



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

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS LINHAGENS CELULARES B103 E C6  
EXPOSTAS À AÇÃO DO METILMERCÚRIO

BELÉM  
2023

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS LINHAGENS CELULARES B103 E C6  
EXPOSTAS À AÇÃO DO METILMERCÚRIO

Tese de doutorado apresentada para a obtenção de título de doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

---

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo H. Correa de Oliveira

Coorientador: Dr. Wallax Augusto S. Ferreira

BELÉM  
2023

**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)**

---

B713a Bonfim, Lais Teixeira.  
Análise transcriptômica das linhagens celulares B103 e C6  
expostas à ação do metilmercúrio / Lais Teixeira Bonfim. — 2023.  
70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira  
de Oliveira

Coorientador(a): Prof. Dr. Wallax Augusto Silva Ferreira  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2023.

1. Metilmercurio. 2. SNC. 3. Toxicidade. 4. Transcriptoma. I. Título.

CDD 571.954663

---

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS LINHAGENS CELULARES B103 E C6  
EXPOSTAS À AÇÃO DO METILMERCÚRIO

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção de título de doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Aprovada em: 27/04/2023

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia  
ICB - UFPA

---

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes  
ICB - UFPA

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha  
IFPA

BELÉM  
2023

---

---

## AGRADECIMENTOS

---

---

- À universidade Federal do Pará;
  - Ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular;
- Ao Instituto Evandro Chagas, especialmente ao Laboratório de Citogenômica e Mutagênese Ambiental;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
  - Ao prof. Dr. Edivaldo de Oliveira e Dr. Wallax Ferreira, por todos os ensinamentos que levarei para a vida;
- À Michelle e Carol, por todo suporte necessário para realização desse trabalho;
  - Aos meus pais por terem priorizado minha educação;
  - Ao Rafael, por todo amor e companheirismo;
  - Aos meus filhos, Mateus e Tobias;
  - Aos amigos do laboratório;
    - À banca

# I

## RESUMO

A intensificação das atividades antrópicas tem produzido uma alta taxa de poluição ambiental principalmente em corpos hídricos, onde a contaminação por metais se tornou objeto de grande importância, devido à incapacidade desses ambientes em suportar tal poluição. O mercúrio (Hg) é um metal pesado de ocorrência natural, que pode ser utilizado na fabricação de elementos domésticos como lâmpadas fluorescentes, fungicidas e germicidas. A entrada do Hg na cadeia alimentar ocorre pela metilação dos íons  $Hg^{2+}$  em MeHg. Após a metilação, o mercúrio é considerado altamente tóxico para o ser humano, e entre os principais órgãos alvo dessa intoxicação podemos citar o cérebro, uma vez que o MeHg atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, podendo acumular-se em diferentes áreas cerebrais. Sabe-se que, uma vez no SNC, o MeHg pode causar extensos danos celulares, como dano ao DNA, estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular tanto em neurônios quanto em células da glia. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar as alterações transcriptômicas das linhagens celulares B103 e C6, células derivadas de neuroblastoma e glioma *de Rattus norvegicus*, expostas à ação do metilmercúrio. Para isso, foi utilizada a técnica de microarray de expressão a fim avaliar o perfil global de expressão genica após 24 h de exposição ao MeHg. Nossos resultados demonstraram que o MeHg induz alterações significativas na expressão genica das duas linhagens celulares estudadas, sendo estas alterações mais proeminentes na linhagem C6, na qual observou-se uma maior quantidade de genes diferencialmente expressos. Entre os genes que mais se destacaram após a exposição das células B103 ao MeHg destacaram-se os genes *Cdc42se2* ( $\log_2$  FC -4.055713), *Dcx* ( $\log_2$  FC 3.618981) e *4930449C09Rik* ( $\log_2$  FC 3.5129156) para a concentração de 0,1  $\mu$ M. Já para a exposição de 2,8  $\mu$ M, os genes com maior FC foram *Crem* ( $\log_2$  FC -4.027875), *Otoa* ( $\log_2$  FC 3.501512) e *Dcx* ( $\log_2$  FC 3.423433). Além dos genes acima citados, destacaram-se os genes *Trim14*, *Gm14169*, *Gm30871*, *Otoa* e *Dcx* por serem compartilhados entre os dois grupos expostos. Quanto a linhagem C6, destacaram-se dez transcritos com FC maior que 3 (*Aldh1l2*, *Dac1*, *Rps4l*, *Zbtb46*, *6430573p05Rik*, *Tcf12*, *Awat2*, *Muc3*, *Dclre1b*, *Slc38a6*). No tratamento de 6,3  $\mu$ M, apenas três genes foram alterados mais de 3 vezes (*Rps4l*, *Ankdr44* e *2610318N02Rik*). Vale ressaltar que três genes foram compartilhados entre os tratamentos (*Rps4l*, *Lamb 3* e *Gm 41386*).

Palavras-chave: MeHg, Transcriptoma, SNC, Poluição, Mercúrio.

## II ABSTRACT

The intensification of anthropogenic activities produces a high rate of environmental pollution, mainly in water bodies, where the contamination by metals has become an object of great interest, due to their inability to support such load. Mercury (Hg) is a naturally occurring metal that can be used in the manufacture of home products such as fluorescent lamps, fungicides, and germicides. The entry of Hg into the food chain occurs through the methylation of Hg<sup>2+</sup> ions into MeHg. After methylation, Hg is considered highly toxic to humans, and among the main target organs of this intoxication we can mention the brain, since MeHg easily crosses the blood-brain barrier and can accumulate in different brain areas. It is known that, once in the CNS, MeHg can cause extensive cellular damage, such as DNA damage, oxidative stress, neuroinflammation and cell death in both neurons and glial cells. Thus, the objective of this study was to analyze the transcriptomic alterations of cell lines B103 and C6, derived from neuroblastoma and glioma of *Rattus norvegicus*, exposed to the action of methylmercury. For this, the expression microarray technique was used to evaluate the global profile of gene expression after 24h of MeHg exposure. Our results demonstrate that MeHg induces significant alterations in gene expression of the two cell lines evaluated. The alterations were more prominent in the C6 cell line, in which a greater amount of differentially expressed genes was observed. Among the genes differentially expressed of the B103 cells we can highlight the genes *Cdc42se2* (log<sub>2</sub> FC -4.055713), *Dcx* (log<sub>2</sub> FC 3.618981) and *4930449C09Rik* (log<sub>2</sub> FC 3.5129156) at a concentration of 0.1 μM. As for the exposure of 2.8 μM, the genes with the highest FC were *Crem* (log<sub>2</sub> FC -4.027875), *Otoa* (log<sub>2</sub> FC 3.501512) and *Dcx* (log<sub>2</sub> FC 3.423433). In addition to the abovementioned genes, the genes *Trim14*, *Gm14169*, *Gm30871*, *Otoa* and *Dcx* were shared between the two exposed groups. As for the C6 lineage, ten transcripts with FC above 3 (*Aldh1l2*, *Dac1*, *Rps4l*, *Zbtb46*, *6430573p05Rik*, *Tcf12*, *Awat2*, *Muc3*, *Dclre1b*, *Slc38a6*) are highlighted. In the 6.3 μM treatment, only three genes were altered more than 3 times (*Rps4l*, *Ankdr44* and *2610318N02Rik*). It is also noteworthy that three genes were shared between treatments (*Rps4l*, *Lamb 3* and *Gm 41386*).

Keywords: MeHg, Transcriptome, CNS, Pollution, Mercury.

### III

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO.....	4
FIGURA 2 VIAS DE DEPOSIÇÃO DE MERCÚRIO NO AMBIENTE TERRESTRE DECORRENTE DA QUEIMA DE AMÁLGAMA DE MERCÚRIO-OURO .....	5
FIGURA 3 GRUPOS POPULACIONAIS OBSERVADOS NOS RELATÓRIOS COMO EM RISCO DEVIDO À EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO.....	6
FIGURA 4 NÚMEROS DE RELATÓRIOS POR REGIÃO QUE REGISTRARAM ESTOQUES DE PRODUTOS CONTENDO MERCÚRIO.....	7
FIGURA 5 DISTRIBUIÇÃO DO MEHG PELO CORPO HUMANO E PRINCIPAIS EFEITOS EM CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	10
FIGURA 6 REPRESENTAÇÃO DO IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MEHG NAS CÉLULAS NEURONAIS E GLIAIS.....	15
FIGURA 7 ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	22
FIGURA 8 ANOTAÇÃO FUNCIONAL GENE ONTOLOGY (GO) DOS DEGS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	25
FIGURA 9 VIAS AFETADAS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS EXPOSIÇÃO AO MEHG POR 24 HORAS.....	27
FIGURA 10 MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	29
FIGURA 11 HEATMAP DOS 23 MIRNAS E VIAS AFETADAS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÃO DE 0,1 µM MEHG.....	28
FIGURA 12 HEATMAP DOS 14 MIRNAS E VIAS AFETADAS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÃO DE 2,8 µM MEHG.....	29
FIGURA 13 TERMOS HPO MAIS SIGNIFICATIVOS DA LINHAGEM CELULAR B103 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	32
FIGURA 14 ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	37
FIGURA 15 ANOTAÇÃO FUNCIONAL GENE ONTOLOGY (GO) DOS DEGS DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	39
FIGURA 16 VIAS AFETADAS DA LINHAGEM C6 APÓS EXPOSIÇÃO AO MEHG POR 24 HORAS.....	41
FIGURA 17 MIRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DA LINHAGEM C6 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG .....	42
FIGURA 18 HEATMAP DOS 23 MIRNAS E VIAS AFETADAS DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÃO 0,1 µM DE MEHG .....	43
FIGURA 19 HEATMAP DOS 24 MIRNAS E VIAS AFETADAS DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS EXPOSIÇÃO A CONCENTRAÇÃO 6,3 µM DE MEHG .....	43
FIGURA 20 TERMOS HPO MAIS SIGNIFICATIVOS DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO MEHG.....	45



IV  
**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

3 $\beta$ -HSD – 3-beta-hidroxi-delta5-esteróide desidrogenase  
ALDH12 – *Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2*  
ANKRD44 – *Ankyrin repeat domain 44*  
BP – Processos biológicos  
CC – Componente celular  
CDC42SE2 – *CDC42 small effector 2*  
cDNA – DNA complementar  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
CREM – *cAMP responsive element modulator*  
cRNA – RNA circular  
CTN – Células tronco neurais  
CY3 – fluorocromo 3-cianina  
DACT1 – *Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1*  
DCX – *Doublecortin*  
DEGs – Genes diferencialmente expressos  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EUA – Estados unidos da América  
FC – *Fold-change*  
GO – *Gene ontology*  
GPCR – Receptores acoplados à proteína G  
GPI-AP – Proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol  
GSH – Glutathiona reduzida  
GSSG – Glutathiona oxidada  
Hg – Mercúrio  
HgS – cinábrio  
HPO – *Human Phenotype Ontology*  
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
IEC – Instituto Evandro Chagas  
LAMB3 – *Laminin, beta 3*  
LC<sub>50</sub> – Concentração letal  
MeHg – Metilmercurio  
MF – Função molecular  
NADP<sup>+</sup> – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida  
OTOA – *Otoancorin*  
RNA – Acido ribonucleico  
RPS4L – *Ribosomal protein S4-like*  
SBF – soro bovino fetal  
SLC – Proteínas transportadoras de soluto  
SNC – sistema nervoso central  
TRIM 14 – *Tripartite motif-containing 14*

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E MERCÚRIO .....	1
1.2 METILMERCURIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	17
3.1 LINHAGENS CELULARES .....	17
3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES.....	17
3.3 EXPOSIÇÃO .....	18
<b>3.3.1 Metilmercurio</b> .....	18
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	18
3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	18
<b>3.5.1 Extração total de RNA</b> .....	18
<b>3.5.2 Microarray de expressão</b> .....	19
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
<b>3.6.1 Interpretação biológica</b> .....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
4.1 A EXPOSIÇÃO AO MEHG MODULOU O PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DAS CÉLULAS B103 .	21
4.2 ANOTAÇÃO GÊNICA E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS B103 APÓS A EXPOSIÇÃO AO MeHg .....	24
4.3 MODULAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE CÉLULAS C6 POR EXPOSIÇÃO AO MeHg. ....	36
4.4 ANOTAÇÃO GENICA E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DO TRANSCRIPTOMA DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS EXPOSIÇÃO AO MeHg .....	39
<b>REFERENCIAS</b> .....	51



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E MERCÚRIO

A atividade antrópica intensa tem produzido uma alta taxa de poluição ambiental, principalmente em corpos hídricos, onde a contaminação por metais se tornou objeto de grande importância, devido à incapacidade dos corpos hídricos de suportar tal poluição (ALVAREZ et al., 2002). Os metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre, entretanto atividades como a mineração, têm introduzido artificialmente estes metais no ambiente, os quais, diferentemente dos poluentes orgânicos, podem persistir por muitos anos no meio aquático, tanto como sedimentos de fundo e em suspensão, como também por retenção em plantas ou peixes, podendo assim contaminar os seres humanos. (MANAHAN, 1999; TREVIZANI, 2014).

Uma importante fonte de contaminação por metais, tanto do ambiente aquático como terrestre, é o descarte inadequado de objetos domésticos que possuem em sua composição metais, como por exemplo baterias, pilhas e lâmpadas fluorescentes. Como consequência do descarte incorreto pode ocorrer a contaminação por contato direto, como em pessoas responsáveis pela coleta seletiva de materiais recicláveis; ou indireto, na qual ocorrerá a exposição de populações por meio de inalação, contato com solo, poeira e ingestão de água e alimentos contaminados (MARQUES & AMÉRICO-PINHEIRO, 2018; GOUVEIA et al., 2019).

A presença aumentada destes metais no ambiente pode ser também resultado de efluentes do processo industrial, tendo como principais representantes o Zinco, Alumínio, Ferro, Cádmiio, Chumbo, Cromo, Cobre, Manganês, Mercúrio, Níquel, entre outros. Entre estes metais, alguns se destacam por serem micronutrientes necessários para manutenção de organismos animais e vegetais, dentre os quais podemos citar o zinco, cobre, manganês, níquel e cobalto; enquanto outros não possuem qualquer função biológica conhecida, como cádmio, chumbo e mercúrio; os quais são também, conhecidos como metais pesados. (SOUZA & MORASSUTI & DEUS, 2019).

A crescente preocupação em torno da contaminação ambiental por metais pesados se dá principalmente por conta dos seus elevados níveis de reatividade e capacidade de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica. Além disso, a exposição a essas substâncias pode causar efeitos deletérios à saúde humana, como alterações enzimáticas, danos neurológicos/musculares, rompimento de cromossomos, entre outros (ABESSA & AMBROZEVICIUS, 2008; RABELO et al., 2018; SOUZA & MORASSUTI & DEUS, 2019).

Um episódio bastante interessante envolvendo metais aconteceu no estado do Pará em 2018, nas comunidades Bom Futuro e Vila Nova, Distrito de Vila de Conde, Cidade de Barcarena. A partir de uma denúncia para realização de avaliação de possíveis danos ambientais e riscos à saúde humana decorrentes de escoamento de efluentes a partir de transbordo e rompimento de bacias de deposição de resíduos sólidos de beneficiamento de bauxita de uma empresa privada. Após a avaliação, feita por uma equipe da seção de meio ambiente do Instituto Evandro Chagas (IEC), concluiu-se, com os resultados físico-químicos e de níveis de metais nas amostras, que ocorreram alterações nas águas superficiais do rio Murucupi, situação que caracteriza impactos ambientais e colocam em risco a saúde das populações ribeirinhas que residem a sua margem, que comprometeram a qualidade das mesmas (LIMA et al., 2018 - IEC, 002/2018).

De posse dos resultados, o IEC foi novamente acionado para dar sequência nas ações de avaliação da qualidade das águas superficiais no rio Murucupi, além de estender essas avaliações para outros rios da região de Barcarena e Abaetetuba, que poderiam ter sido afetados pelos impactos ambientais já relatados. Também foram avaliadas outras formas de lançamentos irregulares de resíduos e efluentes não tratados a partir da planta industrial da empresa. Os resultados demonstraram, em todos os efluentes, teores totais de arsênio, bário, cádmio, cromo, manganês, mercúrio, urânio, níquel, chumbo, selênio, zinco, cobalto e cobre dissolvido. No ambiente, os teores totais de arsênio, mercúrio, chumbo e os teores de alumínio, ferro e cobre dissolvido se mostraram alterados e acima dos limites preconizados pela resolução CONAMA 357/2005 (LIMA et al., 2018 - IEC, 003/2018). Dentre estes metais podemos destacar o mercúrio, um metal pesado tóxico para a biota e à saúde humana, que pode sofrer bioacumulação nos organismos e biomagnificação ao longo da cadeia trófica (NOVO et al., 2021; MIRANDA et al., 2007; KISAKA, 2013).

O mercúrio (Hg) é um elemento químico de ocorrência natural encontrado em rochas da crosta terrestre, possui número atômico 80 e massa molar  $200,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pertence ao grupo 12 da tabela periódica e faz parte da classe dos metais de transição. Este metal é identificado pelas letras Hg, abreviação proveniente da palavra grega *Hydrargyrum* que tem como significado *Prata líquida*, pode existir nas formas metálicas, inorgânica e orgânica. Ele é um dos únicos metais que em condições normais de temperatura e pressão atmosférica é encontrado em estado líquido, apresentando ponto de fusão  $-38,83^\circ\text{C}$  e ebulição  $356,73^\circ\text{C}$ . Além disso, o Hg pode formar ligas com outros

metais, como ouro e a prata, chamadas de amalgamas (DAMAS et al., 2014; SILVA 2014, MIRANDA et al. 2007).

Na natureza a forma mais comum do Hg é o cinábrio (HgS), também conhecido como minério de mercúrio comum, que consiste em um mineral de cor vermelho vivo ou amarronzado e está presente em países como México e Argélia, porém pode ser encontrado em maior quantidade na Espanha. A Obtenção de Hg metálico a partir de cinábrio ocorre por meio da combustão desse minério sob corrente de ar, seguido da condensação do vapor formado e finalizada através da purificação do metal (DAMAS et al., 2014; SILVA, 2014).

Sabe-se que o uso do Hg data de pelo menos 3.500 anos atrás, e sua provável aplicação conhecida mais antiga foi a utilização como pigmento vermelho em pinturas rupestres na forma de cinábrio. Aristóteles foi quem primeiro referenciou, de forma escrita, o uso de Hg no século IV a.C. A partir desta data outros autores gregos, como Plínio, também descreveram algumas aplicações medicinais como tratamento de doenças de pele, além de já terem descrito algumas referências a respeito da utilização do Hg na recuperação de metais nobres através de amalgamas. Posteriormente, o Hg passou a ser utilizados também pelos romanos, na forma de medicamento para várias doenças, na amalgamação e passaram a produzir o pigmento *Vermilion* que foi muito valorizado na época (MIRANDA et al., 2007; SILVA, 2014).

O ciclo biogeoquímico do Hg em ambientes naturais ocorre por uma interrelação entre os sistemas aquáticos, terrestres e atmosférico. Dois ciclos podem afetar o transporte e a distribuição desse metal. são eles: o ciclo global, que envolve a circulação atmosférica do mercúrio elementar proveniente da crosta para os oceanos; e o ciclo local, no qual ocorre a metilação do Hg inorgânico proveniente de fontes antrópicas (Figura 1) (MIRANDA et al., 2007). Assim, este metal pode ser liberado do solo e da água para atmosfera, onde o Hg pode apresentar as formas orgânicas e inorgânicas. Uma vez na atmosfera, pode ser dispersado por longas distâncias até que ocorra novamente a deposição do Hg em ambientes terrestres e aquáticos (BISINOTE & JARDIM, 2004). A deposição seca e/ou úmida desempenha um papel importante na transferência de mercúrio da atmosfera para os solos, na lixiviação para as águas subterrâneas ou na movimentação para as águas superficiais. Uma vez no ambiente aquático, o mercúrio pode permanecer ativo como substrato para a metilação por cerca de um século, ainda que a fonte de contaminação seja eliminada. No solo ou sedimento, pode ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. Além disso, estes ambientes possuem

grande capacidade de reter e armazenar este metal, e solos argilosos apresentam uma maior capacidade de acumular este Hg por muitos anos. Vale ressaltar que a matéria orgânica pode afetar o transporte, especiação e disponibilidade do mercúrio no ambiente terrestre e aquático. O ciclo pode ser concluído por três principais fenômenos: bioconversão em formas solúveis ou voláteis, precipitação e bioacumulação na cadeia alimentar. (BISINOTE & JARDIM, 2004; ZHOU et al., 2016; MIRANDA et al., 2007).

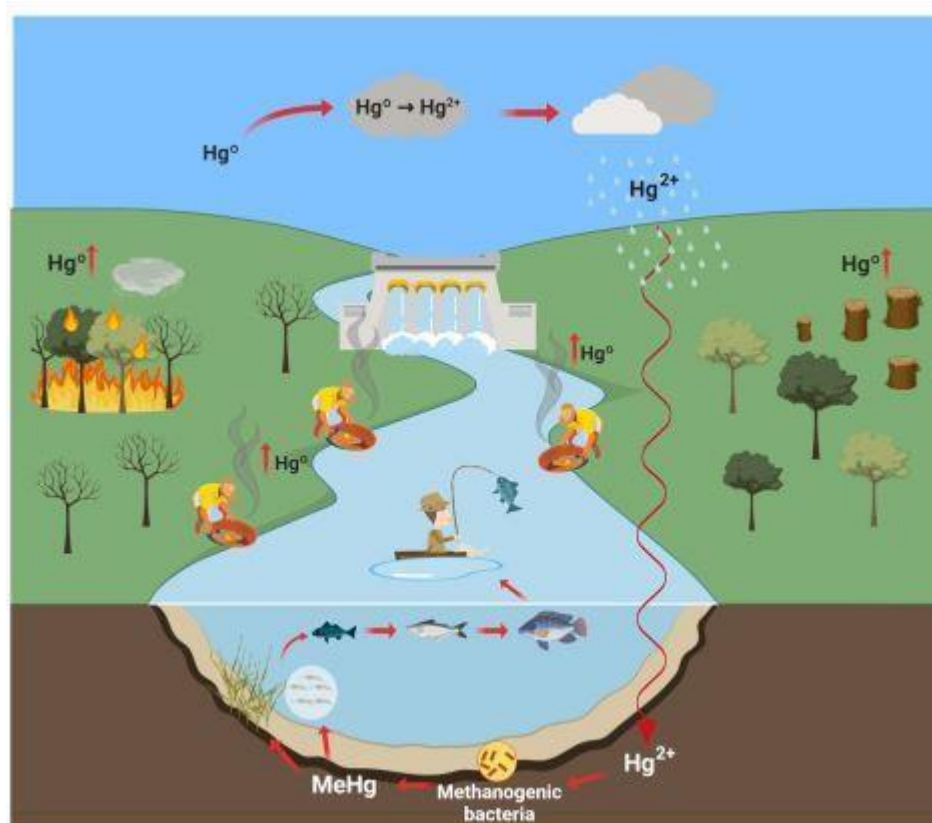


Figura 1 Ciclo biogeoquímico do Mercúrio. Fonte: CRESPO-LOPES et al.,2021.

O Hg foi introduzido na pesquisa científica a partir de 1643 com a invenção do barômetro, equipamento utilizado para medir a pressão atmosférica, por Torriceli. Posteriormente, em 1720 ocorreu a invenção do termômetro de mercúrio por Fahrenheit. Houve, então, várias descobertas relevantes que levaram a uma crescente demanda por Hg, como em 1894 a introdução na indústria de cloro-soda de células eletrolíticas a base de Hg, o desenvolvimento de baterias de Hg durante a segunda guerra mundial, e o uso de fulminato de Hg como detonador de explosivos (MIRANDA et al., 2007).

Uma das principais utilizações e combinações importantes deste metal é a ligação do Hg com ouro, originando uma amalgama. Nesse processo, o Hg elementar líquido é

adicionado a sedimentos ou minérios com a finalidade de isolar o ouro, formando a amálgama. Para que ocorra a separação do ouro, a amálgama precisa ser aquecida, o que gera a liberação de Hg elementar gasoso na atmosfera. Na maioria dos casos a queima da amálgama ocorre sem uma retorta ou outro dispositivo de captura de Hg, liberando este metal para o ambiente (Figura 2) (STYLO et al., 2020).

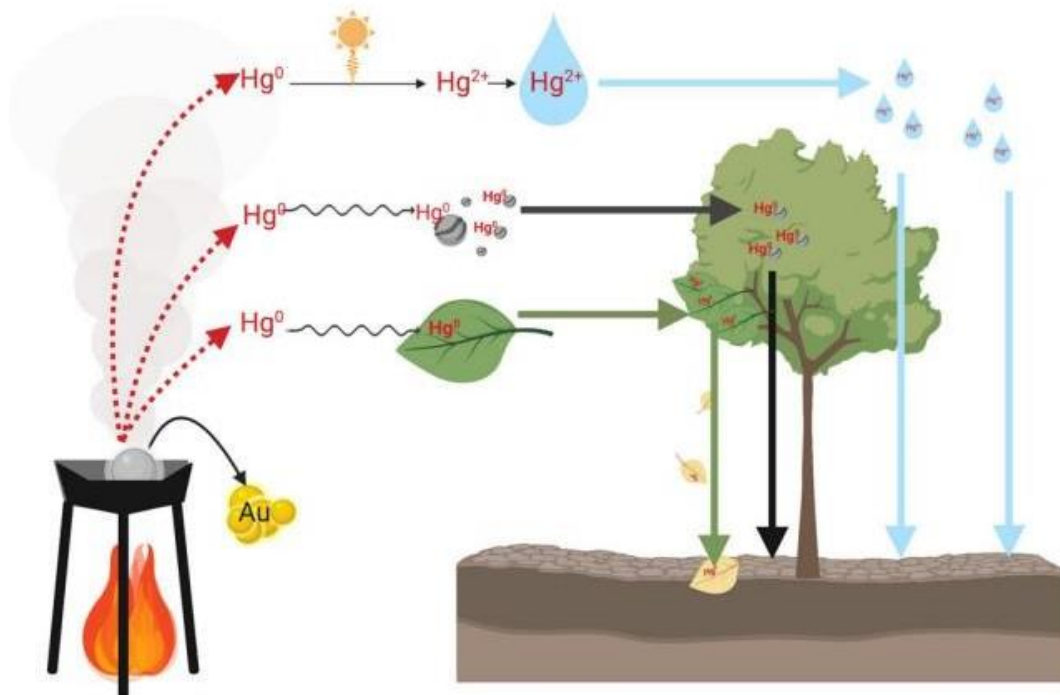


Figura 2 Vias de deposição de mercúrio no ambiente terrestre decorrente da queima de amálgama de mercúrio-ouro. Fonte: GERSON et al., 2022.

O Hg e seus derivados podem ser utilizados de várias formas, como na fabricação de Cloro e sódio, lâmpadas fluorescentes, fungicida, germicida, corantes, pilhas e baterias, no garimpo, medicações tópicas, soluções para lentes de contato, conservante em vacinas, entre outros fins. Vale destacar que no Brasil não existe produção primária de mercúrio, logo este metal entra no mercado nacional por meio da importação. Além disso, como determinado na Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981, que instituiu a Política Nacional do Meio Ambiente, e foi regulamentada pelo Decreto no 97.634, de 10 de abril de 1989, é de responsabilidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) o controle do comércio, produção e importação de mercúrio metálico (DAMAS et al., 2014; IBAMA, 2022).



Entre as principais fontes de contaminação por Hg no meio ambiente destacam-se as fontes antropogênicas, que são na maioria das vezes relacionadas à mineração industrial, ao processamento primário de metais, extração de ouro com amálgama de mercúrio, produtos de consumo contendo mercúrio, incineração de resíduos e queima de combustíveis fósseis. Ocorre, também, a contaminação natural por Hg decorrente de emissões vulcânicas e oceânicas, depósito de minerais, entre outras (LACERDA, 2007; LIMA et al., 2018 - IEC, 002/2018; SILVA, 2014; WHO, 2021).

Dados da Organização Mundial da saúde, referente aos relatórios de avaliação inicial de Minamata em 61 países ao redor do mundo apontaram que os principais grupos populacionais em risco decorrentes da exposição ao Hg são trabalhadores, de forma geral, e trabalhadores de minas (caracterizando a exposição ocupacional), consumidores de pescado, consumidores de produtos contendo mercúrio e consumidores de produtos para clarear a pele (Figura 3). Adicionalmente, nesse mesmo documento foram relatados riscos relacionados ao gênero feminino, incluindo mulheres grávidas e mulheres em idade fértil.

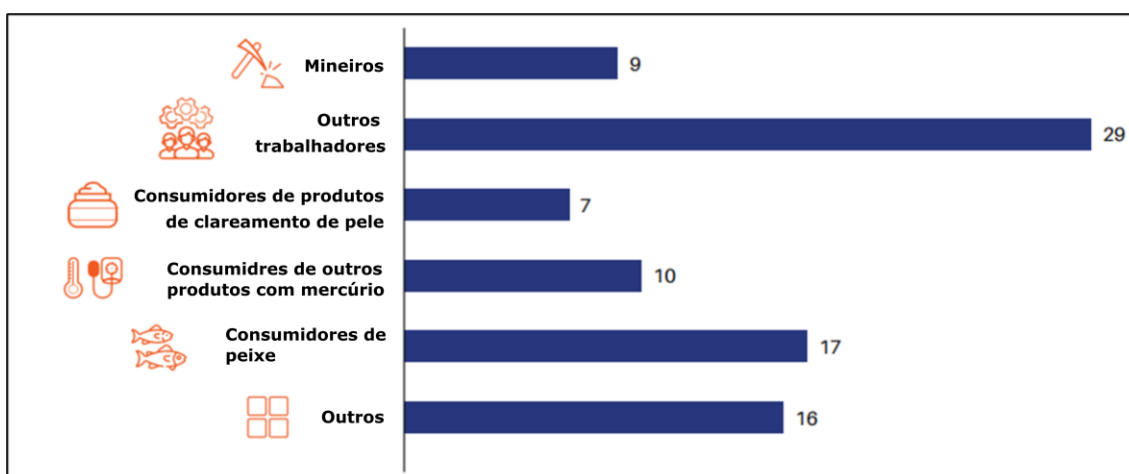


Figura 3 Grupos populacionais observados nos relatórios como em risco devido à exposição ao mercúrio. Fonte: WHO, 2021 (Adaptada).

No que diz respeito a produtos contendo Hg, estes dados demonstraram que ainda é alto o número de países que utilizam termômetros com Hg, ainda ocorre o uso de amálgama dental e esfigmomanômetros (aparelho utilizado para medir a pressão arterial). Além disso, este metal pode ser encontrado, também, em produtos para clareamento da pele (Figura 4) (WHO, 2021).

Região da OMS	Relatórios de Minamata revisados	Termômetros de Mercúrio	Aparelhos de pressão com Mercúrio	Antissépticos com Mercúrio	Clareadores de pele com Mercúrio	Amálgama dental
Africa	28	27	15	1	17	25
América	16	14	7	-	-	13
Mediterrâneo oriental	2	2	1	-	-	2
Europa	7	7	3	-	1	3
Sudeste Asiático	3	3	3	-	1	3
Pacífico Ocidental	5	3	1	-	1	2
Total	61	56	30	1	20	48

Figura 4 Números de relatórios por região que registraram estoques de produtos contendo mercúrio. Fonte: WHO, 2021 (Adaptada).

No que tange a contaminação de Hg por absorção dérmica, o estudo de Chan et al. (2011) demonstrou que o óxido de mercúrio e sais inorgânicos de mercúrio, como cloreto de mercúrio, foram encontrados em cosméticos para clareamento da pele e antiacne importados para os EUA, África, Europa, México e Ásia. Um dado alarmante a respeito deste fato foi descrito por Hamann et al. (2014), os quais demonstraram que do total de 549 amostras de produtos clareadores para pele, oriundos de 32 países e obtidos por meio de compras online, 6% continham mercúrio acima de 1000 ppm e 45% continham mercúrio superior a 10.000 ppm. Demonstrando que os valores encontrados foram superiores àqueles preconizados pelo Food and Drug Administration, o qual limita a quantidade de mercúrio em produtos cosméticos para quantidades de 1 ppm.

Nesse sentido, Copan et al. (2015) avaliaram a toxicidade e contaminação por mercúrio entre familiares a partir do uso cremes para pele. Estes autores obtiveram como resultados os seguintes sintomas, classificados como leves e moderados, decorrentes da toxicidade deste metal: hipertensão, irritabilidade, dificuldade para dormir, fraqueza, espasmos musculares, dormência e formigamento nas mãos, tontura, esquecimento, dores de cabeça, depressão e ansiedade. Entre os sintomas descritos como avançados foram observados espasmos musculares involuntários, dor nas costas grave, espasmos musculares difusos e visíveis das extremidades, língua e lábios, marcha instável, delírio, agitação, distúrbios do sono, sudorese profusa, taquicardia persistente e hipertensão. Este estudo destacou ainda que houve contaminação por contato entre o usuário do creme e seus familiares, além da contaminação por meio de objetos manipulados pelo usuário.

Outra importante fonte de contaminação ambiental por Hg que se destacou nos últimos anos é a deposição atmosférica. Um estudo realizado em uma unidade de

conservação florestal do Rio de Janeiro, que teve como objetivo avaliar a ecotoxicologia do Hg em solos de floresta tropical utilizando como modelo de estudo minhocas, demonstrou que nos tecidos de minhocas adultas as concentrações médias de mercúrio foram maiores quando comparadas com juvenis, sugerindo uma acumulação desse metal nesses animais (BUCH et al., 2017). Com relação aos fatores de bioacumulação do Hg no solo, não foram encontrados vestígios de metais ou resíduos de pesticidas, somente o Hg foi detectado; confirmando o acúmulo de Hg no perfil do solo por deposição atmosférica. Rabello et al. (2018) avaliou, também no estado do Rio de Janeiro, o risco ecológico associado a concentrações de vários metais pesados, dentre eles o Hg, nas águas da lagoa Rodrigo de Freitas. Estes autores observaram que entre os metais avaliados o Hg se destacou por sua concentração aumentada, fato que fez com que este metal fosse considerado um fator de risco ecológico moderado nesse ambiente. Este estudo associou este aumento na concentração do Hg a deposição atmosférica e eventos de dragagem, uma vez que não encontraram outras concentrações de Hg em locais próximos.

Com relação a Amazonia, foi demonstrado que a Amazonia peruana apresenta altos níveis de poluição por mercúrio, proveniente da deposição seca, próximo a áreas de mineração de ouro de pequena escala. Neste estudo foi observado que as folhas das plantas são capazes de sorver o Hg particulado e gasoso, além de assimilar e incorporá-lo diretamente aos tecidos. Além disso, os fluxos atmosféricos de Hg em áreas florestais, próximas às atividades de mineração de ouro, são mais de 15 maiores quando comparadas à áreas desmatadas nos arredores da atividade de mineração, destacando a elevada quantidade de Hg proveniente da atividade mineradora que entra nas florestas via deposição seca e a importância do dossel da floresta na eliminação de Hg derivado dessa atividade para atmosfera. Esse trabalho, avaliou ainda, se o Hg depositado em áreas florestais está entrando nas teias alimentares terrestres, por meio da medição das concentrações totais de Hg nas penas da cauda de aves canoras em áreas impactadas ou não impactadas pela mineração. Dos dez indivíduos amostrados na área impactada pela mineração de ouro, sete excederam a concentração efetiva na qual o sucesso reprodutivo passa a ser reduzido. Em contraste com este resultado, nenhum indivíduo da área não impactada ultrapassou essa concentração. Esses achados iniciais sugerem que o Hg pode estar entrando nas teias alimentares terrestres nas áreas de entorno de atividades de mineração. Por fim, estes autores ainda documentaram que existem concentrações mensuráveis de Metil mercúrio (MeHg), a forma biodisponível e uma das mais tóxicas de Hg, em solos amazônicos próximos à atividade de mineração de ouro, sugerindo que

concentrações elevadas de MeHg se estendem além dos ecossistemas aquáticos (GERSON et al. 2022).

Vários estudos já demonstraram que a presença de MeHg está aumentando em grande parte da Amazônia, seja pelo despejo de Hg em corpos hídricos, por atividade de mineração de ouro, extensa queima de biomassa e desmatamento ilegal ou a construção de projetos de grande escala, como barragens (CRESPO-LOPES et al., 2021). Essa contaminação é alarmante e preocupante, uma vez que pode ocorrer uma extensa exposição de comunidades locais da Amazônia ao MeHg, e esses indivíduos podem vir a desenvolver vários sintomas neurológicos e até mesmo virem à óbito.

## 1.2 METILMERCURIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A entrada do Hg na cadeia alimentar ocorre através da transformação dos íons  $\text{Hg}^{2+}$  em  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , formando o metilmercúrio (MeHg), por meio de uma reação de transferência de um grupamento metil, essa reação é denominada metilação. A metilação do mercúrio é realizada por bactérias metanogênicas e sulfato redutoras, e é chamada de biotransformação. A biotransformação pode ser realizada tanto em ecossistemas aquáticos quanto nos sedimentos e em alguns solos, uma vez que estes ambientes tenham condições ideais para a metilação do Hg, que incluem temperatura elevada, baixos níveis de pH, alta disponibilidade de carbono e substrato para suportar a atividade de metilação bacteriana (BITTENCOURT et al., 2017; KISAKA, 2013; NOVO et al., 2021).

Uma vez na cadeia alimentar e após ser assimilado, podem ocorrer dois principais processos: a bioacumulação e biomagnificação trófica. A bioacumulação ocorre quando o fluxo total de entrada do MeHg supera o da saída, dessa forma o metal é acumulado em um organismo ao longo do tempo. Na biomagnificação ocorre o acúmulo de MeHg nos seres vivos a partir do aumento de níveis tróficos, assim, quanto mais longa a cadeia trófica, maior será a concentração acumulada pelos consumidores. Por exemplo, no fitoplâncton já ocorre um acúmulo de MeHg acima da concentração das águas circundantes por difusão passiva através da membrana, a partir de então o MeHg pode ser acumulado em invertebrados, peixes de meio trófico, mamíferos marinhos e, por fim, atingem os predadores de topo de cadeia. Cabe ressaltar que uma das principais vias de transferência de mercúrio orgânico para seres humanos é a alimentar, principalmente em populações onde os peixes são parte importante da dieta, como ocorre em comunidades locais da Amazônia (MIRANDA et al., 2007; KISAKA, 2013; CRESPO-LOPES et al., 2021; NOVO et al., 2021).

O MeHg é considerado altamente tóxico para o ser humano, pois uma vez consumido, por meio de alimentos contaminados, 95% do MeHg é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído para todos os tecidos. Os principais órgãos afetados pelo MeHg incluem o cérebro, fígado, pulmões, rins e intestino; dentre os quais pode acumular-se nos rins, fígado e no sistema nervoso central (SNC). Além disso, o MeHg pode ser absorvido pela pele e pulmões. Sua eliminação é lenta, e nos seres humanos pode levar meses (Figura 5) (GUIDA et al, 2017, NOVO et al., 2021).

Com relação ao transporte de MeHg, este pode ser transportado por proteínas plasmáticas como a albumina, além da glutatona e do aminoácido L-cisteína, nos quais se liga através de grupos sulfidríla (visto que há uma grande afinidade do MeHg por grupos tiol) aumentando sua solubilidade em água e facilitando sua distribuição para vários órgãos. O MeHg tem alta afinidade pelo SNC, no qual pode ser distribuído para todas as regiões do cérebro, uma vez que atravessa a barreira hematoencefálica por meio do sistema de transporte de L-aminoácidos neutro grandes como um complexo conjugado com L-cisteína, que mimetiza com o aminoácido L-metionina, que facilita a entrada de MeHg no cérebro. As concentrações de MeHg nesse órgão podem ser até 5 vezes maiores do que no sangue (CRESPO-LOPES et al., 2021; dos SANTOS et al., 2016; NOVO et al., 2021).

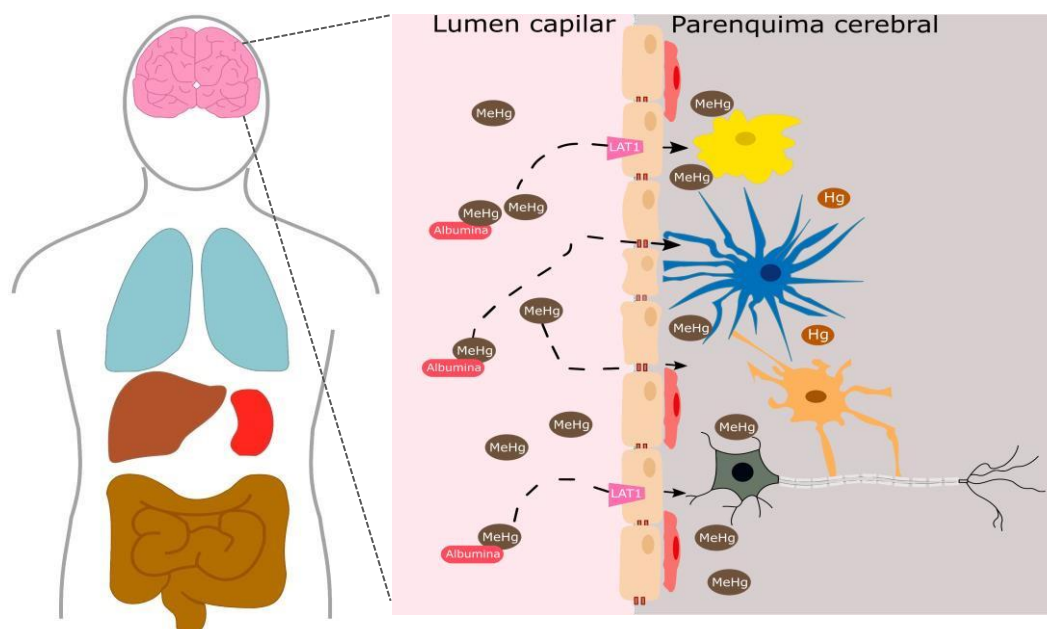


Figura 5 Distribuição do MeHg pelo corpo humano e principais efeitos em células do sistema nervoso central. Fonte: NOVO et al., 2021 (Adaptada).

Além da barreira hematoencefálica, o MeHg pode atravessar qualquer barreira celular, dentre as quais destaca-se a placentária, na qual a exposição pré ou perinatal prolongada ao MeHg ainda que em doses moderadas pode causar vários distúrbios ao feto e após o nascimento, como aborto espontâneo, morte após 20 semanas de gestação (natimorto) e baixo peso ao nascer. Vale destacar que a exposição intrauterina tem sido relacionada a déficits em neurônios e glia, incluindo migração, diferenciação e crescimento anormais, demonstrando que essa exposição compromete, também, a neurogênese. No período neonatal ou em idades precoces, os danos causados pelo MeHg são mais amplamente distribuídos pelo SNC, onde a lesão será generalizada e quanto mais precoce a exposição, mais generalizado será o dano observado (CRESPO-LOPES et al., 2021; dos SANTOS et al., 2016; NOVO et al., 2021).

Após o período neonatal e a partir do crescimento do bebê é possível observar alguns sintomas relacionados a intoxicação por MeHg, como dificuldades no controle da cabeça, sentar-se e andar, distúrbios no desenvolvimento mental com sintomas semelhantes aos da paralisia cerebral e hiper salivação. Essa condição médica é conhecida como doença de Minamata do tipo fetal. Além disso, o cérebro em desenvolvimento é extremamente sensível a exposição por MeHg podendo apresentar uma desorganização difusa e generalizada da citoarquitetura do córtex cerebral com desaparecimento das células granulares. Crianças expostas podem apresentar índice de coeficiente de inteligência diminuído, movimentos prejudicados, percepção visuoespacial. Esses dados revelam um importante papel da toxicidade do MeHg no desenvolvimento do sistema nervoso central, podendo causar alterações principalmente no sistema sensorial motor e na cognição (SAKAMOTO & ITAI & MURATA, 2017; dos SANTOS et al., 2016; CRESPO-LOPES et al., 2006).

Com relação a contaminação aguda por MeHg em adultos, nos quais as características e mecanismos de intoxicação são diferentes daqueles descritos em crianças, sabe-se que podem ocorrer distúrbios de coordenação motora e táteis como dormência, tremores e formigamento nas mãos, espasmos musculares involuntários e marcha instável, ataxia cerebelar, constrição e deterioração progressiva dos sentidos visuais. Tais sintomas podem ser mais ou menos intensos dependendo do nível de exposição e estão relacionados com danos em regiões do cérebro como cerebelo, lobo occipital e tronco cerebral. Essas alterações neurológicas decorrentes da intoxicação por MeHg são chamados de doença de Minamata, por conta de uma epidemia ocorrida na área costeira sul do mar de Yatsushiro, incluindo Minamata, no Japão, principalmente

entre as décadas de 1950 e 1960, onde ocorreu descarte de grande quantidade de metil mercúrio diretamente no mar e a contaminação humana se deu por meio do consumo diário de grande quantidade de peixes e mariscos contaminados (HACHIYA, 2006; COPAN et al., 2015; CRESPO-LOPES et al., 2021; ALBERS et al., 2020).

Foi relatado na literatura um estudo de caso da doença de Minamata em um homem de 40 anos contaminado por uma injeção contendo MeHg, que levou o paciente a morte 10 meses após a exposição. A necropsia demonstrou que o cérebro, especificamente o cerebelo, ponte e medula estavam atrofiados. Adicionalmente, havia alterações no lobo occipital direito e atrofia cortical, e as regiões do hipocampo eram de tamanho inferiores à média. Para verificar as lesões cerebrais foi realizado um exame neuropatológico, que demonstrou significativa perda neuronal e reatividade glial principalmente no lobo occipital, necrose de células granulares quase completa e degeneração das células de Purkinje no cerebelo e degeneração walleriana no tronco encefálico. A análise toxicológica *post mortem* revelou níveis extremamente elevados de mercúrio no fígado e tecido renal, bem como níveis de MeHg no sangue periférico (ALBERS et al., 2020). Dessa forma, nota-se que a contaminação aguda por MeHg em seres humanos é extremamente perigosa, podendo levar até mesmo a óbito.

É importante lembrar que outras alterações clínicas já foram descritas na literatura após a exposição humana ao MeHg, como tontura, esquecimento, dores de cabeça, depressão e ansiedade, além de visão turva, parestesias da área circum-oral seguidos de constrição do campo visual, ataxia, delírio, agitação e distúrbios do sono. Os efeitos clínicos relacionados a contaminação por MeHg não são imediatos e o período de latência pode chegar até mesmo a 10 anos. (COPAN et al., 2015; CLARKSON et al., 2003).

Assim, observa-se que o SNC é um alvo para a toxicidade do MeHg, uma vez que, como descrito anteriormente, este atravessa facilmente a barreira hematoencefálica podendo acumular-se em diferentes áreas cerebrais, das quais destaca-se o cerebelo por ser mais susceptível a contaminação por MeHg. Para entender quais os efeitos do MeHg no SNC, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizado e buscam demonstrar tais efeitos.

No que diz respeito ao efeito do MeHg em culturas primárias de neurônios granulares do cerebelo de ratos Wistar, sabe-se que este induz morte celular por apoptose de forma dose dependente e a partir de concentrações muito baixas nessas células, como 30 nM. Essa morte celular pode ser mediada pela interrupção ou modulação da homeostase do  $Ca^{2+}$  celular ou aumento da geração de espécies reativas de oxigênio nas

mitocôndrias ou outros compartimentos intracelulares. De fato, o  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel crítico na perda de células no SNC e o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  pode desencadear a morte celular tanto por apoptose quanto por necrose (SAKAUE et al., 2005; dos SANTOS et al., 2016).

Sabe-se, também, que a intoxicação por MeHg pode causar alterações na regulação do glutamato em astrócitos. O glutamato é principal neurotransmissor excitatório no SNC e os astrócitos são responsáveis pela retirada de glutamato do espaço extra sináptico através de transportadores excitatórios de glutamato. O MeHg age contribuindo para a desregulação da captação de glutamato e para o efluxo de glutamato, o que leva a um acúmulo de glutamato extracelular próximo às células gliais e neuronais. Esse acúmulo pode induzir excitotoxicidade neuronal devido à superativação dos receptores N-metil-D-aspartato, levando ao aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios e ativação da via de apoptose neuronal. Dessa forma, a inibição da captação de glutamato pelos astrócitos, aumento da liberação espontânea de glutamato dos terminais pré-sinápticos e inibição da captação vesicular de glutamato são fenômenos críticos ligados à excitotoxicidade mediada por MeHg que pode também causar morte celular (NOVO et al., 2021; dos SANTOS et al., 2016).

O MeHg pode inibir o crescimento de células do SNC de rato, como demonstrado nas linhagens de feocromocitoma (PC12) e neuroblastoma (C-1300), causar alterações na morfologia celular como condensação da cromatina e fragmentação nuclear, pode provocar a fragmentação do DNA e alterar o ciclo celular das células PC12, por meio da ruptura de microtúbulos, causando um acúmulo de células na fase G2/M seguido de morte celular por apoptose nessas células (MIURA et al., 1999).

O estudo de Bittencourt e colaboradores (2022), o qual teve como objetivo investigar os efeitos do MeHg no cerebelo de ratos adultos expostos a baixas doses por um período de 60 dias, demonstrou que houve reduções significativas nas densidades de neurônios de Purkinje e neurônios maduros, assim como na densidade de células da glia, seguido de estresse oxidativo e modulação do perfil proteômico global nesse órgão. Este trabalho sugere que a exposição ao MeHg afeta a modulação da plasticidade sináptica e da integridade da mielina, as quais desempenham um papel essencial na perda da função motora. Dessa forma, a disfunção motora observada como um dos principais sintomas que ocorrem após a contaminação por MeHg pode estar associada a um padrão neurodegenerativo, com base no que foi observado nesse trabalho.



No que se refere a genotoxicidade, um dos primeiros trabalhos que relataram os efeitos genotóxicos do MeHg em células do SNC foi o de Crespo-Lopes et al. (2006). Estes autores utilizaram duas linhagens celulares provenientes de neuroblastoma e glioblastoma humano e demonstraram que o MeHg afeta a viabilidade dessas células de forma dose dependente. Além disso, foi observado ainda que em baixas concentrações (0,1 e 1  $\mu\text{M}$ ) o MeHg pode inibir a proliferação de ambas as linhagens, aumentar a frequência de micronúcleos na linhagem de neuroblastoma, aumentar o número de micronúcleos por células nas células de glioblastoma e aumentar a presença de pontes nucleoplasmáticas em ambas as células.

Nesse sentido, outro estudo demonstrou que a exposição de células de origem glial da espécie *Rattus norvegicus* a uma concentração de MeHg considerada baixa, e na ausência de morte celular, resultam na fragmentação da molécula de DNA, aumento na frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares; demonstrando um claro efeito genotóxico. Além desses efeitos, o MeHg pode afetar o ciclo celular, devido a paradas nas fases S e G2/M ou G1/G0 provocadas por um possível efeito ciclostático (CRESPO-LOPES et al., 2016).

Sousa et al. (2022) avaliou a genotoxicidade do MeHg em dois tipos de células do sistema nervoso central de *Rattus*, neuronal (B103) e glial (C6). Estes autores observaram que o MeHg se mostrou citotóxico para as duas células estudadas, entretanto, as células de origem neuronal foram mais afetadas pela exposição ao MeHg quando comparadas a linhagem de origem glial, uma vez que a  $\text{LC}_{50}$  foi maior nas células C6. Além disso, foi observado que em ambas as linhagens ocorreu a formação de micronúcleos, entretanto a formação de broto nuclear só foi observada na linhagem C6, assim como alterações cromossômicas.

Patnaik & Padhy (2018) observaram que a exposição da linhagem celular SH-SY5Y, proveniente neuroblastoma humano, ao MeHg provocou um aumento significativo no índice de fragmentação ao DNA dessas células, além de demonstrar citotoxicidade avaliada por métodos diferentes.

Assim, podemos observar que os efeitos do MeHg no SNC, os sintomas relacionado a esta intoxicação, seus efeitos citotóxicos e genotóxicos já são descritos na literatura, assim como os possíveis mecanismos relacionados à toxicidade do mercúrio, que incluem fatores moleculares e bioquímicos, como a interrupção ou modulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  celular, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias ou outros compartimentos intracelulares, danos diretos ao DNA e à

polimerização dos microtúbulos, excitotoxicidade mediada pelo glutamato e morte celular (Figura 6).

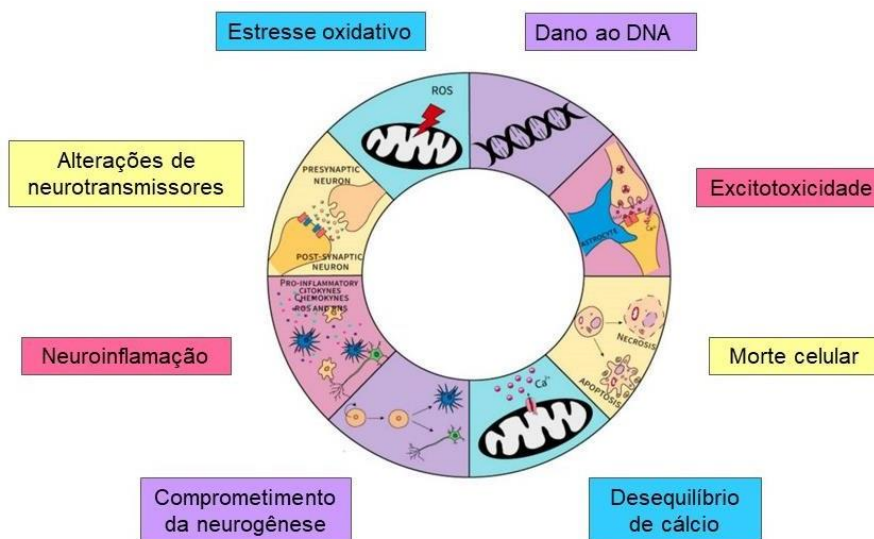


Figura 6 Representação do impacto da exposição ao MeHg nas células neuronais e gliais. Fonte: NOVO et al., 2021 (Adaptada).

Apesar de já existirem muitos estudos que apontem os possíveis mecanismos de dano celular relacionados ao MeHg, ainda são necessárias pesquisas que busquem identificar a origem desses danos, assim como possíveis alvos dessa intoxicação. Nesse sentido, uma proposta para este fim seria o emprego de técnicas conhecidas como ômicas, que são, de forma geral, um conjunto de técnicas moleculares que auxiliam na compreensão das diferentes moléculas biológicas que dão funcionalidades a um organismo. Entre essas técnicas destaca-se a tecnologia de *microarrays*, uma ferramenta de análise de expressão genica que possibilita a avaliação simultânea da expressão de centenas a milhares de genes em uma determinada amostra.

Assim, o presente trabalho visa analisar possíveis alterações transcriptômicas de linhagens celulares derivadas do sistema nervoso central de *Rattus norvegicus* (B103 e C6) expostas à ação do metil mercúrio, a fim de contribuir para a elucidação da origem dos mecanismos de dano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar as alterações transcriptômicas das linhagens celulares B103 e C6 expostas à ação do metil mercúrio.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Avaliar as alterações de expressão gênica das linhagens celulares B103 e C6 expostas a duas concentrações de MeHg;

2.2.2 Definir quais as possíveis vias de sinalização afetadas nas linhagens B103 e C6 após a exposição;

2.2.3 Sugerir quais os possíveis miRNAs envolvidos na regulação de genes diferencialmente expressos.

2.2.4 Associar nossos transcritos com a variabilidade de anormalidades fenotípicas encontradas em doenças humanas;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares B103 (RRID: CVCL\_D538) e C6 (ATCC<sup>®</sup> CCL-107<sup>™</sup>), derivadas de neuroblastoma e glioma de *Rattus norvegicus*, respectivamente, foram obtidas no banco de células do nosso laboratório, no IEC.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas ampolas contendo aproximadamente um milhão de células cada uma. As células foram mantidas em solução de congelamento constituída por 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 90% SBF (Gibco, Grand Island, NY, USA). As ampolas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido por período indeterminado e foram retiradas apenas no momento do descongelamento. Após o descongelamento, as células foram imediatamente transferidas para frascos próprios para cultivo celular com superfície igual a 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (10 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL) e foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio contendo DMSO foi substituído por um novo meio de cultivo, sem DMSO, para o melhor crescimento da monocamada celular. Todos os procedimentos envolvendo cultura de células foram realizados em cabine de fluxo laminar.

#### 3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C até que as culturas obtivessem uma boa confluência, ou seja, até que formem uma monocamada completamente homogênea, o que geralmente ocorre por volta de 72 h após o descongelamento. A confluência celular foi monitorada observando-se o crescimento das células com auxílio de microscópio invertido.

Para o subcultivo, o meio de cultura foi removido e a monocamada lavada duas vezes com 3 mL de solução salina balanceada de Hanks (0,4g de KCl, 0,06g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35g de NaHCO<sub>3</sub>, 1g de glicose, 8g de NaCl, H<sub>2</sub>O q.s.p 1000 mL) por aproximadamente 2 min. Após este processo, as células foram dissociadas com 1 mL de tripsina (0,125g de tripsina, 0,02g EDTA diluídos em 100 mL de solução de Hanks) por um período de 2 min ou até que as células se desprendessem do fundo do frasco de cultivo, sendo possível verificar a soltura em microscópio invertido. Em seguida, a tripsina foi inativada com 5 mL de meio completo e a suspensão celular homogeneizada

foi distribuída igualmente para duas garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, até que as células obtivessem novamente uma boa confluência. Este procedimento foi repetido até a obtenção de uma quantidade suficiente de células para os experimentos.

### 3.3 EXPOSIÇÃO

#### 3.3.1 Metilmercúrio

O MeHg foi obtido da empresa Sigma-Aldrich. A solução estoque de MeHg foi preparada em água deionizada (MilliQ) e armazenada a temperatura de -20° C, sendo descongelada somente no momento do uso.

Para os experimentos, foram realizadas diluições em meio de cultivo, sem adição de SBF, a fim de atingir as concentrações de interesse. As células B103 e C6 foram expostas ao MeHg por um período de 24 horas.

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para análise dos efeitos do MeHg nas células B103 e C6 foram definidos os seguintes grupos de exposição:

- Controle: células foram cultivadas apenas na presença de meio de cultura DMEM;
- MeHg 0,1 µM: células foram expostas a concentração de 0,1 µM (B103 e C6);
- MeHg: 2,8 µM (somente B103);
- MeHg: 6,3 µM (somente para C6).

As maiores concentrações utilizadas no presente estudo foram definidas a partir dos estudos de Sousa et al. (2022), o qual demonstrou que essas concentrações correspondem a  $LC_{50}$  para cada linhagem, a partir da análise de viabilidade celular e acúmulo intracelular de MeHg. Para a menor concentração, utilizamos o estudo de Sousa-Rodrigues et al. (2021), que demonstrou a ausência de citotoxicidade para essa concentração, uma vez que observou, por meio da análise da viabilidade e metabolismo celular, ausência de morte celular nessa concentração.

### 3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

#### 3.5.1 Extração total de RNA

Para a extração do RNA total foram semeadas  $3 \times 10^6$  células em frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> por 24 h. Após este período as linhagens celulares B103 e C6 foram tratadas como descrito no item 3.4. Ao final de 24 h as amostras foram imediatamente dissociadas do frasco de cultivo e centrifugadas, os pellets resultantes foram submetidos a extração de mRNA realizada por meio da utilização do Kit “*SV total RNA isolation system*” da empresa Promega de acordo com as especificações do fabricante. As células foram transferidas para microtúbulos, nos quais foram adicionados às amostras o tampão de lise

contendo beta-mercaptoetanol, e em seguida ocorreu a diluição dessas amostras em tampão de diluição de RNA, logo então as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Foi adicionado as amostras etanol 95%, e após este passo as amostras foram transferidas para colunas de centrifugação, nas quais o RNA pode se ligar a membrana da coluna facilitando a lavagem para eliminação de possíveis contaminantes. As amostras seguiram para 3 etapas de centrifugação de 1 minuto cada uma. Primeiro, foram lavadas com solução de lavagem de RNA, em seguida solução de parada de DNase e, finalmente, solução de lavagem de RNA. Por fim, o RNA foi diluído em 30 µL de água livre de nuclease. A quantificação do RNA total foi realizada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-VIS versão 3.2.1. e a qualidade desse RNA foi demonstrada por meio da análise do número equivalente a integridade de RNA (RIN - do inglês RNA Integrity Number equivalent) utilizando o equipamento “2200 TapeStation RNA ScreenTape” (Agilente). O RNA purificado foi estocado a -80°C para posterior ensaio de microarray de expressão.

### 3.5.2 Microarray de expressão

Para análise de *microarray* foi utilizado o kit “*One-color microarrays-based gene expression Analysis*” (Agilent technologies, EUA), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA total foi utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, que ocorre por meio de transcrição reversa com o auxílio da enzima T7 RNA polimerase. A síntese da segunda fita de cDNA serve de molde para a reação da transcrição *in vitro* para a produção de cRNA. O cRNA foi então incorporado ao fluorocromo 3-cianina (Cy3) utilizando o kit “*RNeasy mini spin kit*” (Agilent Technologies), protocolo fornecido pelo fabricante. Na sequência, foi realizada a purificação do cRNA, e para isso 84 µL de água ultrapura foi adicionada a 350 µL de *buffer RLT* e 250 µL de etanol 100%. A solução foi transferida para a coluna de purificação do kit *RNeasy mini spin*. À cada amostra foi adicionado 500 µL de *buffer RPE* e as amostras foram centrifugadas a 4° C. Em seguida, as amostras foram diluídas em 30 µL de água livre de nuclease para eluição do RNA purificado. O cRNA foi então quantificado por espectrofotometria, analisando a relação de absorvância em (260 nm/280 nm) e a concentração de cRNA (ng/µL) em cada amostra. Para a reação de hibridização, o RNA marcado foi adicionado ao mix de fragmentação (300 ng de *Cyanine 3-labeled*, cRNA amplificado, 5µL de 10×*Gene Expression Blocking Agent*, 1µL de 25×*Fragmentation Buffer* e água ultra-pura) e incubado a 60° C por 30 min, para fragmentar as amostras antes da hibridização. Foi adicionado em cada amostra 25 µL de

2× *Hi-RPM Hybridization Buffer* a 4°C. Para a hibridização, 40 µL de cada amostra foram adicionadas a lâmina de hibridização e em seguida deixados em câmara de hibridização por 17 h a 65° C com rotação de 10 rpm. Após esse período, a lâmina foi lavada e imediatamente escaneada no Scanner de microarray da Agilent (G4900DA). As imagens foram obtidas com auxílio do programa *Feature Extraction v10.10* e os dados analisados no programa GeneSpring GX (Versão 11.0). A identificação dos genes seguiu um critério de restrição com um *fold change* (FC) > 2, ou seja, foram considerados somente os genes que foram encontrados por estar duas vezes mais ou menos expressos quando comparados com o grupo controle.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de intensidade das imagens digitalizadas foram quantificados usando o programa *Feature Extraction* (versão 10.7.3.1) conforme descrito em outro trabalho (FERREIRA et al., 2021). Os dados brutos foram processados através do software GeneSpring GX 14.5 após controle de qualidade e análise de normalização de quantil RMA (*robust multiarray average*) contra a média das amostras de controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram selecionados usando o teste de Mann-Whitney pareado (limite de valor p corrigido de Benjamin-Hochberg <0,05) com valores de fold-change absoluto  $\geq 2$ . Outras análises de dados foram realizadas usando várias funções no software R 2.1 (<http://www.r-project.org>).

#### 3.6.1 Interpretação biológica

A análise de enriquecimento funcional dos DEGs foi realizada usando o pacote R *g:Profiler2* para: (i) ontologia gênica (BP: processos biológicos; CC: componentes celulares; MF: função molecular); (ii) vias biológicas (banco de dados Reactome); (iii) motivos regulatórios no DNA (do TRANSFAC e miRTarBase); (iv) ontologia do fenótipo (da ontologia do fenótipo humano – HP). Usamos o algoritmo *g:SCS* (Set Counts and Sizes) para a correção de testes múltiplos.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Usamos o gráfico de Manhattan para visualizar os resultados do enriquecimento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 A EXPOSIÇÃO AO MEHG MODULOU O PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DAS CÉLULAS B103

Realizamos a análise transcriptômica imparcial usando microarray para identificar vias e mecanismos regulados por MeHg nas células B103. Após padronização e remoção de efeitos de lote nos resultados do microarray, um gráfico de vulcão mostrou que a exposição a 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg levou à desregulação de 798 transcritos (644 regulados positivamente, 154 regulados negativamente) em comparação com o controle (Fig. 7A; Tabela Complementar 1). Entre esses transcritos, observamos mudanças notáveis (mais de 3 vezes) na expressão de sete genes (*Dcx*, *4930449C09Rik*, *Gm30871*, *Trim14*, *Gm14169*, *Nup98* e *Cdc42se2*) (Tabela 1). Em contraste, no tratamento com 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg, o número de DEGs diminuiu para 572, dos quais 426 foram regulados positivamente e 146 foram regulados negativamente (Fig. 7B; Tabela complementar 2). Neste conjunto, cinco genes foram drasticamente alterados (mais de 3 vezes) *Otoa*, *Dcx*, *Trim14*, *Gm30871* e *Crem*, respectivamente (Tabela 2).

Curiosamente, dos 20 principais DEGs identificados nas exposições de 0,1  $\mu\text{M}$  e 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg, cinco genes (*Gm14169*, *Trim14*, *Gm30871*, *Dcx* e *Otoa*) foram compartilhados entre os tratamentos (Fig. 7C). A ontologia (para a função molecular) e a análise de enriquecimento da via deste conjunto de genes revelaram um enriquecimento significativo para a ligação da proteína quinase ligada à modificação pós-traducional, particularmente na síntese de proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI-APs). GPI-APs são proteínas integrais de membrana presentes na superfície celular. Eles desempenham papéis essenciais em processos celulares, como transdução de sinal, adesão celular e resposta imune (KINOSHITA et al., 2020). Embora a exposição induzida por MeHg possa causar um colapso significativo do prolongamento de tecido a partir de células-tronco pluripotentes humanas (NINOMIYA et al., 2020), este estudo é o primeiro a demonstrar uma ligação entre a exposição ao MeHg e a alteração na expressão de GPI-AP.



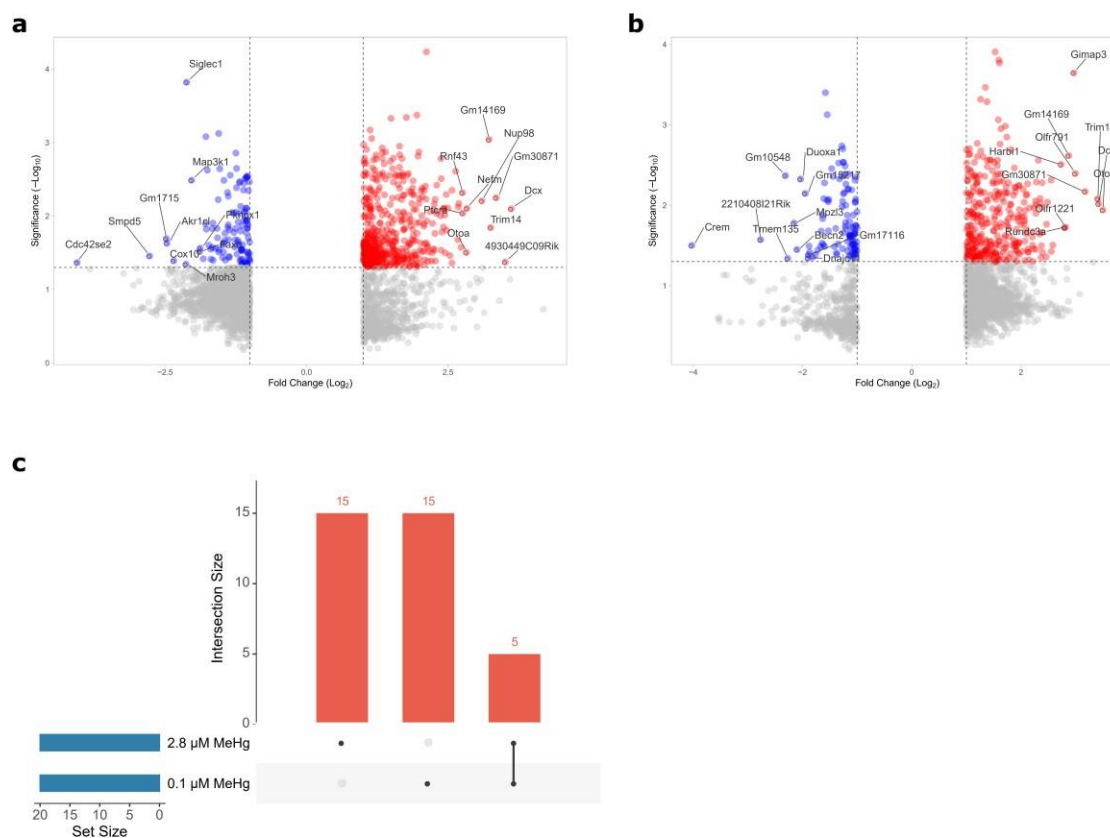


Figura 7 Análise dos genes diferencialmente expressos da linhagem celular B103 após 24 horas de exposição ao MeHg. Gráficos vulcanos representativos de dados de microarray demonstrando genes regulados positivamente (pontos vermelhos) ou regulados negativamente (pontos azuis) pelos tratamentos de (a) 0,1  $\mu\text{M}$  e (b) 2,8  $\mu\text{M}$  MeHg após 24h. Destacamos os dez genes up- e down regulados mais significativos em ambos os tratamentos. Os pontos cinzas representam os genes sem expressão diferencial. (c) Diagrama UpSet ilustrando DEGs comuns em resposta a tratamentos de 0,1  $\mu\text{M}$  e 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg. O gráfico de barras à esquerda indica o número total de genes para cada tratamento. O gráfico de barras superior indica o tamanho da interseção entre conjuntos de genes para cada tratamento. Pontos escuros conectados no painel inferior indicam quais tratamentos são considerados para cada interseção.

**Tabela 1.** Os 20 principais DEGs observados na linhagem celular B103 após 24 horas de exposição a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg.

Gene ID	Change	Description	Fold change (Log2)	Significance (-Log10)
<i>Dcx</i>	Increased	Doublecortin	3.61	2.09
<i>4930449C09Rik</i>	Increased	ncRNA	3.51	1.37
<i>Gm30871</i>	Increased	ncRNA	3.35	2.24
<i>Trim14</i>	Increased	Tripartite motif-containing 14	3.25	1.84
<i>Gm14169</i>	Increased	ncRNA	3.22	3.04
<i>Nup98</i>	Increased	Nucleoporin 98	3.10	2.20
<i>Nefn</i>	Increased	Neurofilament, medium polypeptide	2.83	2.10

<i>Otoa</i>	Increased	Otoancorin	2.82	1.50
<i>Ptcra</i>	Increased	Pre-T cell antigen receptor alpha	2.76	2.04
<i>Rnf43</i>	Increased	Ring finger protein 43	2.75	2.31
<i>Cdc42se2</i>	Decreased	CDC42 small effector 2	-4.05	1.36
<i>Smpd5</i>	Decreased	Sphingomyelin phosphodiesterase 5	-2.77	1.45
<i>Gm1715</i>	Decreased	lncRNA	-2.47	1.69
<i>Akr1cl</i>	Decreased	Aldo-keto reductase family 1, member C-like	-2.46	1.63
<i>Cox10</i>	Decreased	Heme A: farnesyltransferase cytochrome c oxidase assembly factor 10	-2.34	1.39
<i>Mroh3</i>	Decreased	Maestro heat-like repeat family member 3	-2.13	1.34
<i>Siglec1</i>	Decreased	Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	-2.11	3.82
<i>Map3k1</i>	Decreased	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	-2.03	2.48
<i>Faxc</i>	Decreased	Failed axon connections homolog	-1.88	1.51
<i>Pknox1</i>	Decreased	Pbx/knotted 1 homeobox	-1.88	1.56

---

**Tabela 2.** Os 20 principais DEGs observados na linhagem celular B103 após 24 horas de exposição a concentração de 2,8  $\mu$ M de MeHg.

Gene ID	Change	Description	Fold change (Log2)	Significance (-Log10)
<i>Otoa</i>	Increased	Otoancorin	3.50	1.94
<i>Dcx</i>	Increased	Doublecortin	3.42	2.02
<i>Trim14</i>	Increased	Tripartite motif-containing 14	3.40	2.08
<i>Gm30871</i>	Increased	ncRNA	3.17	2.17
<i>Olf791</i>	Increased	Olfactory receptor 791	2.99	2.39
<i>Gimap3</i>	Increased	GTPase, IMAP family member 3	2.96	3.64
<i>Gm14169</i>	Increased	lncRNA	2.87	2.61
<i>Olf1221</i>	Increased	Olfactory receptor 1221	2.81	1.72
<i>Rundc3a</i>	Increased	RUN domain containing 3A	2.79	1.72
<i>Harbi1</i>	Increased	Harbinger transposase derived 1	2.73	2.50
<i>Crem</i>	Decreased	cAMP responsive element modulator	-4.02	1.50
<i>2210408I21Rik</i>	Decreased	RIKEN cDNA 2210408I21	-2.76	1.57
<i>Gm10548</i>	Decreased	Ribosomal protein L29 pseudogene	-2.31	2.36
<i>Tmem135</i>	Decreased	Transmembrane protein 135	-2.27	1.34
<i>Mpz13</i>	Decreased	Myelin protein zero-like 3	-2.15	1.77
<i>Becn2</i>	Decreased	Beclin 2	-2.09	1.45
<i>Duoxa1</i>	Decreased	Dual oxidase maturation factor 1	-2.03	2.32
<i>Gm15217</i>	Decreased	ncRNA	-1.94	2.14
<i>Dnajc11</i>	Decreased	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C11	-1.89	1.34
<i>Gm17116</i>	Decreased	ncRNA	-1.89	1.38

#### 4.2 ANOTAÇÃO GÊNICA E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS B103 APÓS A EXPOSIÇÃO AO MeHg

Em seguida, investigamos as diferenças funcionais em resposta aos tratamentos com MeHg na linhagem de células B103. Na menor concentração, os genes foram enriquecidos principalmente para a atividade da esteroide desidrogenase (atividade 3-beta-hidroxi-delta5-esteróide desidrogenase) e transdução de sinal (Fig. 8A), sugerindo uma possível resposta da célula a hormônios e afetando vias de sinalização, que possivelmente podem servir como um mecanismo de proteção para mitigar os efeitos tóxicos do MeHg nas células.

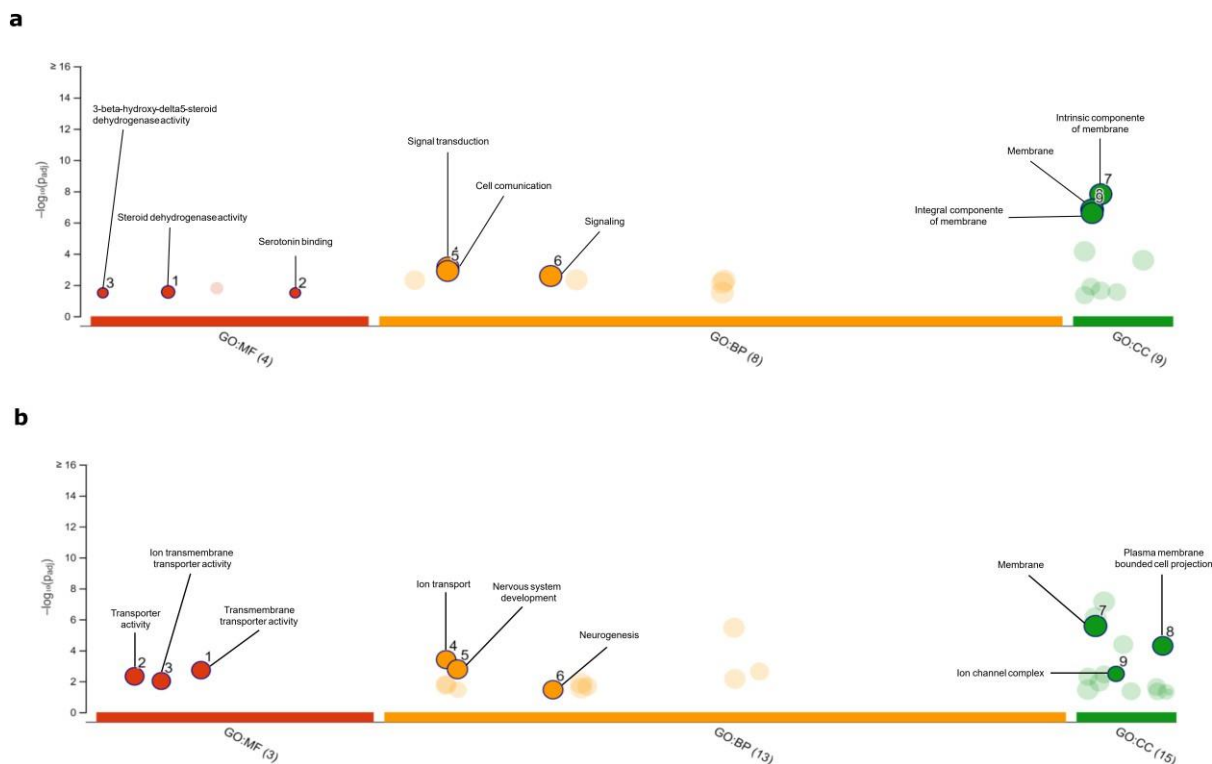


Figura 8 Anotação funcional Gene Ontology (GO) dos DEGs da linhagem celular B103 após 24 horas de exposição ao MeHg. Em **(a)** linhagem exposta a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e **(b)** linhagem exposta a concentração de 2,8  $\mu\text{M}$ . O eixo X representa termos funcionais enquanto o eixo Y mostra os valores P de enriquecimento ajustados na escala log10 negativa. (GO:MF) função molecular, (GO: BP) processos biológicos e (GO:CC) componente celular.

A biossíntese de hormônios esteroides, como andrógenos, estrogênios e progestagênios, envolve a atividade da 3-beta-hidroxi-delta5-esteróide desidrogenase ( $3\beta\text{-HSD}$ ). Embora a relação específica entre a exposição ao MeHg e a atividade de  $3\beta\text{-HSD}$  ainda não tenha sido extensivamente estudada, algumas evidências sugerem que baixas concentrações de MeHg podem interromper as vias hormonais, incluindo a produção e o metabolismo de hormônios esteroides na linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano (KNAZICKA et al., 2012). Além disso, estudos em animais associaram a exposição ao MeHg à disfunção endócrina, incluindo esteroidogênese, espermatogênese e níveis hormonais alterados (LETTIERI et al., 2022; STREET et al., 2012). Essas descobertas enfatizam os riscos potenciais à saúde associados à exposição ao MeHg e destacam a necessidade de mais pesquisas para entender completamente os mecanismos e as implicações para a saúde da desregulação endócrina induzida pelo MeHg.

Outro termo que foi enriquecido em nossos resultados, ainda para a menor concentração, foi ligação a serotonina (Fig.8A) (para função molecular) associado ao

enriquecimento da via de receptores de serotonina (Fig. 9A), sugerindo que a exposição ao MeHg afeta a ligação da serotonina, assim como a via de receptores desse neurotransmissor. O MeHg é neurotóxico e pode acumular-se no cérebro (CRESPO-LOPES et al., 2021). Uma vez neste órgão, o MeHg pode afetar a regulação de neurotransmissores, como por exemplo glutamato, dopamina e serotonina (SIBLERUD et al., 2019). Oudar & Caillar & Fillion (1989) demonstraram os efeitos do mercúrio orgânico (MeHg) e inorgânico em um sistema serotoninérgico *in vitro*. Estes autores observaram que ambas as formas de mercúrio inibiram a ligação da serotonina em seus receptores, o que corrobora nossos achados a respeito da análise GO e de via de receptores de serotonina afetada pela exposição ao MeHg.

Para a maior concentração de MeHg, observamos um enriquecimento de genes associados à atividade do transportador, particularmente o transporte de íons metálicos (Fig. 9B). Esses achados sugerem que os efeitos tóxicos do MeHg no sistema nervoso podem ser mediados pela interrupção da atividade do transportador, o que pode levar ao acúmulo de íons metálicos dentro das células, levando ao estresse oxidativo e dano celular (YOSHIDA et al., 2013). Além disso, a interrupção do transporte de íons metálicos nas células pode ter implicações importantes para vários processos celulares, incluindo expressão gênica, síntese de proteínas e atividade enzimática, que dependem do transporte e distribuição adequados de íons metálicos dentro da célula (GABBIANELLI et al., 2013).

Adicionalmente, cinco vias de sinalização foram afetadas por essa exposição (Fig. 9B), dentre as quais três estão relacionadas a transporte de moléculas ou compostos, como por exemplo a via de transporte transmembrana mediada por SLC, a qual apresentou 15 genes afetados em nossos resultados, sendo 12 regulados positivamente e 3 regulados negativamente (todos estes genes apresentam ortólogos em humanos). As proteínas transportadoras de soluto (SLC) assumem a função de transportar solutos através da membrana celular, e a maioria dos transportadores SLC são transportadores de influxo, que intermediam principalmente a absorção de seus substratos nas células, embora existam exceções. SLCs desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase corporal e são expressos em tecidos-chave, como rim, fígado, intestino e cérebro (especificamente na barreira hematoencefálica) (ZHOU & SHU, 2022; LIU & PAN, 2019) principais órgãos onde o MeHg é acumulado no corpo (GUIDA et al, 2017, NOVO et al., 2021).

Além disso, o enriquecimento gênico demonstrou ainda genes envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso na maior concentração (Fig. 8B). Sugere-se que a exposição ao MeHg pode ter efeitos de longo prazo no sistema nervoso em desenvolvimento, o que pode ter implicações para distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo aprendizado e memória prejudicados e diminuição da neurogênese (GRANDJEAN et al., 2010; CHOI et al., 2012; LLOP et al., 2014).

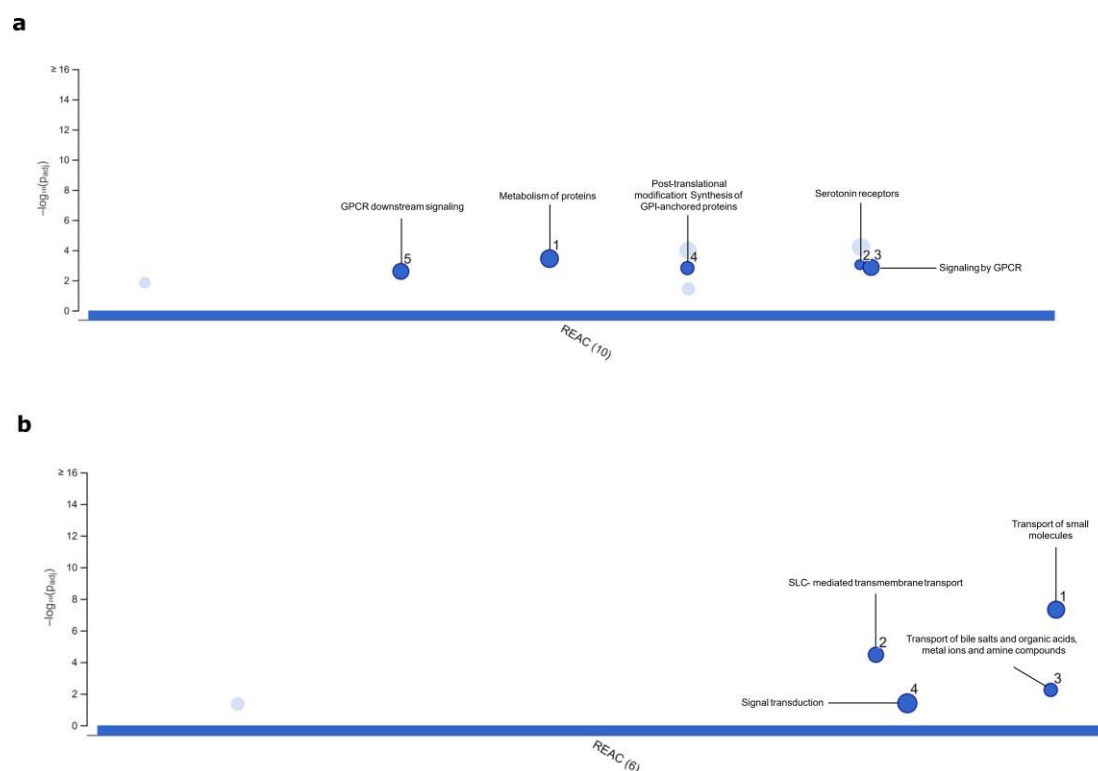


Figura 9 Vias afetadas da linhagem celular B103 após exposição ao MeHg por 24 horas. Em **(a)** concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e em **(b)** concentração de 2,8  $\mu\text{M}$ . Os pontos destacados correspondem as vias mais significativas. O eixo X representa as vias de sinalização moleculares, enquanto o eixo Y mostra os valores P de enriquecimento ajustados na escala log10 negativa.

A partir da análise dos genes diferencialmente expressos, buscou-se identificar quais miRNAs estavam envolvidos na regulação destes genes. Assim, quando a linhagem B103 foi exposta a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg, observou-se que 23 miRNAs foram significativamente alterados (Fig. 10A), os quais foram associados a 129 vias (Fig.11). A análise de enriquecimento das vias a partir dos DEGs regulados por esses miRNAs, indicou que 79 genes estavam envolvidos na sinalização por MAPK, 56 genes na via PI3k-Akt, 53 genes na adesão focal e 52 na via de sinalização de cálcio. Já para o tratamento de 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg, observou-se o total de 14 miRNAs afetados por essa exposição (Fig. 10B), que foram envolvidos em 114 vias (Fig. 12). Os genes regulados por estes miRNAs estão envolvidos em 4 vias principais, são elas: via de sinalização







expressão de 418 miRNAs em trabalhadores expostos ao mercúrio, e demonstrou que quatro miRNAs (miR-16-5p, miR-30c-3p, miR-181a-5p e let-7e-5p) foram regulados negativamente e quatro miRNAs (miR-92a-3p, miR-122-5p, miR-451a e miR-486-5p) foram regulados positivamente em comparação ao grupo controle. Posteriormente, confirmou-se por qRT-PCR que os miRNAs hsa-miR-92 a-3p e hsa-miR-486-5p foram regulados positivamente no grupo expostos ao mercúrio. Este estudo também demonstrou que estes dois miRNAs são fortemente regulados positivamente na linhagem celular HEK-293 (proveniente de rim de embrião humano) e nas células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) expostas ao cloreto de mercúrio. Assim, este estudo demonstrou que o mercúrio pode alterar a expressão de miRNAs, apesar de não observarmos em nossos achados miRNAs correspondentes aos acima citados.

Ainda a respeito dos miRNAs, observou-se que dos 23 miRNAs alterados na linhagem B103 exposta a menor concentração de MeHg, oito miRNAs fazem parte da família miR-466 (miR-466-a/e/p/i/l/d//k-5p e miR-466i-3p). Na concentração de 2,8  $\mu$ M, seis miRNAs da família miR-466 foram observados (miR-466q, miR-466 f/d/a/n- 3p e miR-466l-5p). Além disso, os dois grupos tratados compartilharam 4 miRNAs (miR-297c-5p, miR-297b-5p, miR-425-5p e miR-466l-5p).

Existem na literatura estudos que avaliaram a expressão de miRNAs da família miR-466, como o trabalho de Shyamasundar et al. (2013) que buscou examinar o efeito do diabetes materno na regulação de fatores epigenéticos em células tronco neurais embrionária de camundongos (CTN). Este estudo avaliou a expressão dos genes *Dcx* (Doublecortin) e *Pafah1b1* (fator ativador de plaquetas acetil hidrolase, isoforma 1b, subunidade 1) por haver uma relação entre a expressão deles com má formação de embriões na gravidez diabética. A partir da definição destes genes, os autores buscaram identificar quais miRNAs estavam envolvidos na regulação deles. Em seus resultados, estes autores observaram que quando as CTNs foram expostas a hiperglicemia, ocorreu redução na expressão de quatro microRNAs (*mmu-miR-200a*, *mmu-miR-200b*, *mmu-miR-466a-3p* e *mmu-miR-466d-3p*) concomitantemente com um aumento na expressão das proteínas *Dcx* e *Pafah1b1* e aumento na diferenciação neurogênica. O knockdown dos quatro microRNAs nas CTNs resultou no aumento da expressão das proteínas *Dcx* e *Pafah1b1*, confirmando a predição dos genes-alvo e o destino alterado do CTNs. Em nosso estudo, observamos que a exposição da linhagem B103 a maior concentração de MeHg (2,8 $\mu$ M) afetou a expressão de dois dos quatro miRNAs observados no estudo de acima citado, são eles: *mmu-miR-466a-3p* e *mmu-miR-466d-3p*. Já na menor

concentração observou-se somente a expressão do miRNA mmu-miR-466a-5p. Além disso, entre os DEGs que compõem nossos achados destacou-se o gene *Dcx*, o qual foi altamente regulado positivamente em nossos achados tanto em 0,1 quanto em 2,8  $\mu\text{M}$ , o que corrobora o trabalho acima citado.

Para vincular os resultados dos nossos transcritos com a variabilidade de anormalidades fenotípicas encontradas em doenças humanas, foi utilizado o Human Phenotype Ontology (HPO). Quando a linhagem B103 foi exposta as duas concentrações de MeHg observou-se que vários termos HPO foram enriquecidos, e que alguns se destacaram no contexto da intoxicação por MeHg, os quais estão listados na figura 13A e 13B (0,1 e 2,8  $\mu\text{M}$  respectivamente). Entre os termos HPO enriquecidos observou-se que essa exposição (independente da concentração) pode causar anormalidades fenotípicas, anormalidades nos sistemas nervoso e musculo esquelético, anormalidades na morfologia do sistema nervoso e SNC e anormalidade da função mental superior. Adicionalmente, para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  destacaram-se ainda os termos HPO: anormalidades na morfologia do cérebro e na fisiologia sistema nervoso. Para a concentração de 2,8  $\mu\text{M}$ , os dois últimos termos enriquecidos foram relacionados ao neurodesenvolvimento: neurodesenvolvimento anormal e atraso no neurodesenvolvimento.

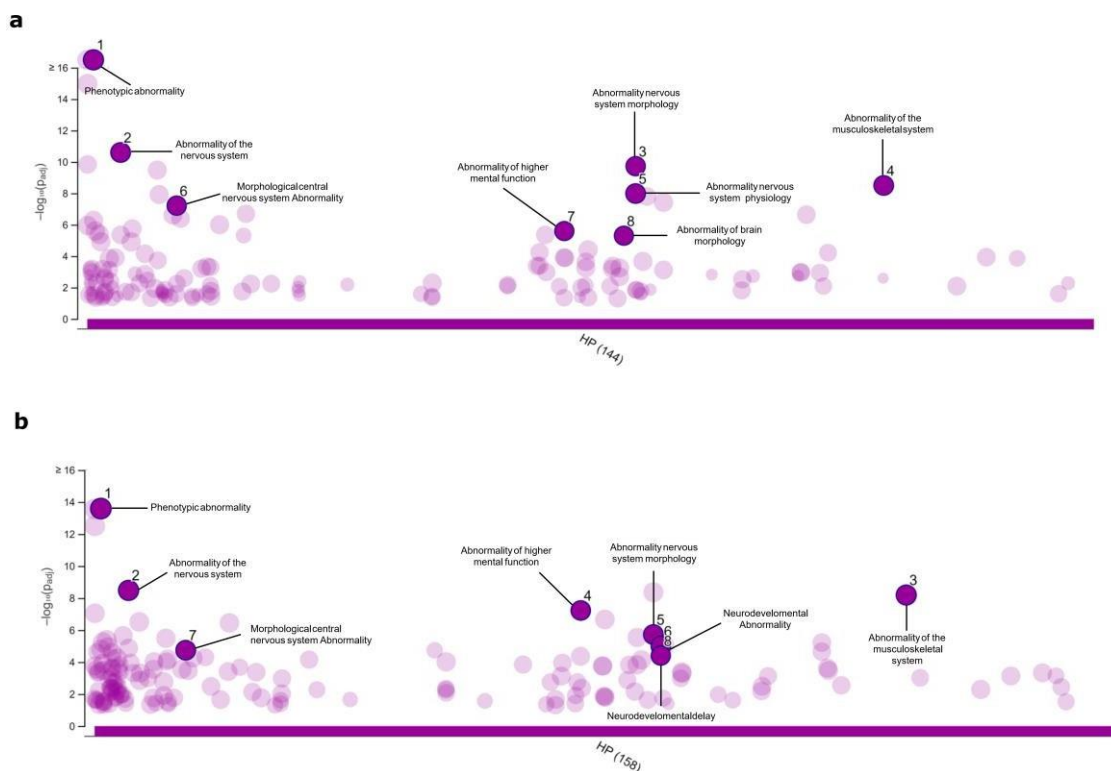


Figura 13 Termos HPO mais significativos da linhagem celular B103 após 24 horas de exposição ao MeHg. Em (a) concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e (b) concentração de 2,8  $\mu\text{M}$ . Os pontos destacados correspondem aos oito termos HPO mais significativos. O eixo X representa os termos HPO após a exposição, enquanto o eixo Y mostra os valores P ajustados na escala log10 negativa.

Os danos no SNC relacionados ao mercúrio têm sido extensivamente estudados tanto em modelos animais como em seres humanos, principalmente porque SNC é o principal e mais sensível órgão-alvo do MeHg. Sabe-se que a intoxicação por MeHg pode causar várias disfunções no SNC, que tem como consequências disfunções também no sistema musculo esquelético, como deficiência visual, ataxia, parestesia, neurastenia, perda auditiva, disartria, neurodegeneração, tremor muscular e hipotonia. Essas alterações neurológicas podem estar associadas a danos bioquímicos, celulares e histológicos induzidos pelo MeHg em diversas áreas do SNC como cerebelo, hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal e córtex visual, auditivo, sensorial e motor (DAY et al., 2005; MILIONI, 2015; CRESPO-LOPES et al, 2015; DOS SANTOS et al., 2016; PUTTY et al., 2019). Em seres humanos as alterações neurológicas mais frequentes apresentadas são: distúrbio sensorial seguido de comprometimento motor e da coordenação, fala motora, comprometimento auditivo, alterações visuais, perda do quociente inteligente, disfunção do humor e do comportamento (PUTY et al., 2019). Adicionalmente, pacientes com doença de Minamata do tipo fetal (ou seja, intoxicação grave causada por exposição *in útero* ao MeHg) nasceram durante o período de poluição

severa por MeHg entre os anos de 1955–1959 no Japão, e apresentaram distúrbios no desenvolvimento mental com sintomas semelhantes aos da paralisia cerebral, o que conseqüentemente afetou o neurodesenvolvimento e a função mental superior. (SAKAMOTO & ITAI & MURATA, 2017, BELLINGER, 2018). Em uma revisão mais recente, Saavedra et al. (2022) sugeriram que a exposição alimentar materna ao MeHg tem um impacto significativo no desenvolvimento físico e neurológico em crianças. Por outro lado, a revisão de Dack et al. (2022) relatou evidências de uma associação fraca entre a exposição ao Hg e o neurodesenvolvimento de crianças. Entretanto, estes autores ressaltam que os efeitos adversos do mercúrio no neurodesenvolvimento podem ser mais detectáveis acima de um certo limiar de exposição, e que as medidas atuais de neurodesenvolvimento podem ser incapazes de detectar as pequenas mudanças que ocorrem em níveis mais baixos de intoxicação. Além disso, sabe-se que a exposição aguda ou crônica ao MeHg causam alterações morfológicas no sistema nervoso central. A intoxicação aguda tem como consequência atrofias no cérebro (especificamente no cerebelo), ponte e na medula. Além de causar, também, alterações no lobo occipital direito, atrofia cortical e redução nas regiões do hipocampo (ALBERS et al. 2020). Quanto a exposição crônica ao MeHg, recentemente foi descrito que esta intoxicação pode causar reduções significativas no volume da substância cinzenta no tálamo, cerebelo e sulco calcarino; e no volume da substância branca no cérebro e cerebelo (HIRAI et al., 2023). Assim, observou-se que nossos achados, para ambas as linhagens estudadas (B103 e C6), estão de acordo com a literatura no que diz respeito aos efeitos fenotípicos decorrentes da exposição ao MeHg.

Como nosso conjunto de transcritos para a linhagem B103 exposta ao MeHg foi bem extenso, buscou-se destacar os DEGs com maiores FC para os dois grupos expostos. Assim, no tratamento de 0,1  $\mu$ M destacaram-se os genes *Cdc42se2* (log<sub>2</sub> FC -4.055713), *Dcx* (log<sub>2</sub> FC 3.618981) e *4930449C09Rik* (log<sub>2</sub> FC 3.5129156). Já para a exposição de 2,8  $\mu$ M, os genes com maior FC foram *Crem* (log<sub>2</sub> FC -4.027875), *Otoa* (log<sub>2</sub> FC 3.501512) e *Dcx* (log<sub>2</sub> FC 3.423433). Além dos genes acima citados, destacaram-se os genes *Trim14*, *Gm14169*, *Gm30871*, *Otoa* por serem compartilhados entre os dois grupos expostos. Todos os genes citados possuem ortólogos humanos, exceto os genes *4930449C09Rik*, *Gm14169* e *Gm30871* que são exclusivos de camundongos, e os dois últimos são genes preditos. Assim, nosso trabalho buscou caracterizar os genes com maiores FC ou comuns aos dois grupos tratados com MeHg.

O gene CDC42SE2, também conhecido como SPEC2, é um gene que codifica pequenas proteínas de 79 a 84 aminoácidos, está envolvido em processos de sinalização celular e regulação da transdução de sinal e está localizado na membrana plasmática. Em humanos há dois membros da família SPEC, SPEC 1 e SPEC 2, os quais representam uma nova família de proteínas efetoras de ligação a CDC42. Ambos SPECs possuem uma região N-terminal conservada e um domínio CRIB, onde ocorre a ligação entre Cdc42/Rac. Em nossos resultados observamos que após a exposição da linhagem celular B103 a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg ocorreu a subexpressão do gene Cdc42se2 (log2 FC -4.055713), correspondendo ao maior valor de alteração dos DEGs observados para este tratamento. Fujimura et al. (2009) demonstraram que o MeHg regula negativamente a expressão de Cdc42 (proteína de ligação da Cdc42se2) e Rac1 em cultura primária de neurônios corticais embrionárias de ratos. Guo et al. (2013) demonstraram que baixas doses de MeHg causam migração neuronal defeituosa no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento. Para esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes à migração defeituosa induzida pelo MeHg, estes autores determinaram os níveis das proteínas Rac1, Cdc42 e RhoA nos tecidos neocorticais de ratos embrionários e infantis por Western blotting. Foi observado que o MeHg interrompe a migração neuronal, suprimindo a expressão de Cdc42, Rac1 e RhoA. Vale destacar que a regulação negativa Cdc42 foi mais acentuada em comparação a Rac1, o que corrobora nossos achados.

O gene Dcx codifica uma proteína citoplasmática de ligação aos microtúbulos, que regula a dinâmica do citoesqueleto e morfogênese, atua na migração neuronal e está funcionalmente envolvida no crescimento e ramificação do processo neuronal. Esse gene está associado a doenças como lissencefalia ligada ao cromossomo X e heterotopia em banda subcortical, que são distúrbios raros de migração neuronal que ocorrem durante o desenvolvimento do cérebro (SLEPAK et al., 2012; TSAI et al., 2016). Na linhagem celular B103, o gene Dcx foi regulado positivamente em ambas as concentrações testadas (corresponde ao segundo gene com maior FC para 0,1  $\mu\text{M}$  e terceiro maior FC para 2,8  $\mu\text{M}$ ). Nossos achados sugerem que o gene DCX pode ser um gene chave para explicar as alterações nos microtúbulos (PENDERGRASS et al., 1997; MIURA et al., 1999), na organização do citoesqueleto, crescimento e migração neuronal (SLEPAK et al., 2012; SCHAAR et al., 2004) descritas na literatura decorrentes da exposição ao MeHg.

O terceiro maior FC obtido em nosso estudo corresponde ao gene 4930449C09Rik (RIKEN cDNA 4930449C09), o qual é exclusivo de camundongos. Em nossos achados foi observado que este gene foi regulado positivamente quando a

linhagem celular B103 foi exposta a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg. A proteína codificada por este gene está envolvida com a interação ou comunicação célula-célula durante a espermatogênese ou fertilização, e sua expressão tem início no estágio de espermatócito (HOUNG et al., 2005). Este gene também foi relacionado como um biomarcador para a identificação de sinais pré-doença, que ocorrem antes da síndrome metabólica, em camundongos (KOIZUME et al., 2019). Entretanto, o papel deste gene na intoxicação pelo MeHg é desconhecido.

O gene *Crem* pertence à família de fatores de transcrição da proteína de ligação do elemento de resposta ao cAMP (CREB), e tem como alvo genes com CREs (sítio de ligação para *Crem*) em suas regiões reguladoras. Diferentes isoformas proteicas codificadas por esse gene podem funcionar como ativadores ou repressores da transcrição. As proteínas CREB/CREM e outros membros da família CREB regulam a atividade transcricional e medeiam a transcrição de muitos genes-chave em células germinativas pós-meióticas durante todos os estágios da espermatogênese (MONACO et al., 2004; WANG et al., 2018). Em nossos resultados, o gene *Crem* foi regulado negativamente nas células B103 expostas a concentração de 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg, maior FC para esse tratamento. Há poucos estudos que associam a exposição ao MeHg e função reprodutiva, um dos poucos nesse sentido é o de Da Silva et al. (2011), que demonstrou que a exposição de ratos wistar ao MeHg reduziu a contagem relativa de espermatozoides, além da motilidade espermática e o tempo de trânsito na cabeça/corpo do epidídimo. Não há até o momento estudos que associem a exposição ao MeHg e expressão do gene *Crem*, porém Wang et al. (2018) avaliaram a expressão genica e proteica de camundongos expostos ao fluoreto de sódio (NaF), e observaram uma redução na expressão de mRNA de *Crem*, assim como a proteína *Crem* demonstrou uma redução significativa nos grupos tratados. Nos animais observou-se uma redução na contagem e viabilidade espermática e aumento na porcentagem de espermatozoides malformados. Esses autores sugerem que a redução na expressão genica e proteica de *Crem* está associada ao comprometimento das funções reprodutivas pelo NaF em camundongos. Em conjunto, esses resultados sugerem que a regulação negativa do gene *Crem* após exposição ao MeHg possa estar envolvida ao comprometimento das funções reprodutivas, entretanto são necessários mais estudos para confirmar tal hipótese.

A proteína otoacorina, codificada pelo gene *OTOA* (Otoancorin) é expressa especificamente no ouvido interno e está localizada na interface entre a superfície apical do epitélio sensorial do ouvido interno e seus géis acelulares. Mutações neste gene estão

associadas a surdez autossômica recessiva 22 e surdez neurosensorial não sindrômica autossômica recessiva tipo DFNB22 (KIM et al., 2019). Além disso, o HPO associa este gene a anormalidade auditiva, deficiência auditiva, deficiência auditiva neurosensorial e anormalidade da orelha. Em nosso estudo, foi observado que o gene *Otoa* foi regulado positivamente na linhagem celular B103 exposta as duas concentrações testadas de MeHg. Nesse sentido, Wassickk & Yonovitz (1985) foram alguns dos primeiros autores a demonstrar uma associação entre a exposição de camundongos ao MeHg a déficits auditivos. Hoshino et al. (2012) compila vários estudos em sua revisão sistemática que confirmam a associação de Hg e perda auditiva em vários modelos experimentais. Dessa forma, nós sugerimos que o aumento na expressão do gene *Otoa* possa estar relacionado com a perda na audição como consequência da exposição ao MeHg, entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

TRIM 14 é um gene que codifica uma proteína da *tripartite motif Family* (TRIM), a qual é composta por mais de 60 membros, dentre os quais acredita-se que possam ser mediadores de vários processos biológicos, como por exemplo regulação da imunidade inata. TRIM14 está localizada na membrana externa da mitocôndria e é caracterizada como um mediador na resposta imune contra a infecção viral, que facilita a resposta imune mediada por vários receptores. Entretanto, a função biológica desta proteína ainda é desconhecida (ZHOU et al., 2013; YANG et al., 2020). Em nossos resultados, a expressão do gene Trim 14 foi regulada positivamente quando a linhagem B103 foi exposta as concentrações de 0,1 e 2,8  $\mu\text{M}$  de MeHg. Até onde sabemos este é o primeiro estudo demonstrando que o Trim 14 foi regulado positivamente em linhagem celular expostas ao MeHg.

#### 4.3 MODULAÇÃO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE CÉLULAS C6 APÓS EXPOSIÇÃO AO MeHg.

A análise dos transcritos da linhagem C6 exposta a duas concentrações de MeHg demonstrou que no tratamento de 0,1  $\mu\text{M}$  um total de 812 genes sofreram alteração na expressão genica (200 genes foram regulados positivamente, 612 foram regulados negativamente) quando comparado ao controle (Fig. 14A; Tabela suplementar 3). Entre estes genes, destacaram-se dez transcritos com FC maior que 3 (*Aldh1l2*, *Dac1*, *Rps4l*, *Zbtb46*, *6430573p05Rik*, *Tcf12*, *Awat2*, *Muc3*, *Dclre1b*, *Slc38a6*) (Tabela 3). No tratamento de 6,3  $\mu\text{M}$ , o número total de DEGs aumentou para 872, dentre os quais 395 genes foram regulados positivamente e 477 genes foram regulados negativamente (Fig.

14B; Tabela suplementar 4). Ao contrário do que foi observado para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ , para esse grupo exposto apenas três genes foram alterados mais de 3 vezes (*Rps4l*, *Ankdr44* e *2610318N02Rik*) (Tabela 4). Vale ressaltar que dos 20 genes com expressão diferencial destacados para cada grupo exposto ao MeHg (0,1 e 6,3  $\mu\text{M}$ ), três genes foram compartilhados entre os tratamentos (*Rps4l*, *Lamb 3* e *Gm 41386*).

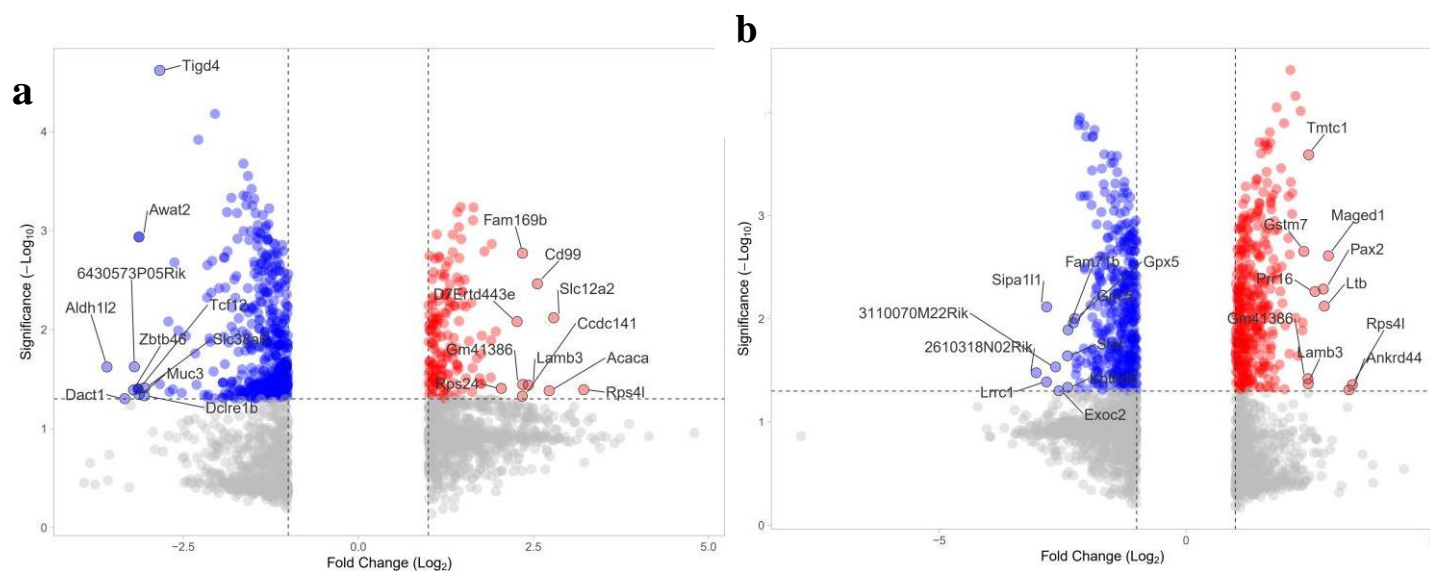


Figura 14 Análise dos genes diferencialmente expressos da linhagem celular C6 após 24 horas de exposição ao MeHg. Gráficos vulcanos representativos de dados de microarray demonstrando genes regulados positivamente (pontos vermelhos) ou regulados negativamente (pontos azuis) pelos tratamentos de (a) 0,1  $\mu\text{M}$  e (b) 6,3  $\mu\text{M}$  MeHg após 24h. Destacamos os dez genes up- e down regulados mais significativos em ambos os tratamentos. Os pontos cinzas representam os genes sem expressão diferencial.

**Table 3.** Os 20 principais DEGs observados na linhagem celular C6 após 24 horas de exposição a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg.

Gene ID	Change	Description	Fold change (log2)	Significance (-Log10)
Rps4l	Increased	Ribosomal protein S4-like	3,2187722	1,392610212
Slc12a2	Increased	Solute carrier family 12, member 2	2,790833	2,1193529
Acaca	Increased	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	2,7258525	1,382823596
Cd99	Increased	CD99 antigen	2,5581508	2,462599288
Lamb3	Increased	laminin, beta 3	2,4283774	1,439649557
Gm41386	Increased	ncRNA	2,3489003	1,446466612
Fam169b	Increased	family with sequence similarity 169, member B	2,3447633	2,771755471
Ccdc141	Increased	Coiled-coil domain containing 141	2,3428946	1,328341131
D7Erttd443e	Increased	DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 443	2,2677217	2,080828727
Rps24	Increased	Ribosomal protein S24	2,0418315	1,406674881



Aldh1l2	Decreased	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	-3,5891192	1,622509723
Dact1	Decreased	Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1	-3,3349226	1,302410726
Zbtb46	Decreased	Zinc finger and BTB domain containing 46	-3,2096238	1,391042197
6430573P05Rik	Decreased	RIKEN cDNA 6430573P05	-3,1973913	1,624654461
Tcf12	Decreased	Transcription factor 12	-3,1442218	1,401771486
Awat2	Decreased	Acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2	-3,1318574	2,935549499
Muc3	Decreased	Mucin 3, intestinal	-3,1290915	1,343420889
Dclre1b	Decreased	DNA cross-link repair 1B	-3,0551953	1,331572613
Slc38a6	Decreased	Solute carrier family 38, member 6	-3,052974	1,411727621
Tigd4	Decreased	Tigger transposable element derived 4	-2,8354948	4,617982957

**Table 4.** Os 20 principais DEGs observados na linhagem celular C6 após 24 horas de exposição a concentração de 6,3  $\mu$ M de MeHg.

Name	Change	Description	Fold change (log2)	Significance (-Log10)
Tmtc1	Increased	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	2,4856088	3,590066809
Maged1	Increased	Melanoma antigen, family D, 1	2,8850684	2,611949783
Gstm7	Increased	Glutathione S-transferase, mu 7	2,3889277	2,653562659
Pax2	Increased	Paired box 2 (Pax2)	2,7819583	2,288360002
Prr16	Increased	Proline rich 16	2,6133332	2,265144388
Ltb	Increased	Lymphotoxin B	2,8015792	2,123497403
Gm41386	Increased	ncRNA	2,469609	1,420209009
Rps4l	Increased	Ribosomal protein S4-like	3,3716965	1,362164874
Lamb3	Increased	Laminin, beta 3	2,477415	1,370241495
Ankrd44	Increased	Ankyrin repeat domain 44	3,3023992	1,311651825
Sipa1l1	Decreased	Signal-induced proliferation-associated 1 like 1	-2,8241448	2,116373991
Gpx5	Decreased	Glutathione peroxidase 5	-2,2534204	2,003899
Fam71b	Decreased	Family with sequence similarity 71, member B	-2,3901517	1,893030486
3110070M22Rik	Decreased	RIKEN cDNA 3110070M22	-2,6430583	1,533848474
Gpc5	Decreased	Glypican 5	-2,2827933	1,9612224
2610318N02Rik	Decreased	RIKEN cDNA 2610318N02	-3,0360851	1,477595742
Srst	Decreased	T2 mRNA	-2,4016821	1,641277794
Kbtbd6	Decreased	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6	-2,3975034	1,336796301
Lrrc1	Decreased	Leucine rich repeat containing 1	-2,8281288	1,389417229
Exoc2	Decreased	Exocyst complex component 2	-2,5763571	1,303287444

#### 4.4 ANOTAÇÃO GENICA E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DO TRANSCRIPTOMA DA LINHAGEM CELULAR C6 APÓS EXPOSIÇÃO AO MeHg

A fim de investigar as funções afetadas após a exposição da linhagem celular C6 ao MeHg, foi realizado a análise de enriquecimento dos DEGs. Os termos GO mais significativos para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  foram ligação a proteínas e ligação a pequenas GTPases, para função molecular (Fig. 15A). Quanto ao enriquecimento de vias, a exposição da linhagem celular C6 a menor concentração de MeHg afetou 10 vias de sinalização, das quais 3 estão associadas a Rho GTPases (Fig. 16A). Puty et al. (2022) demonstraram em seu estudo, utilizando a linhagem celular U87 (glioblastoma humano) expostas a 0,1  $\mu\text{M}$  MeHg, que os termos GO mais significativos foram ligação e ligação a proteínas, e entre as vias afetadas após a exposição destacou-se a via de sinalização por Rho GTPase. Estes achados estão de acordo com nossos resultados. Vale destacar que as Rho GTPases estão envolvidas principalmente com a regulação da migração celular e a exposição ao MeHg afeta esta função (SADOK & MARSHAL, 2014; GUOA et al., 2013).

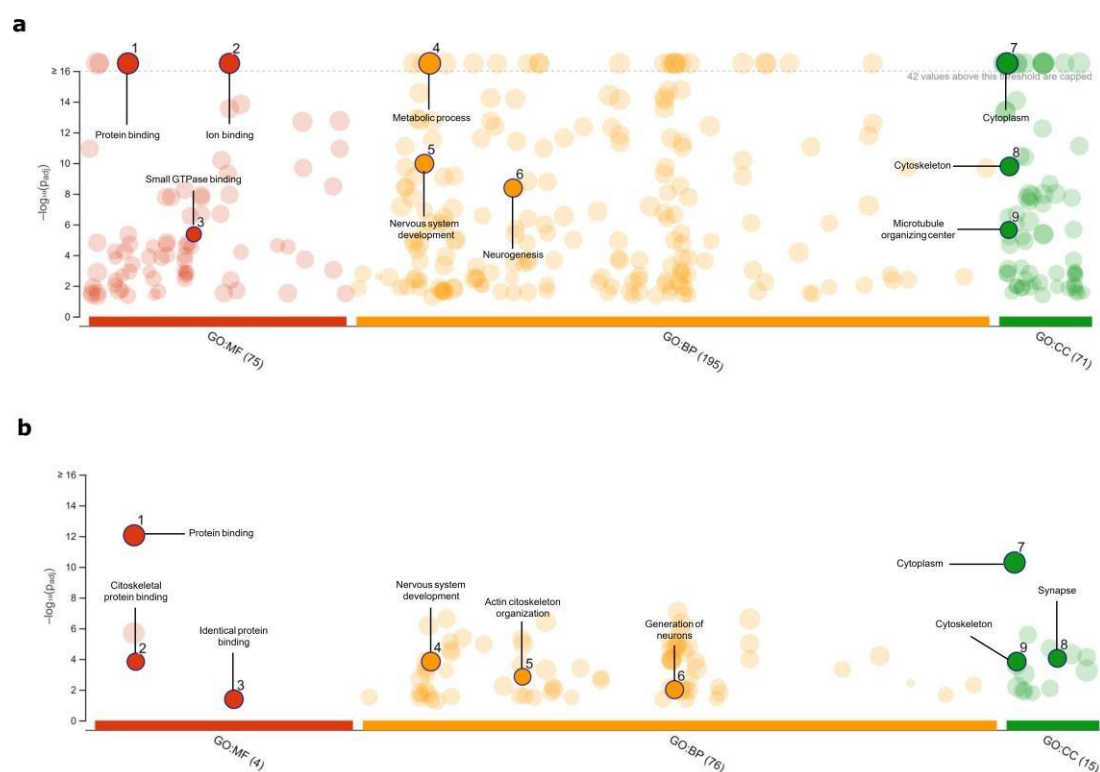


Figura 15 Anotação funcional Gene Ontology (GO) dos DEGs da linhagem celular C6 após 24 horas de exposição ao MeHg. **(a)** Linhagem exposta a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e **(b)** Linhagem exposta a concentração de 6,3  $\mu\text{M}$ . O eixo X representa termos funcionais enquanto o eixo Y mostra os valores P de enriquecimento ajustados na escala  $\log_{10}$  negativa. (GO:MF) Função molecular, (GO:BP) processos biológicos e (GO:CC) componente celular.

No que diz respeito a maior concentração de MeHg (6,3  $\mu\text{m}$ ), foi observado que os termos GO mais enriquecidos estão associados principalmente ao citoesqueleto (ligação de proteínas do citoesqueleto, organização do citoesqueleto de actina e citoesqueleto) (Fig. 15b). A exposição ao MeHg induz alterações nos microtúbulos e citoesqueleto, além disso afeta a regulação de genes ligados a organização dessa estrutura (PUTY et al., 2022; BITTENCOURT et al. 2017). De fato, o citoesqueleto já foi proposto como um ponto final para citotoxicidade do MeHg, uma vez que o desequilíbrio oxidativo e mecanismos mediados pelo glutamato culminam com a ruptura dessa estrutura e posterior morte celular por apoptose em neurônios de ratos. Sabe-se também, que o MeHg causa citotoxicidade por meio do desequilíbrio redox em astrócitos de ratos, levando a interrupção da homeostase do citoesqueleto, que tem como consequência a morte celular por necrose (PIEROZAN et al., 2016).

Em nosso estudo, o enriquecimento das vias de sinalização dos DEGs indicou mudanças significativas em um total de 23 vias pela concentração de 6,3  $\mu\text{M}$  de MeHg (Fig. 16B). Entre estas vias destaca-se a via de metabolismo, que foi a mais significativa nesse grupo. A exposição da linhagem celular U87 ao MeHg demonstrou que essa substância afeta o metabolismo celular e induz a regulação de genes associados ao metabolismo. Além disso, a análise proteica das glândulas salivares de ratos expostos ao MeHg demonstrou que essa substância afeta a classe de proteínas relacionadas com vias metabólicas (PUTY et al., 2022; BITTENCOURT et al. 2017) corroborando nossos achados.

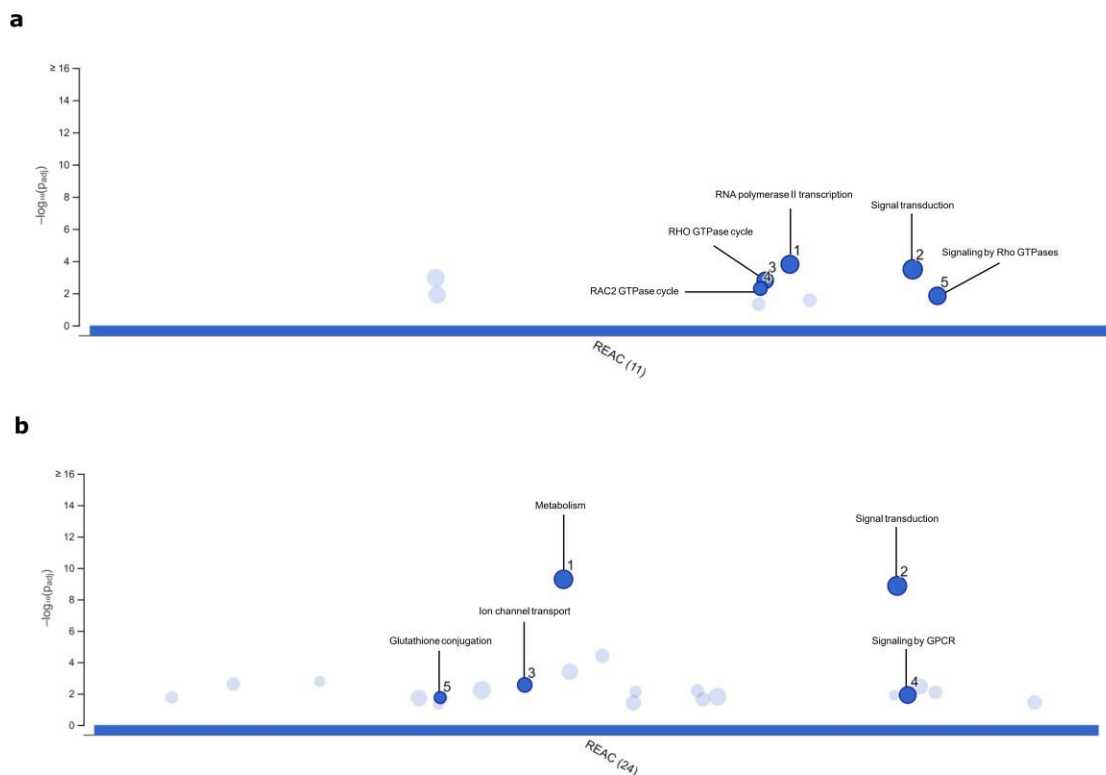


Figura 16 Vias afetadas da linhagem C6 após exposição ao MeHg por 24 horas. Em (a) concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e em (b) concentração de 6,3  $\mu\text{M}$ . Os pontos destacados correspondem as vias mais significativas. O eixo X representa as vias de sinalização moleculares, enquanto o eixo Y mostra os valores P de enriquecimento ajustados na escala log10 negativa.

A avaliação do perfil de expressão de miRNA para a linhagem celular C6 exposta a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg, demonstrou que 23 miRNAs foram significativamente afetados por essa exposição (Fig. 17A). A análise de enriquecimento dos DEGs regulados por esses miRNAs indicou que 141 vias foram associadas a estes miRNAs (Fig. 18). Dentre as vias identificadas, 119 genes foram envolvidos na via de sinalização PI3K-Akt, 100 genes foram associados a via MAPK, 80 genes a adesão focal e 59 genes a regulação do citoesqueleto de actina (Fig. 17B). No tratamento de 6,3  $\mu\text{M}$  de MeHg, observou-se mudanças significativas em 24 miRNAs, que foram associados a regulação de 152 vias (Fig. 19). De forma interessante, as vias enriquecidas pelos DEGs regulados por esses miRNAs foram semelhantes as vias para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ . Dessa forma, destacaram-se as vias de sinalização PI3K-Akt e MAPK, a adesão focal e a regulação do citoesqueleto de actina com 136, 117, 78 e 77 genes, respectivamente.

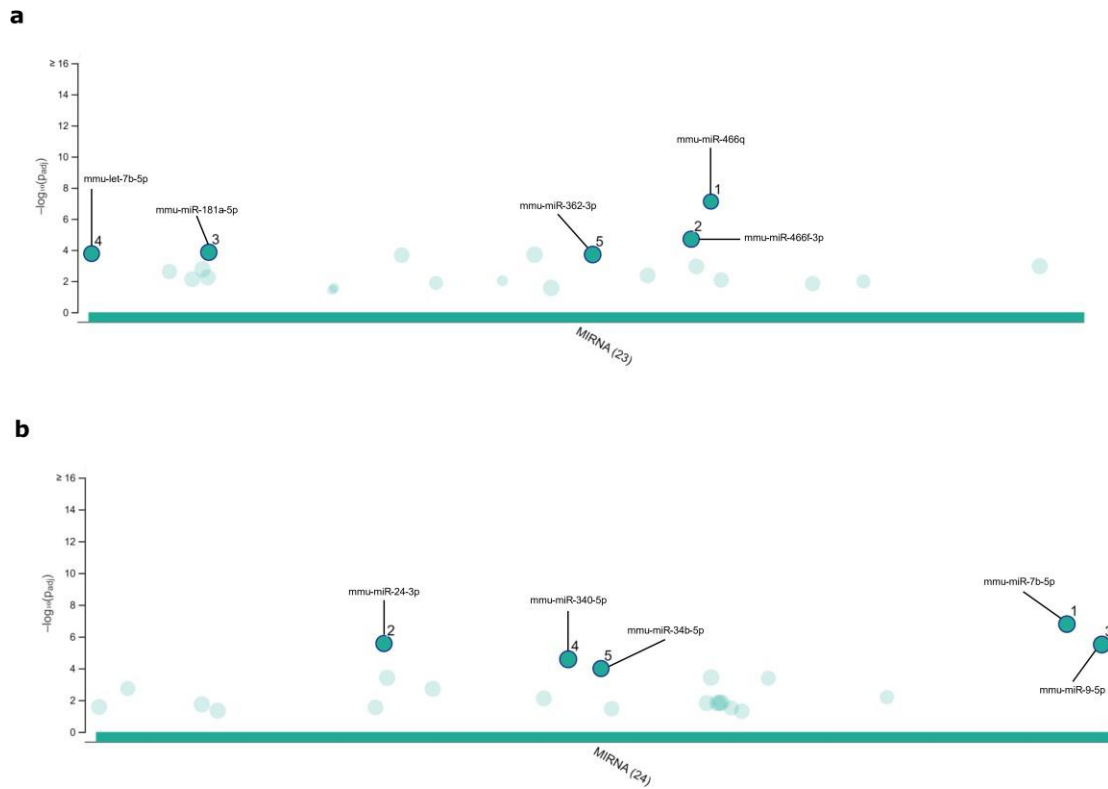
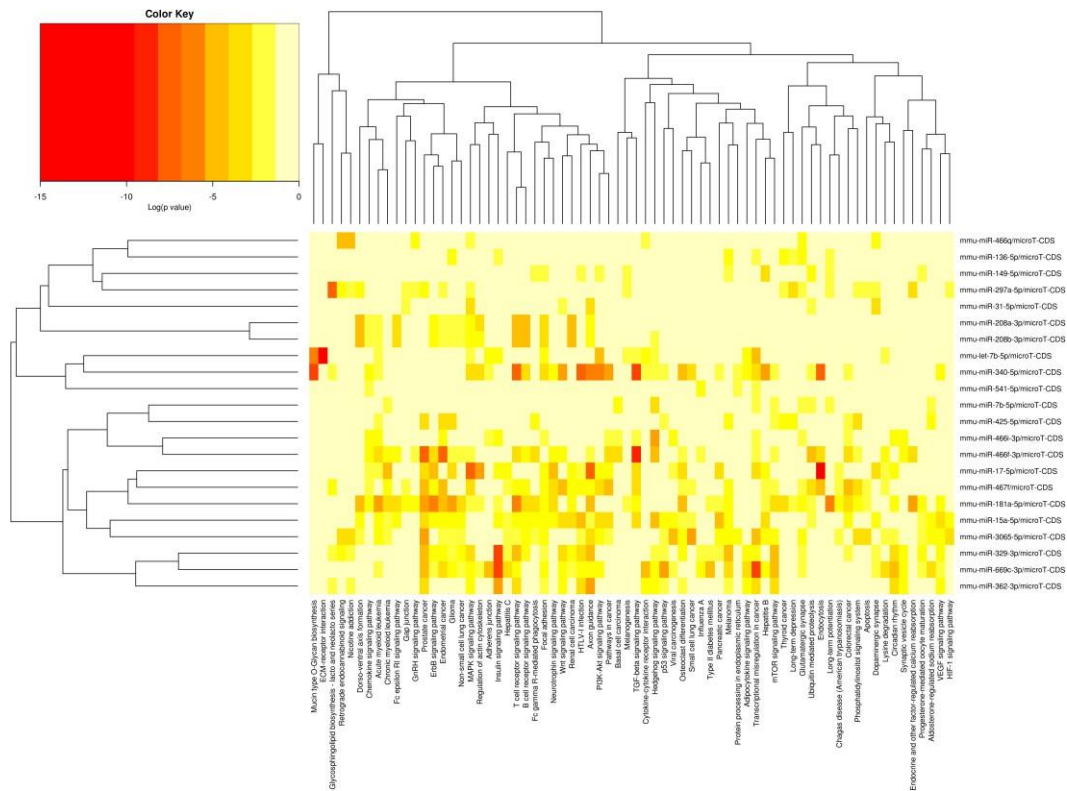


Figura 17 miRNAs diferencialmente expressos da linhagem C6 após 24 horas de exposição ao MeHg. Em (a) concentração de 0,1 μM e em (b) concentração de 6,3 μM. Os pontos destacados correspondem aos cinco miRNAs mais significativos. O eixo X representa os miRNAs afetados após a exposição, enquanto o eixo Y mostra os valores P ajustados na escala log10 negativa





eucariotos, leveduras e humanos. Cada cascata de sinalização é iniciada por sinais extracelulares específicos, como interações com uma pequena GTPase (família Rho GTPases, Cdc42 e Rac), fatores de crescimento ou estresses ambientais. Uma vez ativada, o módulo MAPK fosforila diversos substratos-alvo no citosol e no núcleo, incluindo fatores de transcrição que modulam a expressão gênica (MORRISON, 2012; MARQUINA et al., 2022).

Em uma análise mais aprofundada a respeito dos miRNAs, observou-se ainda que dos 23 miRNAs que foram alterados após a exposição da linhagem C6 a menor concentração de MeHg, três compõem a família miR-466 (miR-466 f/i- 3p e miR-466q). Na maior concentração, seis do total de 24 miRNAs afetados pelo MeHg fazem parte da família miR-466 (miR-466 k/q, miR-466f-3p, miR-466 l/d/i- 5p). Além disso, entre os dois grupos expostos nove miRNAs foram compartilhados (miR-7b-5p, miR-17-5p, let-7b-5p, miR-466q, miR-466f-3p, miR-467f, miR-149-5p, miR-669c-3p, miR-340-5p).

Há poucos estudos na literatura que associem a intoxicação por MeHg a níveis de expressão de miRNAs. Li et al. (2015) avaliaram o perfil expressão de miRNAs de placentas humanas expostas a poluentes ambientais, entre eles o mercúrio. Estes autores observaram que o alto nível de Hg foi associado a expressão reduzida de 17 miRNAs nas amostras, dentre os quais destacou-se a família let-7 com seis miRNAs (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, e let-7i). Em nosso estudo, observou-se que na linhagem celular C6 o let-7b-5p foi afetado pelas duas concentrações de MeHg, corroborando esses achados.

Como estudos relacionando a exposição ao MeHg e miRNAs são escassos, buscou-se estudos que avaliassem a exposição a metais e a expressão de miRNAs. Nesse sentido, o trabalho de Liu & Bain (2018) demonstrou que o arsênico (As) pode prejudicar a diferenciação de células-tronco, alterando a expressão de vários miRNAs, incluindo miR-9, miR-92a, miR-199a, miR-291a, miR-709 e membros do agrupamento miR-466-467-669. Em nosso estudo, quando a linhagem celular C6 foi exposta ao MeHg observou-se que vários miRNA da família miR-466, e dois miRNAs das famílias miR-467 (um) e miR-669 (um) foram afetados por essa exposição, entretanto somente os miRNAs miR-466-q (0,1 e 6,3  $\mu$ M) e miR-9-5p (apenas para o tratamento de 6,3  $\mu$ M) corroboram os achados acima citados. Sabe-se que miR-9 é específico do cérebro e sua inibição afeta a neurogenese em células tronco embrionárias (KRICHEVSKY et al., 2006). Dessa forma, sugere-se que a expressão dos miRNAs observados em nossos estudos possam estar envolvidos com os efeitos do MeHg na neurogenese já descritos na literatura (dos SANTOS et al., 2016).

Para correlacionar os genes diferencialmente expressos na linhagem C6 com anormalidades fenóticas encontradas em doenças humanas, utilizamos o Human Phenotype Ontology (HPO). Observamos que para ambas as concentrações os termos foram enriquecidos principalmente em anormalidades envolvendo o sistema nervoso (Fig. 20A e 20B). Nesse sentido, os termos comuns nas duas concentrações foram: anormalidades fenóticas, anormalidades nos sistemas nervoso e musculo esquelético, anormalidades na morfologia do SNC e neurodesenvolvimento anormal. Em adição, para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  destacaram-se ainda os termos: hipotonia, baixo QI e aplasia/hipoplasia envolvendo o SNC. Para o tratamento de 6,3  $\mu\text{M}$ , os termos HPO exclusivos foram: anormalidade na função mental superior e na morfologia do cérebro, e atraso no neurodesenvolvimento.

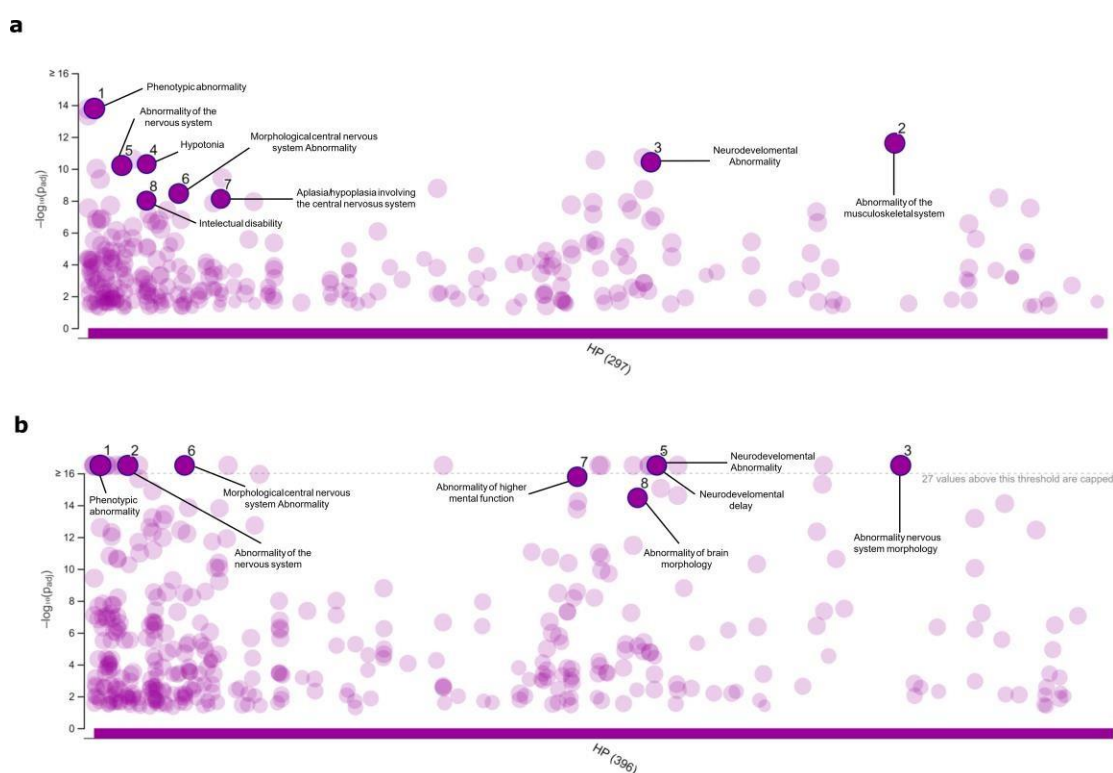


Figura 20 Termos HPO mais significativos da linhagem celular C6 após 24 horas de exposição ao MeHg. Em (a) concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e (b) concentração de 6,3  $\mu\text{M}$ . Os pontos destacados correspondem aos oito termos HPO mais significativos. O eixo X representa os termos HPO após a exposição, enquanto o eixo Y mostra os valores P ajustados na escala  $\log_{10}$  negativa.

Buscando restringir nosso conjunto de DEGs para a linhagem C6 exposta ao MeHg, optou-se por destacar os genes com maiores FC para as duas concentrações testadas. Assim, no tratamento de 0,1  $\mu\text{M}$  destacaram-se os genes *Aldh1l2* ( $\log_2$  FC - 3.5891192), *Dact1* ( $\log_2$  FC -3.3349226) e *6430573P05Rik* ( $\log_2$  FC -3.1973913). Com



relação a exposição de 6,3  $\mu\text{M}$ , os genes com maior FC foram *Rps4l* (log<sub>2</sub> FC 3.3716965), *Ankrd44* (log<sub>2</sub> FC 3.3023992) e *2610318N02Rik* (log<sub>2</sub> FC -3.0360851). Entre os dois grupos expostos (0,1 e 6,3  $\mu\text{M}$ ) três genes foram compartilhados, são eles: *Rps4l*, *Lamb3* e *Gm 41386*. Todos os genes acima citados possuem ortólogos humanos, exceto os genes *6430573P05Rik*, *2610318N02Rik*, *Rps4l* e *Gm 41386* que são exclusivos de camundongos, e o último gene é predito. Assim, nosso estudo buscou caracterizar os genes com maiores FC ou comuns aos dois grupos expostos ao MeHg.

O gene ALDH1L2 (aldeído desidrogenase 1 membro da família L2) codifica uma enzima mitocondrial envolvida no metabolismo do folato, que converte 10-formiltetraidrofolato (10-fTHF) em THF (tetraidrofolato) e CO<sub>2</sub> em uma reação dependente de NADP<sup>+</sup>. Embora o significado biológico desta enzima não seja totalmente compreendido, foi relatado que a reação catalisada por ALDH1L2 é uma importante fonte de NADPH nas mitocôndrias. O NADPH produzido nessa reação é necessário para a redução da glutatona oxidada (GSSG), e a perda do gene ALDH1L2 altera a relação GSH/GSSG. Isso, por sua vez, diminui a capacidade das mitocôndrias de eliminar espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo (KRUPENKO & KRUPENKO, 2018). Sabe-se, também, que a perda desse gene afeta tanto a morfologia mitocondrial quanto o pool de metabólitos relevantes para a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxo, além de desregular o metabolismo lipídico que leva a redução nos níveis de ATP nas mitocôndrias (SARRET et al.; 2019; KRUEENKO et al., 2020). Em nosso estudo, o gene *Aldh1l2* foi regulado negativamente na linhagem celular C6 após a exposição de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg, sendo este o gene com maior FC nesse grupo tratado. De fato, a exposição ao mercúrio causa disfunção mitocondrial e estresse oxidativo tanto *in vitro* quanto *in vivo* em diferentes modelos experimentais (FUJIMURA & USUKI, 2018; LEE et al., 2016; ZAO et al., 2020; NOGUEIRA et al. 2021; NOGUEIRA et al. 2019; SOUSA-RODRIGUES et al., 2021; PIEROZAN et al., 2016; BITENCOURT et al., 2017; ARRIFANO et al., 2021), e a forte regulação negativa deste gene pode estar envolvida na origem dos danos relacionados ao estresse oxidativo subjacente aos efeitos citotóxicos do MeHg.

Os genes DACT (dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1; ou Dapper/MDpr/ Frodo) codificam uma família de três membros de proteínas que são encontrados em vertebrados, os quais têm papéis importantes na regulação da sinalização. DACT1 é um membro da família DACT, e a proteína codificada por este gene pertence à família dapper, caracterizada pela presença do motivo de ligação de PDZ no C-terminal.

Este gene desempenha um papel específico na modulação das vias de sinalização Wnt canônicas e não canônicas por meio da interação com proteínas da família DSH (Dishevelled), e dependendo do seu estado de fosforilação este gene pode tanto ativar quanto inibir essas vias. O Dact1 desempenha um importante papel em vários processos durante o desenvolvimento de vertebrados, incluindo gastrulação e movimentos morfológicos, somitogênese, desenvolvimento da notocorda e da cabeça e formação do coração. Além disso, este gene é expresso durante a miogênese esquelética em galinhas e camundongos e é modulado em doenças musculares humanas. Mutações no gene Dact 1/DACT 1 estão relacionadas a defeitos no fechamento do tubo neural em camundongos e em seres humano, uma vez que essas mutações levam a sinalização desregulada da via de polaridade celular planar (Wnt não canônica), a qual desempenha um papel crítico no fechamento do tubo neural. Além disso, mutações nos genes VANGL 1 e VANGL 2 (genes chaves para mesma via), desempenham papéis importantes nesses defeitos em seres humanos (KIBAR et al., 2007; SHI et al., 2012; HOU et al., 2014; HOU et al., 2019; CONTRICIANI et al., 2021). Em nosso estudo, os genes Dact 1 e Vangl 1 foram regulados negativamente quando a linhagem celular C6 foi exposta a concentração de 0,1  $\mu$ M de MeHg (a alteração em Dact 1 foi correspondente ao segundo maior FC para este grupo tratado). A expressão do gene Dact 1 foi relacionada com distrofias e doenças musculares como a miopatia quadriplégica aguda, na qual este gene foi regulado negativamente (CONTRICIANI et al., 2021). De fato, a intoxicação por mercúrio é conhecida por causar miopatia, uma vez que este metal causa alterações no diâmetro das fibras musculares, atrofia e até mesmo necrose da fibra muscular, o que pode estar relacionado com os sintomas de coordenação motora descritos após a intoxicação por este metal (GONÇALES, 2021; COPAN et al., 2015; ALBERS et al. 2020). Por outro lado, a regulação positiva do gene DACT1 foi descrita no desenvolvimento normal da placenta humana. A expressão de DACT1 aumenta a partir da sétima semana gestacional, momento em que o sistema nervoso, ossos e outros tecidos estão mais desenvolvidos (HOU et al., 2014). A exposição intrauterina ao MeHg ocorre por conta da sua capacidade de atravessar a barreira placentária podendo causar várias consequências para o feto, tais como aborto espontâneo e morte após 20 semanas de gestação (DOS SANTOS et al., 2016). Nesse sentido, sugere-se que a regulação negativa do gene Dact1 em nosso estudo pode estar relacionada com um mal desfecho para a gestação.

O gene 6430573P05Rik (RIKEN cDNA 6430573P05) também conhecido como Gm1648 representa o terceiro maior FC da linhagem celular C6 após a exposição a

concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeHg. Este gene é um ncRNA exclusivo da espécie *Mus musculus*, logo não possui ortólogo em seres humanos. Nosso trabalho demonstrou que 6430573P05Rik foi regulado negativamente para esse grupo tratado. Até onde sabemos, este é o primeiro relato da associação deste gene com a intoxicação por metais.

O gene Rps4l (ribosomal protein S4-like) foi regulado positivamente em nossos achados, e corresponde ao gene com maior FC quando a linhagem C6 foi exposta a concentração de 6,3 $\mu\text{M}$ . Além disso, esse gene teve sua expressão aumentada em ambas as concentrações testadas. A proteína ribossômica semelhante a S4 recebeu este nome por apresentar uma sequência de aminoácidos 93% idêntica da proteína ribossômica S4 ligada ao X (Rps4x). O gene que codifica essa proteína é um pseudogene exclusivo da espécie *Mus musculus*, e sua expressão ocorre predominantemente no testículo de camundongos. O Rps4l foi detectado de forma ubíqua no citoplasma de células germinativas masculinas em testículos de camundongos adultos e juvenis. Adicionado a isto, sugere-se um potencial envolvimento de proteínas ribossômicas, como a Rps4l, na espermatogênese por meio da tradução. Uma vez que, a expressão anormal de genes de proteínas ribossômicas afeta a biogênese do ribossomo, que é essencial para a tradução em todas as células (SUGIHARA et al., 2013). Não há, até o momento, outros relatos de expressão genica deste gene relacionado a exposição por metais, sendo este o primeiro estudo que demonstrou esta associação.

O Gene Ankrd44, Ankyrin Repeat Domain 44, codifica a proteína Serina/treonina-proteína fosfatase 6 reguladora da subunidade B de repetição de anquirina. Acredita-se que a função desta proteína seja o reconhecimento de substratos de fosfoproteínas, entretanto sua função não foi totalmente elucidada (OHAMA, 2018; ZIEMBIK et al., 2017). Sabe-se, porém, que a associação entre subunidades da proteína fosfatase-6 e Ankdrs 28 e 44 induziram mitose anormal em cultura de células de melanoma (GOLD et al., 2014). Em nossos achados, o gene Ankrd44 foi regulado positivamente na linhagem celular C6 exposta a concentração de 6,3  $\mu\text{M}$  de MeHg, sendo o segundo maior FC para este grupo tratado. Não encontramos outros registros na literatura que associem este gene a intoxicação por metais, sendo este o primeiro registro nesse sentido.

O terceiro gene mais significativo (FC-3.0360851) da linhagem C6 após o tratamento de 6,3  $\mu\text{M}$  de MeHg, foi o gene 2610318N02Rik (RIKEN cDNA 2610318N02), o qual é exclusivo de camundongos e foi regulado negativamente em nosso estudo. Há poucos relatos sobre este gene na literatura, e nenhum deles relacionado a intoxicação por metais. Além disso, nenhuma função conhecida foi relatada para este

gene. Até o momento o que se sabe é que o gene 2610318N0Rik pode ser regulado negativamente por TGF- $\beta$ 1- fator transformador de crescimento beta 1 (CASTRO et al., 2014).

O Gene LAMB3 (Laminina Subunidade Beta 3) codifica a proteína laminina beta 3, que juntamente com as subunidades gama e alfa formam a laminina332, anteriormente conhecida como laminina 5, que pertence à família de proteínas da membrana basal. Esta proteína é considerada essencial para junção dermoepidérmica, sendo considerada uma ponte molecular entre os queratinócitos basais da epiderme e a derme subjacente. Dessa forma, a laminina 332 atua como suporte para adesão dermoepidérmica. Mutações nos genes que codificam as subunidades de laminina332, como o gene LAMB3, podem ter como consequência a ausência ou redução dessa proteína, o que resulta na sua perda de função. Entre as doenças relacionadas a mutações no gene LAMB3, estão a epidermólise bolhosa juncional tipo Herlitz e epidermólise bolhosa benigna atrófica generalizada. Sendo este gene responsável por cerca de 80% dos casos graves dessas doenças (MARIATH et al., 2020; TAN et al., 2022). O gene Lamb3 foi regulado positivamente em nossos achados, tanto na concentração de 0,1 quando 6,3  $\mu$ M. Não encontramos outros relatos na literatura da expressão aumentada deste gene quando exposto ao MeHg ou a metais, sendo este o primeiro relato.

Assim, nossos resultados demonstraram que a exposição a baixas concentrações de MeHg (não citotóxicas) e concentrações que correspondem a Lc50 podem modular significativamente o transcriptoma das linhagens celulares B013 e C6 após 24 horas de exposição. Além disso, foi demonstrado ainda que esta exposição afeta a ligação de proteínas, como a serotonina, pequenas GTPase e proteínas do citoesqueleto; assim como a transdução de sinal e a atividade do transportador de íons. No que diz respeito a transdução de sinal, observou-se que a ligação de segundos mensageiros, tais como a ligação do GPCR e RHO GTPases, foi demonstrada tanto entre vias enriquecidas pelo REACTOME quanto pelas vias moduladas por meio dos miRNAs reguladores. Entre as principais vias de transdução de sinal associadas a esta exposição estão as vias MAPK, PI3K-akt, adesão focal e a via de regulação do citoesqueleto de actina.

Nosso estudo demonstrou também que dois importantes genes relacionados a migração celular, Dcx e Cdc42se2, tiveram sua expressão regulada pelo MeHg e podem ser genes chaves para explicar os mecanismos pelos quais essa substância afeta a migração. Outro gene destacado em nossos achados foi o gene Crem, que pode explicar a associação entre a exposição ao MeHg e o comprometimento de funções reprodutivas.

Sabe-se que a exposição ao MeHg tem como uma de suas consequências a perda ou comprometimento auditivo, o que pode ser explicado pela regulação da expressão do gene *Otoa* observada em nosso estudo. Observou-se, ainda, que a intoxicação pelo MeHg regulou a expressão do gene *Aldh112*, a qual pode estar envolvida na origem dos danos relacionados ao estresse oxidativo decorrentes do MeHg, e do gene *Dact 1*. A expressão do gene *Dact 1* já foi associada a distrofias musculares, como a miopatia quadriplégica aguda, e ao desenvolvimento normal da placenta humana que estão intimamente associados com a intoxicação pelo MeHg. Além desses genes, também foi observado que a exposição ao MeHg causa mudanças significativas na regulação dos genes *4930449C09Rik*, *Trim14*, *6430573P05Rik*, *2610318N02Rik*, *Rps41*, *Ankrd44* e *Lamb3*. Até o momento não há outros registros que associem a intoxicação por metais a estes genes, sendo este o primeiro estudo nesse sentido.

Por fim, ressaltamos que mais estudos são necessários para confirmar as hipóteses levantadas nesse trabalho e que os genes aqui identificados podem dar suporte a pesquisas adicionais para uma melhor compreensão dos efeitos do MeHg.

**REFERENCIAS**

A, ALBERS, GIES U, RAATSCHEN HJ, AND KLINTSCHAR M. 2020. "Another umbrella murder? - A rare case of Minamata disease." *Forensic science, medicine, and pathology* 16 (3).

A, ANTUNES DOS SANTOS, APPEL HORT M, CULBRETH M, LÓPEZ-GRANERO C, FARINA M, ROCHA JB, AND ASCHNER M. 2016. "Methylmercury and brain development: A review of recent literature." *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 38.

A, HASAN, DANKER KY, WOLTER S, BÄHRE H, KAEVER V, AND SEIFERT R. 2014. "Soluble adenylyl cyclase accounts for high basal cCMP and cUMP concentrations in HEK293 and B103 cells." *Biochemical and biophysical research communications* 448 (2).

A, SADOK, AND MARSHALL CJ. 2014. "Rho GTPases: masters of cell migration." *Small GTPases* 5.

AC, BUCH, BROWN GG, CORREIA MEF, LOURENÇATO LF, AND SILVA-FILHO EV. 2017. "Ecotoxicology of mercury in tropical forest soils: Impact on earthworms." *The Science of the total environment* 589.

AC, HOSHINO, FERREIRA HP, MALM O, CARVALLO RM, AND CÂMARA VM. 2012. "A systematic review of mercury ototoxicity." *Cadernos de saude publica* 28 (7).

AH, SOUSA, PEREIRA JPG, MALAQUIAS AC, SAGICA FDES, AND DE OLIVEIRA EHC. 2022. "Intracellular accumulation and DNA damage caused by methylmercury in glial cells." *Journal of biochemical and molecular toxicology* 36 (10).

AKR, SOUZA, MORASSUTI CY, DEUS WB. 2018. POLUIÇÃO DO AMBIENTE POR METAIS PESADOS E UTILIZAÇÃO DE VEGETAIS COMO BIOINDICADORES. *Acta Biomedica Brasiliensia / Volume 9/ nº 3*.

AM, KRICHEVSKY, SONNTAG KC, ISACSON O, AND KOSIK KS. 2006. "Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis." *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (4).

B, PUTY, BITTENCOURT LO, PLAÇA JR, DE OLIVEIRA EHC, AND LIMA RR. 2023. "Astrocyte-Like Cells Transcriptome Changes After Exposure to a Low and Non-cytotoxic MeHg Concentration." *Biological trace element research* 201 (3).

B, PUTY, LEÃO LKR, CRESPO-LOPEZ ME, ALMEIDA APCPSC, FAGUNDES NCF, MAIA LC, AND LIMA RR. 2019. "Association between methylmercury environmental exposure and neurological disorders: A systematic review." *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 52.

BA, HEMMINGS, AND RESTUCCIA DF. 2012. "PI3K-PKB/Akt pathway." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (9).

BELLINGER, D.C. 2023. "Environmental chemical exposures and neurodevelopmental impairments in children." *Pediatric medicine*.

BH, CHOI, LAPHAM LW, AMIN-ZAKI L, AND SALEEM T. 1978. "Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 37.

BJ, KIM, KIM DK, HAN JH, OH J, KIM AR, LEE C, KIM NK, PARK HR, KIM MY, LEE S, LEE S, OH DY, PARK WY, PARK S, AND CHOI BY. 2019. "Clarification of glycosylphosphatidylinositol anchorage of OTOANCORIN and human OTOA variants associated with deafness." *Human mutation* 40 (5).

BQ, GUO, YAN CH, CAI SZ, YUAN XB, AND SHEN XM. 2013. "Low level prenatal exposure to methylmercury disrupts neuronal migration in the developing rat cerebral cortex." *Toxicology* 304.

BT, SCHAAR, KINOSHITA K, AND MCCONNELL SK. 2004. "Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons." *Neuron* 41 (2).

C, SARRET, ASHKAVAND Z, PAULES E, DORBOZ I, PEDIADITAKIS P, SUMNER S, EYMARD-PIERRE E, FRANCANNET C, KRUPENKO NI, BOESPFLUG-TANGUY O, AND KRUPENKO SA. 2019. "Deleterious mutations in ALDH1L2 suggest a novel cause for neuro-ichthyotic syndrome." *NPJ genomic medicine* 4.

C, WANG, CHEN Y, MANTHARI RK, AND WANG J. 2018. "Abnormal spermatogenesis following sodium fluoride exposure is associated with the downregulation of CREM and ACT in the mouse testis." *Toxicology and industrial health* 34 (4).

CR, HAMANN, BOONCHAI W, WEN L, SAKANASHI EN, CHU CY, HAMANN K, HAMANN CP, SINNI AH K, AND HAMANN D. 2014. "Spectrometric analysis of mercury content in 549 skin-lightening products: is mercury toxicity a hidden global health hazard?" *Journal of the American Academy of Dermatology* 70 (2).

D, SCHUBERT, HEINEMANN S, CARLISLE W, TARIKAS H, KIMES B, PATRICK J, STEINBACH JH, CULP W, AND BRANDT BL. 1974. "Clonal cell lines from the rat central nervous system." *Nature* 249 (454).

DA, FOSSATO DA SILVA, TEIXEIRA CT, SCARANO WR, FAVARETO AP, FERNANDEZ CD, GROTTTO D, BARBOSA F, AND KEMPINAS WDE G. 2011. "Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats." *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 31 (4).

DK, MORRISON. 2012. "MAP kinase pathways." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (11).

DMS, ABESSA, AMBROZEVICIUS, AP. 2008. *Poluição aquática e tratamentos de esgotos*. 1ª ed. São Vicente: Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

- E, DING, GUO J, BAI Y, ZHANG H, LIU X, CAI W, ZHONG L, AND ZHU B. 2017. "MiR-92a and miR-486 are potential diagnostic biomarkers for mercury poisoning and jointly sustain NF- $\kappa$ B activity in mercury toxicity." *Scientific reports* 7 (1).
- EA, ALVAREZ, MOCHÓN MC, JIMÉNEZ SÁNCHEZ JC, AND TERNERO RODRÍGUEZ M. 2002. "Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants." *Chemosphere* 47 (7).
- EC, TAN, DIANA IA, WEI H, GONDOKARYONO SP, DWIYANA RF, YOGYA Y, RAHARDJA JI, AND KOH MJ. 2022. "Novel LAMB3 variants in two Asian patients and an overview of LAMB3 variants associated with generalized intermediate junctional epidermolysis bullosa." *The Australasian journal of dermatology* 63 (4).
- G, LETTIERI, CARUSONE N, NOTARIALE R, PRISCO M, AMBROSINO A, PERRELLA S, MANNA C, AND PISCOPO M. 2022. "Morphological, Gene, and Hormonal Changes in Gonads and In-Creased Micrococcal Nuclease Accessibility of Sperm Chromatin Induced by Mercury." *Biomolecules* 12 (1).
- GB, DAMAS, BERTOLDO B, COSTA LT. 2014. Mercury: from Antiquity to Nowadays. *Rev. Virtual Quim.*, 6 (4), 1010-1020.
- GP, ARRIFANO, AUGUSTO-OLIVEIRA M, SOUZA-MONTEIRO JR, MACCHI BM, LIMA RR, SUÑOL C, DO NASCIMENTO JLM, AND CRESPO-LOPEZ ME. 2021. "Revisiting Astrocytic Roles in Methylmercury Intoxication." *Molecular neurobiology* 58 (9).
- H, NINOMIYA, INTOH A, ISHIMINE H, ONUMA Y, ITO Y, MICHIE T, TAZAKI A, AND KATO M. 2020. "Application of a human mesoderm tissue elongation system in vitro derived from human induced pluripotent stem cells to risk assessment for teratogenic chemicals." *Chemosphere* 250.
- HL, GOLD, WENGROD J, DE MIERA EV, WANG D, FLEMING N, SIKKEMA L, KIRCHHOFF T, HOCHMAN T, GOLDBERG JD, OSMAN I, AND GARDNER LB. 2014. "PP6C hotspot mutations in melanoma display sensitivity to Aurora kinase inhibition." *Molecular cancer research : MCR* 12 (3).
- J, HOU, WEN YH, FENG KN, MA XF, AND YAO JP. 2015. "DACT1 is involved in human placenta development by promoting Wnt signaling." *Archives of gynecology and obstetrics* 291 (6).
- J, HOU, YUE Y, HU B, XU G, SU R, LV L, HUANG J, YAO J, GUAN Y, WANG K, AND WU Z. 2019. "DACT1 Involvement in the Cytoskeletal Arrangement of Cardiomyocytes in Atrial Fibrillation by Regulating Cx43." *Brazilian journal of cardiovascular surgery* 34 (6).
- J, ZHOU, WANG Z, SUN T, ZHANG H, AND ZHANG X. 2016. "Mercury in terrestrial forested systems with highly elevated mercury deposition in southwestern China: The risk to insects and potential release from wildfires." *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 212.



JC, PENDERGRASS, HALEY BE, VIMY MJ, WINFIELD SA, AND LORSCHIEDER FL. 1997. "Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain." *Neurotoxicology* 18 (2).

JJ, DAY, REED MN, AND NEWLAND MC. 2005. "Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methyl mercury and fish oil." *Neurotoxicology and teratology* 27 (4).

JP, NOVO, MARTINS B, RAPOSO RS, PEREIRA FC, ORIÁ RB, MALVA JO, AND FONTES-RIBEIRO C. 2021. "Cellular and Molecular Mechanisms Mediating Methylmercury Neurotoxicity and Neuroinflammation." *International journal of molecular sciences* 22 (6).

JR, GERSON, SZPONAR N, ZAMBRANO AA, BERGQUIST B, BROADBENT E, DRISCOLL CT, ERKENSWICK G, EVERS DC, FERNANDEZ LE, HSU-KIM H, INGA G, LANSDALE KN, MARCHESE MJ, MARTINEZ A, MOORE C, PAN WK, PURIZACA RP, SÁNCHEZ V, SILMAN M, URY EA, VEGA C, WATSA M, AND BERNHARDT ES. 2022. "Amazon forests capture high levels of atmospheric mercury pollution from artisanal gold mining." *Nature communications* 13 (1).

JY, LEE, ISHIDA Y, TAKAHASHI T, NAGANUMA A, AND HWANG GW. 2016. "Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity." *Scientific reports* 6.

K, DACK, FELL M, TAYLOR CM, HAVDAHL A, AND LEWIS SJ. 2022. "Prenatal Mercury Exposure and Neurodevelopment up to the Age of 5 Years: A Systematic Review." *International journal of environmental research and public health* 19 (4).

K, KOIZUMI, OKU M, HAYASHI S, INUJIMA A, SHIBAHARA N, CHEN L, IGARASHI Y, TOBE K, SAITO S, KADOWAKI M, AND AIHARA K. 2019. "Identifying pre-disease signals before metabolic syndrome in mice by dynamica network biomarkers." *Scientific reports* 9 (1).

K, MIURA, KOIDE N, HIMENO S, NAKAGAWA I, AND IMURA N. 1999. "The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines." *Toxicology and applied pharmacology* 160 (3).

KH, WASSICK, AND YONOVITZ A. 1985. "Methyl mercury ototoxicity in mice determined by auditory brainstem responses." *Acta oto-laryngologica* 99 (1-2).

KL, CRUMP, AND TRUDEAU VL. 2009. "Mercury-induced reproductive impairment in fish." *Environmental toxicology and chemistry* 28 (5).

L, COPAN, FOWLES J, BARREAU T, AND MCGEE N. 2015. "Mercury Toxicity and Contamination of Households from the Use of Skin Creams Adulterated with Mercurous Chloride (Calomel)." *International journal of environmental research and public health* 12 (9).

L, MONACO, KOTAJA N, FIENGA G, HOGVEEN K, KOLTHUR US, KIMMINS S, BRANCORSINI S, MACHO B, AND SASSONE-CORSI P. 2004. "Specialized rules of

gene transcription in male germ cells: the CREM paradigm." *International journal of andrology* 27 (6).

LD, LACERDA, dos SANTOS AF, MARINS RV. 2007. Mercury emissions to the atmosphere from natural gas burning in Brazil. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 366-369.

LIU, T.J.; BAIN, L.J. 2018. Arsenic Induces Members of the mmu-miR-466-669 Cluster Which Reduces NeuroD1 Expression. *Toxicological Sciences*, Vol. 162, No. 1.

LM, MARIATH, SANTIN JT, SCHULER-FACCINI L, AND KISZEWSKI AE. 2020. "Inherited epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects." *Anais brasileiros de dermatologia* 95 (5).

LO, BITTENCOURT, MATTA PPM, NASCIMENTO PC, EIRÓ-QUIRINO L, ARAGÃO WAB, DIONIZIO A, FERNANDES LMP, SILVA MCF, BUZALAF MAR, ASCHNER M, CRESPO-LOPEZ ME, MAIA CSF, AND LIMA RR. 2022. "Deciphering the Global Proteomic Profile Involved in Methylmercury-Induced Cerebellar Neurodegeneration and Motor Dysfunction in Adult Rats." *Toxics* 10 (9).

LO, BITTENCOURT, PUTY B, CHARONE S, ARAGÃO WAB, FARIAS-JUNIOR PM, SILVA MCF, CRESPO- LOPEZ ME, LEITE AL, BUZALAF MAR, AND LIMA RR. 2017. "Oxidative Biochemistry Disbalance and Changes on Proteomic Profile in Salivary Glands of Rats Induced by Chronic Exposure to Methylmercury." *Oxidative medicine and cellular longevity*.

LS, NOGUEIRA, VASCONCELOS CP, MITRE GP, DA SILVA KATAOKA MS, LIMA MO, DE OLIVEIRA EHC, AND LIMA RR. 2019. "Oxidative Damage in Human Periodontal Ligament Fibroblast (hPLF) after Methylmercury Exposure." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019.

LS, NOGUEIRA, VASCONCELOS CP, PLAÇA JR, MITRE GP, BITTENCOURT LO, KATAOKA MSDS, DE OLIVEIRA EHC, AND LIMA RR. 2021. "Non-Lethal Concentration of MeHg Causes Marked Responses in the DNA Repair, Integrity, and Replication Pathways in the Exposed Human Salivary Gland Cell Line." *Frontiers in pharmacology* 12.

M, BISINOTI, JARDIM CWF. 2004. Comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 4, 593-600.

M, FUJIMURA, AND USUKI F. 2018. "Methylmercury induces oxidative stress and subsequent neural hyperactivity leading to cell death through the p38 MAPK-CREB pathway in differentiated SH- SY5Y cells." *Neurotoxicology* 67.

M, FUJIMURA, AND USUKI F. SAWADA, M. ROSTENE, W. GODFROY, D. TAKASHIMA, A. 2012. "Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead, amyloid  $\beta$ , and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: differential expression of rho proteins associated with neurotoxicity." *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 126 (2).

M, FUJIMURA, USUKI F, SAWADA M, ROSTENE W, GODEFROY D, AND TAKASHIMA A. 2009. "Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons." *Neurotoxicology* 30 (1).

M, MARQUINA, LAMBEA E, CARMONA M, SÁNCHEZ-MARINAS M, LÓPEZ-AVILES S, AYTE J, HIDALGO E, AND ALIGUE R. 2022. "A new negative feedback mechanism for MAPK pathway inactivation through Srk1 MAPKAP kinase." *Scientific reports* 12 (1).

M, POURHADI, NIKNAM Z, GHASEMI R, ZOMORROD MS, NIAZI V, FAIZI M, ZALI H, AND MOJAB F. 2022. "Cuscuta epithimum Murr. crude extract preconditioning protects C6 cells from L-glutamate-induced neurotoxicity." *BMC complementary medicine and therapies* 22 (1).

M, SAKAMOTO, ITAI T, AND MURATA K. 2017. "[Effects of Prenatal Methylmercury Exposure: From Minamata Disease to Environmental Health Studies]." *Nihon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene* 72 (3).

M, SAKAUE, OKAZAKI M, AND HARA S. 2005. "Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation." *Toxicology* 213 (1-2).

MA, RAHMAN, KIM NH, KIM SH, OH SM, AND HUH SO. 2012. "Antiproliferative and cytotoxic effects of resveratrol in mitochondria-mediated apoptosis in rat b103 neuroblastoma cells." *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 16 (5).

MA, ZIEMBIK, BENDER TP, LARNER JM, AND BRAUTIGAN DL. 2017. "Functions of protein phosphatase-6 in NF- $\kappa$ B signaling and in lymphocytes." *Biochemical Society transactions* 45 (3).

MBL, MARQUES, AMERICO-PINHEIRO, JHP. 2018. Ecotoxicological effects of metals to aquatic organisms. *Fórum Ambiental da Alta Paulista*.

ME, CRESPO-LOPEZ, AUGUSTO-OLIVEIRA M, LOPES-ARAÚJO A, SANTOS-SACRAMENTO L, YUKI TAKEDA P, MACCHI BM, DO NASCIMENTO JLM, MAIA CSF, LIMA RR, AND ARRIFANO GP. 2021. "Mercury: What can we learn from the Amazon?" *Environment international* 146.

ME, CRESPO-LOPEZ, COSTA-MALAQUIAS A, OLIVEIRA EH, MIRANDA MS, ARRIFANO GP, SOUZA- MONTEIRO JR, SAGICA FE, FONTES-JUNIOR EA, MAIA CS, MACCHI BM, AND DO NASCIMENTO JL. 2016. "Is Low Non-Lethal Concentration of Methylmercury Really Safe? A Report on Genotoxicity with Delayed Cell Proliferation." *PloS one* 11 (9).

ME, CRESPO-LÓPEZ, HERCULANO AM, CORVELO TC, AND DO NASCIMENTO JL. 2005. "[Mercury and neurotoxicity]." *Revista de neurologia* 40 (7).

ME, CRESPO-LÓPEZ, LIMA DE SÁ A, HERCULANO AM, RODRÍGUEZ BURBANO R, AND MARTINS DO NASCIMENTO JL. 2007. "Methylmercury

genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system." *Environment international* 33 (2).

Mercúrio metálico. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/mercurio-metalico/sobre-o-mercurio-metalico#principais-fontes-emissao>. Acessado em 24.05.2022.

MH, TSAI, KUO PW, MYERS CT, LI SW, LIN WC, FU TY, CHANG HY, MEFFORD HC, CHANG YC, AND TSAI JW. 2016. "A novel DCX missense mutation in a family with X-linked lissencephaly and subcortical band heterotopia syndrome inherited from a low-level somatic mosaic mother: Genetic and functional studies." *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society* 20 (5).

MO, LIMA, MENDES L DE CS, QUEIROZ TKL, CARNEIRO BS, FAIAL KCF. 2018. Avaliação dos impactos referente ao transbordo de efluentes de lama vermelha na cidade de Barcarena, estado do Pará. Instituto Evandro chagas. SAMAM-IEC 002.

MO, LIMA, MENDES L DE CS, QUEIROZ TKL, COSTA BNS, SAILVA MMC, FERREIRA DPM, JUNIOR NTV, MARQUES LCA, CARNEIRO BS, FAIAL KCF. 2018. Avaliação preliminar dos impactos ambientais referente ao transbordo e lançamentos irregulares de efluentes de lama vermelha na cidade de Barcarena, estado do Pará. Instituto Evandro chagas. SAMAM-IEC 003.

MR, MIRANDA, COELHO-SOUSA, AS, GUIMARAES, JRD, CORREIA, RRS, OLIVEIRA, D. 2007. Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores ambientais que afetam a metilação. *Oecol. Bras.*, 11 (2): 240-251.

N, GOUVEIA, BUZZO ML, GROSSI MG, de L, DE SOUZA GF, MUTO EY. 2019. Occupational exposure to mercury in recycling cooperatives from the metropolitan region of Sao Paulo, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 24(4):1517-1526.

N, GOUVEIA, BUZZO ML, GROSSI MGL, SOUZA GF, AND MUTO EY. 2019. "Occupational exposure to mercury in recycling cooperatives from the metropolitan region of São Paulo, Brazil." *Ciencia & saude coletiva* 24 (4).

N, GUIDA, LAUDATI G, MASCOLO L, VALSECCHI V, SIRABELLA R, SELLERI C, DI RENZO G, CANZONIERO LM, AND FORMISANO L. 2017. "p38/Sp1/Sp4/HDAC4/BDNF Axis Is a Novel Molecular Pathway of the Neurotoxic Effect of the Methylmercury." *Frontiers in neuroscience* 11.

N, HACHIYA. 2006. The history and present of Minamata disease – Entering the second half a century. *JMAJ*, 49(3): 112-118.

NE, CASTRO, KATO M, PARK JT, AND NATARAJAN R. 2014. "Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) enhances expression of profibrotic genes through a novel signaling cascade and microRNAs in renal mesangial cells." *The Journal of biological chemistry* 289 (42).

NI, KRUPENKO, SHARMA J, PEDIADITAKIS P, HELKE KL, HALL MS, DU X, SUMNER S, AND KRUPENKO SA. 2020. "Aldh112 knockout mouse metabolomics

links the loss of the mitochondrial folate enzyme to deregulation of a lipid metabolism observed in rare human disorder." *Human genomics* 14 (1).

P, BENDA, LIGHTBODY J, SATO G, LEVINE L, AND SWEET W. 1968. "Differentiated rat glial cell strain in tissue culture." *Science (New York, N.Y.)* 161 (3839).

P, GRANDJEAN, AND LANDRIGAN PJ. 2014. "Neurobehavioural effects of developmental toxicity." *The Lancet. Neurology* 13 (3).

P, OUDAR, CAILLARD L, AND FILLION G. 1989. "In vitro effect of organic and inorganic mercury on the serotonergic system." *Pharmacology & toxicology* 65 (4).

P, PIEROZAN, BIASIBETTI H, SCHMITZ F, ÁVILA H, FERNANDES CG, PESSOA-PUREUR R, AND WYSE ATS. 2017. "Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: the Cytoskeleton as a Main Target." *Molecular neurobiology* 54 (8).

Q, LI, KAPPIL MA, LI A, DASSANAYAKE PS, DARRAH TH, FRIEDMAN AE, FRIEDMAN M, LAMBERTINI L, LANDRIGAN P, STODGELL CJ, XIA Y, NANES JA, AAGAARD KM, SCHADT EE, MURRAY JC, CLARK EB, DOLE N, CULHANE J, SWANSON J, VARNER M, MOYE J, KASTEN C, MILLER RK, AND CHEN J. 2015. "Exploring the associations between microRNA expression profiles and environmental pollutants in human placenta from the National Children's Study (NCS)." *Epigenetics* 10 (9).

R, KIRUBAGARAN, AND JOY KP. 1988. "Inhibition of testicular 3 beta-hydroxy-delta 5- steroid dehydrogenase (3 beta-HSD) activity in catfish *Clarias batrachus* (L.) by mercurials." *Indian journal of experimental biology* 26 (11).

R, PATNAIK, AND PADHY RN. 2018. "Comparative study on toxicity of methylmercury chloride and methylmercury hydroxide to the human neuroblastoma cell line SH- SY5Y." *Environmental science and pollution research international* 25 (21).

R, SIBLERUD, MUTTER J, MOORE E, NAUMANN J, AND WALACH H. 2019. "A Hypothesis and Evidence That Mercury May be an Etiological Factor in Alzheimer's Disease." *International journal of environmental research and public health* 16 (24).

RD, DE SOUZA-RODRIGUES, PUTY B, BONFIM L, NOGUEIRA LS, NASCIMENTO PC, BITTENCOURT LO, COUTO RSD, BARBOZA CAG, DE OLIVEIRA EHC, MARQUES MM, AND LIMA RR. 2021. "Methylmercury-induced cytotoxicity and oxidative biochemistry impairment in dental pulp stem cells: the first toxicological findings." *PeerJ* 9.

RE, CONTRICIANI, DA VEIGA FC, DO AMARAL MJ, CASTELUCCI BG, DE SOUSA LM, DE JESUS MB, CONSONNI SR, COLLARES-BUZATO CB, MERMELSTEIN C, DIETRICH S, AND ALVARES LE. 2021. "Dact1 is expressed during chicken and mouse skeletal myogenesis and modulated in human muscle diseases." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 256.

REVIEW OF MINAMATA CONVENTION INITIAL ASSESSMENT REPORTS: KEY FINDINGS FOR HEALTH. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2021.

RM, SILVA. 2014. Metilação de mercúrio em águas da região amazônica na presença e ausência de macrófitas: experimentos em microcosmos. Instituto de química Araraquara. Universidade estadual paulista. Tese de doutorado, São Paulo.

S, HONG, CHOI I, WOO JM, OH J, KIM T, CHOI E, KIM TW, JUNG YK, KIM DH, SUN CH, YIGS, EDDY EM, AND CHO C. 2005. "Identification and integrative analysis of 28 novel genes specifically expressed and developmentally regulated in murine spermatogenic cells." *The Journal of biological chemistry* 280 (9).

S, HOU, SONG Y, SUN D, ZHU S, AND WANG Z. 2021. "Xanthohumol-Induced Rat Glioma C6 Cells Death by Triggering Mitochondrial Stress." *International journal of molecular sciences* 22 (9).

S, LLOP, ENGSTRÖM K, BALLESTER F, FRANFORTE E, ALHAMDOW A, PISA F, TRATNIK JS, MAZEJ D, MURCIA M, REBAGLIATO M, BUSTAMANTE M, SUNYER J, SOFIANOU-KATSOULIS A, PRASOULI A, ANTONOPOULOU E, ANTONIADOU I, NAKOU S, BARBONE F, HORVAT M, AND BROBERG K. 2014. "Polymorphisms in ABC transporter genes and concentrations of mercury in newborns--evidence from two Mediterranean birth cohorts." *PloS one* 9 (5).

S, SAAVEDRA, FERNÁNDEZ-RECAMALES Á, SAYAGO A, CERVERA-BARAJAS A, GONZÁLEZ- DOMÍNGUEZ R, AND GONZALEZ-SANZ JD. 2022. "Impact of dietary mercury intake during pregnancy on the health of neonates and children: a systematic review." *Nutrition reviews* 80 (2).

S, SHYAMASUNDAR, JADHAV SP, BAY BH, TAY SS, KUMAR SD, RANGASAMY D, AND DHEEN ST. 2013. "Analysis of epigenetic factors in mouse embryonic neural stem cells exposed to hyperglycemia." *PloS one* 8 (6).

SA, KRUPENKO, AND KRUPENKO NI. 2018. "ALDH1L1 and ALDH1L2 Folate Regulatory Enzymes in Cancer." *Advances in experimental medicine and biology* 1032. SE, MANAHAN. 1999. *Environmental Chemistry*. 7 ed. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 898pp.

T, HIRAI, ABE O, NAKAMURA M, INUI S, UETANI H, UEDA M, AND AZUMA M. 2023. "Brain structural changes in patients with chronic methylmercury poisoning in Minamata." *Brain research* 1805.

T, KINOSHITA. 2020. "Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins." *Open biology* 10 (3).

T, OHAMA. 2019. "The multiple functions of protein phosphatase 6." *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (1).

T, TOYAMA, YOSHIDA E, SHINKAI Y, AND KUMAGAI Y. 2011. "DNA microarray analysis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to methylmercury." *The Journal of toxicological sciences* 36 (6).

TB, KISAKA. 2013. Análise quantitativa de mercúrio no bioma cerrado - estudo de caso na lagoa bonita, Planaltina, DF. FACULDADE UNB PLANALTINA. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. PLANALTINA – DF.

TH, TREVIZANI. 2014 Bioacumulação de metais pesados e avaliação da biomagnificação na biota da Bahia do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

TI, SLEPAK, SALAY LD, LEMMON VP, AND BIXBY JL. 2012. "Dyrk kinases regulate phosphorylation of doublecortin, cytoskeletal organization, and neuronal morphology." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 69 (7).

TW, CLARKSON, MAGOS L, AND MYERS GJ. 2003. "The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations." *The New England journal of medicine* 349 (18).

TY, CHAN. 2011. "Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products." *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 49 (10).

TYK, CHAN. 2011. Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products. *Clin. Toxicol.*, 49, 886–891.

V, DES PORTES, PINARD JM, BILLUART P, VINET MC, KOULAKOFF A, CARRIÉ A, GELOT A, DUPUIS E, MOTTE J, BERWALD-NETTER Y, CATALA M, KAHN A, BELDJORD C, AND CHELLY J. 1998. "A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome." *Cell* 92 (1).

W, YANG, GU Z, ZHANG H, AND HU H. 2020. "To TRIM the Immunity: From Innate to Adaptive Immunity." *Frontiers in immunology* 11.

W, ZHANG, AND LIU HT. 2002. "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." *Cell research* 12 (1).

Y, SHI, DING Y, LEI YP, YANG XY, XIE GM, WEN J, CAI CQ, LI H, CHEN Y, ZHANG T, WU BL, JIN L, CHEN YG, AND WANG HY. 2012. "Identification of novel rare mutations of DACT1 in human neural tube defects." *Human mutation* 33 (10).

Y, SUGIHARA, SADOHARA E, YONEZAWA K, KUGO M, OSHIMA K, MATSUDA T, AND NADANO D. 2013. "Identification and expression of an autosomal paralogue of ribosomal protein S4, X-linked, in mice: potential involvement of testis-specific ribosomal proteins in translation and spermatogenesis." *Gene* 521 (1).

Y, ZHAO, ZHOU C, GUO X, HU G, LI G, ZHUANG Y, CAO H, LI L, XING C, ZHANG C, YANG F, AND LIU P. 2021. "Exposed to Mercury-Induced Oxidative

Stress, Changes of Intestinal Microflora, and Association between them in Mice." *Biological trace element research* 199 (5).

Z, KIBAR, TORBAN E, MCDEARMID JR, REYNOLDS A, BERGHOUT J, MATHIEU M, KIRILLOVA I, DE MARCO P, MERELLO E, HAYES JM, WALLINGFORD JB, DRAPEAU P, CAPRA V, AND GROS P. 2007. "Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects." *The New England journal of medicine* 356 (14).

Z, KNAZICKA, LUKAC N, FORGACS Z, TVRDA E, LUKACOVA J, SLIVKOVA J, BINKOWSKI L, AND MASSANYI P. 2013. "Effects of mercury on the steroidogenesis of human adrenocarcinoma (NCI-H295R) cell line." *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 48 (3).

Z, ZHOU, JIA X, XUE Q, DOU Z, MA Y, ZHAO Z, JIANG Z, HE B, JIN Q, AND WANG J. 2014. "TRIM14 is a mitochondrial adaptor that facilitates retinoic acid-inducible gene-I- like receptor-mediated innate immune response." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2).



