

ALÓDIA BRASIL COSTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Euterpe oleracea*
(AÇAÍ) NA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DA RETINA DE
RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO.**

Belém

2013

ALÓDIA BRASIL COSTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Euterpe oleracea*
(AÇAÍ) NA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DA RETINA DE
RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO.**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Neurociências e
Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Anderson
Manoel Herculano.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando
Allan Farias Rocha.

Belém

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de
Bibliotecas da UFPA

Costa, Alódia Brasil, 1988-

Avaliação do efeito protetor da euterpe oleracea (açai) na resposta eletrofisiológica da retina de ratos expostos ao metilmercúrio / Alódia Brasil Costa. - 2013.

Orientador: Anderson Manoel Herculano;

Coorientador: Fernando Allan Farias Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2013.

1. Mercurio Toxicologia. 2. Antioxidantes. 3. Retina. 4. Stress oxidativo. 5. Rato como animal de laboratório. I. Título.

CDD 22. ed. 615.925663

ALÓDIA BRASIL COSTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA *Euterpe oleracea* (AÇAÍ) NA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DA RETINA DE RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, para a comissão formada pelos seguintes professores:

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano (presidente)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Coorientador:

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha (vice-presidente)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Examinadores:

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes (membro titular)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Karen Renata Matos Oliveira (membro titular)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Maria Elena Crespo López (membro suplente)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À minha mãe (in memoriam) pelo exemplo de humanidade, generosidade, humildade, bom humor, perseverança e amor.

Ao meu pai por ser o maior incentivador de meus estudos.

Aos meus irmãos pelo carinho, companheirismo e exemplo de dedicação.

Ao meu namorado pelo incentivo, compreensão e amor.

Ao meu orientador Professor Dr. Anderson Manoel Herculano pela confiança depositada em mim, o que possibilitou a concretização desse trabalho.

Aos professores doutores: Fernando Allan Farias Rocha, Karen Renata Matos Oliveira, Manoel da Silva Filho, Bruno Duarte Gomes e Maria Elena Crespo López pelas importantes contribuições ao trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia e Laboratório de Farmacologia Molecular por terem contribuído de alguma forma para a realização desse trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é a forma mais tóxica do mercúrio. A exposição ao MeHg gera estresse oxidativo, podendo afetar a retina, pois esta possui alta vulnerabilidade em função do seu elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e consumo de oxigênio. Nesse contexto, a administração de antioxidantes exógenos obtidos pela dieta, como os presentes na *Euterpe oleracea* (açai), poderia ser uma forma de prevenir esse desequilíbrio e suas consequências. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito protetor da *Euterpe oleracea* nas alterações eletrofisiológicas causadas pelo MeHg na retina. Para tal, foi realizada gavagem com MeHgCl (5 mg/Kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) durante 7 dias e pré-tratamento com ração enriquecida com polpa de açai (10%) por 28 dias. Foram utilizados ratos Wistar divididos em 4 grupos: Grupo MeHg (recebeu ração padrão e MeHgCl); MeHg+Açai (ração enriquecida com açai e MeHgCl); Açai (ração enriquecida com açai e NaCl); Veículo (ração padrão e NaCl). Um dia após a última gavagem os animais foram submetidos ao eletrorretinograma de campo total (ffERG) para obtenção da resposta escotópica (de bastonetes, mista 1 e mista 2) e fotópica (de cones e de flicker em 12; 18; 24 e 30Hz). No dia seguinte ao ffERG foi aplicado o teste campo aberto para avaliar a atividade locomotora dos animais. Posteriormente, foi feita medição de peroxidação lipídica no tecido retiniano pelo método TBARS. A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA de uma via com pós-teste de *Tukey*, considerando significativo $p < 0,05$. Os resultados do campo aberto e da massa corporal não apresentaram diferença entre os grupos. O MeHg reduziu a amplitude das seguintes respostas: onda-b da resposta de bastonetes (Veículo: $114,6 \pm 23,6 \mu\text{V}$ e MeHg: $41,2 \pm 9,6 \mu\text{V}$); onda-a (Veículo: $8,4 \pm 1,4 \mu\text{V}$ e MeHg: $3,4 \pm 0,3 \mu\text{V}$) e onda-b (Veículo: $176,7 \pm 17,8 \mu\text{V}$ e MeHg: $69,5 \pm 12,0 \mu\text{V}$) na resposta mista 1; onda-a (Veículo: $103,1 \pm 23,3 \mu\text{V}$ e MeHg: $40,2 \pm 9,6 \mu\text{V}$) e onda-b (Veículo: $281 \pm 38,3 \mu\text{V}$ e MeHg: $138,6 \pm 14 \mu\text{V}$) da resposta mista 2; onda-a (Veículo: $27,2 \pm 3,6 \mu\text{V}$ e MeHg: $7,5 \pm 1,8 \mu\text{V}$) e onda-b (Veículo: $139,3 \pm 16,1 \mu\text{V}$ e MeHg: $54,4 \pm 10 \mu\text{V}$) da resposta de cones; onda-b nas frequências 12 Hz (Veículo: $67,7 \pm 10 \mu\text{V}$ e MeHg: $28,6 \pm 6,9 \mu\text{V}$), 18 Hz (Veículo: $31,3 \pm 3,4 \mu\text{V}$ e MeHg: $14,2 \pm 2,3 \mu\text{V}$) e 24 Hz (Veículo: $21,0 \pm 1,8 \mu\text{V}$ e MeHg: $11,0 \pm 1,1 \mu\text{V}$) e 30 Hz (Veículo: $10,9 \pm 0,6 \mu\text{V}$ e MeHg: $6,0 \pm 1,1 \mu\text{V}$). O tempo implícito das ondas não foi alterado em nenhuma das respostas. O pré-tratamento com *Euterpe oleracea* evitou a redução de amplitude de ambas as ondas nas respostas mista 1 (onda-a: $8,3 \pm 0,6 \mu\text{V}$; onda b: $144,1 \pm 7,1 \mu\text{V}$) e mista 2 (onda-a: $106,4 \pm 13,6 \mu\text{V}$; onda b: $275,2 \pm 27,6 \mu\text{V}$), assim como da onda-b da resposta de cones ($104,5 \pm 5,9 \mu\text{V}$) e fotópica de flicker em 12 Hz ($67,2 \pm 9,1 \mu\text{V}$), 18 Hz ($29,5 \pm 4,8 \mu\text{V}$) e 24 Hz ($21,9 \pm 2,4 \mu\text{V}$). A peroxidação lipídica no tecido retiniano do grupo MeHg ($294,9 \pm 205,8\%$) foi maior que a do Veículo ($100 \pm 25,1\%$) e o açai protegeu contra esse dano oxidativo (MeHg+Açai: $111,2 \pm 26,1\%$). Nossos resultados demonstraram alteração difusa na resposta eletrofisiológica e aumento na peroxidação lipídica da retina induzidos pelo MeHg e proteção exercida pelo açai nesses dois parâmetros. Assim, a *Euterpe oleracea* poderia ser utilizada como importante alternativa para amenizar as alterações causadas pelo MeHg na retina.

Palavras-chave: Metilmercúrio, Estresse Oxidativo, Retina, Eletrorretinograma de campo total, *Euterpe oleracea*, Proteção.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is organic form most toxic of mercury. The MeHg exposure generates oxidative stress may affect the retina, because it has a high vulnerability due to their high content of polyunsaturated fatty acids and oxygen consumption. In this context, administration of exogenous antioxidants obtained from the diet, such as those present in *Euterpe oleracea* (açai), could be a way to prevent this imbalance and its consequences. Therefore, the objective of this study was to evaluate the possible protective effect of *Euterpe oleracea* in electrophysiological changes caused by MeHg in the retina. For this was performed gavage with MeHgCl (5mg/kg) or saline (NaCl 0.9%) for 7 days and pretreatment with açai (10%) per 28 days. Was used Wistar rats were divided into 4 groups: Group MeHg (received standard diet and MeHgCl); MeHg + Acai (enriched diet with acai and MeHgCl); Acai (enriched diet with açai and NaCl); Vehicle (standard diet and NaCl). One day after the last gavage animals were subjected to full-field electroretinography (ffERG) to obtain the scotopic responses (rods, mixed 1 and mixed 2) and photopic responses (cone and flicker at 12, 18, 24 and 30Hz). The next day to the ffERG was applied open field test to evaluate the animals locomotor activity. Subsequently, measurement of the lipid peroxidation by the method TBARS in retinal tissue. Statistical analysis was done by one-way ANOVA with *Tukey* post-test, considering significant $p < 0.05$. The open field and body weight results showed no difference between groups. The MeHg reduced the amplitude of the following responses: b-wave in rod response (Vehicle: $114.6 \pm 23.6 \mu\text{V}$ and MeHg: $41.2 \pm 9.6 \mu\text{V}$); a-wave (Vehicle: $8.4 \mu\text{V}$ and MeHg ± 1.4 : $3.4 \pm 0.3 \mu\text{V}$) and b-wave (Vehicle: $176.7 \pm 17.8 \mu\text{V}$ and MeHg: $69.5 \pm 12.0 \mu\text{V}$) in mixed 1 responses; a-wave (Vehicle: $103.1 \pm 23.3 \mu\text{V}$ and MeHg: $40.2 \pm 9.6 \mu\text{V}$) and b-wave (Vehicle: $281 \pm 38.3 \mu\text{V}$ and MeHg: $138.6 \pm 14 \mu\text{V}$) in mixed 2 response; a-wave (Vehicle: $27.2 \pm 3.6 \mu\text{V}$ and MeHg: $7.5 \pm 1.8 \mu\text{V}$) and b-wave (Vehicle: $139.3 \pm 16.1 \mu\text{V}$ and MeHg: $54.4 \pm 10 \mu\text{V}$) of cones response; b-wave in frequencies 12 Hz (Vehicle: $67.7 \pm 10 \mu\text{V}$ and MeHg: $28.6 \pm 6.9 \mu\text{V}$), 18Hz (Vehicle: $31.3 \pm 3.4 \mu\text{V}$ and MeHg : $14.2 \pm 2.3 \mu\text{V}$), 24Hz (Vehicle: $21.0 \pm 1.8 \mu\text{V}$ and MeHg: $11.0 \pm 1.1 \mu\text{V}$) and 30Hz (Vehicle: $10.9 \pm 0.6 \mu\text{V}$ and MeHg: $6.0 \pm 1.1 \mu\text{V}$). While the implicit time of the waves was not altered. The pretreatment with *Euterpe oleracea* prevented the decrease of amplitude of both waves in mixed 1 (a-wave: $8.3 \pm 0.6 \mu\text{V}$; b-wave: $144.1 \pm 7,1 \mu\text{V}$) and mixed 2 responses (a-wave: $106.4 \pm 13.6 \mu\text{V}$; b-wave: $275,2 \pm 27,6 \mu\text{V}$), b-wave of cone response ($104.5 \pm 5.9 \mu\text{V}$) and photopic flicker at 12 Hz ($67.2 \pm 9.1 \mu\text{V}$), 18 Hz ($29.5 \pm 4.8 \mu\text{V}$) and 24 Hz ($21.9 \pm 2.4 \mu\text{V}$). Lipid peroxidation in retinal tissue of MeHg group ($294.9 \pm 205.8\%$) was higher than that of the Vehicle ($100 \pm 25.1\%$) and açai protected against this oxidative damage (MeHg + Acai = $111.2 \pm 26.1\%$). Our results demonstrate diffuse alteration in the electrophysiological response and increase in lipid peroxidation of the retina induced by MeHg and protection exerted by *Euterpe oleracea* in these two parameters. Thus, *Euterpe oleracea* could be used as an important alternative to attenuate the changes in the retina caused by MeHg.

Keywords: Methylmercury, Oxidative Stress, Retina, full-field Electroretinogram, *Euterpe oleracea*, Protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico.	2
Figura 2.	Organização da retina em camadas.	7
Figura 3.	Estrutura de bastonetes e cones.	8
Figura 4.	Fototransdução.	11
Figura 5.	Ativação das células bipolares <i>ON</i> e <i>OFF</i> .	13
Figura 6.	Distribuição de fotorreceptores na retina de ratos.	16
Figura 7.	Curvas de absorção espectral dos cones tipo UV e M encontrados na retina de ratos.	17
Figura 8.	Micrografia de células horizontais da retina de rato.	18
Figura 9.	Diagrama das células bipolares encontradas na retina de ratos.	19
Figura 10.	Correntes extracelulares geradas em resposta a estímulo luminoso.	21
Figura 11.	Formas de ondas obtidas no ffERG em resposta a diferentes estímulos.	23
Figura 12.	Foto da ração enriquecida com açaí.	38
Figura 13.	Ordem cronológica dos procedimentos experimentais.	39
Figura 14.	Eletrodos utilizados no eletrorretinograma.	42
Figura 15.	Parâmetros do ffERG analisados.	45
Figura 16.	Evolução da massa corporal dos animais.	49
Figura 17.	Cruzamento de quadrantes no campo aberto.	50
Figura 18.	Registro das respostas escotópicas de bastonete.	52
Figura 19.	Registro das respostas escotópicas mista 1.	53
Figura 20.	Registro das respostas escotópicas mista 2.	54
Figura 21.	Registro das respostas fotópicas de cone.	55
Figura 22.	Registro das respostas fotópicas de flicker em 12 Hz.	56
Figura 23.	Registro das respostas fotópicas de flicker em 18 Hz.	57
Figura 24.	Registro das respostas fotópicas de flicker em 24 Hz.	58
Figura 25.	Registro das respostas fotópicas de flicker em 30 Hz.	59
Figura 26.	Amplitude da onda-b na resposta escotópica de bastonete.	60
Figura 27.	Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta escotópica mista 1.	61
Figura 28.	Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta escotópica mista 2.	62
Figura 29.	Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta fotópica de cone.	63
Figura 30.	Amplitude da onda-b na resposta fotópica de flicker em diferentes frequências de estímulo.	64
Figura 31.	Diferença de amplitude nas frequências 12 Hz, 18 Hz, 24 Hz e 30 Hz.	65
Figura 32.	Razão entre a amplitude da onda-b e amplitude da onda-a.	67
Figura 33.	Peroxidação lipídica no tecido retiniano.	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APB 2-Amino-4-phosphonobutyrate

BSA Albumina de soro bovino

Ca²⁺ Íon cálcio

CAT Catalase

CH₃Hg Metilmercúrio

DNA Ácido Desoxirribonucleíco

EROs Espécie Reativa De Oxigênio

ERG Eletrorretinograma

ffERG Eletrorretinograma de Campo Total

Fe Ferro

GMPc Guanosina Monofosfato Cíclica

GPx Glutathione Peroxidase

GSH Glutathione

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

Hg Mercúrio

Hg⁰ Mercúrio metálico

Hg²⁺ Mercúrio inorgânico

MDA Malonaldeído

MeHg Metilmercúrio

MTTs Metalotioneínas

NaOH Hidróxido de sódio

NMDA N-metil D-aspartato

O²⁻ Ânion superóxido

OH[·] Radical hidroxila

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Phosphate Buffered Saline

PDA Ácido piperidinedicarboxílico

PDE Fosfodiesterase

SNC Sistema Nervoso Central

SOD Superóxido dismutase

TBARS Espécies Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	METILMERCÚRIO E O AMBIENTE.....	1
1.2	METABOLISMO DO METILMERCÚRIO.....	4
1.3	FISIOLOGIA DA RETINA.....	6
1.4	RETINA DE RATOS.....	14
1.5	ELETRORRETOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG).....	20
1.6	INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO SISTEMA VISUAL.....	25
1.7	MECANISMOS DE TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO.....	28
1.8	<i>Euterpe oleracea</i> (AÇAÍ).....	31
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	ANIMAIS E GRUPOS.....	37
3.2	RAÇÃO ENRIQUECIDA COM POLPA DE AÇAÍ.....	37
3.3	EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO.....	40
3.4	ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL.....	40
3.5	CAMPO ABERTO.....	41
3.6	ELETRORRETOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG).....	41
3.6.1	Equipamentos	41
3.6.2	Procedimentos	43
3.6.3	Mensuração dos componentes do ffERG	45
3.7	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO TECIDO RETINIANO.....	46
3.7.1	Dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976)	47
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL.....	48
4.2	CAMPO ABERTO.....	50
4.3	ELETRORRETOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG).....	51
4.4	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	68
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 METILMERCÚRIO E O AMBIENTE

O mercúrio (Hg) é um metal pesado poluente amplamente encontrado no ambiente, que pode apresentar-se na forma inorgânica ou orgânica. Na forma inorgânica pode ser encontrado em três estados de oxidação: mercúrio metálico ou elementar (Hg^0); íon mercurioso (Hg_2^{+2}), pouco estável na natureza; íon mercúrico (Hg^{+2}). As formas orgânicas são: etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$), metilmercúrio (CH_3Hg) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), nas quais o íon mercúrico apresenta-se ligado a um radical orgânico (CLARKSON, 2002). Dentre as diferentes formas do mercúrio, o metilmercúrio (MeHg) é a forma mais tóxica desse metal (TOIMELA; TÄHTI, 2004; CRESPO-LÓPEZ, *et al*, 2005), pois os compostos organometálicos têm maior solubilidade em lipídios que espécies inorgânicas, sendo mais fácil de difundir através da matriz lipídica da membrana celular, aumentando seu potencial tóxico (CRESPO-LÓPEZ, *et al*, 2009).

A forma orgânica do mercúrio mais comumente encontrada na natureza é o MeHg. Na Amazônia, a presença de mercúrio metálico (H^0) no ambiente deu-se principalmente pelas atividades garimpeiras (as quais utilizavam mercúrio que, posteriormente, se acumulava na atmosfera) desenvolvidas na região, especialmente nas décadas de 80 e 90. O mercúrio metálico é oxidado na atmosfera a íon mercúrico (Hg^{+2}), carregado pelas chuvas diretamente para os rios ou para o solo, de onde é levado aos rios por processo de lixiviação ou erosão ou volta para atmosfera na forma de mercúrio metálico (H^0), a partir de incêndios florestais. O mercúrio permanece no solo amazônico por longos períodos de tempo e em grande concentração por esse solo ser rico em ferro (Fe) que forma complexo com o Hg^{+2} . Nos rios o Hg^{+2} é biometilado a MeHg (CH_3Hg) por bactérias metalogênicas, contaminando o ecossistema aquático, inclusive os peixes.(figura 1) (BOENING, 2000; WASSERMAN; HACON; WASSERMAN, 2001; DE SÁ, *et al*, 2006; MYERS; DAVIDSON; STRAIN, 2007;

PASSOS; *et al*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al*, 2006, 2007, 2008, 2012; BERZAS NEVADO; *et al*, 2010).

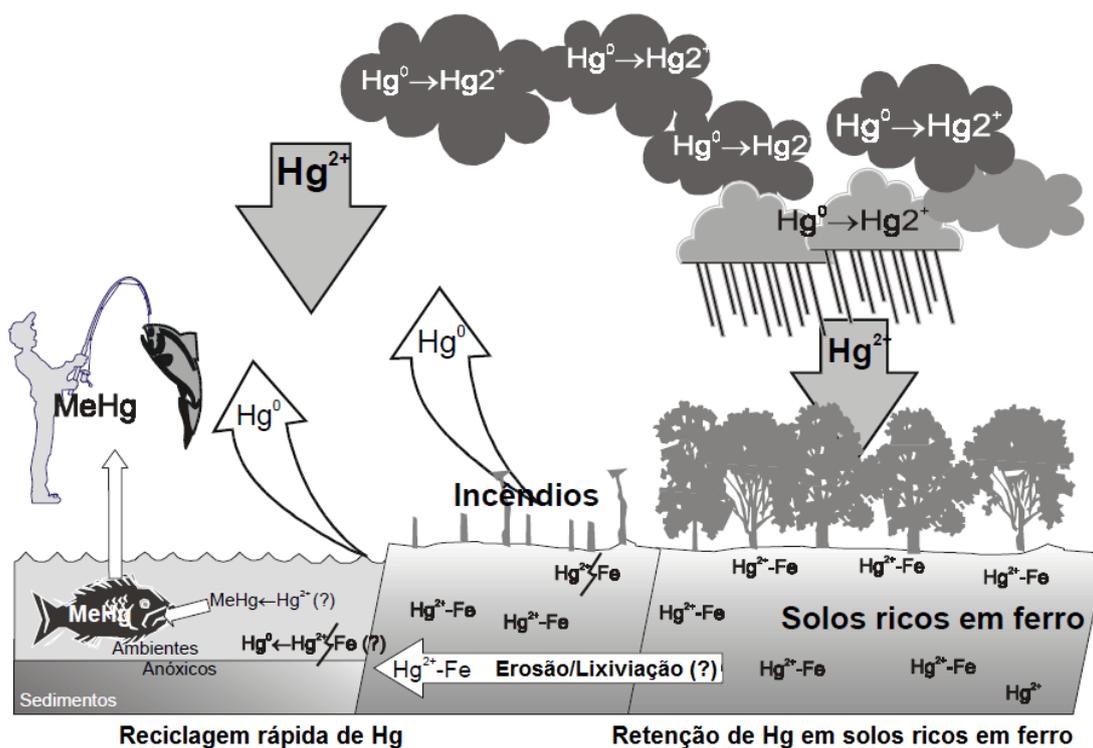


Figura 1. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico (WASSERMAN; HACON; WASSERMAN, 2001).

O MeHg acumula-se na cadeia alimentar aquática devido a magnificação trófica, processo caracterizado pelo aumento da concentração do metal com o avanço nos níveis tróficos. Assim, peixes predadores podem apresentar elevadas concentrações de MeHg, devido a capacidade desse metal orgânico de permanecer por longos períodos nos tecidos do organismo, até chegar na dieta humana através do consumo de peixes (BOENING, 2000; WASSERMAN; HACON; WASSERMAN, 2001; DE SÁ, *et al*, 2006; MYERS; DAVIDSON; STRAIN, 2007; PASSOS; *et al*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al*, 2006, 2007, 2008; 2012; BERZAS NEVADO; *et al*, 2010).

O consumo de peixe contaminado é a maior fonte de contaminação humana por MeHg (DE SÁ, *et al*, 2006; MYERS; DAVIDSON; STRAIN, 2007; PASSOS; *et al*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al*, 2006, 2007, 2008; 2012; BERZAS NEVADO; *et al*, 2010). Portanto, em comunidades em que o peixe é a principal fonte de alimentação diária, a população torna-se mais exposta a essa intoxicação (DE SÁ, *et al*, 2006; MYERS; DAVIDSON; STRAIN, 2007; PASSOS; *et al*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al*, 2006, 2007, 2008; 2012; BERZAS NEVADO; *et al*, 2010).

Baseada nesse fato, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um limite de segurança com base na concentração de Hg no músculo do peixe (0,5 µg/g de peso úmido), assim como um limite de ingestão inferior a 0,3 mg de Hg total e inferior a 0,2 mg de MeHg por pessoas adulta por semana (WHO, 1990). Entretanto estudos de monitoramento da concentração de Hg em pexes do rio Tapajós mostram que algumas espécies peixes apresentam concentrações superiores a 0,5 µg/g de peso úmido no músculo, principalmente peixes carnívoros com Traíra e Tucunaré (BERZAS NEVADO; *et al*, 2010)

Comunidades ribeirinhas da Amazônia, principalmete de São Luis do Tapajós (área de garimpo de ouro), apresentam valores de concentração sanguínea de Hg e concentração de Hg em raiz de cabelo acima do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde de 10 µg/L e 10 µg/g (1 µg/g em unidade log), respectivamente (PASSOS; *et al*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al*, 2006, 2007, 2008; 2012; BERZAS NEVADO; *et al*, 2010). Esses valores de tolerância foram baseados em episódios de intoxicação aguda e correspondem a um risco de 5% para o aparecimento dos efeitos do MeHg (WHO, 1990).

Um estudo em 7 comunidades ribeirinhas do rio Tapajós encontrou relação diretamente proporcional entre o consumo de peixes carnívoros e a concentração de mercúrio no sangue e urina e relação inversamente proporcional entre consumo de frutas como banana, ingá e laranja (avaliado por questionário sobre frequência de consumo semanal) e concentração sanguínea de Hg, assim, o consumo de frutas parece regular a relação entre consumo de peixes e a exposição ao Hg (PASSOS; *et al*, 2003, 2007).

Em monitoramento da exposição ao mercúrio na bacia do rio Tapajós, de 1994 a 2010, na população de Barreiras (1994-2010) e São Luiz do Tapajós (1996-2007) observou-se, na maioria do período estudado, valores de concentração de Hg em raiz de cabelo acima de 1 µg/g em unidade log, valor superior ao limite recomendado pela OMS (WHO, 1990). Variando em São Luiz do Tapajós de 1,21±0,03 µg/g em 1996 a 1,16±0,07 µg/g em 2007 e em Barreiras de 1,25±0,04 µg/g em 1994 a 1,0±0,03 µg/g em 2010.

Os valores foram abaixo de 1 µg/g apenas no ano de 2002 (0,86±0,03 µg/g) em São Luiz do Tapajós e nos anos de 2001 (0,94±0,04 µg/g), 2005 (0,96 ± 0,05 µg/g) e 2008 (0,92 ± 0,04 µg/g) em Barreiras. A concentração de mercúrio total encontrada em ambas as comunidades não apresentaram diferença estatística entre os anos, confirmando a constante exposição da população da Amazônia a esse metal, especialmente comunidades ribeirinhas (PINHEIRO; *et al*, 2012).

1.2 METABOLISMO DO METILMERCÚRIO.

Após a exposição via oral o MeHg é absorvido no trato gastrointestinal com taxa de absorção de cerca de 90-95% em humanos (SANFELIU, *et al*, 2003) não variando consideravelmente entre animais de diferentes espécies (CECCATELLI; DARÉ; MOORS, 2010). Essa elevada taxa de absorção contribui significativamente para a sua elevada disponibilidade e consequente toxicidade (NIELSEN, 1992). Posteriormente à absorção, o MeHg é distribuído entre vários tecidos, através da corrente sanguínea por ligação com resíduos cisteína da hemoglobina dos eritrócitos (ZAREBA; *et al*, 2007) e sua excreção

ocorre principalmente através do rim (menos de 10% do metal excretado) e do trato gastrointestinal. O mercúrio inorgânico formado no fígado (por desmetilação) e o MeHg não desmetilado são excretados na bÍlis conjugados com glutathione (GSH) (WHO, 1990). No entanto, o MeHg é reabsorvido no intestino pela recirculação enterohepática voltando para a corrente sanguÍnea. A taxa de excreção do MeHg depende da espécie assim como a meia vida de excreção que varia de 1000 dias em peixes, 70 dias em humanos, 16 dias em ratos a 8 dias em camundongos (CLARKSON, 1972 apud CECCATELLI; DAR; MOORS, 2010).

Também ocorre processo de desmetilação no cérebro pela aço de astrócitos e micróglia por mecanismos ainda não totalmente elucidados e o mercúrio inorgânico formado apresenta meia-vida longa nesse tecido. Uma vez no tecido cerebral, o Hg pode ser sequestrado por metalotioneÍnas (MTTs), uma famÍlia de proteÍnas ricas em cisteÍna que se ligam com alta afinidade metais (Cd, Zn e Hg). As MTTs são encontradas em diferentes órgãos, incluindo o cérebro (CECCATELLI; DAR; MOORS, 2010) e o epitélio pigmentar da retina (TATE; MICELI; NEWSOME, 1995).

O MeHg afeta uma variedade de funções celulares, podendo causar danos em muitos órgãos e tecidos. Entretanto, trabalhos toxicológicos sobre a exposição ao MeHg demonstraram que o sistema nervoso central (SNC)  um importante alvo da toxicidade do MeHg (MOTTET; *et al.*, 1984; CARTA; *et al.*, 2003; TOIMELA; THTI, 2004; CRESPO-LÓPEZ, *et al.*, 2007; BERZAS NEVADO; *et al.*, 2009; MAXIMINO, *et al.*, 2011) levando a prejzos neurológicos que afetam habilidades cognitivas, sensoriais e motoras (WHO, 1990; LEBEL; *et al.*, 1998; CARTA; *et al.*, 2003; LUCENA; *et al.*, 2007, CECCATELLI; DAR; MOORS, 2011; FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011; MAXIMINO, *et al.*, 2011).

A toxicidade do MeHg no SNC pode estar relacionada a sua habilidade de atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica acumulando-se em diferentes áreas como o córtex cerebral, cerebelo, hipotálamo, glândula pituitária, estriado, fissura calcarina do córtex visual e retina (MOTTET; *et al.*, 1984, CHARLESTON; *et al.*, 1995; OLIVEIRA; *et al.*, 2006; MELA; *et al.*, 2010).

As alterações induzidas pelo MeHg em regiões como córtex cerebral e cerebelo (FARINA; *et al.*, 2005; LUCENA; *et al.*, 2007) são bastante exploradas,

porém poucos trabalhos mostram as alterações causadas por esse metal na eletrofisiologia da retina, que é um alvo potencial de dessa toxicidade (GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU; *et al*, 2001; VENTURA, *et al*, 2004; RODRIGUES; *et al* 2007, BARBONI, 2007; BARBONI; *et al*, 2008; FEITOSA-SANTANA; *et al*, 2008). Neste contexto estudos que exploram os efeitos toxicológicos do MeHg na retina são de singular importância para a caracterização de possíveis fármacos que minimizem a ação deste metal no sistema visual.

1.3 FISIOLOGIA DA RETINA

A retina é responsável pela captação de sinais luminosos e transformação desses em sinais neurais, processo iniciado a partir da absorção de luz pelos fotorreceptores. A retina apresenta uma organização laminar com as células dispostas em camadas como mostrado na figura 2 (CAJAL, 1972; WÄSSLE, 2004).

A citoarquitetura da retina está organizada, da camada mais externa para a mais interna: epitélio pigmentar (envolve os segmentos externos dos fotorreceptores promovendo a nutrição dessas células e contínua reciclagem dos segmentos externos); camada de segmentos externos dos fotorreceptores; camada nuclear externa (possui os corpos celulares dos fotorreceptores); camada plexiforme externa (onde os fotorreceptores estabelecem sinapses com as células bipolares e horizontais); camada nuclear interna (contém os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e núcleo das células de Müller); camada plexiforme interna (onde bipolares e amácrinas estabelecem contato sináptico com as células ganglionares); camada de células ganglionares (figura 2) (CAJAL, 1972; WÄSSLE, 2004).

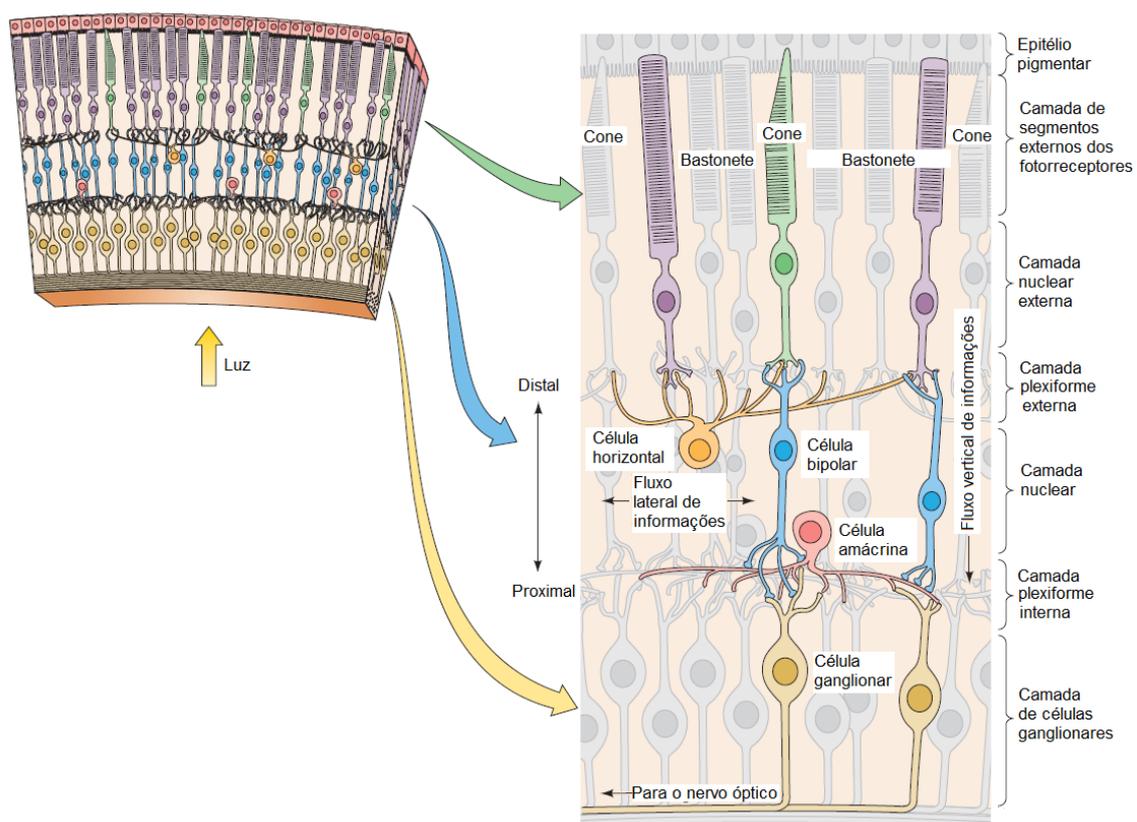


Figura 2. Organização da retina em camadas (Adaptado de PURVES; *et al*, 2004).

Na retina de vertebrados encontramos dois tipos de fotorreceptores: os bastonetes e os cones, divididos morfológicamente em segmento externo, segmento interno, corpo celular e terminais sinápticos. O segmento interno separa-se do segmento externo por um estrangulamento na membrana chamado pedículo ciliar.

O segmento interno continua-se com o corpo celular (onde localiza-se o núcleo) e a terminação sináptica. Nos cones a terminação sináptica designa-se por pedículo, é grande, cônica, com uma porção terminal achatada e nos bastonetes, designam-se por esférulas e são pequenas porções alargadas da terminação dos axônios. A estrutura dos fotorreceptores é apresentada na figura 3 (ANDERSON; FISHER, 1976; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

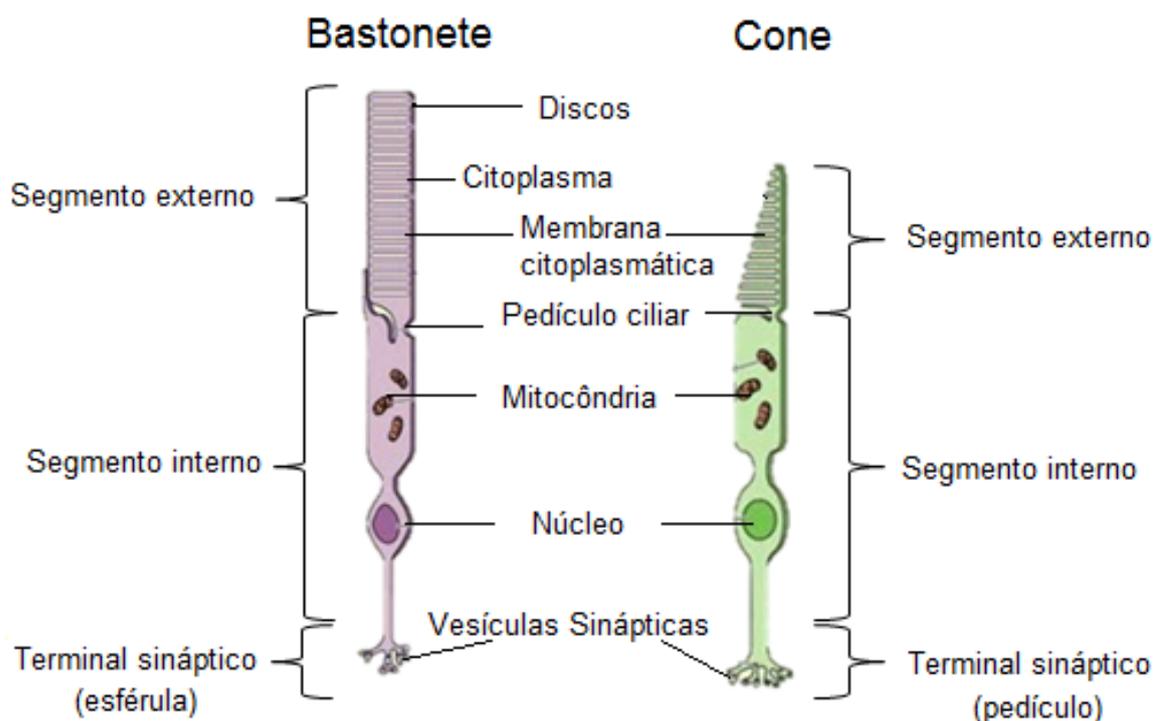


Figura 3. Estrutura de bastonetes e cones (Adaptado de http://thebrain.mcgill.ca/flash/d/d_02/d_02_m/d_02_m_vis/d_02_m_vis.html. Acesso em 26/12/2012).

O segmento externo dos fotorreceptores contém dobras na membrana celular (discos membranosos) que absorvem a luz devido a presença de fotopigmento, uma proteína receptora sensível a luz chamada opsina (DACEY, 2000; MASLAND, 2001; FU; YAU, 2007).

A membrana do segmento externo dos fotorreceptores, assim como, a retina como um todo apresentam alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados que são susceptíveis a oxidação. Conseqüentemente, essas membranas são muito vulneráveis a peroxidação lipídica induzida pela ação dos radicais livres, aumentados pela exposição mercurial, podendo gerar alterações estruturais, fisiológicas e até a morte das células da retina, especialmente dos fotorreceptores (FLIESLER; ANDERSON, 1983; ALI; LEBEL; BONDY, 1992; FARINA; *et al.*, 2005; LUCENA; *et al.*, 2007; DO NASCIMENTO; *et al.*, 2008; FRANCO; *et al.*, 2009, 2010; ABDALLA; *et al.*, 2011; BARCELOS; *et al.*, 2011; FARINA, *et al.*, 2011).

Além de a retina conter altos níveis da enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) e baixa atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que catalisam a dismutação do H_2O_2 em água e O_2 , em relação a outros tecidos, o que favorece o acúmulo de peróxidos e conseqüente dano na membrana (FLIESLER; ANDERSON, 1983).

Os bastonetes contêm como fotopigmento a rodopsina e apresentam segmento externo alongado com muitos discos membranosos, têm alta sensibilidade à luz com baixo limiar de ativação, sendo capaz de detectar um único fóton, mas têm lenta resolução temporal, ou seja, não são bons na detecção de objetos em movimento rápido. Atuam principalmente na visão escotópica ou noturna (em baixas condições de iluminação) e acromática (ANDERSON; FISHER, 1976; FU; YAU, 2007) com pico de sensibilidade espectral em torno de 500 nm de comprimento de onda de luz em ratos (JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).

Já os cones contêm o fotopigmento opsina e apresentam segmento externo em forma cônica, mais curto e estreito, são menos sensíveis à luz e ativados em condições de iluminação superior as que ativam os bastonetes, ou seja, são necessários mais fótons para ativá-los (ANDERSON; FISHER, 1976; FU; YAU, 2007). Dessa forma, os cones atuam principalmente na visão

fotópica ou diurna e visão de cores. Tem maior resolução temporal, sendo mais adequados na detecção de objetos em movimento (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; FU; YAU, 2007).

Os cones são classificados de acordo com a região do espectro de luz com maior probabilidade de excitar seu fotopigmento, ou seja, cada tipo de cone possui opsinas mais sensíveis a um comprimento de onda específico (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003).

Cones e bastonetes possuem diferenças morfológicas e funcionais, mas realizam semelhantes mecanismos de conversão de informação luminosa em elétrica, mecanismo chamado fototransdução.

A ativação do pigmento fotossensível rodopsina ou opsina presente nos segmentos externos dos fotorreceptores é o primeiro passo da fototransdução. A ativação da rodopsina ativa a transducina, uma proteína G localizada na membrana do segmento externo dos fotorreceptores, a qual ativa a fosfodiesterase (PDE), enzima que hidrolisa o segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica (GMPc), diminuindo suas concentrações no fotorreceptor, o que induz o fechamento dos canais de cátions ativados por GMPc, interrompendo a entrada de íons Na^+ , gerando hiperpolarização graduada do fotorreceptor. Seguida do fechamento dos canais de cálcio no terminal sináptico da célula, e conseqüente diminuição da liberação de glutamato na sinapse.

Esse fenômeno é denominado fototransdução. Na ausência de luz a fosfodiesterase não é ativada, não há degradação de GMPc em GMP, os canais de cátions permanecem abertos, a célula fica despolarizada e há liberação de glutamato (Figura 4) (PUGH; COBBS, 1983; BURNS; *et al*, 2002; FU; YAU, 2007).

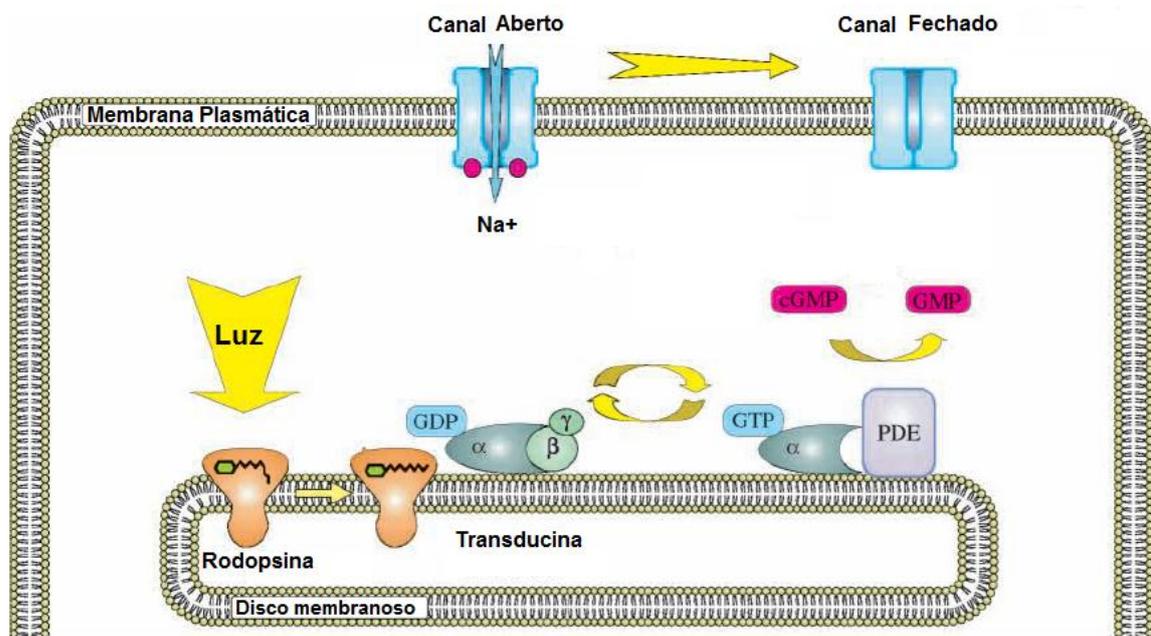


Figura 4. Fototransdução (KRAMER; MOLOKANOVA, 2001).

A fototransdução exige um alto consumo de oxigênio com elevada atividade mitocondrial nos fotorreceptores. Essa característica torna a retina susceptível a alterações no equilíbrio redox e a danos mitocondriais, como os causados pelo MeHg (ANDERSON, 1968 ALI; LEBEL; BONDY, 1992; FARINA; *et al.*, 2005; LUCENA; *et al.*, 2007; DO NASCIMENTO; *et al.*, 2008; FRANCO; *et al.*, 2009, 2010; ABDALLA; *et al.*, 2011; BARCELOS; *et al.*, 2011; FARINA, *et al.*, 2011).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) prejudicam o metabolismo energético mitocondrial através da indução de mudanças oxidativas estruturais e subsequente inatividade de enzimas mitocondriais que possuem papel essencial na produção de ATP. Além da direta ação de EROs nos lipídios e proteínas da membrana mitocondrial que pode resultar na ativação da cascata apoptótica, através da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (FISKUM; *et al.*, 2004). Podendo, assim, levar a morte dos fotorreceptores e prejudicar a fototransdução, reduzindo a resposta da retina a estímulos luminosos.

Após a conversão da informação luminosa em elétrica, esta é transmitida dos fotorreceptores às células bipolares diretamente ou através das células horizontais (DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004). As células bipolares são classificadas de acordo com as respostas ao neurotransmissor glutamato liberados pelos fotorreceptores da seguinte forma: células bipolares do tipo *ON* (hiperpolarizam na presença e despolarizam na ausência de glutamato) e células bipolares do tipo *OFF* (despolarizam na presença de glutamato e hiperpolarizam na sua ausência) (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; EULER, SCHNEIDER; WASSLE, 1996; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

A compreensão da função das células bipolares depende do conceito de campo receptivo que é a área da retina que quando estimulada pela luz gera uma alteração no potencial de membrana da célula. Sendo que o campo receptivo de uma célula bipolar é dividido em duas regiões: o centro que recebe aferências diretas dos fotorreceptores (via direta); a periferia que recebe aferências das células horizontais (via indireta), fornecendo informação dos fotorreceptores (figura 5) (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; BERNTSON; TAYLOR, 2000; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

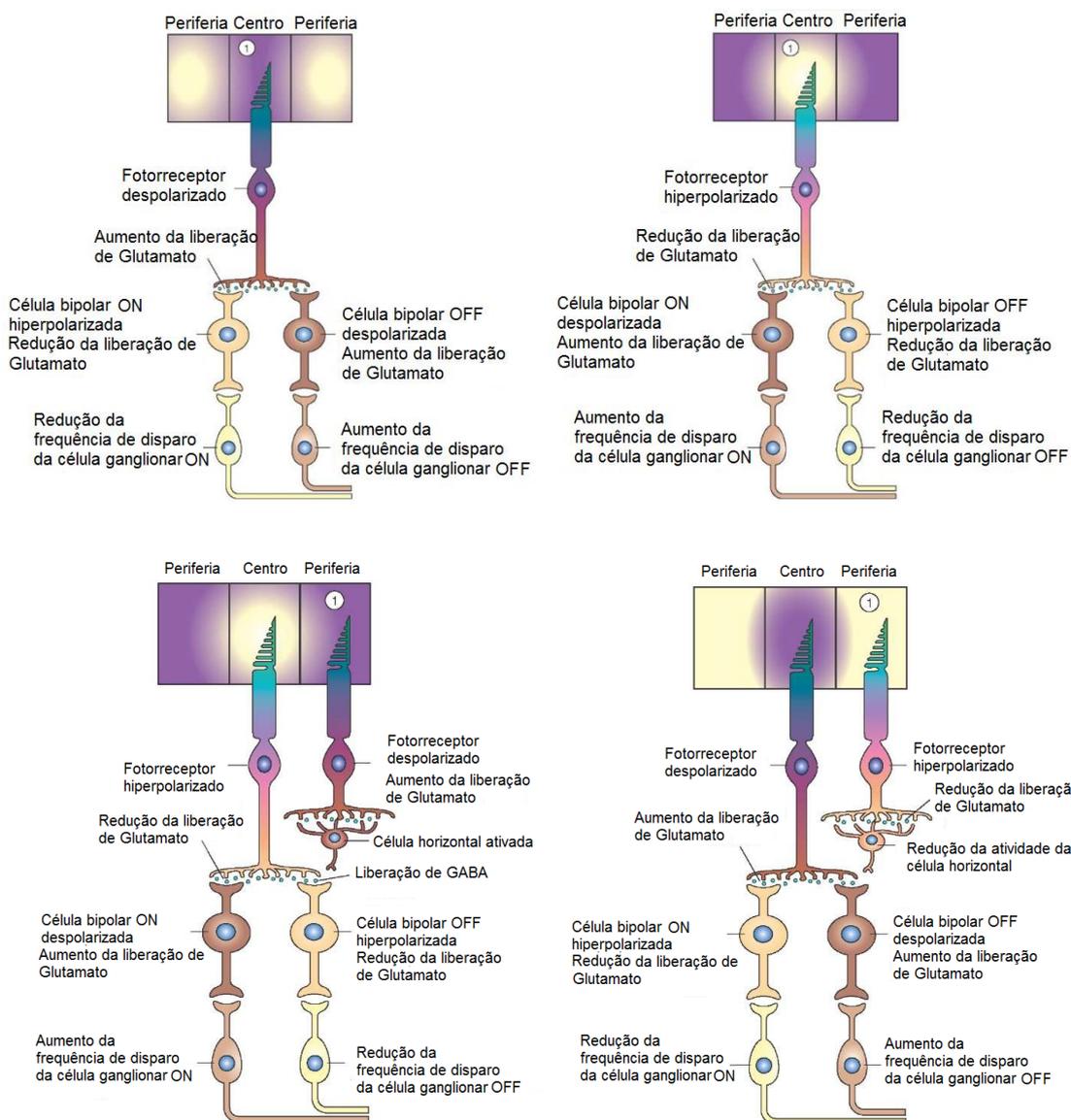


Figura 5. Ativação das células bipolares ON e OFF (Adaptado de <http://what-when-how.com/neuroscience/visual-system-sensory-system-part-2/>. Acesso em 12/02/2013).

Portanto, as células bipolares possuem centro e periferia antagônicos nos seus campos receptivos, ou seja, as respostas do potencial de membrana de uma célula bipolar a luz no centro do seu campo receptivo são opostas as geradas pela luz na periferia. Desse modo, as células bipolares *ON* possuem o centro do campo receptivo do tipo *on* (ativado pela luz) e a periferia do tipo *off* (desativado pela luz), enquanto as células bipolares *OFF* possuem centro *off* e periferia *on* (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; BERNTSON; TAYLOR, 2000; DACEY, 2000).

Os fotorreceptores que constituem o centro do campo receptivo se hiperpolarizam na presença da luz reduzindo a liberação de glutamato na fenda sináptica. Essa redução de glutamato resulta na despolarização das células bipolares tipo *ON*. Enquanto isso as células horizontais ligadas aos fotorreceptores da periferia não iluminada do campo receptivo despolarizam, levando a hiperpolarização das células bipolares tipo *OFF* (Figura 5) (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; EULER, SCHNEIDER; WASSLE, 1996; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

Após esse processo, as células bipolares, por sua vez, transmitem os sinais para as células ganglionares, de maneira direta ou através de conexões com as células amácrinas (interneurônios cuja função ainda não é bem elucidada). As células ganglionares também possuem organização centro-periferia como as bipolares as quais estão ligadas. As células ganglionares geram potenciais de ação conduzidos pelo nervo ótico, formados pelos axônios dessas células, para os centros de processamento visual (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003; WÄSSLE, 2004).

1.4 RETINA DE RATOS

A camada de fotorreceptores em ratos contém aproximadamente 99% de bastonetes e 1% de cones (figura 6). Esse sistema visual bastonete dominante essencialmente ativo em condições escotópicas (com baixas condições de iluminação) é importante devido o rato ser um animal noturno. A distribuição espacial de cones e bastonetes é relativamente uniforme por toda a

retina, não contendo fóvea (SZEL; ROHLICH,1992, 2000). Diferente da retina de humanos que possui distribuição de fotorreceptores na qual os bastonetes ocupam principalmente a periferia da retina e cones o centro.

A retina de primatas possui uma depressão na região central chamada fóvea que contém quase exclusivamente fotorreceptores cones e é altamente especializada com alta acuidade visual e discriminação de formas e detalhes finos (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003). A densidade de cones na retina de ratos é similar à encontrada na periferia da retina de primatas (BOYCOTT; WÄSSLE, 1999 apud JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).

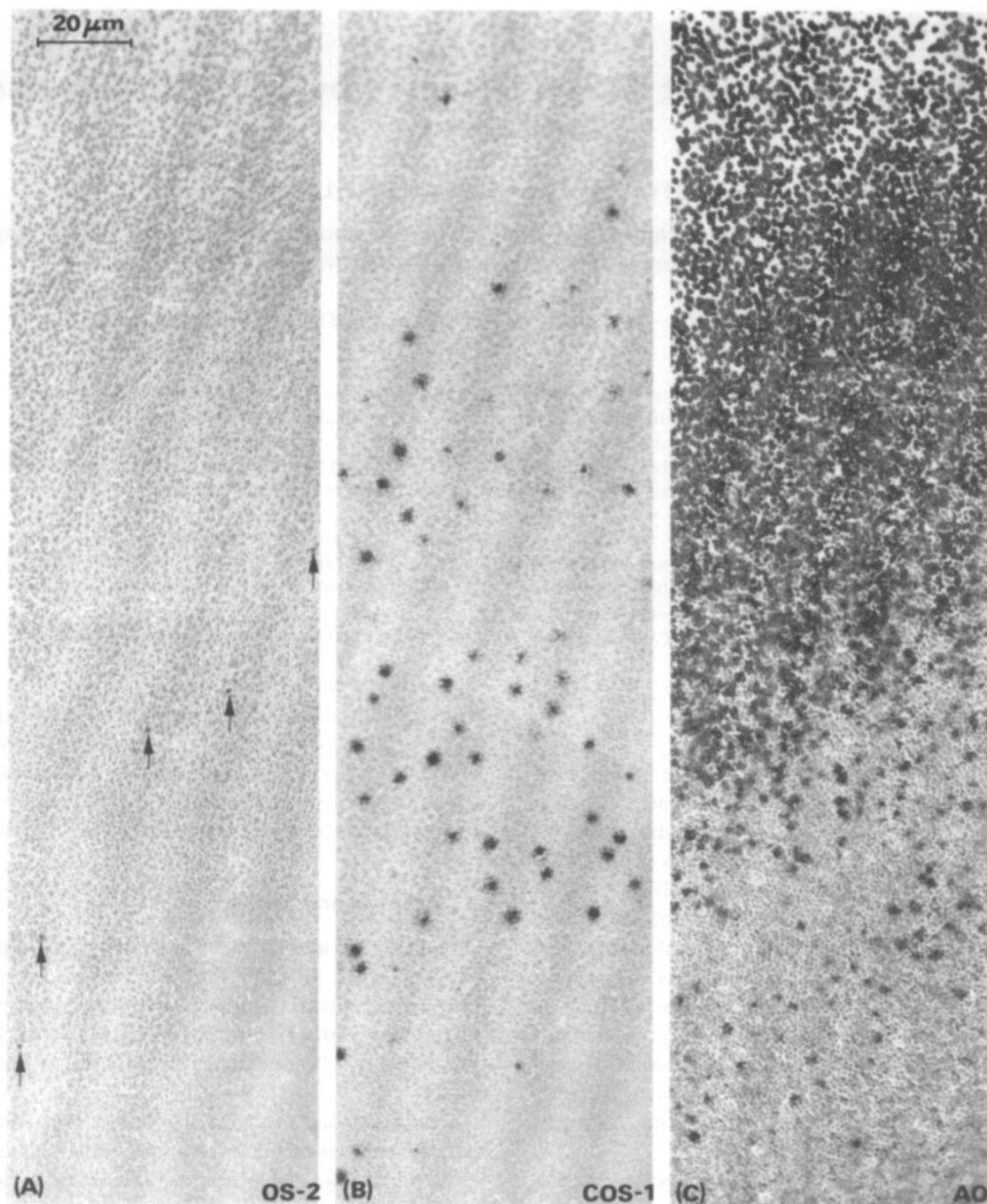


Figura 6. Distribuição de fotorreceptores na retina de ratos. Em A os cones UV, em B os cones M e em C os bastonetes (SZEL; ROHLICH,1992).

A retina de humanos contém 3 tipos de cones: cones S (*short wavelength sensitive*); cones M (*middle wavelength sensitive*); cones L (*long wavelength sensitive*), com pico de absorção espectral em aproximadamente 440 nm, 535 nm e 565 nm, respectivamente (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003). Já os ratos, como qualquer mamífero não primata, possuem dois tipos de cones caracterizando seu sistema visual como dicromata (BOWMAKER, 1998). São eles: cones tipo M e cones tipo UV, sendo cerca de 7% de todos os cones do tipo UV em ratos albinos (figura 7) (SZEL; ROHLICH, 1992) e 11-12% em ratos pigmentados (JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001). Os cones tipo UV possuem pigmento mais sensível a comprimentos de onda curtos, com pico de absorção em aproximadamente 359 nm e os cones tipo M possuem pigmento mais sensível a comprimentos de onda médios, com pico em aproximadamente 509 nm, representados na figura 7 (JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).

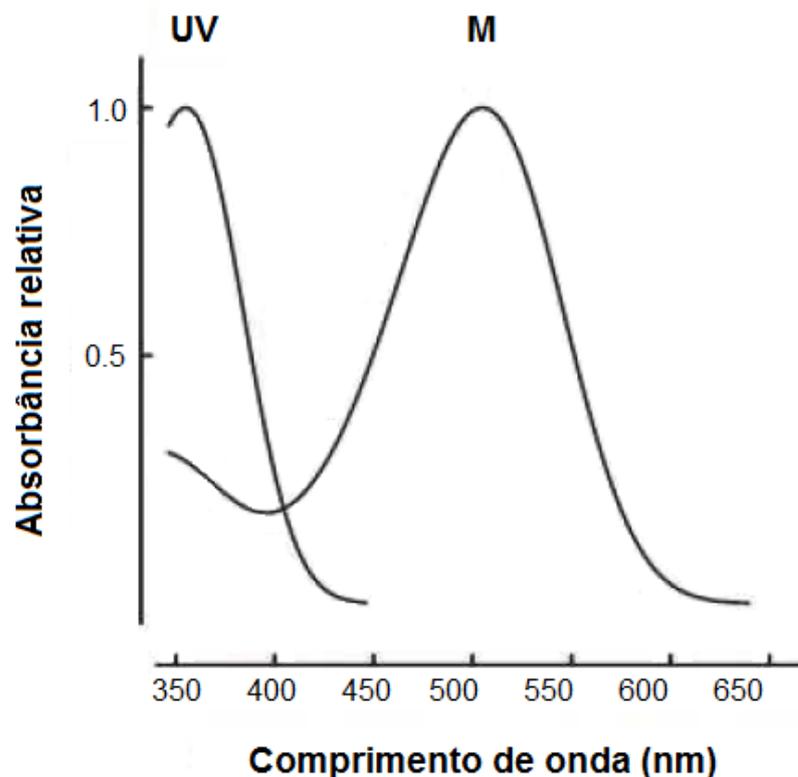


Figura 7. Curvas de absorção espectral dos cones tipo UV e M encontrados na retina de ratos (Adaptado de JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).

Na maioria dos mamíferos, inclusive em humanos, há dois tipos de células horizontais morfologicamente distintas, em ratos há apenas um tipo, chamadas células horizontais do tipo B e dispostas em um mosaico homogêneo e regular (figura 8). No entanto, a razão cone/células horizontal é similar à das espécies com dois tipos de células horizontais, logo, a falta de um dos tipos de células horizontais não acarreta grandes diferenças na transmissão do sinal (CHU; HUMPHREY; CONSTABLE, 1993; PEICHL; GONZÁLEZ-SORIANO, 1994).

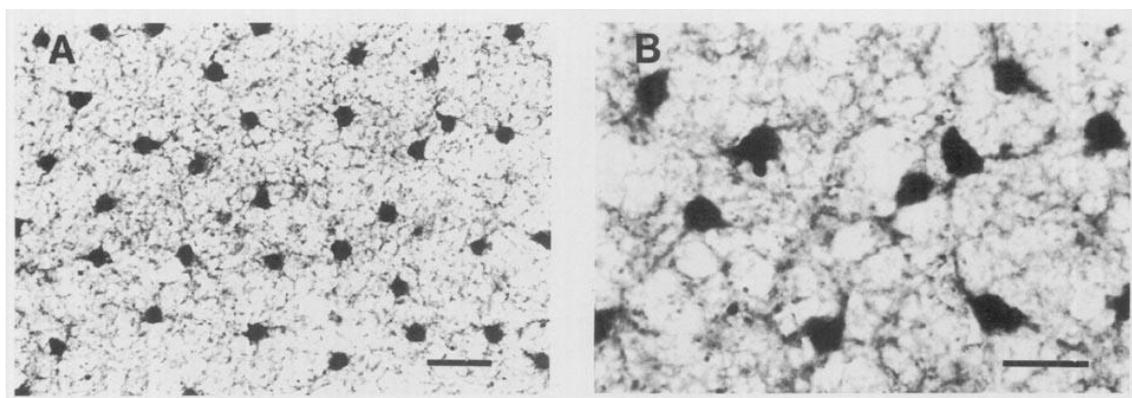


Figura 8. Micrografia de células horizontais da retina de rato. Focada na borda camada plexiforme externa/camada nuclear interna. Em A magnificação de 20 μm e em B 30 μm (CHU; HUMPHREY; CONSTABLE, 1993).

Na retina de ratos há nove tipos morfologicamente diferentes de células bipolares de cones e um tipo de célula bipolar de bastonete classificados com base no padrão das ramificações e no nível da estratificação das terminações dos axônios na camada plexiforme interna (figura 9). As células bipolares de cones totalizam cerca de 50% de todas as células bipolares de ratos (EULER; WÄSSLE, 1995). Enquanto primatas possuem 11 tipos de células bipolares de cones e uma de bastonete (WÄSSLE, 2004).

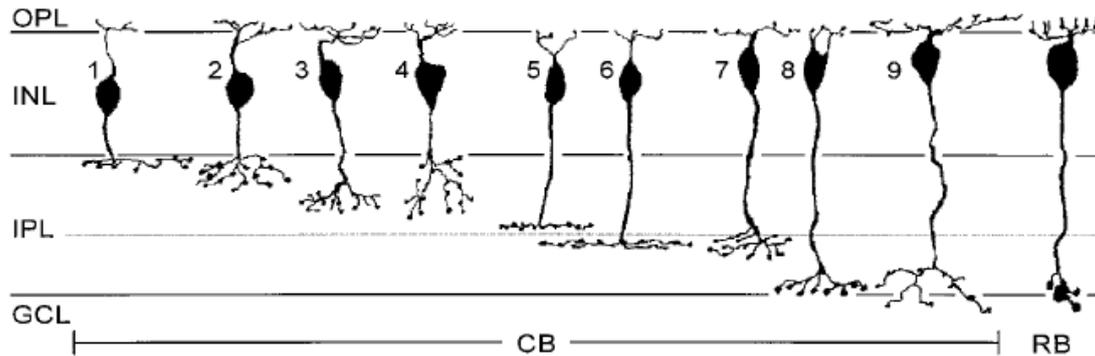


Figura 9 Diagrama das células bipolares encontradas na retina de ratos. Nove (1-9) são células bipolares de cones (CB) e uma é célula bipolar de bastonetes (RB). OPL: camada plexiforme externa, INL: camada nuclear interna, IPL: camada plexiforme interna, GCL: camada de células ganglionares (EULER; WÄSSLE, 1998).

As células amácrinas são as células mais diversas da retina, com mais de 30 tipos já descritos (MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004). Não são conhecidas as funções específicas de todos os tipos, porém sabe-se que possuem morfologia diferenciada de acordo com o neurotransmissor utilizado: as gabaérgicas possuem longos processos axonais, chamadas de células de campo grande (wide field) e as glicinérgicas possuem processos curtos, chamadas de células de campo estreito (narrow field) (MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004). Na retina de ratos foram identificadas 15 tipos de células amácrinas glicinérgica (MENGER; POW; WÄSSLE, 1998).

Na camada de células ganglionares de ratos há grande número de células amácrinas deslocadas, podendo chegar a mais de 50 % do total de células dessa camada (PERRY, 1981).

A camada das células ganglionares da retina de mamíferos apresenta de 15 a 20 tipos diferentes de células ganglionares, cujas principais características que as distinguem são o tamanho de sua ramificação e o tamanho de suas árvores dendríticas. Cada tipo de célula ganglionar é responsável pela codificação e aspectos diferentes das cenas visuais, o que gera adequada resolução espacial e temporal (WASSLER, 2004). Os ratos possuem 16 tipos de células ganglionares que apresentam significativa variabilidade na sua citoarquitetura sem simetria radial rigorosa e a localização das áreas de maior densidade é aparentemente aleatória (DANIAS, *et al*, 2002).

Apesar da retina de ratos ser bastonete dominante (SZEL; ROHLICH, 1992), Euler; Wässle (1995) observaram que cerca de 50% de todas as células bipolares são células bipolares de cone, possuindo mesma proporção de células bipolares de cones de primatas que, também, são bastonete dominante (95% de bastonete e 5% de cones) (WÄSSLE, 2004).

Logo, essas células podem desempenhar um papel mais importante no sistema visual do rato do que se pensava e isso pode se refletir no eletrorretinograma, uma técnica amplamente utilizada para avaliação funcional da retina (EULER; WÄSSLE, 1995).

1.5 ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG)

O eletrorretinograma de campo total (ffERG) é o registro elétrico da retina em resposta a um estímulo luminoso que gera estimulação simultânea em todo o campo visual permitindo uma avaliação em massa das células de toda retina. Esse teste é utilizado no mundo inteiro para avaliar o estado da retina em doenças oculares em pacientes humanos e em animais de laboratório utilizados como modelos de doenças da retina (HOLMGREN, 1980; MARMOR; *et al*, 2009; JACOB; *et al*, 2011)

O estímulo luminoso pode ser gerado por um equipamento chamado *Ganzfeld*, palavra alemã que significa “Campo Total” (formado por uma cúpula com interior constituído de uma superfície difusora branca de alta pureza) ou por fotoestimulador móvel. A estimulação é realizada através de modulação da fonte luminosa, podendo alterar características dos estímulos como intensidade, frequência temporal e cromaticidade (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB; *et al*, 2011).

Os potenciais elétricos são captados por diferentes tipos de eletrodos ativos que podem ser posicionados em diferentes regiões: na córnea (como os eletrodos em forma de lente de contato dos tipos Burian - Allen ou ERG – Jet); na conjuntiva (como as fibras condutoras do tipo DTL ou eletrodos em forma de folhas de ouro); na superfície cutânea (como os eletrodos de superfície) (MARMOR; *et al*, 2009;HECKENLIVELY; ARDEN, 2006).

O registro da resposta elétrica da retina é obtido através da diferença de voltagem medida entre o eletrodo ativo e o eletrodo de referência. O eletrodo terra serve de zero, ou seja, a polaridade da voltagem registrada é positiva (eletrodo ativo) ou negativa (eletrodo referência) em relação ao eletrodo terra. Os eletrodos de referência e terra são geralmente eletrodos cutâneos e podem ser do tipo agulha (intradérmicos) ou de superfície (epidérmicos), feitos de metal como platina, prata, ouro, níquel, aço inoxidável (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006). O eletrodo ativo detecta corrente extracelular gerada em resposta a um estímulo luminoso, demonstrada na figura 10 (MARMOR;*et al*, 2009).

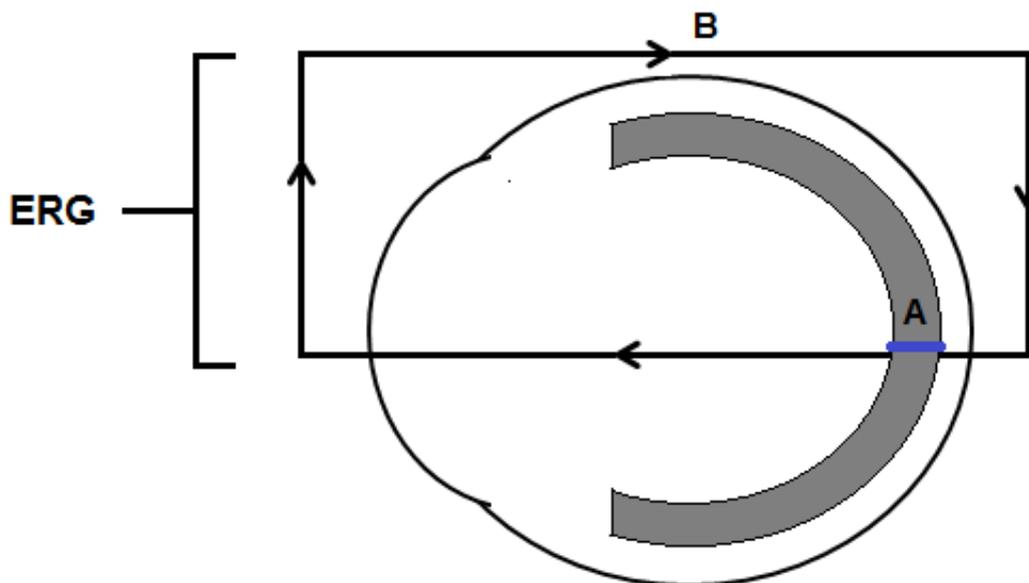


Figura 10. Correntes extracelulares geradas em resposta a estímulo luminoso. A trajetória A da corrente representa a corrente local através da retina, enquanto a trajetória B mostra as correntes que saem da retina através do humor vítreo e da córnea e voltam à retina através da coróide e epitélio pigmentar. O registro do eletroretinograma é obtido a partir da trajetória B.

Os protocolos utilizados para obtenção dos diferentes tipos de respostas no ffERG são baseados na condição de adaptação prévia ao escuro (escotópica) ou ao claro (fotópica) e condições de estimulação como intensidade e duração do estímulo e intervalo entre os estímulos. Os tipos de resposta mais estudadas são: escotópica de bastonetes; escotópica máxima (resposta mista de bastonete-cone); escotópica de potenciais oscilatórios; fotópica de cones ao flash único; fotópica de flicker (figura 11). Dentro da mesma resposta pode-se variar a intensidade e duração do estímulo no intuito de realizar uma avaliação mais ampla da resposta elétrica da retina (HEIDUSCHKA; SCHRAERMAYER, 2008; MARMOR; *et al*, 2009; HARAZNY; *et al*, 2009).

A adaptação escotópica (ao escuro) isola resposta de bastonetes ou permite a obtenção de resposta mista de cones e bastonetes e a adaptação fotópica (ao claro) isola resposta de cones (MARMOR; *et al*, 2009).

Os registros obtidos através dos diferentes estímulos e condições de adaptação apresentam formas distintas. Os componentes mais analisados nos estudos que utilizam o ffERG são a onda negativa (a) e a positiva (b), cuja amplitude e tempo implícito são determinados (figura 11).

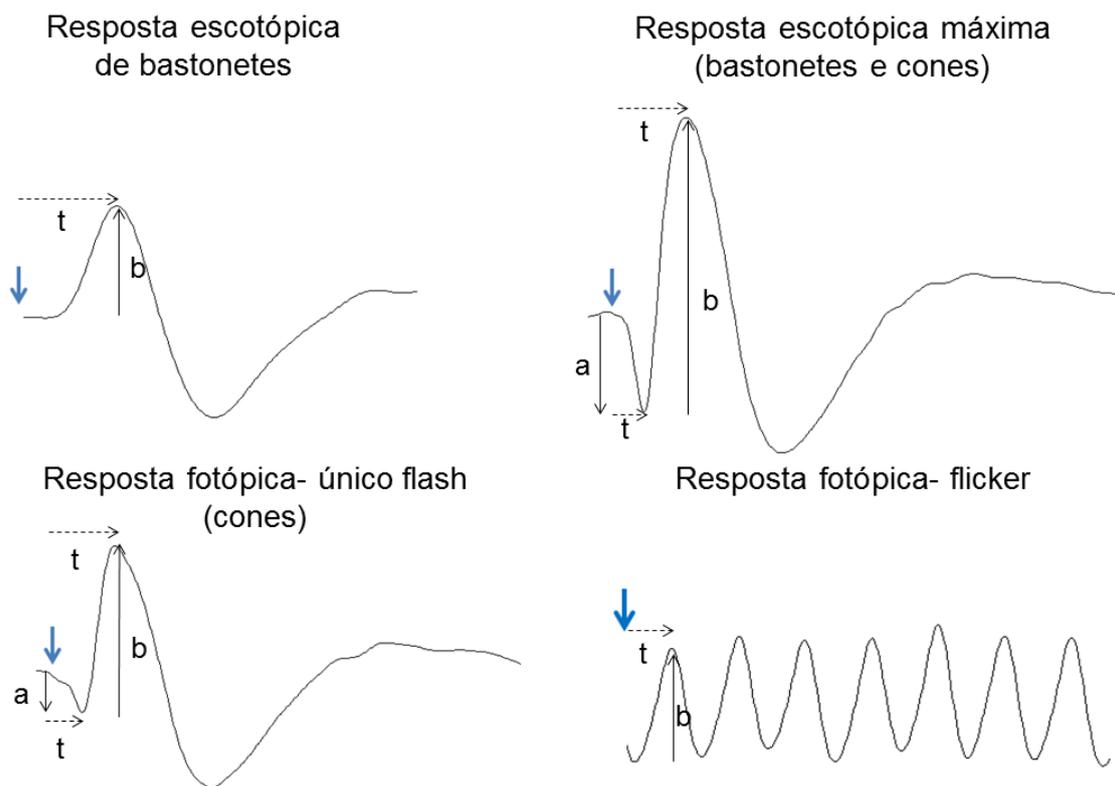


Figura 11. Formas de ondas obtidas no ffERG em resposta a diferentes estímulos. As setas azuis indicam o momento do início do estímulo, as setas pretas representam as amplitudes das ondas a e b e as setas tracejadas representam tempo implícito das ondas a e b.

Cada componente da onda é gerado por determinado grupo celular. A onda-a negativa é gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores, enquanto a onda-b positiva é gerada pela despolarização das células de Müller (células da glia que se estendem por toda a largura da retina, desempenham uma função de suporte aos diferentes elementos celulares e manutenção da integridade estrutural da retina) em resposta ao aumento da concentração de potássio na retina interna e pela ativação das células bipolares do tipo *ON*. A onda c positiva mais lenta é gerada pela hiperpolarização do epitélio pigmentar (NOELL, 1954).

O conhecimento sobre as origens celulares dos componentes do ERG foi obtido a partir de vários experimentos. A origem da onda-a como resposta dos fotorreceptores foi mostrada a partir de registro do ERG com microeletrodos intra-retinianos e da exposição da retina a agonistas ou antagonistas de L-glutamato, que podem bloquear a transmissão sináptica dos fotorreceptores, o que resultou na eliminação dos demais componentes isolando a onda-a. Além dos fotorreceptores, estudos sugerem que as células bipolares *OFF* possuem papel importante na geração da onda-a. Essa afirmação foi obtida a partir do uso de PDA, ácido piperidinedicarboxílico (substância responsável por bloquear a transmissão de sinais entre os fotorreceptores e as células bipolares *OFF* e horizontais e entre as células bipolares *ON* e *OFF* e as células ganglionares e amácrinas) que provocou redução na amplitude até o bloqueio completo da onda-a (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB; *et al*, 2011).

A origem celular da onda-b foi descoberta através do bloqueio da transmissão sináptica dos fotorreceptores para neurônios de segunda ordem (por saturação dos receptores pós-sinápticos com L-aspartato ou L-glutamato) que elimina onda-b, logo, esse componente seria gerado a partir da retina pós-sináptica aos fotorreceptores (células bipolares *ON* e células de Müller). Outro experimento que corroborou com o anterior utilizou a droga 2-Amino-4-phosphonobutyrate (APB), um agonista específico dos receptores de glutamato metabotrópicos (receptores encontrados apenas nas células bipolares centro *ON*) e observou que houve redução na resposta da onda-b do ERG, praticamente sem alteração na onda-a, logo, a onda-b seria gerada principalmente pelas células bipolares *ON*. A participação das células de Müller

foi demonstrada por registro intracelular na retina, no qual lenta despolarização de células de Müller em resposta a um estímulo de luz seguiu um padrão temporal, semelhante a onda-b do ERG (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB; *et al*, 2011).

A onda-c teve sua origem descoberta a partir de registros intracelulares em células do epitélio pigmentar que mostrou alterações potenciais idênticas a onda-c em resposta a estímulo luminoso. O epitélio pigmentar como origem da onda-c foi confirmado pelo experimento em que essa foi separada da retina resultando no desaparecimento desse componente (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB; *et al*, 2011).

O ERG tem sido muito utilizado para avaliação da retina em várias doenças que geram degeneração retiniana e em toxicidade de drogas usadas em elevadas doses ou por longo período de tempo (ANYANWU; KANU; NNADOZIE, 2006; HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB; *et al*, 2011).

Essa técnica também se mostrou eficaz na caracterização das alterações eletrofisiológicas da retina em exposição experimental ao MeHg (GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU; *et al*, 2001), desta forma o eletrorretinograma representa uma técnica pouco evasiva para avaliação de disfunções do sistema visual e pode representar uma importante ferramenta para avaliação de substâncias que podem proteger este sistema contra os efeitos tóxicos de xenobióticos como o MeHg

1.6 INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO SISTEMA VISUAL

O sistema visual como um alvo potencial para a intoxicação mercúrial é bem reportado na literatura (WHO, 1990; LEBEL;*et al*, 1998, GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU; *et al*, 2001; VENTURA, *et al*, 2004; BONCI *et al*, 2006; RODRIGUES; *et al* 2007, BARBONI, 2007; BARBONI; *et al*, 2008; FEITOSA-SANTANA; *et al*, 2008; MELA; *et al*, 2010, 2012).

A vulnerabilidade do sistema visual ao MeHg foi demonstrada a partir de alterações funcionais como redução da função de sensibilidade ao contraste espacial e temporal de luminância (função que permite perceber diferenças de

luminosidade entre regiões adjacentes) em macacos expostos ao MeHg (RICE; GILBERT, 1990). Outras alterações decorrentes da intoxicação mercurial na visão foram evidenciadas em humanos. Entre essas estão: redução de campo visual, da capacidade de discriminação cromática e de sensibilidade ao contraste espacial de luminância e redução da resposta elétrica da retina (LEBEL; *et al*, 1998, VENTURA, *et al*, 2004; RODRIGUES; *et al* 2007, BARBONI, 2007; BARBONI; *et al*, 2008; FEITOSA-SANTANA; *et al*, 2008).

Também já foi demonstrado que as células da retina apresentam vulnerabilidade seletiva ao MeHg. Caracterizada por redução da amplitude das respostas no registro eletrofisiológico da retina (ERG), no qual os cones apresentaram mais sensibilidade que os bastonetes, células bipolares e células de Müller. Enquanto as células amácrinas seriam relativamente resistentes (GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU; *et al*, 2001). A resposta eletrofisiológica de células horizontais na retina de peixes (*Hoplias malabaricus*) também é alterada pelo MeHg com redução da amplitude na maioria das doses (0,01; 0,05 e 0,1 mg/kg) ou completa eliminação da resposta (1,0; 2,0 e 6 mg/kg) (TANAN; *et al*, 2006).

A importância do estudo da retina na intoxicação mercurial foi reforçada por Herculano *et al* (2006) que demonstraram a vulnerabilidade em cultura de células de retina de embrião de galinha à toxicidade induzida pelo MeHg com redução da viabilidade celular de aproximadamente 50% em 6 horas de incubação com 10µM de MeHg e observaram que essa redução de viabilidade ocorre com modulação nitrérgica.

A sensibilidade da retina ao MeHg foi demonstrada em modelo com peixes por Mela *et al* (2010), estudo que mostrou que esse metal tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-retiniana, acumulando-se em alta densidade nas camadas nucleares interna e externa, no segmento interno da camada de fotorreceptores e nos discos dos segmentos externos, ocasionalmente, nas camadas plexiformes, muito raramente no espaço intercelular da camada de células ganglionares sem depósito de Hg na camada de fibras do nervo óptico. Depósitos de mercúrio foram encontrados distribuídos em toda a retina, mas a marcação mais intensa foi observada na região central. Houve, também, uma redução na espessura da camada nuclear interna tanto na retina central quanto periférica (MELA; *et al*, 2010).

Os mesmos autores demonstraram que a exposição ao MeHg causam degeneração na camada de fotorreceptores, alterações morfológicas no segmento interno e externo dos bastonetes, alterações estruturais na membrana plasmática e descontinuidade estrutural dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores (MELA; *et al*, 2012).

Outro estudo de avaliação morfológica da retina de peixes tratados com MeHg mostrou redução na densidade de células bipolares ON e amácrinas, com diferente susceptibilidade a intoxicação mercurial, sendo as amácrinas afetadas de forma dose dependente, apresentando redução de densidade a partir da menor das duas doses utilizadas (2µg/g) e as bipolares tiveram densidade reduzida apenas com a maior dose (6µg/g) (BONCI;*et al*, 2006), contrariando o achado de que as células amácrinas seriam relativamente resistentes a intoxicação mercurial (GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU; *et al*, 2001).

As alterações histológicas e funcionais da retina supracitadas podem estar relacionadas como desequilíbrio do estado redox causado pelo MeHg (ALI; LEBEL; BONDY, 1992; FARINA; *et al*, 2005; LUCENA; *et al*, 2007; DO NASCIMENTO;*et al*, 2008; FRANCO; *et al*, 2009, 2010; ABDALLA; *et al*, 2011; BARCELOS; *et al*, 2011; FARINA *et al*, 2011), uma vez que alterações histológicas da retina são observadas em condições geradoras de estresse oxidativo, podendo causar morte dessas células, com a camada nuclear interna mais afetada pela apoptose e mais precocemente que as demais células de outras camadas da retina (ROH; *et al*, 2007). Cingolani *et al* (2006) também demonstraram essa relação, a partir da injeção intravítrea de substância conhecida por gerar EROs ocasionando redução das amplitudes das respostas das ondas a e b no ERG, redução da espessura das camadas nucleares interna e externa por morte celular por apoptose.

O estresse oxidativo é um dos principais fatores de risco para doenças no sistema visual, pois a retina é altamente vulnerável devido ao elevado consumo de oxigênio (ANDERSON, 1968), alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados que podem sofrer dano oxidativo pela ação dos radicais livres, altos níveis da enzima SOD e baixa atividade das enzimas GPx e CAT, em relação a outros tecidos, favorecendo o acúmulo de peróxidos (FLIESLER; ANDERSON, 1983).

Os mecanismos que levam as alterações funcionais e histológicas da retina causadas pela intoxicação mercurial ainda não foram bem elucidados. No entanto, sabe-se que o MeHg gera desequilíbrio do equilíbrio redox dentre outros mecanismos que podem estar relacionados com as alterações encontradas na retina.

1.7 MECANISMOS DE TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO

Os principais mecanismos de citotoxicidade do MeHg são: 1) desregulação na homeostase do cálcio (Ca^{2+}); 2) distúrbio no equilíbrio entre os processos celulares oxidativos e redutores, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio e reduzindo a proteção antioxidante endógena, levando a danos celulares; 3) afinidade por grupos sulfidríla (ALI; LEBEL; BONDY, 1992; ASCHNER; *et al*, 2000, FARINA; *et al*, 2003; FARINA; *et al*, 2005; LUCENA; *et al*, 2007; ROONEY, 2007, CARVALHO; *et al*, 2008, DO NASCIMENTO; *et al*, 2008; FRANCO; *et al*, 2009, 2010; CECCATELLI, DARÉ; MOORS, 2010, ABDALLA; *et al*, 2011; BARCELOS; *et al*, 2011; FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011).

O MeHg causa alteração na homeostase do Ca^{2+} a partir de dois processos: 1) liberação primária dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citoplasma (LIMKE; *et al*, 2003); 2) super ativação dos receptores de glutamato tipo N-metil D-aspartato (NMDA), que gera um aumento do influxo de Ca^{2+} e Na^+ intracelular com aumento da produção de óxido nítrico (CHOI, 1992).

Adicionalmente, a citotoxicidade do Ca^{2+} pode induzir disfunção mitocondrial, pois um aumento nos níveis de Ca^{2+} na célula leva a mitocôndria a captar o excesso de Ca^{2+} , causando despolarização da membrana mitocondrial com inibição de ATPases, inchaço e alteração da homeostase dessa organela e consequente elevação da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio através da fuga de elétrons da cadeia respiratória para o oxigênio, formando ânion superóxido (O_2^-) causando apoptose celular (DREIEM; SEEGAL, 2007; CECCATELLI, DARÉ E MOORS, 2010).

A mitocôndria é alvo da toxicidade do MeHg não apenas devido à desregulação na homeostase do Ca^{2+} , mas também: 1) pela afinidade do MeHg com tiois (grupos sulfidrílicos) presentes em complexos e enzimas mitocondriais, inibindo-os; 2) pelo dano oxidativo causado direto na mitocôndria por ação de radicais livres em lipídios e proteínas de membrana, o que pode gerar uma liberação descontrolada de Ca^{2+} ; 3) pela indução de superprodução mitocondrial de EROs (FRANCO;*et al*, 2007; FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011).

O MeHg aumenta a produção de EROs, que são moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e muito reativas. Entre essas EROs estão radicais como OH^{\cdot} (radical hidroxila) e O^{2-} (superóxido) e não-radicais como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). São geradas no núcleo, citoplasma, mitocôndrias ou na membrana celular. A oxidação e formação de EROs ocorrem naturalmente no metabolismo dos organismos aeróbios e aumenta por condições patológicas ou tóxicas como a intoxicação mercurial (ALI; LEBEL; BONDY, 1992; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, leva a um desequilíbrio que caracteriza o estresse oxidativo que pode causar efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, as enzimas, aos carboidratos e DNA. A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos pela ação de EROs devido à peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com consequente perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além do aumento de produção de EROs (ALI; LEBEL; BONDY, 1992), dados da literatura sugerem que as disfunções celulares causadas pelo MeHg estão associadas a sua afinidade por grupos sulfidrílicos ou selenol (ROONEY, 2007), causando inativação de enzimas e de proteínas transportadoras, já que várias possuem grupos sulfidrílicos ou selenocisteína no seu sítio ativo, nos quais o MeHg pode ligar-se inativando ou diminuindo a atividade das mesmas (CARVALHO; *et al*, 2008).

Assim, o MeHg leva a depleção de glutathiona livre (GSH), um tripeptídeo com ação antioxidante que contém cisteína (que possui grupo sulfidril) e protege as células contra as EROs, “sequestrando” os radicais livres. Altera a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, GPx e a CAT. Logo, o MeHg pode alterar o equilíbrio oxidativo do organismo, por aumento de EROs e por redução dos agentes antioxidantes endógenos. (FARINA; *et al.*, 2005; LUCENA; *et al.*, 2007; DO NASCIMENTO; *et al.*, 2008; FRANCO; *et al.*, 2009, 2010; ABDALLA; *et al.*, 2011; BARCELOS; *et al.*, 2011; FARINA; *et al.*, 2011).

Essa afinidade com a cisteína leva a inativação de transportadores de glutamato (GLT1 e GLAST) que contém resíduos de cisteína em sequência. Juntamente com a inibição da captação astrocitária de glutamato e estímulo do efluxo desse neurotransmissor, causados pelo MeHg, resulta em uma concentração excessiva de glutamato na fenda sináptica, levando a citotoxicidade neuronal e morte celular (ASCHNER; *et al.*, 2000, FARINA; *et al.*, 2003).

Esses mecanismos podem ocorrer isolada ou simultaneamente, no entanto, o bloqueio ou redução do estresse oxidativo gerado pelo MeHg poderia amenizar uma cascata de outros eventos celulares e suas consequências fisiológicas. Nesse contexto, muitos estudos têm usado compostos com propriedades antioxidantes como estratégia de reduzir os danos causados pela intoxicação mercurial (FARINA; *et al.*, 2005, LUCENA; *et al.*, 2007; FRANCO; *et al.*, 2007, FRANCO; *et al.*, 2010; BARCELOS; *et al.*, 2011, WAGNER; *et al.*, 2010).

Por a região amazônica ser rica em plantas e frutos com propriedades antioxidantes como o açaí (CANUTO; *et al.*, 2010), esses poderiam ser usados nessa estratégia, uma vez que a referida região é muito exposta ao MeHg (DE SÁ, *et al.*, 2006; PASSOS; *et al.*, 2003, 2007; PINHEIRO; *et al.*, 2006, 2007, 2008; 2012; BERZAS NEVADO; *et al.*, 2010).

1.8 *Euterpe oleracea* (AÇAÍ)

Euterpe oleracea é uma palmeira originária do rio Amazonas e seus afluentes e estuários da América do Sul. O seu fruto, conhecido como açaí, possui grande valor socioeconômico para os povos nativos. É produzido e consumido em larga escala na região amazônica, principalmente, no estado do Pará. A polpa comercial é preparada por maceração das frutas em água morna, separando-as da semente e preparadas com diferentes diluições (HEINRICH;DHANJI; CASSELMAN, 2011).

A região Amazônica possui uma flora riquíssima com frutos de alto valor nutricional e com potencial terapêutico que ainda pode ser bastante explorado em nossa região (CANUTO; *et al*, 2010). O açaí reúne em sua composição uma série de componentes químicos com propriedades descritas como antioxidantes, anti-inflamatórios, antiproliferativos, cardioprotetores (MERTENS-TALCOTT; *et al*, 2008, SOUZA; *et al*, 2010, HOGAN; *et al*, 2010, HEINRICH;DHANJI; CASSELMAN, 2011). Embora o potencial terapêutico do açaí seja promissor, as pesquisas que mostram a atividade protetora deste fruto utilizando modelos animais como primeiro passo para sua caracterização como biofármaco ainda são escassas.

O açaí é produzido em larga escala na região amazônica. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a maioria da produção se concentra nos estados da Região Norte, com 94% da produção nacional. A produção total obtida em 2011 foi de 215.381 toneladas, sendo o Estado do Pará o maior produtor (109.345 toneladas) seguido pelos Estados do Amazonas (89.480 toneladas) e Maranhão (12.119 toneladas) (IBGE, 2011).

O consumo local do açaí é alto apesar do crescimento das exportações. No município de Belém, capital do Estado do Pará (maior produtor), o consumo *per capita* foi estimado em 43 kg por habitante ao ano, superando o consumo de laticínios, carne bovina, cereais e farinha (EMBRAPA, 2009). Em comunidades ribeirinhas do município de Belém o consumo por família é, em média, de 7 kg de açaí fruto (2,8 a 3,7 litros da polpa) por dia ou a cada dois dias chegando a 14 kg de açaí fruto (5,6 a 7,4 litros da polpa) por dia, fazendo-

se até três refeições diárias, o que faz do açaí o principal alimento consumido por estes ribeirinhos (Azevedo, 2005).

Segundo Azevedo (2005) o consumo local é na forma de uma bebida preparada colocando-se os frutos em água quente para amolecerem, depois são batidos com água em uma máquina manual, em sua grande maioria, ou elétrica. É extraída uma polpa grossa que é servida normalmente sem açúcar e com farinha, acompanhada de charque, peixe ou camarão.

O açaí tem um alto valor nutricional principalmente pelo seu conteúdo de proteínas, fibras alimentares, gorduras, vitamina E, minerais potássio e cálcio (tabela 1). O alto teor lipídico do açaí se deve principalmente aos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, especialmente ácido oléico e linoléico que podem contribuir para um efeito cardioprotetor e para melhorar o perfil lipídico (SCHAUSS; *et al*, 2006; MENEZES; *et al*, 2008).

Composição	Quantidade na matéria seca
Energia	66,3 Kcal/100 g
Proteínas	13 g/100 g
Lipídios	48 g/100 g
Açúcares	1,5 g/100 g
Fibras	34 g/100g
Sódio	56,4 mg/100 g
Potássio	932 mg/100 g
Cálcio	286 mg/100 g
Magnésio	174 mg/100 g
Ferro	1,5 mg/100 g
Cobre	1,7 mg/100 g
Zinco	7 mg/100 g
Fósforo	124 mg/100 g
Vitamina B1	0,25 mg/100 g
α-Tocoferol (vitamina E)	45 mg/100 g

Tabela 1. Composição química do açaí (ROGEZ, 2000).

Os constituintes químicos bioativos predominantes no açaí são polifenóis, principalmente antocianinas (319 mg/100 g) e outros flavonóides. As principais antocianinas presentes no açaí são cianidina-3-glucosídeo (C3G) e cianidina-3-rutinosídeo (C3R) totalizando 117 e 193 mg/100 g, respectivamente (PACHECO-PALENCIA; *et al.*, 2010; SCHAUSS; *et al.* 2006). Entre os outros flavonóides estão homoorientina, orientina, isovitexina, scoparina, deoxihexose taxifolina, vitexina, luteolina, quercetina crisoeriol e dihidrokaempferol (SCHAUSS; *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2010).

O açaí provê uma ampla gama de benefícios à saúde, devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiproliferativos e cardioprotetores (MERTENS-TALCOTT; *et al.* , 2008, SOUZA; *et al.*, 2010, HOGAN; *et al.*, 2010, HEINRICH; DHANJI; CASSELMAN, 2011). Inclusive sua atividade antioxidante é maior que a de outros frutos tropicais da Amazônia como buriti (*Mauritia flexuosa*), murici (*Byrsonimacrassifolia*) e noni (*Morindacitrifolia*) (CANUTO; *et al.*, 2010).

O efeito antioxidante da suplementação de açaí em ratos foi observado a partir da reversão do aumento da atividade da enzima SOD induzido por dieta hipercolesterolêmica. Além de resultar em um efeito hipocolesterolêmico, reduzindo colesterol total e o índice aterogênico (SOUZA; *et al.*, 2010). O açaí pode aumentar até mesmo a sobrevivência, diminuindo o estresse oxidativo no processo de envelhecimento e antagonizando os efeitos nocivos de uma dieta hiperlipídica (SUN; *et al.*, 2010).

Em humanos esses efeitos antioxidantes do açaí foram demonstrados por estudo com voluntários que realizaram consumo agudo de suco de açaí. Observou-se que a capacidade antioxidante do plasma foi aumentada significativamente, a partir da análise de concentração de antocianinas no plasma e de ensaio de capacidade de absorção de radical oxigênio. Esses resultados demonstram a absorção e os efeitos antioxidantes das antocianinas do açaí no plasma (MERTENS-TALCOTT; *et al.* , 2008).

Os efeitos do açaí podem estar relacionados a muitos dos seus compostos, porém, sua atividade antioxidante tem sido atribuída principalmente aos flavonóides que contém como as antocianinas, e outros compostos fenólicos como orientina, homoorientina, vitexina, luteolina, quercetina crisoeriol

e dihidrokaempferol (DEL POZO-INSFRAN; *et al*, 2004; MERTENS-TALCOTT; *et al*, 2008; DOS SANTOS *et al*, 2008; KANG *et al*, 2010).

A utilização de diferentes agentes antioxidantes como vitamina E e análogos (trolox, tocoferóis e tocotrienóis), GSH, selênio e inibidor de peroxidação lipídica (ácido α -lipóico) e flavonóides antagonizam alguns dos efeitos deletérios do MeHg como a formação de EROs e peroxidação lipídica em mitocôndrias de cérebro de roedores, danos no DNA nos hepatócitos e leucócitos, redução dos níveis de GSH e da atividade da GPx nos eritrócitos (FARINA; *et al*, 2005, LUCENA; *et al*, 2007; FRANCO; *et al*, 2007, FRANCO; *et al*, 2010; CECCATELLI, DARÉ; MOORS, 2010; BARCELOS; *et al*, 2011, WAGNER; *et al*, 2010).

A estratégia de proteção antioxidante contra os prejuízos celulares e fisiológicos causados pelo MeHg tem focado órgãos como rim, fígado, córtex cerebral e cerebelo (FARINA; *et al*, 2005; LUCENA; *et al*, 2007; ABDALLA; *et al*, 2011). Contudo, faz-se necessário o uso dessa estratégia em outros tecidos alvos do MeHg como a retina, uma vez que já foi demonstrada eficácia do uso de antioxidantes na proteção da retina em outros modelos de degeneração retiniana.

Nesse contexto, o açaí poderia ser utilizado no intuito de amenizar os efeitos prejudiciais causados pelo MeHg na retina devido ao elevado poder antioxidante que possui e boa acessibilidade da população ribeirinha da Amazônia que apresenta elevada exposição a esse metal .

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito protetor da *Euterpe oleracea* (açai) nas alterações eletrofisiológicas causadas pelo MeHg na retina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Monitorar a massa corporal dos ratos.
- ii) Avaliar a atividade locomotora dos animais dos quatro grupos experimentais no aparato campo aberto.
- iii) Caracterizar alterações funcionais na retina provocadas pelo MeHg, a partir de eletrorretinograma de campo total (ERG), medindo as seguintes respostas: escotópica de bastonetes, escotópica mista (bastonetes e cones), fotópica de cones e fotópica de flicker.
- iv) Avaliar o possível efeito protetor da *Euterpe oleracea* (açai) na função da retina dos ratos expostos ao MeHg, através do eletrorretinograma nas seguintes respostas: escotópica de bastonetes, escotópica mista (bastonetes e cones), fotópica de cones e fotópica de flicker.
- v) Caracterizar o padrão de estresse oxidativo a partir da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, no tecido retiniano dos grupos controle, expostos ao MeHg, pré-tratados com *Euterpe oleracea* e pré-tratados com *Euterpe oleracea* seguido pelo tratamento com MeHg.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E GRUPOS

Os animais utilizados para realização dos experimentos foram ratos Wistar adultos machos (150 a 200g com aproximadamente 2 meses de idade), obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade federal do Pará (UFPA). Mantidos em gaiolas de polipropileno, com no máximo quatro animais e alojados no Laboratório de Psicobiologia do ICB/UFPA, com ciclo 12h claro-escuro à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ com água e ração *ad libitum*. Sendo respeitadas todas as normas estabelecidas pelos guias de cuidados e uso de animais laboratoriais.

Durante os 28 dias que antecedem a gavagem, os animais permaneceram divididos em dois grupos: um recebeu ração padrão e outro ração enriquecida com polpa de açaí como descrito no tópico subsequente. A partir do primeiro dia de gavagem foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo Veículo: recebeu ração padrão e gavagem com solução salina 0,9% durante 7 dias consecutivos (8 animais).
- Grupo MeHg: recebeu ração padrão e gavagem com cloreto de MeHg – MeHgCl - (5mg/kg) por 7 dias consecutivos (8 animais) de acordo com o descrito por Liu et al, 2009.
- Grupo MeHg+Açaí: recebeu ração enriquecida com açaí por 28 dias e gavagem com MeHgCl (5mg/kg) por 7 dias consecutivos (8 animais).
- Grupo Açaí: recebeu ração enriquecida com açaí por 28 dias e gavagem com solução salina 0,9% por durante 7 dias consecutivos (6 animais).

3.2 RAÇÃO ENRIQUECIDA COM POLPA DE AÇAÍ

A polpa de açaí comercial fresca (obtida em um ponto de venda do município de Belém) com cerca de 90% de umidade (SOUZA; *et al*, 2010) foi

homogeneizada a ração comercial padrão na proporção de 10% de peso seco do fruto, ou seja, para cada litro da polpa de açaí, com cerca de 100g peso seco foi adicionado 900g de farelo de ração padrão. Após homogeneização, foi aquecida a 150°C na forma de pellets por cerca de 40 minutos, para redução da umidade. Esses pellets foram, então, pesados e armazenados em refrigeração dentro de sacos plásticos hermeticamente fechados durante o período de 3 a 5 dias. A figura 12 mostra a ração enriquecida pronta (SOUZA; *et al*, 2010).



Figura 12. Foto da ração enriquecida com açaí.

A ração enriquecida foi ofertada como pré-tratamento por 28 dias, antes da gavagem com MeHgCl ou solução salina (NaCl 0,9%), e foi pesada sobra e oferta diariamente, assim como a ração padrão, para controle do consumo alimentar. Também foi monitorada a massa corporal dos animais, por pesagem semanal. A ordem cronológica dos procedimentos experimentais é apresentada no esquema da figura abaixo (Figura 13).

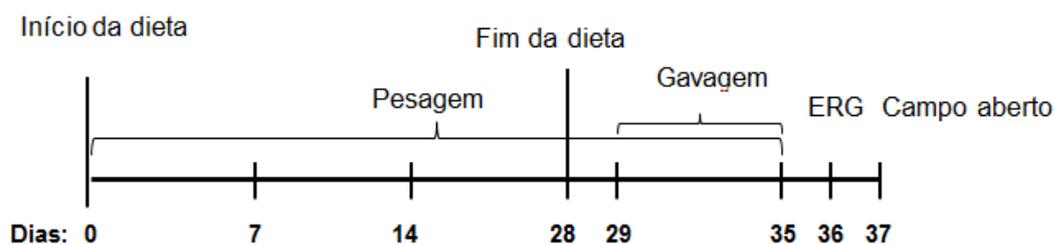


Figura 13. Ordem cronológica dos procedimentos experimentais.

3.3 EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

O cloreto de MeHg foi diluído em solução salina 0,9% em concentração de 1 mg/ml. Essa solução foi administrada na dose de 5 mg/Kg (LIU; *et al*, 2009) por gavagem durante 7 dias consecutivos nos grupos MeHg e MeHg+Açaí. Os animais foram pesados durante o período de gavagem para cálculo do volume da solução de MeHgCl a ser utilizada. Os grupos Veículo e Açaí receberam gavagem com solução salina à 0,9% com mesma relação volume/massa corporal (5 ml/kg).

3.4 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL

A massa corporal dos animais foi monitorada semanalmente durante todo o experimento (6 semanas) nos dias 0; 7; 14; 21; 28 e 35. Para análise da variação de massa corporal no decorrer do período de administração da dieta (Dia 0 ao Dia 28) foram considerados 2 grupos: um que recebeu ração padrão (posteriormente subdividido em grupo Veículo e grupo MeHg) e um que recebeu ração enriquecida com açaí (posteriormente subdividido em grupo Açaí e grupo MeHg+Açaí). Enquanto para o período de gavagem (Dia 28 ao Dia 35) foram avaliados os 4 grupos experimentais (Veículo, Açaí, MeHg e MeHg+Açaí).

Em ambos os períodos foram feitas análises dentro do mesmo grupo nos diferentes dias e entre os grupos em cada dia da pesagem. O consumo alimentar dos animais também foi monitorado, a partir da pesagem da ração, obtendo como consumo a diferença entre ração ofertada e a sobra no dia seguinte a oferta, média de consumo dos 4 animais por gaiola.

2.1 CAMPO ABERTO

Foi realizada avaliação comportamental no teste campo aberto 48 horas após a última gavagem para avaliação da atividade locomotora dos animais através da avaliação de cruzamento de quadrantes no aparato. O campo aberto utilizado tem formato circular com diâmetro de 83 cm e 52 cm de altura, no qual os animais são colocados no centro e filmados por 3 minutos. Os vídeos foram, então, analisados com auxílio do programa X-Plo-Rat 2005 para quantificação do número de quadrantes cruzados dentro do aparato campo aberto.

2.2 ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ERG)

2.2.1 Equipamentos

Os pulsos de luz foram gerados por um fotoestimulador com tubo de xenônio, modelo PS33-PLUS, marca Grass Technologies. Foram utilizados filtros de densidade neutra, sendo que um reduz a intensidade luminosa em 1,5 e outro em 2,0 unidades log. Os eletrodos utilizados foram (figura 14): eletrodo de aço tipo agulha, modelo F-E3-48; eletrodo de prata tipo disco de 6 mm, modelo F-E6SHC-12, ambos da marca Grass Technologies; eletrodo de filamento de prata (dobrado em forma circular em tamanho proporcional ao olho do animal) gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Manoel da Silva Filho. Os registros eletrofisiológicos obtidos enviados a um amplificador diferencial AC com alta impedância de entrada (Grass Technologies, modelo P511), com filtragem passa-alta de 0,3 Hz e passa-baixa de 300 Hz. As respostas elétricas da retina foram amplificadas em 50.000 vezes, monitoradas com um osciloscópio (*Protek*, modelo 6510) com uma frequência de amostragem de 1 KHz por uma placa de aquisição de dados A/D (*National Instruments, Austin*,

TX). O programa de aquisição de dados utilizado foi o Labview 3.0 (*National Instruments, Austin, TX*).



Figura 14. Eletrodos utilizados no eletrorretinograma. Da esquerda para direita: eletrodo terra, eletrodo ativo e eletrodo de referência.

2.2.2 Procedimentos

Os registros foram realizados no dia seguinte à última gavagem. Os animais foram adaptados ao escuro por, no mínimo 14 horas (“overnigh”) na sala de experimentação, com o objetivo de manter os bastonetes em seu limiar de ativação, para a realização dos testes de resposta escotópica (bastonetes) e mista (bastonetes e cones). Os registros eletrofisiológicos da retina foram realizados após anestésiar os animais com injeção intraperitoneal de solução de hidrocloreto de cetamina e hidrocloreto de xilazina (100 e 6 mg/kg, respectivamente) (JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001). Os mesmos também tiveram a pupila previamente dilatada com uma gota de colírio tropicamida a 1% (Mydriacyl Alcon®) para que o estímulo luminoso alcançasse maior área possível do tecido retiniano.

Após a dilatação da pupila, os eletrodos foram colocados com auxílio de uma lupa (3,5x) da seguinte forma: eletrodo ativo bipolar de filamento de prata posicionado sobre a córnea com colírio de metilcelulose a 2% para proteção da superfície da córnea; o eletrodo referência (tipo agulha) posicionado na pálpebra inferior (atravessando-a) e o eletrodo terra (tipo disco) na orelha ipsilateral ao olho testado (figura 13), utilizando uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O. WEAVER) aplicada no eletrodo, para facilitar a condução elétrica. Logo em seguida os animais foram posicionados na gaiola de Faraday (46,5x40,3x30cm), a 30cm do fotoestimulador.

Todos esses procedimentos foram realizados no escuro com auxílio de uma luz vermelha de baixa intensidade. Após os registros das respostas escotópicas, os ratos foram adaptados ao claro por 10 minutos, para anular a participação de bastonetes, obtendo respostas isoladas de cones. Os estímulos luminosos foram apresentados por fotoestimulador modelo PS33-PLUS posicionado a 30 cm do olho do animal.

Foram apresentados estímulos de luz branca com diferentes intensidades, duração e intervalo interestímulos de acordo com o tipo de resposta que se pretendeu obter, baseado nos padrões estabelecidos por HARAZNY; *et al* (2009). Para cada tipo de resposta foram emitidos 6 a 12 pulsos, exceto na resposta de flicker, na qual foram emitidos pulsos

intermitentes durante 6 segundos. A resposta final foi a média das respostas a cada pulso. O protocolo, a partir do início dos registros, teve duração de 20 a 30 minutos.

Foram obtidos, na ordem da esquerda para direita, os seguintes tipos de resposta:

Tipo de Resposta	Escotópica de Bastonete	Escotópica Mista 1	Escotópica Mista 2	Fotópica de Cone	Fotópica de Flicker (12, 18, 24, 30Hz)
Adaptação	Escotópica (≥14h)	Escotópica (≥14h)	Escotópica (≥14h)	Fotópica (10 min)	Fotópica (10 min)
Intensidade do estímulo	<0,09 cd.s/m ²	0,378 cd.s/m ²	10,215 cd.s/m ²	10,215 cd.s/m ²	10,215 cd.s/m ²
Duração do estímulo	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms
Intervalo entre estímulos	15 s	15 s	15 s	4 s	12, 18, 24 ou 30/s
Resposta	Bastonete	Bastonete + Cone	Bastonete + Cone	Cone	Cone

Tabela 2. Tipos de respostas obtidas com o ffERG.

2.2.3 Mensuração dos componentes do ffERG

As respostas obtidas a partir de cada pulso de luz foram promediadas e medidas com auxílio do programa Signal 3.0 como descrito a seguir:

A amplitude da onda-*a* é a medida entre a linha de base e o pico máximo da onda-*a* e a amplitude da onda-*b* é a medida entre o pico máximo da onda-*a* e o pico máximo da onda-*b*. O tempo implícito de cada onda é medido entre o início do estímulo (*flash*) e o pico máximo da onda (Figura 15).

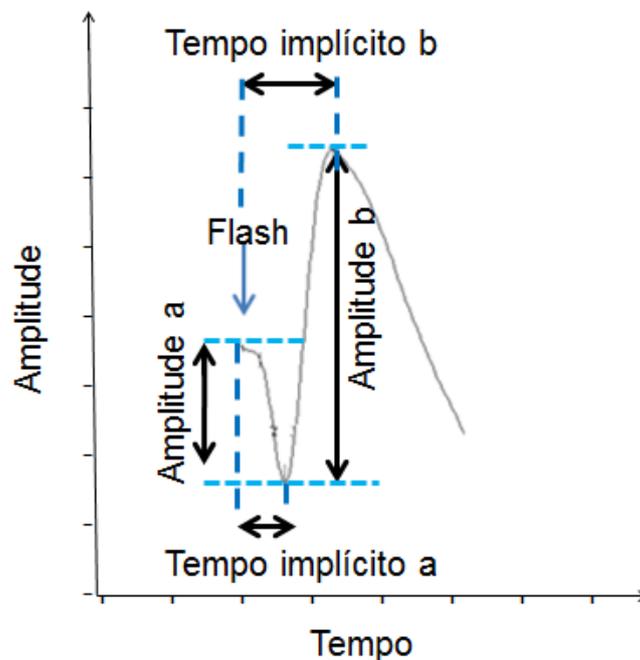


Figura 15. Parâmetros do ffERG analisados. A amplitude da onda-a medida a partir da linha de base até o pico máximo da onda-a. A amplitude da onda-b medida a partir do pico máximo da onda-a ao pico máximo da onda-b. O tempo implícito de ambas as ondas determinado do início do estímulo ao pico máximo de cada onda.

2.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO TECIDO RETINIANO

A análise bioquímica de peroxidação lipídica foi realizada pelo método TBARS (UCHIYAMA; MIHARA, 1978). A retina foi dissecada e colocada em *eppendorf* com 700 µl de PBS (salina tamponada com fosfato, pH 7.4), em seguida, acondicionada em -20°C até a análise bioquímica, até uma semana após a dissecação do tecido. No momento da análise bioquímica, o tecido foi previamente homogeneizado na solução em que foi armazenado (700 µl de PBS) por sonificador magnético por 5 segundos. Desse homogeneizado foi retirado 200µl para dosagem de proteína. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos à 4°C e o sobrenadante utilizado para avaliação da peroxidação lipídica a partir da dosagem de malonaldeído (MDA), um biomarcador de estresse oxidativo.

Para isso, foi adicionado 1,9ml do reativo TBAR, composto por ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), ácido clorídrico (HCl) e água destilada (H₂O) à 100 µl do sobrenadante da amostra. Os tubos contendo as amostras e o reativo TBAR foram aquecidos em banho-maria por 15 minutos a 80°C. O TBA reage com MDA (produto tóxico produzido no processo de peroxidação lipídica, liberado quando ocorre injúria de ligações insaturadas de ácidos graxos presentes na membrana plasmática da célula a partir da atuação de EROs) gerando espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), formando um cromógeno de coloração rosada que foi lido em espectrofotômetro Uv-Vis (SP-2100UV/2100UVPC/SPECTRUM-METER) a 535nm. A quantificação de MDA foi feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA e normalizada pelo teor de proteína contido na amostra, medido pelo método de Bradford (1976) e os resultados foram obtidos em pmol de MDA/mg de proteína e expressos em porcentagem do controle.

2.3.1 Dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976)

Após a homogenização do tecido em PBS foi retirado 200 µl e adicionado a 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) e 600 µl de água destilada. Dessa diluição foi retirado 25 µl adicionado a 175 µl de água destilada e 2ml do reativo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol 95%, ácido fosfórico 85%) e após 2 minutos a reação origina um composto de coloração azul medida em espectrofotômetro Uv-Vis (SP-2100UV/2100UVPC/SPECTRUM-METER) a 595 nm.

A dosagem de proteína foi feita a partir de curva de calibração construída com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste ANOVA de uma via com pós teste *Tukey* para comparação entre os 4 grupos experimentais ou ANOVA de duas vias para comparação da massa corporal dos grupos experimentais nos diferentes dias de pesagem. Foi utilizado o programa graphpad prism 5.0 e considerado significativo valores de $p < 0,05$.

Os resultados de massa corporal e peroxidação lipídica são expressos em média e desvio padrão e os resultados do eletrorretinograma de campo total (ffERG) e campo aberto em média e erro padrão.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL

A avaliação da massa corporal dos animais no período de administração da dieta (28 dias) mostrou não haver diferença estatística entre o grupo que recebeu ração padrão e o grupo que recebeu ração enriquecida com açaí em nem um dos dias de pesagem (figura 16A).

Na avaliação da massa corporal dos animais no período de gavagem (um dia antes e último dia desse procedimento, Dias 28 e 35, respectivamente) foi observado que não houve diferença entre os quatro grupos experimentais. A avaliação intragrupo nesse período mostrou que os grupos não apresentaram variação significativa de massa corporal (Figura 16 B).

O consumo alimentar dos animais também foi monitorado durante todo o experimento. Observou-se que não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos, tanto antes (Grupo ração padrão= $26,6 \pm 7,7$ g/dia; Grupo ração açaí= $29,6 \pm 5,4$ g/dia) quanto durante o período da gavagem (Veículo= $17,7 \pm 1,5$ g/dia; Açaí= $15,2 \pm 3,4$ g/dia; MeHg= $16,2 \pm 3,6$ g/dia; MeHg+Açaí= $15,9 \pm 1,7$ g/dia).

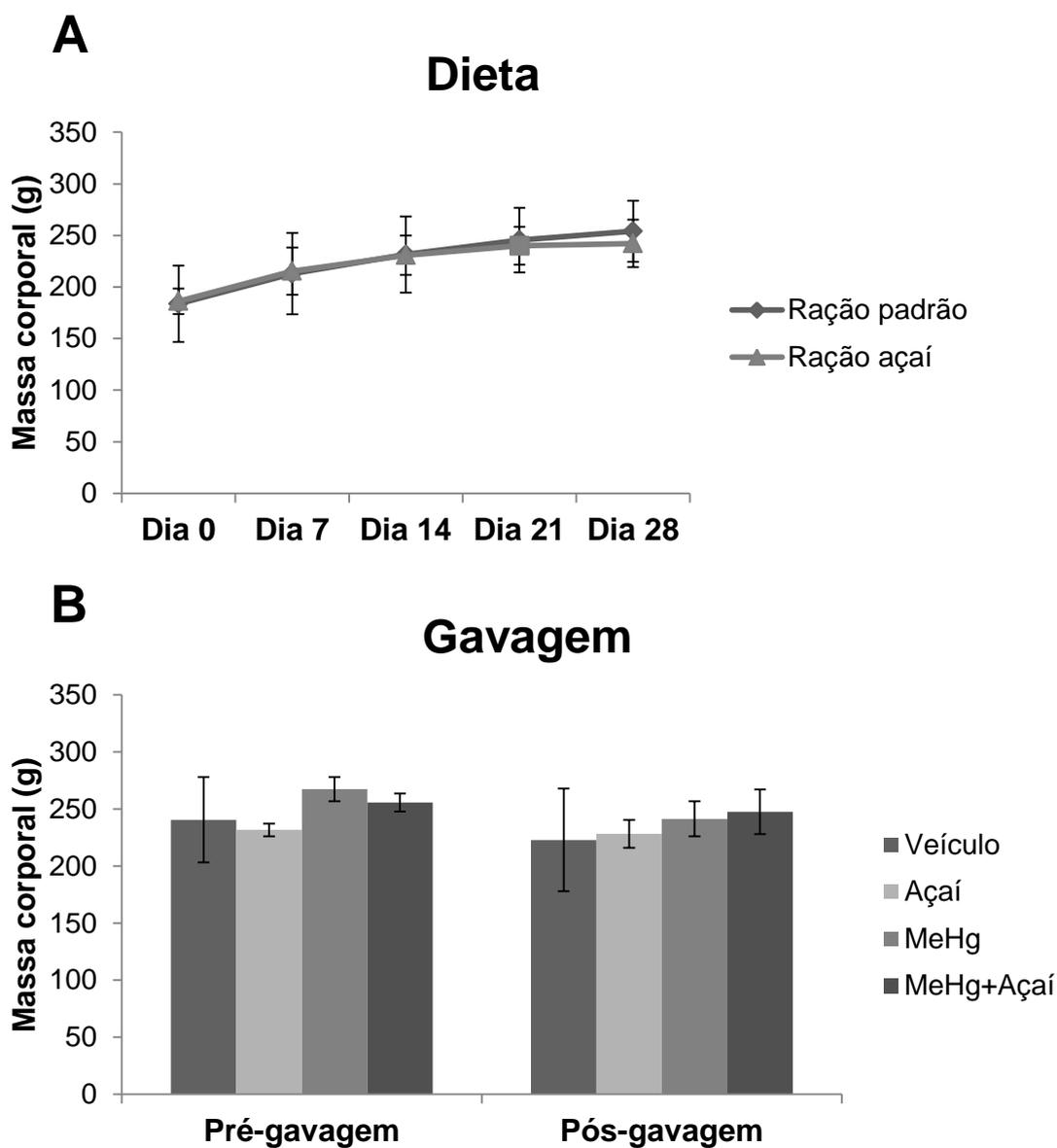


Figura 16. Evolução da massa corporal dos animais. Em A os grupos que receberam ração padrão (n=14) e ração enriquecida com açai (n=11) durante os 28 dias de pré-tratamento com dieta. Em B os 4 grupos experimentais (Veículo n=7; Açai n=5; MeHg n=7; MeHg+Açai n=6) durante o período de gavagem. Valores expressos em média e DP. Teste *t de Student* para comparação entre grupo ração padrão e ração açai em cada dia de pesagem (A) e entre cada grupo experimental no dia 28 e 35 (B). ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey* para comparação do mesmo grupo nos 5 dias de pesagem (A) e dos 4 grupos experimentais no dia 28 e no dia 35 (B).

3.2 CAMPO ABERTO

Foi utilizado o teste comportamental campo aberto para avaliar possível redução da atividade locomotora causada pelo MeHg. No entanto, a partir da avaliação de número de quadrantes cruzados no aparato, observou-se que não houve diferença estatística de locomoção entre os grupos, apenas uma tendência de maior locomoção no grupo Açai (Figura 17).

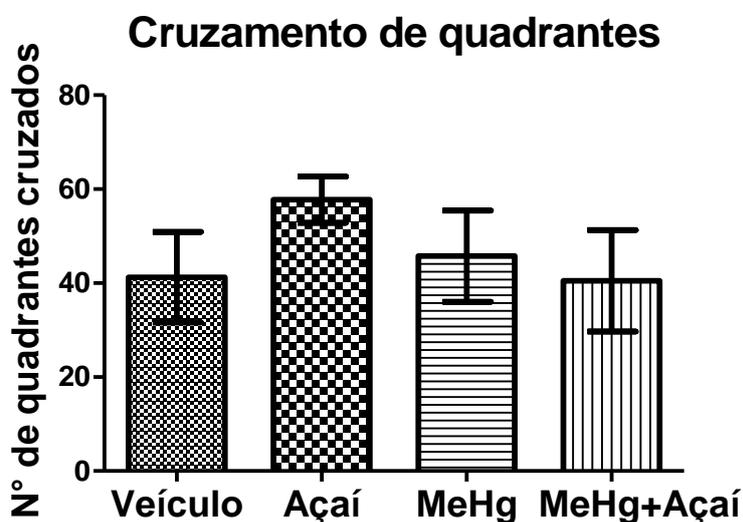


Figura 17. Cruzamento de quadrantes no campo aberto. Resultados expressos em média e EP (n=4). Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*.

3.3 ELETRORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG)

Foi realizada avaliação funcional da retina através da técnica de eletrorretinograma de campo total, como descrito nos métodos. Os parâmetros analisados foram amplitude e tempo implícito para dois componentes da resposta eletrofisiológica: onda-a e onda-b.

Quanto ao tempo implícito, não houve diferença estatística entre os grupos em nem um dos tipos de respostas. Na resposta escotópica de bastonetes os grupos apresentaram média de tempo implícito entre 95,7 e 104,0 ms (n=5 a 7). Na resposta escotópica mista 1 apresentaram média de tempo implícito entre 29,5 e 33,5 ms (n=5) para onda-a e entre 75,1 e 79,8 ms (n=5 a 7) para onda-b. Em resposta escotópica mista 2 apresentaram média de tempo implícito entre 26,4 a 27,7 ms (n=5 a 7) para onda-a e entre 59,4 e 63,7 ms (n=5 a 7) para onda-b. Quanto à resposta fotópica de cones os grupos apresentaram média de tempo implícito entre 26,8 e 27,9 ms (n=6 a 7) para onda-a e entre 55,8 e 59,2 ms (n=6 a 8) para onda-b. Para respostas fotópicas de flicker as médias de tempo implícito entre os grupos foram: 58,3 a 62,5 ms para 12 Hz (n=5 a 7); 56,7 a 62,8 ms para 18 Hz (n=5 a 7); 54,4 a 58,3 ms para 24 Hz (n=4 a 7) e 31,1 a 43,3 ms para 30 Hz (n=4 a 7).

Na resposta fotópica de flicker as respostas em 30 Hz apresentaram tempo implícito inferior ao das demais frequências em todos os grupos (média de 54,4 à 62,6 ms nos 4 grupos nas frequências de 12, 18 e 24 Hz e de 31,1 à 43,3 ms nos 4 grupos em 30 Hz).

A redução de amplitude da resposta eletrofisiológica da retina causada pelo MeHg assim como a proteção exercida pelo açaí são evidenciadas nas figuras de 18 a 25, que apresentam exemplos de registros de um animal de cada grupo (nos 6 tipos de respostas avaliadas (escotópica de bastonetes, escotópica mista 1, escotópica mista 2, fotópica de cone e fotópica de flicker)).

RESPOSTA ESCOTÓPICA DE BASTONETE

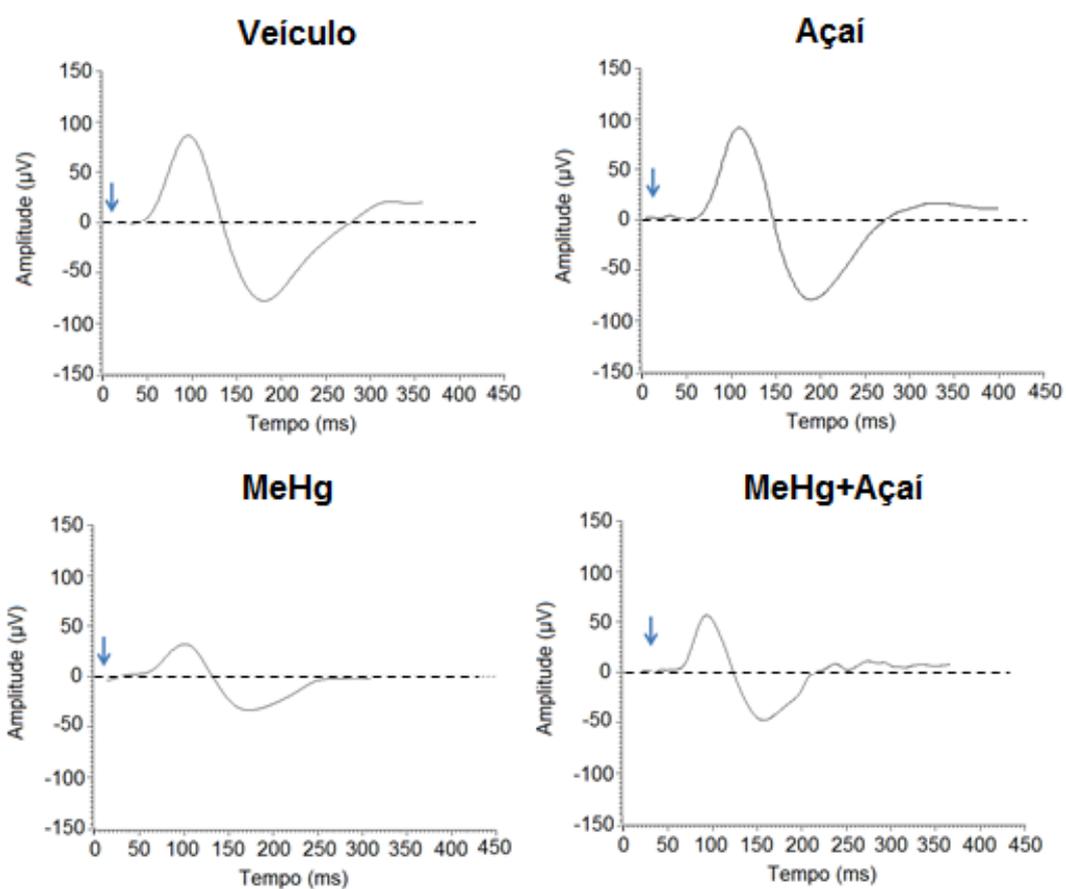


Figura 18. Registro das respostas escotópicas de bastonete. As setas representam o início do estímulo.

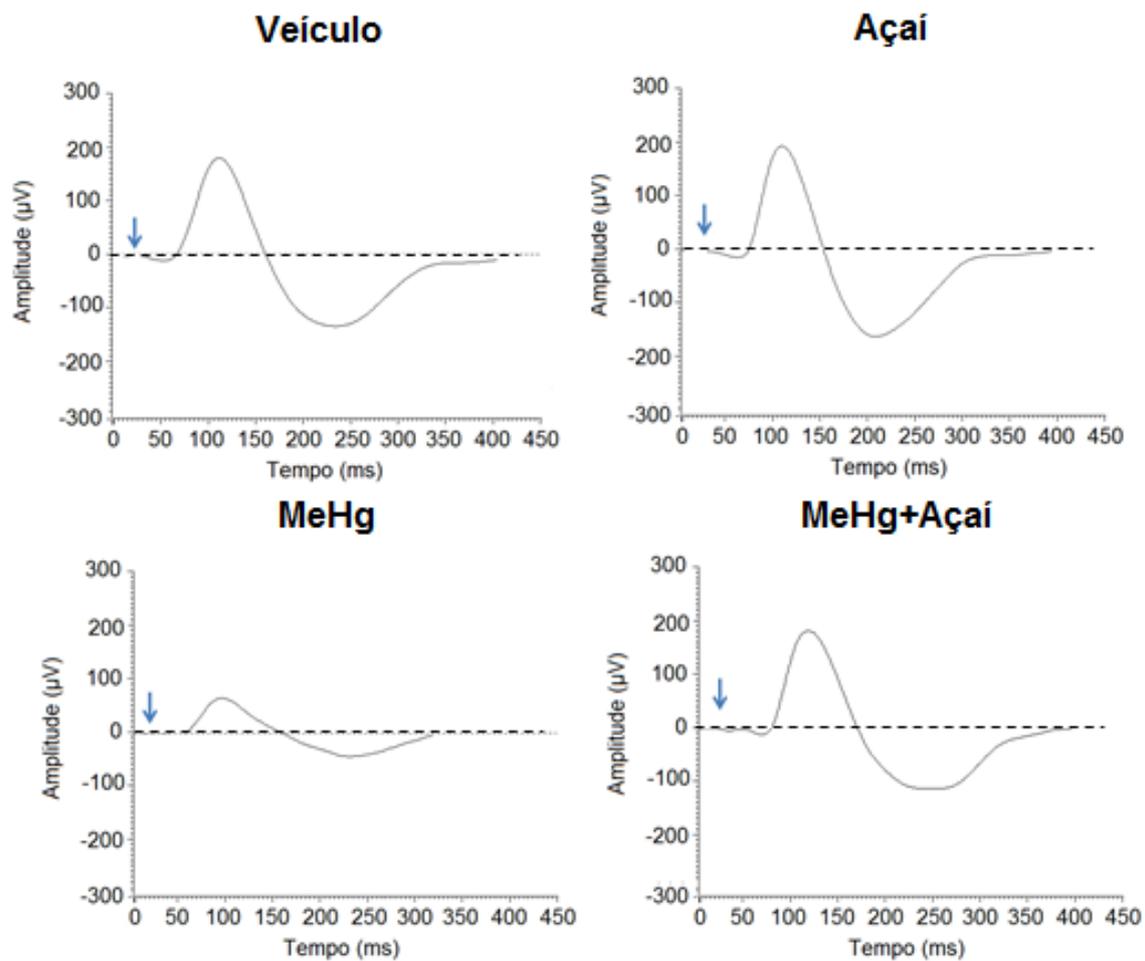
RESPOSTA ESCOTÓPICA MISTA 1

Figura 19. Registro das respostas escotópicas mista 1. As setas representam o início do estímulo.

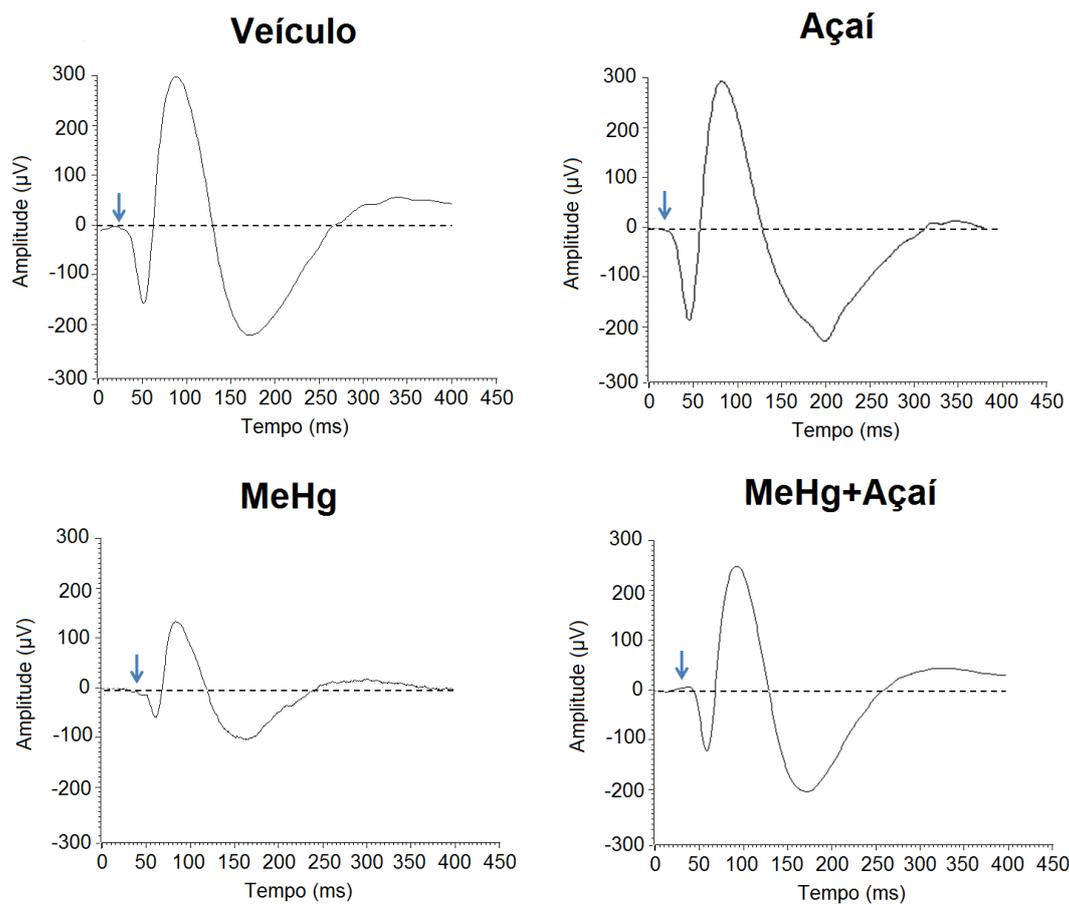
ESPOSTA ESCOTÓPICA MISTA 2

Figura 20. Registro das respostas escotópicas mista 2. As setas representam o início do estímulo.

RESPOSTA FOTÓPICA DE CONE

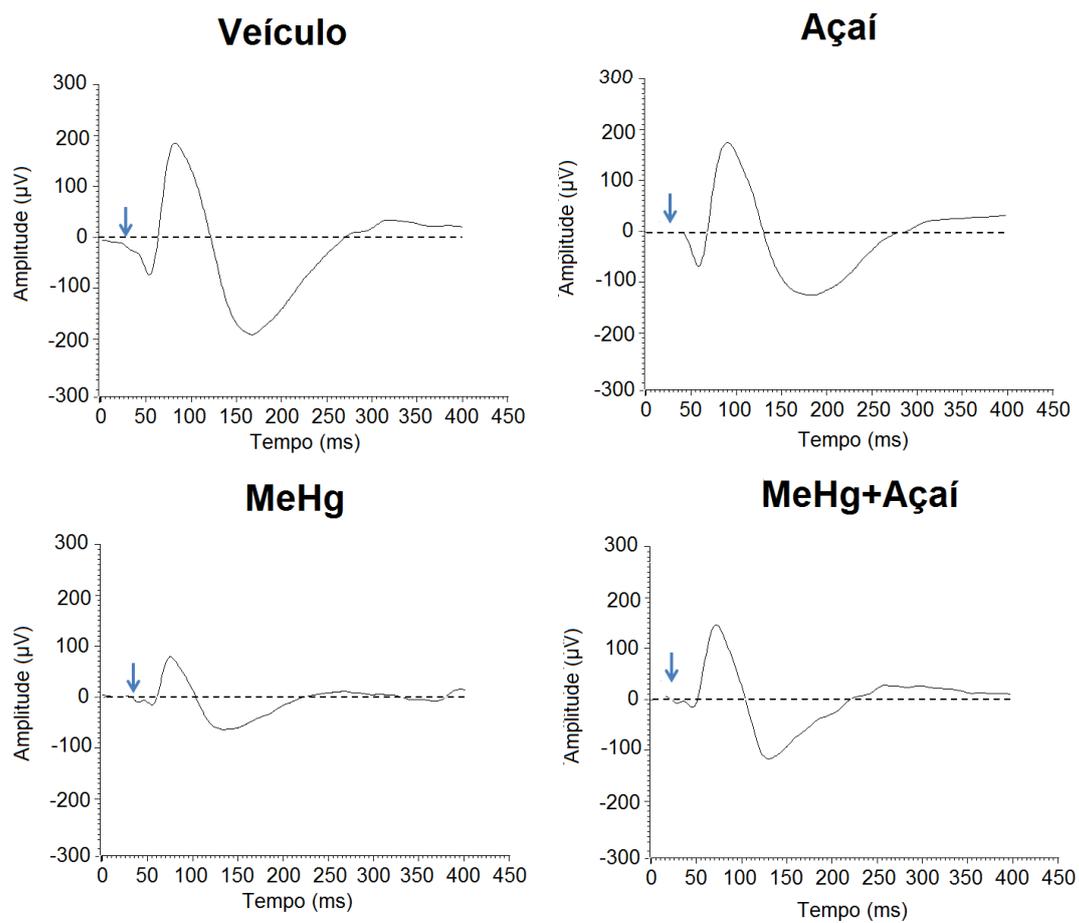


Figura 21. Registro das respostas fotópicas de cone. As setas representam o início do estímulo.

RESPOSTA FOTÓPICA DE FLICKER 12 Hz

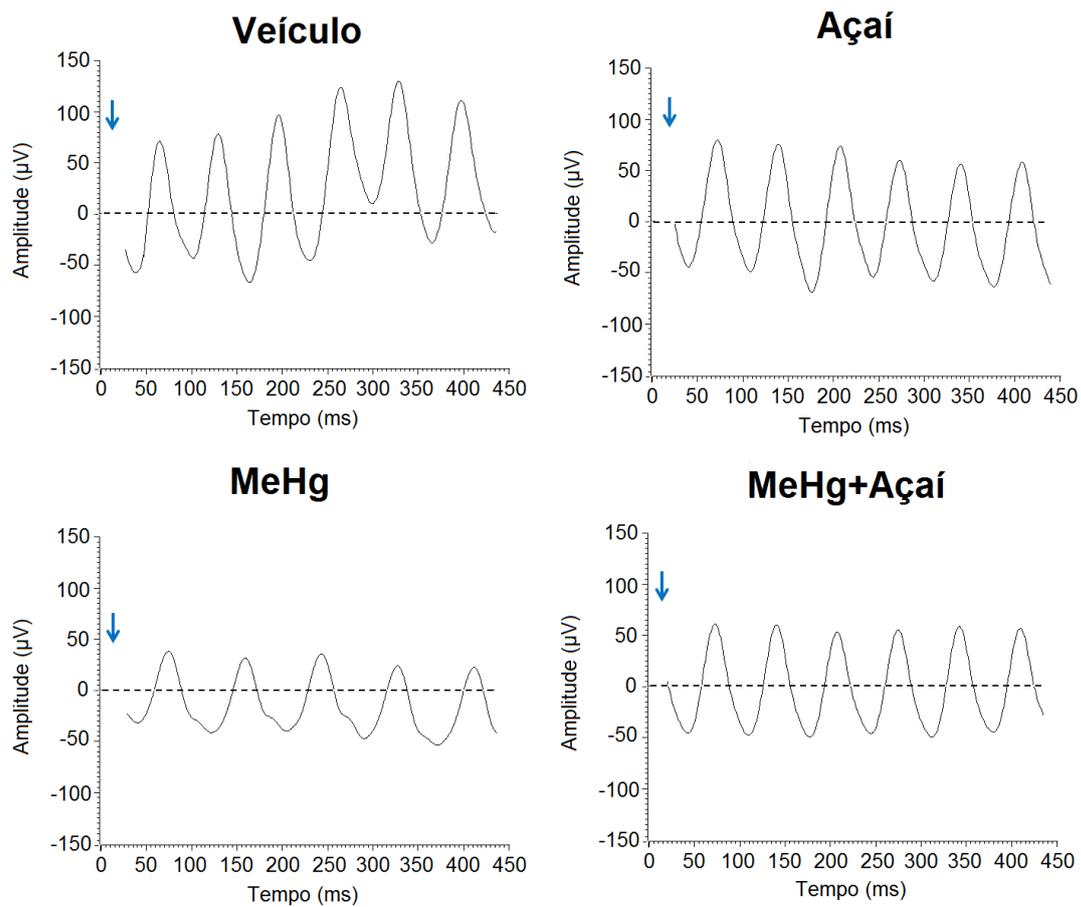


Figura 22. Registro das respostas fotópicas de flicker em 12 Hz. As setas representam o início do estímulo.

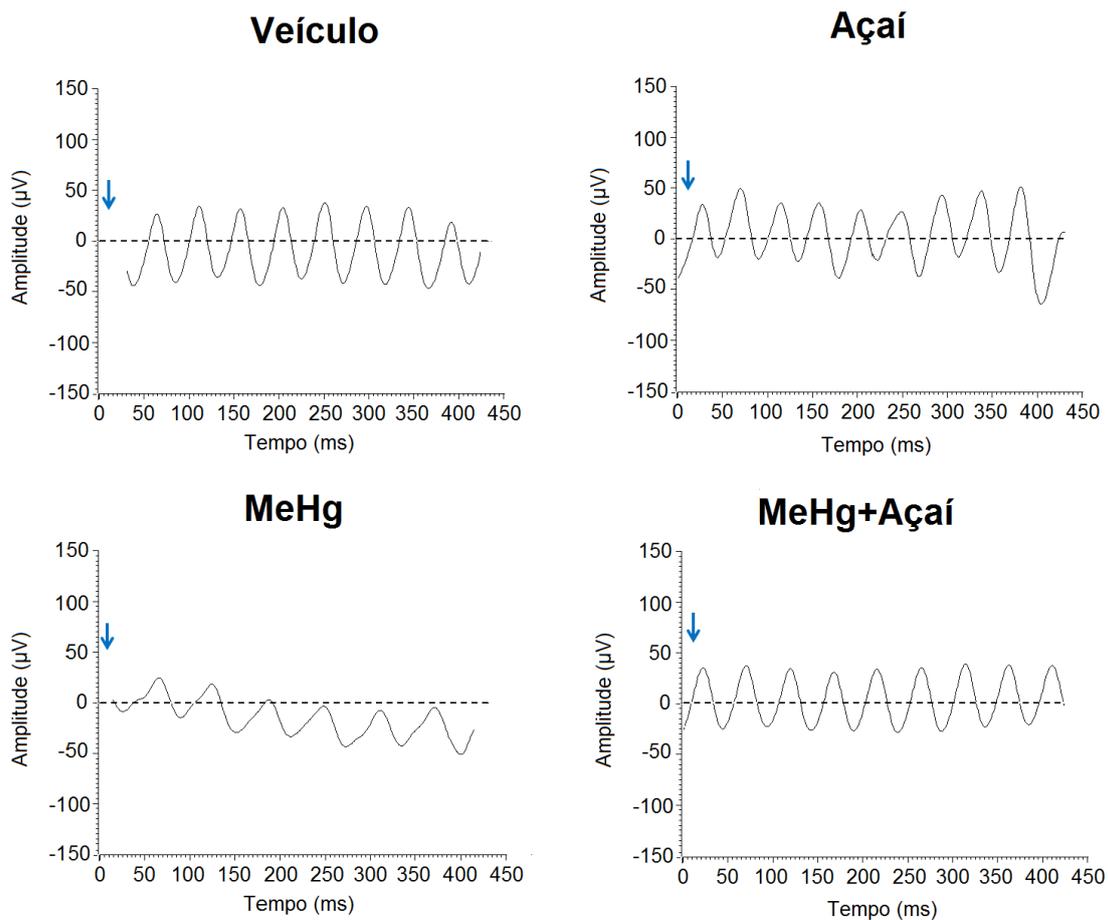
RESPOSTA FOTÓPICA DE FLICKER 18 Hz

Figura 23. Registro das respostas fotópicas de flicker em 18 Hz. As setas representam o início do estímulo.

RESPOSTA FOTÓPICA DE FLICKER 24 Hz

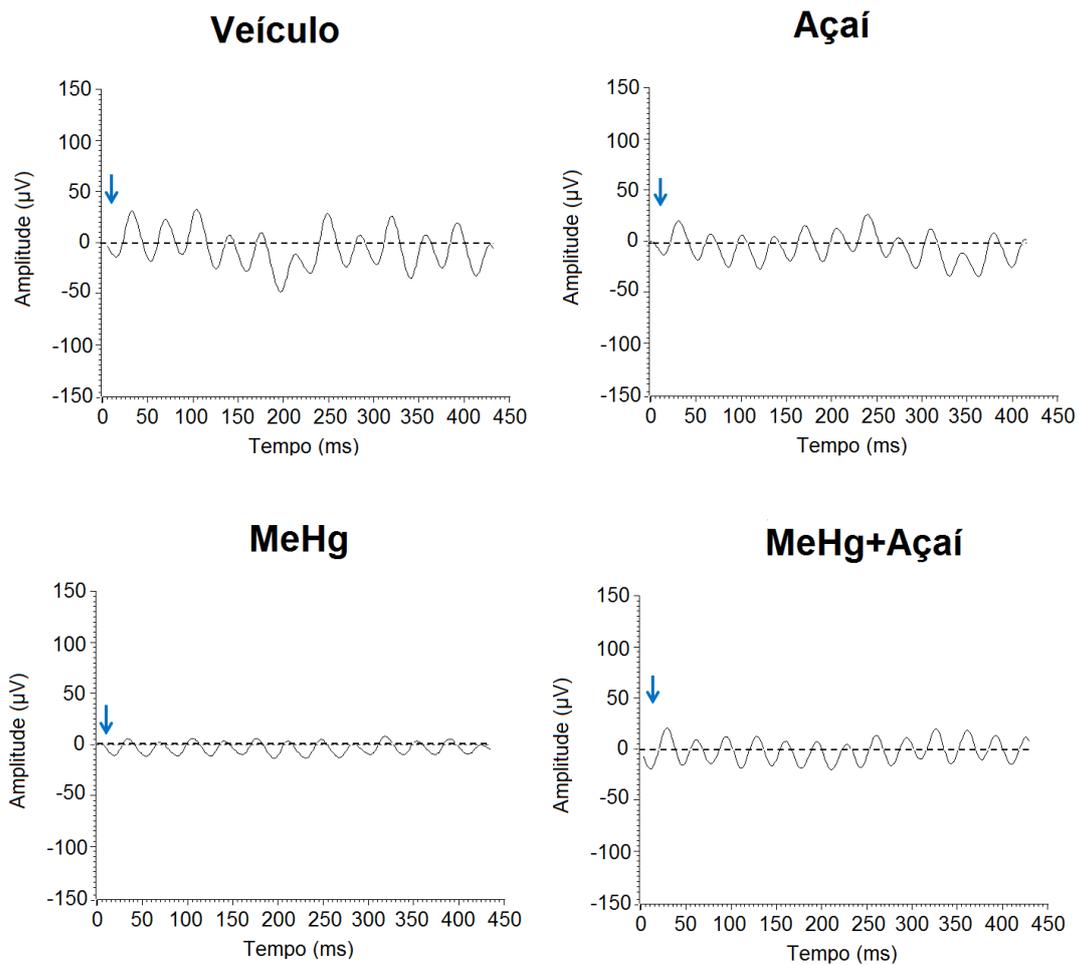


Figura 24. Registro das respostas fotópicas de flicker em 24 Hz. As setas representam o início do estímulo.

RESPOSTA FOTÓPICA DE FLICKER 30 Hz

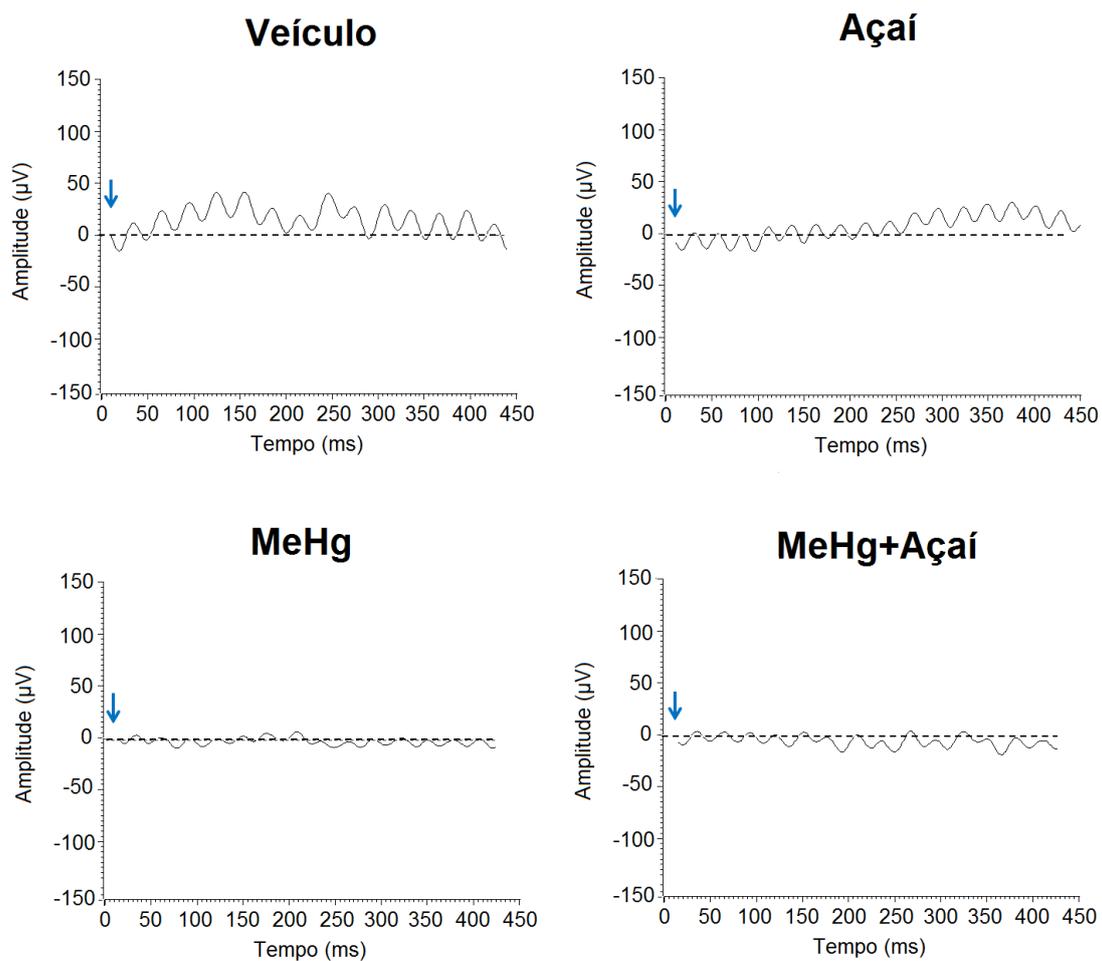


Figura 25. Registro das respostas fotópicas de flicker em 30 Hz. As setas representam o início do estímulo.

Na resposta escotópica de bastonetes houve diferença na amplitude da resposta entre os grupos Veículo ($114,6 \pm 23,6 \mu\text{V}$) e MeHg ($41,2 \pm 9,6 \mu\text{V}$), o que representou uma redução de aproximadamente 64%. A amplitude média do grupo MeHg+Açaí ($68,9 \pm 5,3 \mu\text{V}$) não apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos (Figura 26).

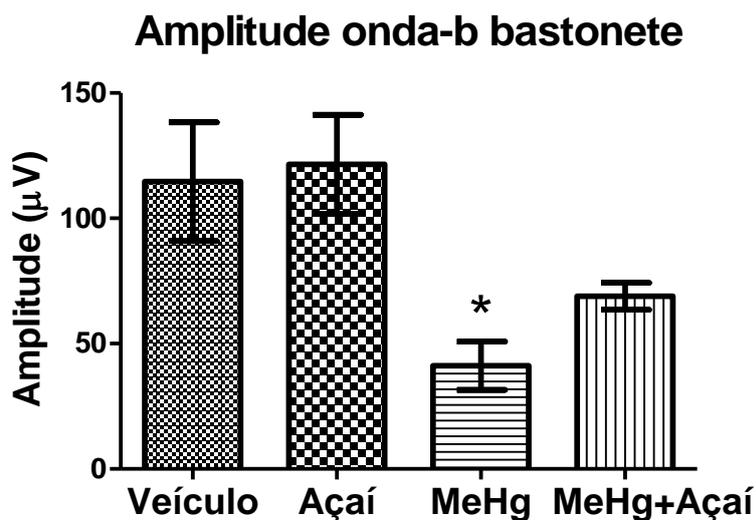


Figura 26. Amplitude da onda-b na resposta escotópica de bastonete. Resultados expressos em média e EP (n=5). Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo.

O MeHg causou redução de aproximadamente 59,7% nas amplitudes da onda-a (Veículo: $8,4 \pm 1,4 \mu\text{V}$ e MeHg: $3,4 \pm 0,3 \mu\text{V}$) e de 60,6% da onda-b (Veículo: $176,7 \pm 17,8 \mu\text{V}$ e MeHg: $69,5 \pm 12,0 \mu\text{V}$) da resposta escotópica mista 1. O grupo MeHg+Açaí apresentou amplitude da onda-a ($8,3 \pm 0,6 \mu\text{V}$) e da onda-b ($144,1 \pm 7,1 \mu\text{V}$) maior que o grupo MeHg (Figura 27).

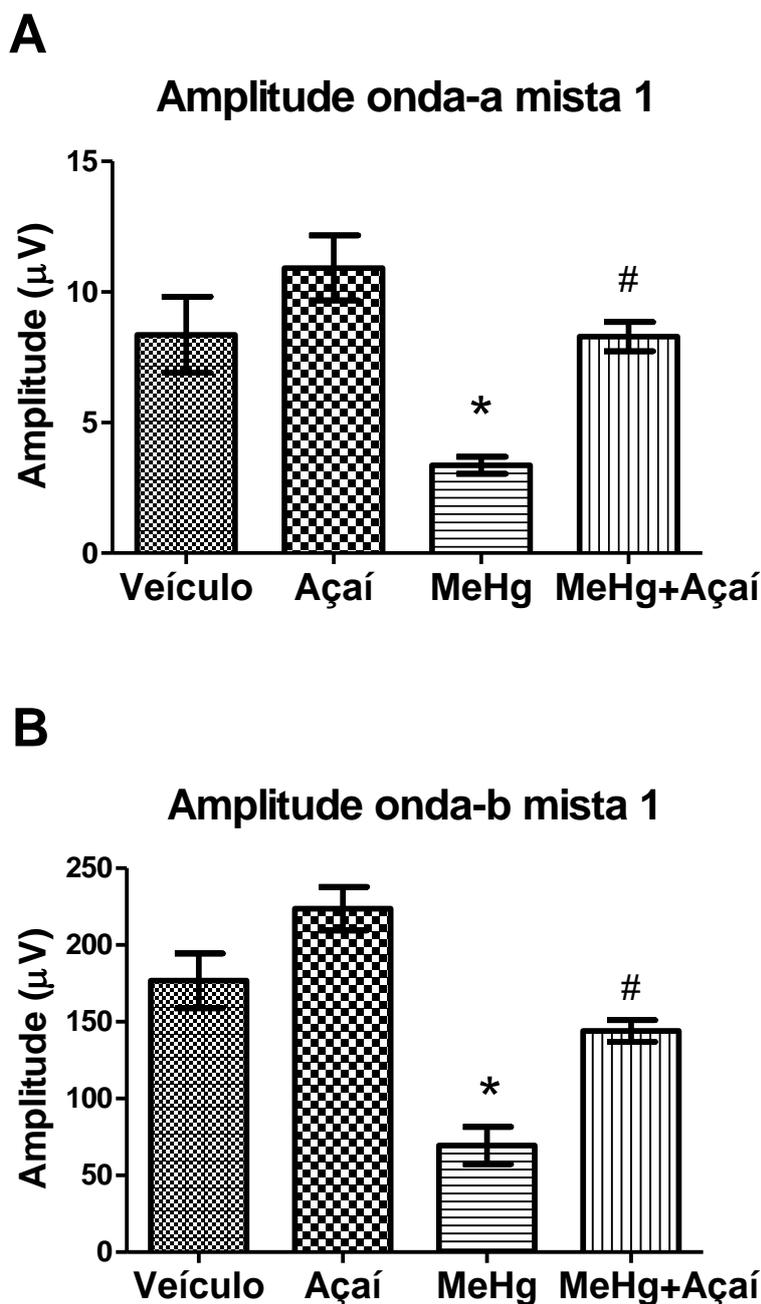


Figura 27. Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta escotópica mista 1. Amplitude da onda-a em A e amplitude da onda-b em B. Resultados expressos em média e EP (n=4 a 5 para onda-a e n=4 a 7 para onda-b). Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo MeHg.

Com relação à resposta escotópica mista com maior intensidade luminosa (mista 2), o MeHg reduziu as amplitudes da onda-a em cerca de 77,5% (Veículo: $103,1 \pm 23,3 \mu\text{V}$ e MeHg: $40,2 \pm 9,6 \mu\text{V}$) e da onda-b em aproximadamente 50,7% (Veículo: $281 \pm 38,3 \mu\text{V}$ e MeHg: $138,6 \pm 14 \mu\text{V}$). O grupo MeHg+Açaí apresentou amplitude da onda-a ($106,4 \pm 13,6 \mu\text{V}$) e onda-b ($275,2 \pm 27,6 \mu\text{V}$) maior que a do grupo MeHg (Figura 28).

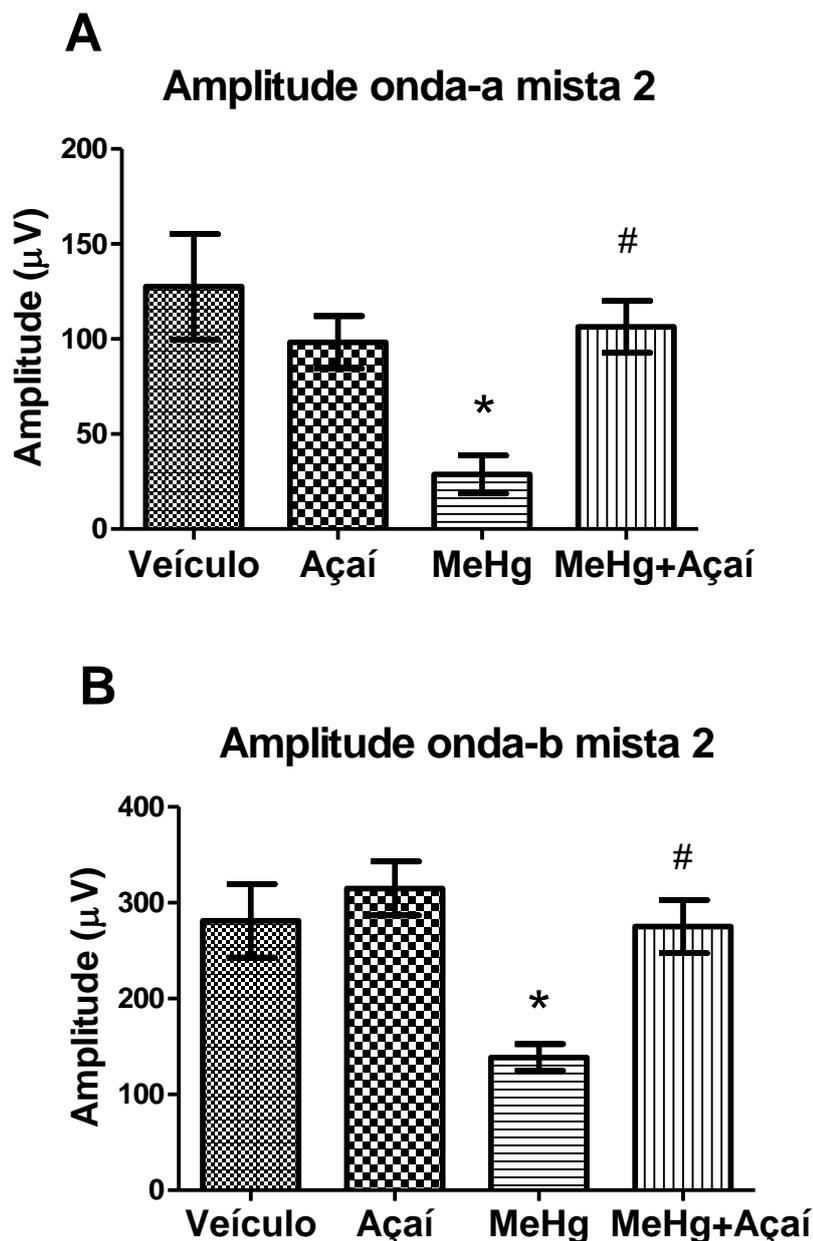


Figura 28. Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta escotópica mista 2. Amplitude da onda-a em A e amplitude da onda-b em B. Resultados expressos em média e EP (n=4 a 6 para onda-a e n= 4 a 6 para onda-b). Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*. *p<0,05 em relação ao grupo Veículo e #p<0,05 em relação ao grupo MeHg.

A amplitude da onda-a (Veículo: $27,2 \pm 3,6 \mu\text{V}$ e MeHg: $7,5 \pm 1,8 \mu\text{V}$) e da onda-b (Veículo: $139,3 \pm 16,1 \mu\text{V}$ e MeHg: $54,4 \pm 10 \mu\text{V}$) em resposta fotópica de cone foi menor no grupo exposto ao MeHg que no grupo Veículo, sendo a redução da onda-a de aproximadamente 72,4% e da onda-b de cerca de 60,9%. O grupo MeHg+Açaí apresentou amplitude da onda-a ($6,9 \pm 2,3 \mu\text{V}$) menor que do grupo Veículo e amplitude da onda-b ($104,5 \pm 5,9 \mu\text{V}$) maior que a do grupo MeHg (Figura 29).

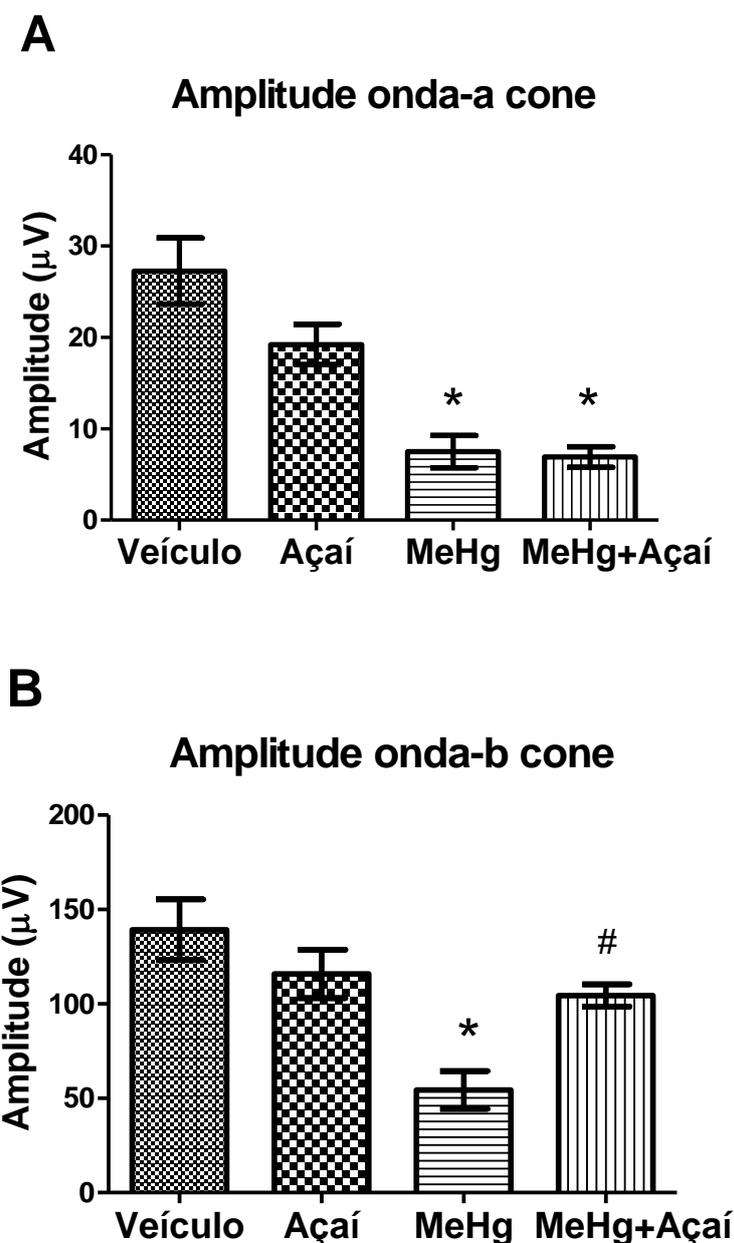


Figura 29. Amplitude da onda-a e da onda-b na resposta fotópica de cone. Amplitude da onda-a em A e amplitude da onda-b em B. Resultados expressos em média e EP (n= 4 a 5 para onda-a e 5 a 6 para onda-b). Teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo MeHg

Em resposta fotópica de flicker as amplitudes de onda-b nas frequências de estimulação de 12 Hz (Veículo: $67,7 \pm 10 \mu\text{V}$ e MeHg: $28,6 \pm 6,9 \mu\text{V}$), 18 Hz (Veículo: $31,3 \pm 3,4 \mu\text{V}$ e MeHg: $14,2 \pm 2,3 \mu\text{V}$) e 24 Hz (Veículo: $21,0 \pm 1,8 \mu\text{V}$ e MeHg: $11,0 \pm 1,1 \mu\text{V}$) e 30 Hz (Veículo: $10,9 \pm 0,6 \mu\text{V}$ e MeHg: $6,0 \pm 1,1 \mu\text{V}$) foram reduzidas pelo MeHg. Redução de aproximadamente 57,8%, 54,6%, 47,6% e 44,4% nas frequências 12, 18, 24 e 30 Hz respectivamente, em relação à média do grupo Veículo. O grupo MeHg+Açaí apresentou amplitudes superiores ao grupo MeHg nas frequências 12 Hz ($67,2 \pm 9,1 \mu\text{V}$), 18 Hz ($29,5 \pm 4,8 \mu\text{V}$) e 24 Hz ($21,9 \pm 2,4 \mu\text{V}$) (Figura 30).

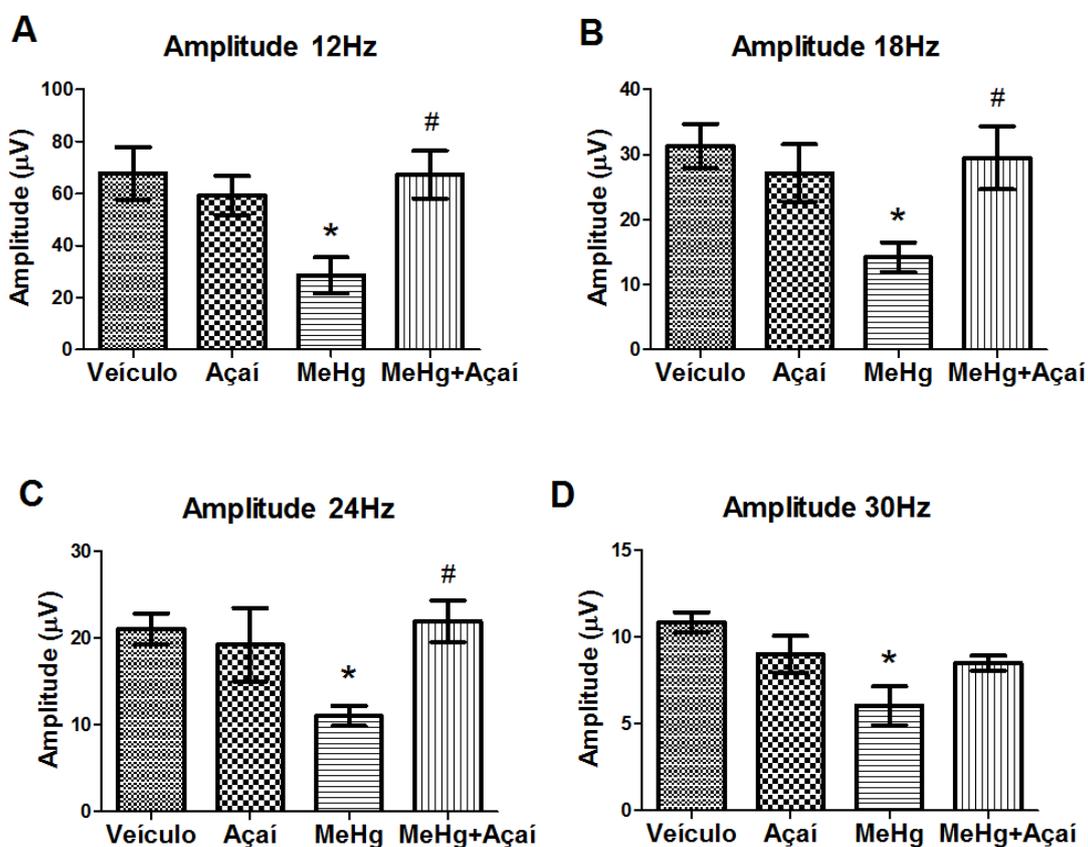


Figura 30. Amplitude da onda-b na resposta fotópica de flicker em diferentes frequências de estímulo. Amplitude da onda-b em 12 Hz (A), 18 Hz (B), 24 Hz (C) e 30 Hz (D). Resultados expressos em média e EP (n= 5 a 7 para 12 Hz, n=6 a 8 para 18 Hz, n=6 a 8 para 24 Hz e n= 5 a 6 para 30 Hz). Teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. *p<0,05 em relação ao grupo Veículo e #p<0,05 em relação ao grupo MeHg.

Em avaliação da amplitude de resposta do mesmo grupo em diferentes frequências de estímulo observamos que houve diferença apenas na amplitude da onda-b na frequência de 12 Hz em relação às demais frequências em todos os grupos experimentais (figura 31).

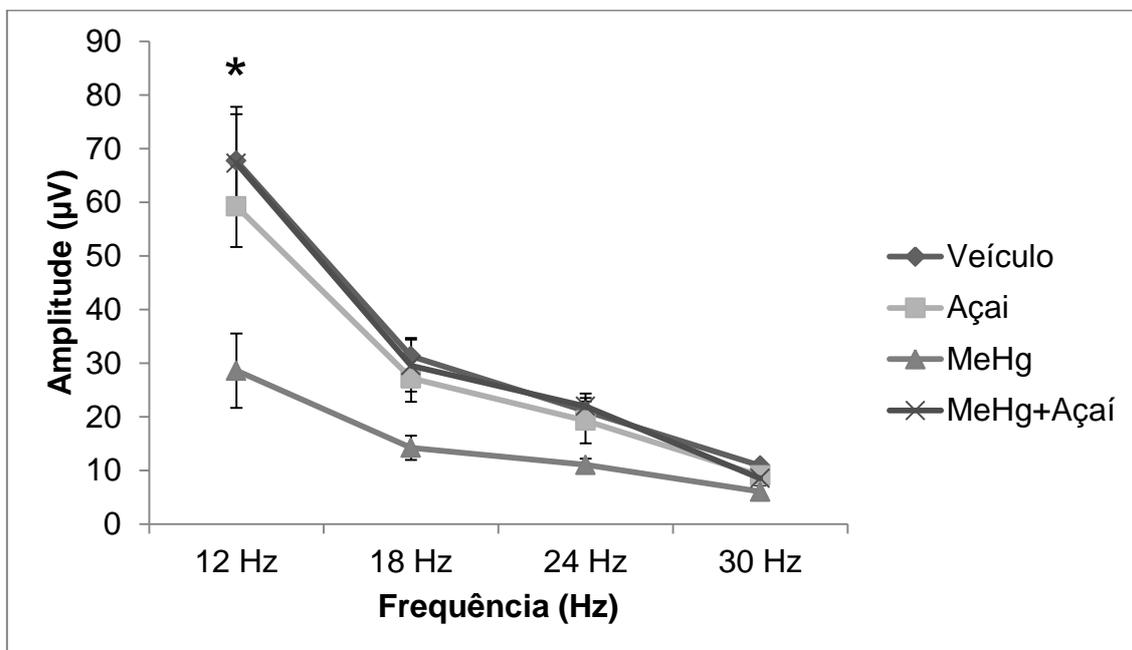


Figura 31. Diferença de amplitude nas frequências 12 Hz, 18 Hz, 24 Hz e 30 Hz. Em A o grupo Veículo (n= 6 a 8), em B o grupo Açai (n= 5 a 6), em C o grupo MeHg (n= 5 a 8) e em D o grupo MeHg+Açaí (n= 5 a 7). Resultados expressos em média EP. Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ em relação às demais frequências.

A razão entre amplitude da onda-b e a amplitude da onda-a é um parâmetro utilizado para caracterizar alterações seletivas para apenas uma das ondas. Ou seja, patologias que reduzem a amplitude somente da onda-a resulta em uma relação b/a maior que o controle e em patologias que reduzem seletivamente a onda-b resulta em uma razão b/a menor que o controle (JACOB; *et al*, 2011). Quando a comparação da razão b/a não é estatisticamente diferente do controle, apesar de haver diferença nos componentes de onda, subentende-se que as alterações observadas não foram seletivas à um dos componentes de onda (a ou b).

Assim, a avaliação da razão b/a mostra que o dano causado pelo MeHg foi relativamente homogêneo para ambos os componentes do ffERG (onda-a e onda-b), uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos na razão onda b/a em nem uma das respostas (figura 32). A proteção exercida pelo açai foi relativamente homogênea nas respostas escotópicas mistas 1 e 2, porém, na resposta fotópica de cone foi mais eficaz na onda-b do que na onda-a, evidenciado por a razão b/a ter sido maior no grupo MeHg+Açai que nos outros grupos (figura 32 C).

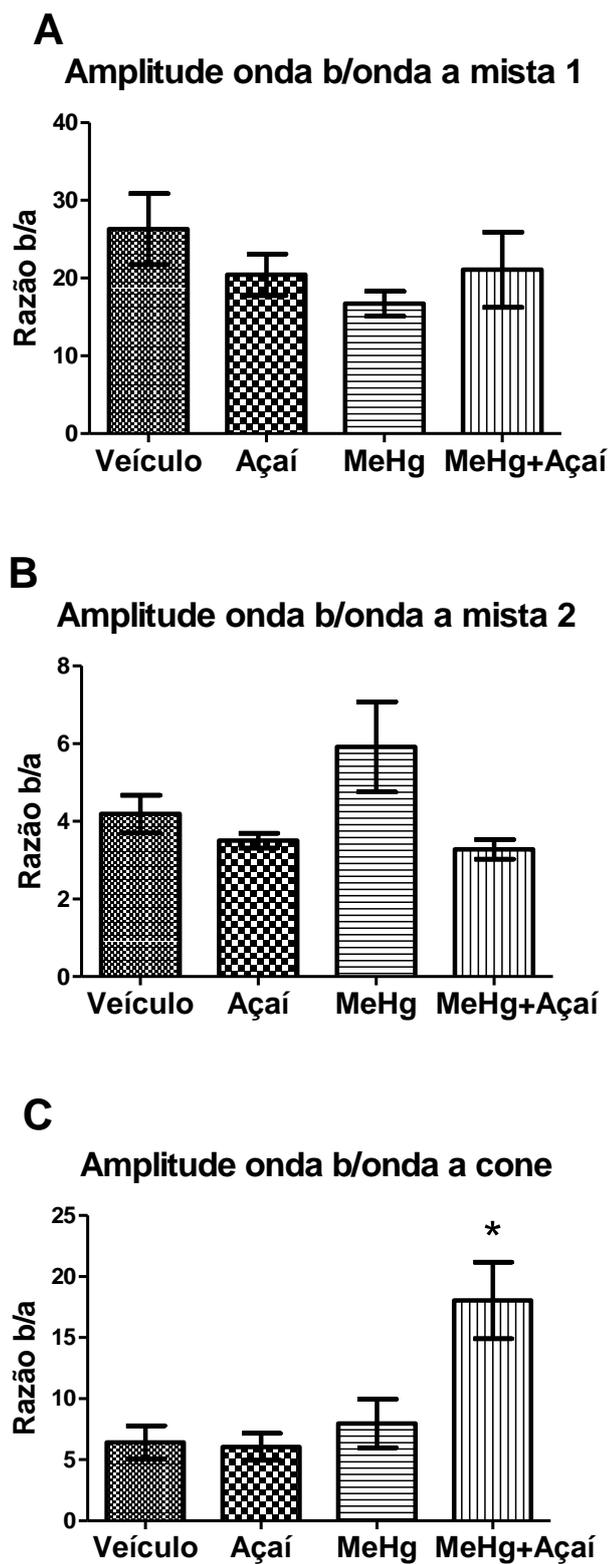


Figura 32. Razão entre a amplitude da onda-b e amplitude da onda-a. Respostas: escotópica mista 1 em A; escotópica mista 2 em B; fotópica de cone em C. n=3 a 4. Valores expressos em média e EP. Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*.

3.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO TECIDO RETINIANO

A peroxidação lipídica no tecido retiniano foi maior no grupo MeHg (294,9±205,8%) enquanto o grupo MeHg+Açaí (111,2±26,1%) permaneceu com valor de MDA no nível do grupo Veículo (100±25,1%) (figura 33).

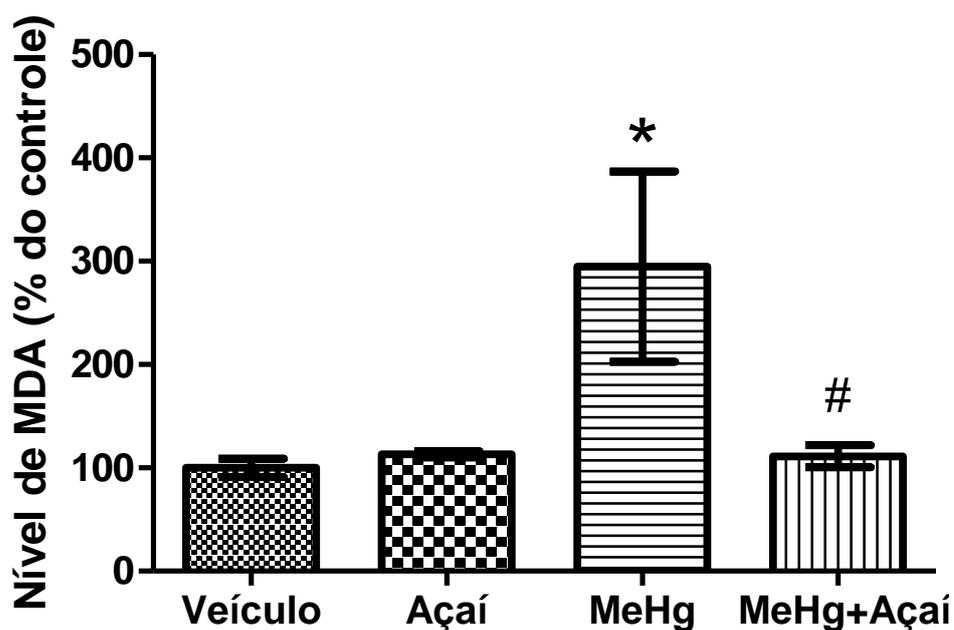


Figura 33. Peroxidação lipídica no tecido retiniano. Valores expressos em média e DP do nível de MDA em porcentagem do controle. N= 4 a 8. Teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo MeHg.

4 DISCUSSÃO

Como já foi mencionado, ainda são escassas pesquisas que mostram a atividade protetora o açaí (*Euterpe oleracea*) em modelos animais. Neste contexto, nosso trabalho é pioneiro na caracterização de um efeito protetor deste fruto em eventos de intoxicação mercurial.

Nossa curiosidade para buscar uma possível atividade do açaí em relação à exposição ao MeHg é motivada por dois aspectos, o primeiro relacionado ao descrito mecanismo oxidante associado a intoxicação mercurial no sistema nervoso central, incluindo a retina. O segundo baseia-se ao fato de que o açaí é facilmente acessível à população dessa região o que favoreceria a co-terapia (AZEVEDO, 2005; EMBRAPA, 2009). Além desta descrita acessibilidade, estudos revelam que quando comparado com os constituintes de outros frutos procedentes da região Amazônica, como abiu (*Pouteria caimito*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), bacuri (*Platonia insignis*), buriti (*Mauritia flexuosa*), cajá (*Spondias lutea*), cajarana (*Spondias lutea* Linn), caju (*Anacardium occidentale*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), graviola (*Anona muricata*), murici (*Byrsonima crassifolia*), noni (*Morinda citrifolia*) e tamarindo (*Tamarindus indica*) a polpa de açaí apresenta maior conteúdo total de compostos fenólicos e maior atividade anti-radicaís livres, sendo correlacionado o conteúdo total de compostos fenólicos à capacidade antioxidante da polpa (CANUTO; et al, 2010).

As antocianinas, principais compostos fenólicos contidos no açaí, são solúveis em água e termosensíveis, no entanto Tonon, Brabet, Hubinger (2009) mostraram que, a partir da secagem da polpa de açaí pelo método spray drying à temperatura de 138°C e 170°C, esse apresentou percentual de retenção de antocianina de 84,2± 1,4% e 81,1 ± 1,4%, respectivamente. Logo, o tratamento térmico utilizado em nosso trabalho não foi demasiadamente deletério quanto aos níveis de antocianina. A temperatura de secagem da ração enriquecida com polpa de açaí utilizada no presente trabalho foi de 150°C e o efeito protetor do pré-tratamento com açaí na retina dos ratos expostos ao MeHg foi expressivo tanto na fisiologia da retina, observada através do ffERG, quanto na peroxidação lipídica nesse tecido mesmo que a ração tenha sido submetida a

temperaturas elevadas, ou seja, seu efeito ainda poderia ser associado a esse componente, contudo, futuros estudos com a utilização de antocianinas purificadas são necessários para caracterizar de fato que esta substância representa o componente bioativo de nosso estudo.

No que tange aos efeitos biológicos do MeHg o presente estudo mostrou que o MeHg não reduziu a massa corporal dos ratos. A associação entre exposição mercurial e perda excessiva de massa corpórea tem sido observada em várias pesquisas e diferentes tratamentos (CHAPMAN; CHAN, 2000). No entanto, o resultado encontrado no presente estudo corrobora com Liu et al (2009) que tratou ratos de diferentes idades com mesma dose (5 mg/kg) e período de exposição oral (7 dias) e não observou diferença no crescimento e ganho de massa corporal dos animais.

O procedimento da gavagem também não reduziu a massa corporal dos animais, apesar de ser uma técnica altamente invasiva.

Apesar de o açaí conter alto teor lipídico, composto principalmente por ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, não houve diferença na massa corporal entre o grupo que recebeu ração padrão e o grupo que recebeu ração enriquecida com açaí nos diferentes dias de pesagem. O consumo alimentar também não foi diferente nos dois grupos alimentados com os diferentes tipos de dieta, apesar de a alteração no padrão de dieta poder alterar o comportamento alimentar pelo fator novidade ou pela composição da ração (DUARTE; *et al*, 2006).

Embora seja bem caracterizado que a exposição ao MeHg promove danos cerebelares acarretando déficits motores associados ao efeito pró-oxidativo do MeHg nesse órgão, a avaliação da locomoção dos animais em nosso experimento, a partir da análise de número de quadrantes cruzados no aparato campo aberto, demonstrou que a dose utilizada em nosso experimento não promoveu aparente prejuízo motor. É importante caracterizar que no estudo supracitado o efeito pró-oxidativo do mercúrio no cerebelo foi observado apenas em concentrações maiores que a utilizada em nosso estudo (LUCENA; *et al*, 2007).

No que concerne a nossa avaliação eletrofisiológica da resposta retiniana, demonstramos que o MeHg reduziu a amplitude dos dois componentes (onda-a e onda-b) de todas as respostas avaliadas (escotópica

de bastonetes, escotópica mista 1, escotópica mista 2, fotópica de cones e fotópica de flicker), alteração difusa evidenciada também pela avaliação da razão b/a, sem alteração no tempo implícito. As amplitudes mais afetadas pelo MeHg foram da onda-a (que reflete a hiperpolarização dos fotorreceptores e das células bipolares tipo *OFF*) da resposta de fotópica de cones e escotópica mista 2 (que por ser obtida com alta intensidade luminosa possui grande participação de fotorreceptores cones), com média de cerca de 72,4% e 77,5% respectivamente, de redução de amplitude em relação ao grupo Veículo. Esse dado corrobora com o achado de Goto; Shigematsu; Tobimatsu (2001), que mostrou que fotorreceptores cones são mais sensíveis a exposição ao MeHg devido a menor dose utilizada (0,25 mg/kg) durante 30 dias de injeção subcutânea apresentar apenas alteração fotópica em 20 Hz sem alteração escotópica. Esses autores também não encontraram alteração no tempo implícito das respostas fotópicas e escotópicas em nem uma das doses utilizadas (0,25; 0,70 e 1,5 mg/kg) e tempos testados (10, 20 e 30 dias de exposição) no ffERG.

Ventura; *et al* (2004) e Barboni (2007) mostraram que o mercúrio causa maior prejuízo nas respostas mediadas pelas via dos cones a partir da redução de amplitude nas regiões centrais da retina observada com o etrorretinograma multifocal (mfERG), técnica que permite obtenção de um mapa topográfico da atividade elétrica da retina, em humanos expostos ocupacionalmente a vapor de mercúrio (durante 10 anos em média) após o afastamento da fonte de exposição (7 anos em média).

O sistema de cones, como importante alvo do MeHg, também foi sugerido por Tanan *et al* (2006), a partir de registro eletrofisiológico intracelular da resposta de células horizontais monofásicas à luz (que refletem a atividade dos cones) na retina de peixes (*Hoplias malabaricus*) intoxicados por injeção intraperitoneal de MeHgCl. Observou-se redução da amplitude de resposta nas doses de 0,01; 0,05 e 0,1 mg/kg e completa eliminação da resposta nas doses de 1,0; 2,0 e 6 mg/kg mostrando que essas células horizontais são afetadas de forma dose-dependente pelo MeHg e que o sistema de cones é prejudicado nessa intoxicação (TANAN; *et al*, 2006).

O presente trabalho mostra alteração difusa na retina induzida pelo MeHg com redução de amplitude nos dois componentes de onda (onda-a e

onda-b), indicando déficit nos diferentes grupos celulares responsáveis por cada componente (fotorreceptores e células bipolares *OFF*; células bipolares *ON* e células de Muller, respectivamente). O MeHg afetou respostas das vias de cones e bastonetes, uma vez que reduziu a amplitude de resposta em condições de adaptação fotópica e escotópica. Essa alteração difusa nas duas ondas e em respostas fotópicas e escotópicas foi, também, demonstrada por Ventura; et al (2004) e Barboni (2007) em humanos expostos a vapor de mercúrio sem alteração no tempo implícito das respostas e por Goto; Shigematsu; Tobimatsu (2001) com dose de MeHg 1,5 mg por 10 dias e 0,70 mg/kg por 30 dias .

Dentro deste contexto, os resultados nos animais pré-tratados com *Euterpe oleracea* ratificou nossa hipótese científica de que o tratamento com a dieta enriquecida foi capaz de evitar a redução causada pelo MeHg na amplitude da onda-a nas respostas escotópicas mista 1 e mista 2, nas amplitudes da onda-b nas respostas escotópica mista 1, escotópica mista 2, fotópica de cone e fotópica de flicker em 12; 18 e 24Hz.

Nossos resultados sugerem, de forma indireta, que o efeito protetor do açaí foi eficaz na resposta de bastonetes, não sendo demonstrado mesmo efeito na resposta eletrofisiológica atribuída aos fotorreceptores cones (onda-a da resposta fotópica de cone). Essa afirmação foi evidenciada por o açaí ter prevenido contra a redução de amplitude da onda-a nas respostas escotópicas mista 1 e mista 2 sem proteção na onda-a da resposta fotópica de cone. Estes resultados estão de acordo com a literatura que descrevem os fotorreceptores cones como as células mais afetadas pela intoxicação mercurial (GOTO; SHIGEMATSU; TOBIMATSU, 2001; VENTURA; et al, 2004; BARBONI, 2007)

Essa seletividade na proteção de fotorreceptores bastonetes pode estar relacionada com a antocianina cianidina-3-glucosídeo (C3G) presente no açaí, uma vez que foi demonstrado que esse componente apresenta um efeito estimulatório na regeneração da rodopsina em fotorreceptores bastonetes (MATSUMOTO; et al, 2003). Essa afirmação foi reforçada por Paik: et al (2012), que demonstraram que extrato de antocianina de soja preta, contendo C3G apresenta maior ação protetora contra degeneração retiniana em resposta escotópica quando comparado com resposta fotópica.

Além dos bastonetes a prevenção do pré-tratamento observada parece ter sido mais expressiva, também, na resposta de células bipolares tipo *ON* de cones, uma vez que o açaí não foi capaz de proteger contra a redução de amplitude da onda-b da resposta escotópica de bastonetes (que representa a função das células bipolares *ON* de bastonetes) gerada pelo MeHg, mas apresentou proteção na amplitude da onda-b das respostas escotópicas mista 1 e mista 2 (que refletem a função de células bipolares *ON* de cones e de bastonetes), fotópica de cone e fotópica de flicker (que refletem a função das células bipolares *ON* de cones).

A avaliação da razão entre amplitude da onda b/ onda-a na resposta fotópica de cone reforçou o fato de o açaí ter protegido células bipolares *ON* de cones e não fotorreceptores cones.

Mesmo que o pré-tratamento com *Euterpe oleracea* não tenha protegido da redução de amplitude de resposta de fotorreceptores cones e células bipolares *ON* de bastonetes, já pode ser indicado como uma alternativa para amenizar o déficit funcional que o MeHg gera na retina, pois parece ter evitado a redução de resposta de fotorreceptores bastonetes e de células bipolares *ON* de cones. Esse dado é inovador e muito relevante uma vez que essa proteção pode ser refletida significativamente no padrão perceptual.

Os quatro grupos apresentaram redução nas amplitudes de resposta com o aumento da frequência temporal do estímulo apresentado no flicker a partir de 18Hz. Ou seja, a amplitude de resposta em 12Hz foi maior que as amplitudes nas demais frequências temporais.

Harazny; et al (2009) demonstraram, por meio de estimulação com mesmas frequências temporais (12; 18; 24 e 30 Hz), redução gradual da amplitude de resposta de camundongos pigmentados (DBA/2J e C57/BL6) com o aumento da frequência, no entanto no presente trabalho com ratos Wistar albinos essa redução foi significativa apenas na comparação entre a menor frequência testada 12 Hz e as demais, mostrando que ratos albinos poderiam ter menor resolução temporal que camundongos pigmentados.

No tempo implícito não houve diferença entre os grupos em nem uma das frequências, no entanto reduziu para todos os grupos em 30Hz, com diferença entre essa frequência e as demais, mostrando que o estímulo mais rápido necessita de um tempo de resposta menor.

A resposta à frequência de 30 Hz apresenta importante participação de células ganglionares e essas células podem não ter sido protegidas pelo pré-tratamento, o que pode ser responsável por não ter havido diferença entre os grupos MeHg e MeHg+Açaí em 30 Hz. Os resultados mostram que o ffERG é um método capaz de detectar alterações funcionais causadas pelo MeHg na retina e a proteção exercida pelo açaí, porém essa técnica não permite identificar os mecanismos responsáveis pelas alterações geradas nem como e quais componentes do açaí seriam responsáveis por essa proteção. Porém alguns dos mecanismos de citotoxicidade do MeHg podem estar associados ao efeito deletério observado, assim como alguns efeitos associados ao açaí poderiam antagonizar os efeitos induzidos pelo MeHg.

Os danos funcionais na retina podem ter relação com acúmulo de Hg em diversas áreas do tecido retiniano (WARFVINGE; BRUUN, 1996; MELA; *et al*, 2010), com alterações histológicas como a redução na espessura da camada nuclear interna (com redução na densidade de células bipolares ON e amácrinas), degeneração na camada de fotorreceptores com alterações morfológicas nos fotorreceptores (BONCI; *et al*, 2006; MELA; *et al*, 2010, 2012). A redução de densidade de células bipolares ON pode estar associada à redução da amplitude da onda-b das respostas do ffERG, assim como, a degeneração da camada de fotorreceptores e as alterações morfológicas nessas células podem estar relacionadas com a diminuição da amplitude da onda-a das respostas no ffERG.

Sabe-se que o MeHg gera aumento na concentração de NO (HIMI; *et al*, 1996) e que essa molécula medeia a redução da viabilidade de células da retina (HERCULANO; *et al*, 2006). O aumento da concentração de NO na retina pode aumentar a formação de peroxinitrito (ONOO^-), um agente oxidante formado a partir da reação do O^{2-} com NO, promovendo a lesão celular e apoptose das células desse tecido com consequente dano funcional. No entanto, o extrato do fruto de açaí apresenta potente efeito inibidor sobre a produção de NO por linhagem celular macrófagos ativados RAW 264,7 a partir de redução na atividade iNOS (MATHEUS; *et al*, 2006). O estresse oxidativo (EO) causado pelo MeHg pode ser a principal causa dos déficits funcionais na resposta elétrica da retina. Pois EO gera redução das amplitudes das respostas

das ondas a e b no ERG e redução da espessura das camadas nucleares interna e externa com morte celular por apoptose (CINGOLANI; *et al*, 2006).

O açaí poderia agir a partir de seu comprovado efeito antioxidante, atribuído a seus compostos polifenóis, principalmente antocianinas (DEL POZO-INSFRAN; *et al*, 2004; MERTENS-TALCOTT; *et al*, 2008; DOS SANTOS *et al*, 2008; KANG *et al*, 2010; SOUZA; *et al.*, 2010; SUN; *et al*, 2010). A atividade antioxidante dos flavonóides, componentes presentes no açaí, está relacionada à capacidade de doar elétrons e reduzir EROs evitando o dano oxidativo dos tecidos. A presença de grupos hidroxila ligados à anéis fenólicos é correlaciona com a capacidade dos flavonoides de doar elétrons (FRANCO; *et al*, 2010).

Muitos trabalhos têm utilizado flavonóides na estratégia coadjuvante de amenizar os danos induzidos pelo MeHg (FARINA; *et al*, 2005, LUCENA; *et al*, 2007; FRANCO; *et al*, 2007, FRANCO; *et al*, 2010; BARCELOS; *et al*, 2011, WAGNER; *et al*, 2010).

O flavonóide quercetina, presente no açaí (KANG *et al*, 2010), se mostrou eficaz na proteção contra danos no DNA nos hepatócitos e leucócitos, contra a redução dos níveis de GSH e da atividade da GPx causados por MeHg em ratos (BARCELOS; *et al*, 2011). Estudos *in vitro* também mostraram que a quercetina reduz os efeitos mitotóxicos do MeHg, inibindo a formação de EROs e peroxidação lipídica em mitocôndrias de cérebro de ratos e camundongos (FRANCO; *et al*, 2007; WAGNER *et al*, 2010).

Além de flavonóides isolados, têm-se utilizado extrato de plantas para buscar reverter os efeitos prejudiciais do MeHg. Dentre esses, o extrato de *Syzygium cumini* (planta medicinal fonte de compostos fenólicos), o qual reverte os efeitos tóxicos do MeHg, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica no fígado e rim em ratos neonatos (ABDALLA; *et al*, 2011).

Outros trabalhos realizados em camundongos, mostraram efetiva proteção exercida por extratos de plantas brasileiras (*Polygalapaniculata* ou *Cypura paludosa*), que contém flavonóides, contra a neurotoxicidade induzida por MeHg. Essa proteção foi caracterizada por redução da disfunção na coordenação motora, redução da inibição da atividade da enzima GPx cerebelar e redução dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

(indicador de peroxidação lipídica) no córtex cerebral e cerebelo (FARINA; *et al*, 2005; LUCENA; *et al*, 2007).

As antocianinas apresentam capacidade neuroprotetora em modelos de degeneração retiniana (TANAKA; *et al*, 2011; PAIK; *et al*, 2012).

Paik *et al* (2012) demonstraram que extrato do flavonóide antocianina (50 mg/kg/dia durante 4 semanas) tem efeito neuroprotetor nos neurônios da retina, com significativa preservação da função (com preservação da amplitude da onda-a e onda-b das respostas fotópicas e escotópicas no ffERG) e histologia, frente à degeneração retiniana com morte de fotorreceptores induzida por N-metil-N-nitrosureia (um agente que induz metilação de DNA causando dano nos fotorreceptores).

Esse efeito protetor das antocianinas também foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* em modelo de degeneração retiniana induzida pela exposição à luz. Observou-se redução na degeneração de fotorreceptores a partir de mecanismos antioxidantes, com redução da produção de EROs e do número de células apoptóticas (TANAKA; *et al*, 2011).

A Alfa-tocoferol, vitamina presente em grande quantidade no açaí (ROGEZ, 2000), também pode estar associada ao efeito encontrado nos nossos resultados eletrofisiológicos, uma vez que pode atuar como antioxidante, protegendo as membranas da retina contra peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} -ascorbato *in vitro* (ZAPATA; *et al*, 2008).

Os resultados de peroxidação lipídica no tecido retiniano corroboram com os resultados do ffERG, demonstrando possível associação entre dano oxidativo e funcional na retina causado pelo MeHg, pois mostram que o grupo MeHg apresentou maior quantidade de MDA que o grupo Veículo e o grupo MeHg+Açaí apresentou valores de MDA inferiores aos do grupo MeHg, permanecendo nos níveis do veículo. Logo, foi evidente a proteção contra o dano oxidativo nesse tecido e contra as alterações nas respostas eletrofisiológicas da retina.

Apesar de o açaí conter Fe, metal que participa da reação de Fenton para produção de EROs, esse Fe é do tipo não heme (Fe^{+3}) que tem baixa absorção, cerca de 1% a 5%, podendo variar em função da presença de fatores químicos e dietéticos como com a presença de tanino (TOAIARI; *et al*, 2005). O açaí contém tanino (232 μ g/g), fator que reduz ainda mais a

biodisponibilidade do Fe. A baixa biodisponibilidade de ferro da ração à base de açaí foi confirmada por Toiari *et al* (2005), a partir da quantificação do ganho total de ferro hemoglobínico e o total de ferro ingerido pelos animais durante o período experimental, demonstrando que os ratos que receberam ração à base de açaí desidratado apresentaram biodisponibilidade de Fe, em média $12,1 \pm 5,5\%$, valor inferior aos apresentados por ratos que receberam ração controle que apresentaram biodisponibilidade de $34,9 \pm 4,2\%$.

Esse trabalho mostra, pela primeira vez, o efeito protetor do açaí (*Euterpe oleracea*) na retina frente à exposição ao MeHg, podendo servir como terapia coadjuvante ao tratamento de intoxicação mercurial. Contudo é necessária a realização de mais estudos para elucidar os efeitos protetores do açaí e seus mecanismos de ação.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o MeHg reduziu a massa corporal dos animais e não gerou alteração na atividade locomotora na dose de 5 mg/kg durante 7 dias e o açaí (*Euterpe oleracea*) evitou a redução de massa corporal dos ratos expostos ao MeHg.

Os resultados obtidos no eletrorretinograma de campo total (ffERG) mostram que o MeHg causa alteração difusa na resposta elétrica da retina com redução de amplitude das ondas a e b das respostas escotópicas (de bastonetes, mista 1 e mista 2) e fotópicas (de cones e de flicker) sem alteração no tempo implícito.

O pré-tratamento com açaí preveniu a redução de amplitude causada pelo MeHg na amplitude das ondas a e b das respostas escotópicas mista 1 e mista 2, na amplitude da onda-b da resposta fotópica de cone e fotópica de flicker em 12; 18 e 24 Hz. Logo essa proteção parece ser mais evidente para fotorreceptores bastonetes e células bipolares ON de cones. Esse estudo foi pioneiro na caracterização da proteção exercida pelo açaí na fisiologia da retina contra o déficit causado pelo MeHg.

O MeHg também causou aumento da peroxidação lipídica no tecido retiniano. Esse dano oxidativo pode estar associado às alterações eletrofisiológicas encontradas na retina. O pré-tratamento com *Euterpe oleracea* foi capaz de evitar o aumento de peroxidação lipídica que pode estar relacionado à proteção eletrofisiológica exercida por esse fruto. Logo, o açaí pode ser indicado como estratégia coadjuvante para amenizar os prejuízos causados pelo MeHg na retina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F.H.; BELLÉ, L.P.; BITENCOURT, P.E.R.; et al. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals**. 24(2):349-356, 2011.

AHMED, N.S.; MOHAMED, A.S.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and histological changes in retinas and kidney in rats: Protective role of ascorbic acid and alpha tocopherol. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 98(1):33-38, 2010.

ALI, S.F.; LEBEL, C.P; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **NeuroToxicology**. (3): 637–648, 1992.

ANDERSON Jr., B. Ocular effects of changes in oxygen and carbon dioxide tension. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.** 66: 423-474, 1968

ANYANWU, E.C.; KANU, I.; NNADOZIE, J.B. Electrophysiological Evaluation Of Adolescents Presenting With Chloroquine Toxicity Due To Persistent Malaria Infections. **The Internet Journal of Neurology**. 5 (2), 2006.

ASCHNER, M.; YAO, C.P.; ALLEN, J.W.; TAN, K.H. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**. 37, 199–206, 2000.

AZEVEDO, J.R. Tipologia do sistema de manejo de açazais nativos praticado pelos ribeirinhos em belém, estado do pará. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Do Pará, PA, 2005.

BARBONI, M.T.S. Estudo eletrofisiológico e psicofísico em indivíduos intoxicados por vapor de mercúrio. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, SP, 2007.

BARBONI, M.T.S.; DA COSTA, M.F.; MOURA, A.L. A.; et al. Visual field losses in workers exposed to mercury vapor. **Environ. Res.** 107(1):124-131, 2008.

BARCELOS, G.R.M.; GROTTTO, D.; SERPELONI, J.M.; et al. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Arch Toxicol.** 85(9):1151-1157, 2011.

BEAR; MARK, F.; CONNORS; BARRY, W.; PARADISO; MICHAEL, A. **Neurociências**: Desvendando o Sistema Nervoso. 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

BERNTSON, A.; TAYLOR, W.R. Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina. **Journal of Physiology.** 524 (3): 879-889, 2000.

BERZAS NEVADO , J.J.; RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.; JIMÉNEZ MORENO, M.; MARTINS DO NASCIMENTO, J.L.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Mercury speciation analysis on cell lines of the human central nervous system to explain genotoxic effects. **Microchemical Journal.** 93: 12-16, 2009

BERZAS NEVADO, J.J.; RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.; GUZMÁN BERNARDO, F.J.; JIMÉNEZ MORENO, M.; HERCULANO, A.M.; DO NASCIMENTO, J.L.; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International.** 36(6):593-608. 2010.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere.** 40(12):1335-1351, 2000.

BONCI, D.M.O.; DE LIMA, S.M.A.; GRÖTZNER, S.R. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; HAMASSAKI, D.E.; VENTURA, D.F. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive protein kinase C bipolar cells caused by methylmercury chloride intoxication in the retina of the tropical fish *Hoplias malabaricus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39: 405-410, 2006.

BOYCOTT, B. B.; WÄSSLE, H. Morphological classification of bipolar cells in the macaque monkey retina. **European Journal Neuroscience.** 3:1069-1088, 1991.

BOYCOTT, B.; WASSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 40: 1313–1327, 1999.

BOWMAKER, J.K. Evolution of colour vision in vertebrates. **Eye.** 12: 541-547, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BURNS, M.E. *et al.* Dynamics of Cyclic GMP Synthesis in Retinal Rods. **Neuron.** 36: 81-91, 2002.

CAJAL, S.R. The Structure of the Retina. Thomas, Springfield, 1972.

CANUTO, G.A.B.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T. Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos da Amazônia e sua Correlação com a Atividade Anti-Radical Livre. **Rev. Bras. Frutic.** 32 (4): 1196-1205, 2010

CARTA, P.; FLORE, C.; ALINOVI, R.; *et al.* Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. **Neurotoxicology.** 24(4-5):617-623, 2003.

CARVALHO, C.M.L.; CHEW, E-H; HASHEMY, S;I.; LU, J.; HOLMGREN, A. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. **J. Biol. Chem.** 283(18):11913-11923, 2008.

CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions.** 188: 301–308, 2010.

CINGOLANI, C.; ROGERS, B.; LU, L.; KACHI, S.; SHEN, J.; PETER A. CAMPOCHIARO, P.A. Retinal degeneration from oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine.** 40: 660 – 669, 2006.

CHARLESTON, J.S.; BODY, R.L.; MOTTET, N.K.; VAHTER, M.E.; BURBACHER, T.M. Autometallographic Determination of Inorganic Mercury Distribution in the Cortex of the Calcarine Sulcus of the Monkey *Macaca fascicularis* Following Long-Term Subclinical Exposure to Methylmercury and Mercuric Chloride. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 132 (2): 325–333, 1995.

CHOI, D,W. Excitotoxic cell death. **J Neurobiol.** 23:1261–1276, 1992.

CHU, Y.; HUMPHREY, M.F.; CONSTABLE, I.J. Horizontal Cells of The Normal and Dystrophic Rat Retina: A Wholemout Study Using Immunolabelling for the 28-kDa Calcium-binding Protein. **Exp. Eye Res.** 57: 141-148, 1993.

CLARKSON, T.W. The pharmacology of mercury compounds, *Annu. Rev. Pharmacol.* 12: 375–406, 1972 apud CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions.** 188: 301–308, 2010.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect.** 110 (1): 11–23, 2002.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; HERCULANO, A.M.; CORVELO, T.C.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Mercurio y neurotoxicidad. **Rev Neurol.** 40:441–7, 2005.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DE SÁ A.L.; HERCULANO, A.M; BURBANO , R.R.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International** 33: 141–146, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MACÊDO, G.L.; PEREIRA, S.I.D.; ARRIFANO, G.P.F. PIKANÇO-DINIZ, D.L.W.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; HERCULANO, A.M. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research.** 60: 212–220, 2009.

DACEY, D.M. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:743–775, 2000.

DANIAS, J.; SHEN, F.; GOLDBLUM, D.; CHEN, B.; RAMOS-ESTEBAN, J.; PODOS, S.M.; MITTAG, T. Cytoarchitecture of the Retinal Ganglion Cells in the Rat. **IOVS.** 43 (3): 587-594, 2002.

DE SÁ A.L.; HERCULANO, A.M; PINHEIRO, M.C.; SILVEIRA L.C.L.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Human exposure to mercury in the west region of Pará State. **Rev Para Med** 20:19–25, 2006.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.** 52(6):1539-1545, 2004.

DO NASCIMENTO, J.L.M.; OLIVEIRA, K.R.M.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; et al. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian J. Med. Res.** 128(4): 373-382, 2008.

DOS SANTOS, G.M.; MAIA, G.M.; DE SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C.; DE FIGUEIREDO, R.W.; DO PRADO, G.M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos De Nutricion.** 58 (2): 187-192, 2008.

DREIEM, A.; SEEGAL, R.F. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. **NeuroToxicology.** 28: 720–726, 2007.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENE-FIORESE, M.; DÂMASO, A.R.; CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev. Nutr.** 19 (3):341-348, 2006.

EULER, T.; WÄSSLE, H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. **Journal of Comparative Neurology.** 361 (3): 461–478, 1995.

EULER, T.; SCHNEIDER, H.; et al. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. **Journal of Neuroscience.** 16: 2934-2944, 1996.

EULER, T.; WÄSSLE, H. Different Contributions of GABAA and GABAC Receptors to Rod and Cone Bipolar Cells in a Rat Retinal Slice Preparation. **J Neurophysiol.** 79:1384-1395, 1998.

EMBRAPA, 2009. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/setembro/4a-semana/palestra-aborda-caracteristicas-do-mercado-de-acai/?searchterm=consumo%20a%C3%A7a%C3%AD>. Acessado em 20/01/2013.

FARINA, M.; FRIZZO, M.E.S.; SOARES, F.A.A.; et al. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicol. Lett.** 144(3):351-357, 2003.

FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; et al. Protective effects of Polygala paniculata extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 57(11):1503-1508, 2005.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T. Special Issue: Environmental Chemicals and Neurotoxicity Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.** 256(3): 405–417, 2011.

FEITOSA-SANTANA, C.; BARBONI, M.T.S.; OIWA, N.N.; et al. Irreversible color vision losses in patients with chronic mercury vapor intoxication. **Vis. Neurosci.** 25(3):487-491, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.** 43(1): 61-8, 1997.

FISKUM, G.; ROSENTHAL, R.E.; VERECZKY, V. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. **J Bioenerg Biomembr.** 36: 347–352, 2004.

FLIESLER, S.J.; ANDERSON, R.E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. **Progress in Lipid Research.** 22: 79–131, 1983.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; STRINGARI, J.; et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem. Res. Toxicol.** 20 (12):1919-1926, 2007.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic. Biol. Med.** 47(4):449-457, 2009.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; MISSAU, F.; et al. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. **Environ Toxicol Pharmacol.** 30(3):272-278, 2010.

FU, Y.; YAU, K-W. Phototransduction in mouse rods and cones. **Pflugers Archive European Journal Physiology.** 454: 805-819. 2007.

GEGENFURTNER, K.R.; KIPER, D.C. Color Vision. **Annu. Rev. Neurosci.** 26:181–206, 2003.

GOTO, Y.; SHIGEMATSU, J.; TOBIMATSU, S.; et al. Different vulnerability of rat retinal cells to methylmercury exposure. **Current Eye Research**, 23: 171-178, 2001.

GRANIT, R. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. **J Physiol**. 77: 207–239, 1933.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Tradução da 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HARAZNY, J.; SCHOLZ, M.; BUDER, T.; LAUSEN, B.; KREMERS, J. Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse. **Doc Ophthalmol**. 119:181–197, 2009.

HECKENLIVELY; JOHN R.; ARDEN; GEOFFREY B. **Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision**. 2ª ed. Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2006.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**. 4: 10–21, 2011.

HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; LIMA, S.M.A.; PICANÇO-DINIZ, D.L.W.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39: 415-418, 2006.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. **Food Chemistry**. 118: 208–214, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. 26: 1-53, 2011.

JACOB, M.M.; SOUZA, G.S.; SILVEIRA, L.C.L.; GOMES, B.D.; Eletroretinograma de campo total: das origens celulares à aplicação clínica. **Neurociências**. 7 (2): 107-17, 2011.

JACOBS, G. H.; FENWICK, J. A.; WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. **The Journal of Experiment Biology**. 204: 2439-2446. 2001.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**. 122(3):610-617, 2010.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazonian Basin. **Environmental Research**. 79: 20-32, 1998.

LIMKE, T.L.; OTERO-MONTANEZ, J.K.L.; ATCHISON, W.D. Evidence for Interactions between Intracellular Calcium Stores during Methylmercury-Induced Intracellular Calcium Dysregulation in Rat Cerebellar Granule Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 304: 949–958, 2003.

LIU, W.; WANG, X.; ZHANG, R.; ZHOU, Y. Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats. **Toxicology Letters**. 188: 230–235, 2009.

LUCENA, G.M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; AZEVEDO, M.S.; MEOTTI, F.C.; GADOTTI, V.M.; DAFRE, A.L.; SANTOS, A.R. e FARINA, M. *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**. 101, 127–131, 2007.

MAHER, P.; HANNEKEN, A. Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**. 46(12):4796-4803, 2005.

MARMOR; et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Doc Ophthalmol**. 118: 69-77, 2009.

MASLAND, R.H. The fundamental plan of the retina. **Nature Neuroscience**. 4 (9): 877-886, 2001.

MATSUMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; TACHIBANAKI, S.; KAWAMURA, S.; HIRAYAMA, M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. **J. Agric. Food Chem**. 51: 3560-3563, 2003.

MAXIMINO, C.; ARAUJO, J.; LEÃO, L.K.R.; GRISOLIA, A.B.A.; OLIVEIRA, K.R.M.; LIMA, M.G.; BATISTA, E.J.O.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; GOUVEIA JR., A.; HERCULANO, A.M. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**. 33: 727–734, 2011.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GROTZNER, S.R.; RIBEIRO, C.A.O.; VENTURA, D.F.; MASSABUAU, J-C. Methylmercury localization in *Danio rerio* retina after trophic and subchronic exposure: A basis for neurotoxicology. **NeuroToxicology**. 31: 448–453, 2010.

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

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SABAASRUR, A.U. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) liofilizada. **Acta Amazônica**. 38 (2), 311–316, 2008.

MENGER, N.; POW, D. V.; WÄSSLE, H. Glycinergic amacrine cells of the rat retina. **J. Comp. Neurol.** 401, 34–46 (1998).

MERTENS-TALCOTT, S.U; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **J. Agric. Food Chem.** 56(17):7796-7802, 2008.

MOTTET, N.K.; VAHTER, M.E.; CHARLESTON, J.S.; FRIBERG LT. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. **Met Ions Biol Syst**. 34:371-403, 1997.

MYERS, G.J.; DAVIDSON, P.W.; STRAIN, J.J. Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. **J. Nutr.** 137(12):2805-2808, 2007.

NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, O. The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury-effect of selenomethionine. **Toxicology**. 74:233–241, 1992.

NOELL, W.K.: The origin of the eletroretinogram. **Am J Ophthalmol** 38:78-90, 1954.

OLIVEIRA, F.R.T.; FERREIRA, J.R.; SANTOS, C.M.C.; OIVEIRA, R.B.; MACÊDO, L.E.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; FARO; FERREIRA, L.R.; PIKANÇO-DINIZ, D. L. W. Estradiol reduces cumulative mercury and associated disturbances in the hypothalamus–pituitary axis of ovariectomized rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 63: 488-493, 2006.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; TALCOTT, S.T. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**. 118(1):17-25, 2010.

PAIK, S-S.; JEONG, E.; JUNG, S.W.; HA, T.J.; KANG, S.; SIM, S.; JEON, J.H.; CHUN, M-H.; KIM, I-B. Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. **Experimental Eye Research**. 97(1):55-62, 2012.

PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D.; GASPAR, E.; MORAIS, S.; LUCOTTE, M.; LARRIBE, F.; et al. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environ Res**. 93:123–30, 2003.

PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D.; FILLION, M.; et al. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**. 105 (2):183-193, 2007.

PEICHL, L.; GONZÁLEZ-SORIANO, J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: A comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. **Vis Neurosci**. 11(3):501-17, 1994.

PERRY, V. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. **Neuroscience**. 6: 931–944, 1981.

PINHEIRO, M.C.N.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J.L.F.; et al. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 39(3):411-414, 2006.

PINHEIRO, M.C.N.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.A.; ARAÚJO, C.C. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environ Int.** 33:56–61, 2007.

PINHEIRO, M.C.N.; MACCHI B.M.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; AMORAS W.W.; GUIMARÃES, G.A.; et al. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. **Environ Res.** 107:53–9, 2008.

PINHEIRO, M.C.; FARRIPAS, S.S.; OIKAWA, T.; COSTA, C.A.; AMORAS, W.W.; VIEIRA, J.L.; SILVEIRA, A.J.; LIMA, A.C.; SOUZA, G.S.; SILVEIRA, L.C. Temporal evolution of exposure to mercury in riverside communities in the Tapajós basin, from 1994 to 2010. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89(1):119-24, 2012.

PUGH JR, E.N.; COBBS, W.H. Visual transduction in vertebrate rods cones: a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. **Vision Res.** 26 (10): 1613-1643, 1986.

RICE, D.C.; GILBERT, S.G. Effects of Developmental Exposure to Methyl Mercury on Spatial and Temporal Visual Function in Monkeys. **Toxicology And Applied Pharmacology.** 102: 151-163, 1990.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochem. Soc. Trans.** 24 (3):790-795, 1996.

RODRIGUES, A.R.; SOUZA, C.R.B.; BRAGA A.M.; et al. Mercury toxicity in the Amazon: contrast sensitivity and color discrimination of subjects exposed to mercury. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 40 (3):415-424, 2007.

ROH, Y.J.; MOON, C.; KIM, S.Y.; PARK, M.H.; BAE, Y.C.; CHUN, M.H.; MOON, J.I. Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, in vivo. **Neurosci Lett.** 7;417 (3):266-70, 2007.

ROONEY, J.P.K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology.** 234(3):145-156, 2007.

SANFELIU, C.; SEBASTIÀ, J.; ROSA CRISTÒFOL, R.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. **Neurotoxicity Research.** 5: 283-305, 2003.

SANTOS, G.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G.M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 58 (2): 187-192, 2008.

SCHAUSS, A.G.; WU, R.L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry *Euterpe oleracea* Mart. (açaí). **J. Agric. Food Chem**. 54 (22): 8598–8603, 2006.

SERRACARBASSA, P.D. Vitaminas e antioxidantes na degeneração macular relacionada à idade. **Arq Bras Oftalmol**. 69 (2):443-5, 2006.

SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R.P.; PEDROSA, M.L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**. 26: 804–810, 2010.

SUN, X.; SEEBERGER, J.; ALBERICO, T.; et al. Açaí palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Exp. Gerontol**. 45(3):243-251, 2010.

SZEL, A.; ROHLICH, P. Two cone types of rat retina detected by antivisual pigment antibodies. **Exp. Eye Res**. 55: 47–52, 1992.

SZÉL, A.; LUKÁTS, A.; FEKETE, T.; SZEPESSY, Z.; ROHLICH, P. Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. **J. Opt. Soc. Am. A**. 17 (3), 2000.

TANAKA, J.; NAKANISHI, T.; OGAWA, K.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; SHIMODA, H.; HARA, H. Purple Rice Extract and Anthocyanidins of the Constituents Protect against Light-Induced Retinal Damage in Vitro and in Vivo. **J. Agric. Food Chem**. 59: 528–536, 2011.

TATE JR.D.J.; MICELI, M.V.; NEWSOME, D.A. “Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells,” **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 36 (7): 1271–1279, 1995.

TOAIARI, S.D.A.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SOUZA, R.F.S. Biodisponibilidade de ferro do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. **Rev. Nutr.** 18 (3): 291-299,, 2005.

TOIMELA T, TÄHTI H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminium, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch Toxicol* 2004;78:565–74.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.** 86: 271-278, 1978.

WAGNER, C.; VARGAS, A.P.; ROOS, D.H.; et al. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. **Arch. Toxicol.** 84 (2):89-97, 2010.

WASSERMAN, J.C.; HACON, S.S.; WASSERMAN, M.A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo e Vida.** 2 (1-2): 46-53, 2001.

WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Review Neuroscience.** 5: 747-757, 2004.

WHO. Methylmercury in Environmental Health Criteria 101, Geneva: World Health Organization. 118-144, 1990.

YU, F.; WANG, Z.; JU, B.; et al. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. **Exp. Toxicol. Pathol.** 59 (6):415-423, 2008.

ZAPATA, G.L.; GUAJARDO, M.H.; TERRASA, A.M. The in vitro protective effect of alpha-tocopherol on oxidative injury in the dog retina. **Vet. J.** 177(2):266-272, 2008.

ZAREBA, G.; CERNICHIARI, E.; HOJO, R.; NITT, S.M.; WEISS, B.; MUMTAZ, M.M.; JONES, D.E.; CLARKSON, T.W. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury. **Jf Appl Toxicol.** 27:511–518, 2007.