

CLAUDIA ALMEIDA COELHO DE ALBUQUERQUE

**EMBRIOTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO (MeHg)
SOBRE A ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E
ULTRAESTRUTURAL DO MESENCÉFALO E CEREBELO
DE *Gallus domesticus***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD – da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento em 2016.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Albuquerque, Claudia Almeida Coelho de Albuquerque
Embriotoxicidade do metilmercúrio (MeHg) sobre a
organização estrutural e ultraestrutural do mesencéfalo e
cerebelo de Gallus domesticus / Claudia Almeida Coelho de
Albuquerque Albuquerque ; orientadora, Yara Maria Rauh
Müller Müller - Florianópolis, SC, 2016.
118 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Embriotoxicidade. 3. Morfologia. 4. Diferenciação celular.
5. Ciclo celular. I. Müller, Yara Maria Rauh Müller. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

“Embriotoxicidade do MeHg sobre a organização estrutural e ultraestrutural do mesencéfalo e cerebello de *Gallus domesticus*”

Por

Claudia Almeida Coelho de Albuquerque

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (020/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Banca examinadora:



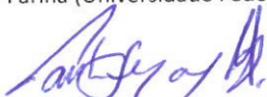
Dr(a) Yara Maria Rauh Müller (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Talita da Silva Jeremias (Universidade Federal de Santa Catarina)



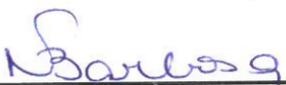
Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Paulo Fernando Dias (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Claudia Pinto Figueiredo (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr(a) Nilda Berenice de Vargas Barbosa (Universidade Federal de Santa Maria)

Florianópolis, 07 de Novembro de 2016.

Aos meus pais, por terem me ensinado a persistir...
Ao meu marido, Gerson e filhas, Isabel e Luisa por estarem
sempre do meu lado, vivendo o doutorado comigo, me dando
carinho e colo...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller, não só pela sua contribuição na realização deste trabalho, mas pela amizade e carinho, tão qual a uma mãe, chamou-se a atenção firmemente, assim como me acalentou durante momentos difíceis da minha vida. Esses anos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, junto a Prof.^a. Yara foi um período de grande aprendizagem pessoal e principalmente profissional que tive o prazer de conviver e que com certeza levarei muito de sua experiência e ensinamentos para minha vida, como o lema: “vamos para frente”.

Quero agradecer de forma especial à Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari, (minha querida amiga adolescente) por ter me apresentado o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, com a disciplina de Embriotoxicidade, na qual era apenas uma aluna visitante, e de forma tão maravilhosa encantou a todos sua forma de conduzir as aulas. Tive uma nova visão da Evelise, agora uma profissional exemplar, seja na pesquisa ou em sala de aula. Obrigada por sempre acreditar em nós.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, pela competência, respeito e carinho com os acadêmicos, demonstrando de verdade o que fazem nesta Instituição que sempre me orgulhei de ter feito minha vida acadêmica.

Pela doação do material biológico, quero agradecer a empresa Tyson do Brasil Alimentos, Ltda, localizada em São José, e pela Avícola Polastri, Ltda Itajai, SC.

Agradeço aos servidores técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME (Eliana) e, do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia - LAMEBs (Chirle, Demétrio, Emily, Bibiana, Denis e Vanessa) pelo treinamento e uso dos equipamentos.

Agradeço a Universidade Regional de Blumenau - FURB, que permitiu que eu fosse liberada das minhas aulas e projetos para o doutoramento. As minhas amigas da Histologia, Sara, Débora, Graziela e Elizia que sofreram comigo para que eu pudesse estar aqui de forma integral.

Agradeço aos incentivadores deste doutoramento, e que foram os primeiros colegas do Laboratório de Reprodução e

Desenvolvimento Animal que me ajudaram muito com o conhecimento de bancada: Gilian, Luciane e Eliane, muito obrigada pelo apoio, carinho e muitos sorrisos. Obrigada aos demais mestrandos e doutorandos: Manuela, Fabiana, Aline, Carla, Michael, Thiciane, Madson, e aos demais estudantes que tive o prazer de conviver Maria Luiza, Mariana, Karla, Nathalia, pelo companheirismo, pela troca, pelo riso, pelo choro e silêncio, e por toda forma de ajuda.

Agradecimento especial à querida Thaline pelas horas despedidas no auxílio da organização de minhas pranchas, pela parceria constante. Que me fez ver que não há diferenças de idade, que na vida, poderia ser minha filha, mas na academia pôde me mostrar que a ciência é um processo de descobertas, dependendo de como se observa. Esta doutoranda foi uma companheira científica e de coração fundamental para meu crescimento. Obrigada!

Ao meu único irmão, obrigada por cuidar do pai enquanto sigo meu sonho. A minha sobrinha Daniela que segue os passos da ciência e me deixa muito feliz.

As minhas filhas Isabel e Luisa e ao meu amigo e amor, obrigada por toda a paciência e compreensão que tiveram comigo durante todo este período. Vocês fazem parte desta conquista.

Muito obrigada!

Só por hoje eu não quero mais chorar.
Só por hoje eu espero conseguir aceitar o que
passou e o que virá.
Só por hoje vou me lembrar que sou feliz”.

(Renato Russo)

RESUMO

A neurotoxicidade do metilmercúrio (MeHg) em indivíduos adultos é relativamente conhecida, contudo são escassos os trabalhos que analisam os estudos sobre a ação desse metal em duas estruturas do SNC durante o desenvolvimento. Este trabalho teve como objetivo relacionar os efeitos do MeHg sobre a organização estrutural e ultraestrutural do mesencéfalo e cerebelo, bem como identificar sua ação nos processos de proliferação e diferenciação celular, utilizando como modelo experimental embriões de *Gallus domesticus*. Os embriões foram tratados in ovo no 3º dia de incubação (E3) com uma única dose de metilmercúrio (MeHg) (0,1 µg diluído em 50 µL de salina) e analisados no 10º dia de incubação (E10). Os embriões do grupo controle foram tratados somente com 50 µL de solução salina. As análises morfológicas e morfométricas do mesencéfalo e cerebelo foram realizadas a partir de secções histológicas coradas com HE. A quantificação e imunolocalização de proteínas relacionados ao ciclo celular (ciclina E; p21 e p53), diferenciação celular (NeuN; Tubulina III e GFAP), proliferação celular (fosfohistona H3) e dano ao DNA (γPH2Ax), bem como relacionados a dinâmica mitocondrial (Drp-1 e Mfn-1) foram obtidos a partir de técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo. Foram realizados ensaios de detecção do MeHg através do espectrofotômetro de absorção atômica e análises por microscopia eletrônica de transmissão, para investigar alterações ultraestruturais. Os resultados mostraram deposição de Hg no mesencéfalo e cerebelo. A exposição ao MeHg provocou aumento da expressão da p21 no mesencéfalo e p53 no cerebelo, e significativa redução da expressão da ciclina E e de fosfohistona H3, sugerindo parada no ciclo celular e da proliferação celular. No grupo tratado foram observadas alterações ultraestruturais, sendo as mais evidentes nas mitocôndrias das células do mesencéfalo e principalmente do cerebelo. Os insultos ao ciclo e a estrutura celular alteraram os processos de diferenciação, provocando uma diminuição no número das células das linhagens neural e glial. Este estudo revelou que os insultos do MeHg no cerebelo foram mais severos do que no mesencéfalo, demonstrando que a toxicodinâmica do MeHg é dependente do período do desenvolvimento, podendo comprometer funções importantes para a sobrevivência do embrião.

Palavras-chave: Desenvolvimento. SNC. Toxicidade. Metilmercúrio. Ciclo celular. Diferenciação celular. Mitocôndrias.

ABSTRACT

Neurotoxicity of Methylmercury (MeHg) has been studied for years, but their relationship with the development of two CNS structures (midbrain and cerebellum) is highly unusual. This study aimed to analyze the effects of MeHg in the structural and ultrastructural organization and its influence on the processes of proliferation, differentiation and cell cycle of the midbrain and cerebellum of *Gallus domesticus* embryos. The embryos were treated in ovo on the 3rd day of incubation (E3) with a single dose of methylmercury (MeHg) (0.1 ug in 50 uL of diluted saline) and analyzed on the 10th day of incubation (E10). The control group embryos were treated only with 50 uL saline solution. The morphological and morphometric analysis of the midbrain and cerebellum sections were taken from histological sections stained with hematoxylin-eosin. The quantification and immunolocalization of proteins related to cell cycle (Cyclin E, p21 and p53), cell differentiation (NeuN; tubulin III and GFAP), cell proliferation (phosphohistone H3) and DNA damage (γ PH2Ax) and related mitochondrial dynamics (Drp-1 and Mfn-1) were obtained from immunohistochemistry and flow cytometry techniques. Metal detection assays were conducted using the atomic absorption spectrophotometer and analysis by transmission electron microscopy to investigate ultrastructural changes. The results showed deposition of Hg in the midbrain and cerebellum. Exposure to MeHg caused increased p21 expression in the midbrain and p53 in the cerebellum, and significant reduction in the expression of cyclin E and phosphohistone H3, suggesting cell cycle arrest and cell proliferation. Ultrastructural changes were observed, being more evident in the mitochondria of cells of the midbrain and especially of cerebellum. The insults to the cycle and the cellular structure altered the processes of differentiation, causing a decrease in the number of cells of neural and glial lineages. This study revealed that MeHg insults in the cerebellum were more severe than in the midbrain, demonstrating that the toxicology of MeHg is dependent on the developmental period and could compromise functions important for the survival of the embryo.

Keywords: Development. CNS. Toxicity. Methylmercury. Cell cycle. Cell differentiation. Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vesículas encefálicas de embrião de <i>G.domesticus</i>	29
Figura 2: Secção esquemática da vesícula encefálica em desenvolvimento.	31
Figura 3: Desenvolvimento do mesencéfalo.	32
Figura 4: Representação esquemática do desenvolvimento do cerebelo em secção sagital.....	34
Figura 5: Secção Sagital do encéfalo de embriões em E10.....	45
Figura 6: Autometalografia do mesencéfalo e cerebelo realizada pelo método de TIMM contra corado com hematoxilina.....	54
Figura 7: Concentração média de Hg no mesencéfalo e cerebelo juntos ($\mu\text{g/g}$) através da análise no espectrofotômetro de absorção atômica. ...	55
Figura 8: Viabilidade das células do mesencéfalo e cerebelo analisada pelo método de MTT.....	56
Figura 9: Morfometria das camadas do mesencéfalo e cerebelo.....	57
Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão de células mesencefálicas.....	61
Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão de células cerebelares.....	62
Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão das mitocôndrias de células do mesencéfalo e cerebelo.....	63
Figura 13:Quantificação do conteúdo total da proteína reguladora da fissão mitocondrial, Drp-1 no mesencéfalo e cerebelo de embrião.....	66
Figura 14: Quantificação do conteúdo total da proteína reguladora da fusão mitocondrial, Mfn-1 no mesencéfalo e cerebelo de embrião.....	67
Figura 15: Perfil autofágico através da reação com laranja de acridina.....	68
Figura 16: Quantificação do conteúdo total da proteína γ -H2A.X das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões.	71
Figura 17: Células apoptóticas pelo método do TUNEL e proliferação celular utilizando Fosfohistona H3.....	72
Figura 18: Quantificação do conteúdo total da proteína Ciclina E das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões.	74
Figura 19: Quantificação do conteúdo total da proteína p21 das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões.	75
Figura 20: Quantificação do conteúdo total da proteína p53 das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões.	76
Figura 21: Quantificação do conteúdo total de proteína GFAP.	77
Figura 22: Quantificação do conteúdo total da proteína de β -Tubulina III e NeuN.	79

Figura 23: Representação gráfica da ação do MeHg sobre mesencéfalo e cerebelo.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nas análises por imunohistoquímica e citometria de fluxo.....	48
Tabela 2: Densidade da população celular (NA) das camadas do mesencéfalo e cerebelo de embriões controle e tratados com MeHg. ...	58
Tabela 3: Frequência de danos ultraestruturais frente ao tratamento com MeHg no mesencéfalo e cerebelo.....	64
Tabela 4: Intensidade dos danos ultraestruturais mitocondriais no mesencéfalo e cerebelo após o tratamento com MeHg.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMG - Autometalografia
ANOVA - Análise de variância
AC - Aqueduto cerebral
APPs - Áreas de preservação permanente
BHE - Barreira hematoencefálica
BMP - Proteína morfogenética óssea (do inglês, Bone morphogenetic protein)
Ca⁺⁺ - Cálcio
Cb - Cerebelo
CdK - quinase dependente de ciclina (do inglês, Cyclin-dependente kinase)
CGE - Camada granular externa
CGI - Camada granular interna
ClMeHg - Cloreto de metilmercúrio
CM - Camada molecular
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAB - 3,3-diaminobenzidina
DAPI - 4,6-diamidina-2-fenilindol
DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, Desoxyribonucleic acid)
DMSO - Dimetilsulfóxido
Drp1 - Proteína ligada a fissão mitocondrial (do inglês, Dynamamin-related protein 1)
E - Dia embrionário
Ep - Camada ependimária
ERO - Espécie reativa de oxigênio
FBS - Soro fetal bovino (do inglês, Fetal bovine serum)
FSC-A: Definição para o parâmetro tamanho (do inglês, forward scatter)
GLAST - Glutamate-aspartate transporter
GFAP - Proteína ácida fibrilar da glia (do inglês, glial fibrillary acidic protein)
GSH - Glutathiona reduzida
HE - Hematoxilina e eosina
Hg - Mercúrio
HgI - Mercúrio inorgânico
I - camada intermediária
Ma - Camada do manto
Mar - Camada marginal

Mfn1 - Proteína ligada a fusão mitocondrial - mitofusina 1 (do inglês, Mitofusin 1)

Mfn2 - Proteína ligada a fusão mitocondrial - mitofusina 2 (do inglês, Mitofusin 2)

Ms - Mesencéfalo

MTT - Methyl Thiazolyl Blue

OPA1 - Proteína reguladora da fusão mitocondrial (do inglês, Atrophy optic 1)

PC - Placa cortical

PP - Pré-placa

® - Marca registrada

Shh - Do inglês, Sonic hedgehog

SP - Subplaca

TUNEL - Porção terminal de DNA fragmentado (do inglês, transferase terminal dUTP nick end labeling)

V - camada ventricular

γ -H2A.X - Forma fosforilada da histona H2A presente no nucleossoma da cromatina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 A PRESENÇA DO MEHG NO AMBIENTE.....	26
1.2 O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	28
1.3 A NEUROTOXICIDADE DO MEHG	35
1.4 A INTERFERÊNCIA DO MEHG NA ESTRUTURA E FUNÇÕES CELULARES.....	37
1.5. JUSTIFICATIVA.....	41
2. OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES	43
3.2 TRATAMENTO	43
3.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS	44
3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HG.....	46
3.5 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT.....	46
3.6 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS	46
3.6.1 DEPOSIÇÃO DO MEHG - AUTOMETALOGRAFIA (AMG)	46
3.6.2 DETECÇÃO DE CÉLULAS EM APOPTOSE POR TUNEL .47	
3.6.3 IDENTIFICAÇÃO DE AUTOFAGIA PELA REAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.....	47
3.7 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	48
3.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO MESENCÉFALO E CEREBELO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	50
3.9 AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO	51

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	52
4. RESULTADOS	53
4.1 DEPOSIÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MEHG	53
4.3 AÇÃO DO MEHG SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	55
4.4 EFEITOS DO MEHG SOBRE A ORGANIZAÇÃO CELULAR	56
4.6 AÇÕES DO MEHG SOBRE OS MARCADORES DE FISSÃO E FUSÃO MITOCONDRIAL	65
4.8 EFEITOS DO MEHG SOBRE MORTE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	69
4.8.1 MEHG - DANOS AO DNA	69
4.8.2 MEHG - MORTE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	69
4.8.3 MEHG - CICLO CELULAR.....	72
4.9 EFEITOS DO MEHG SOBRE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR	77
5. DISCUSSÃO	81
5.1 OS EFEITOS DO MEHG SOBRE A ORGANIZAÇÃO CELULAR E ULTRAESTRUTURA.....	83
5.2 O MEHG INTERFERE NO CICLO CELULAR	88
5.3 OS EFEITOS DO MEHG NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR.	92
6. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um metal comum no ambiente, apresentando tanto origem natural como antropogênica. As fontes naturais estão principalmente relacionadas com os processos de desgastes da crosta terrestre e com a atividade vulcânica, enquanto que a antropogênica está relacionada com a produção industrial. O mercúrio (Hg) é amplamente utilizado na indústria química, na produção de papel, de plásticos, tintas, baterias e lâmpadas fluorescentes (TCHOUNWOU et al., 2003). Os compostos de Hg liberados por fontes antropogênicas no ambiente representam uma forma importante de intoxicação animal ou humana sendo atualmente a forma mais comum (CLARKSON et al., 2003), causando prejuízos em vários sistemas corporais como no sistema nervoso central (SNC), cardiovascular e urinário (AGUADO et al., 2013; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006).

A forma orgânica mais tóxica de Hg é o metilmercúrio (MeHg) (BRAUNE et al., 2012; GOLDMAN; KORBAS et al., 2011; SHANNON, 2001), cuja capacidade de bioacumulação na cadeia alimentar oferece riscos ao bem estar das populações (CRESPO-LÓPEZ et al, 2005; SYVERSEN, 2012). O MeHg é encontrado nos organismos sob a forma metilada, podendo se acumular em vários órgãos como rins, fígado e principalmente no SNC (CRESPO-LÓPEZ, 2005), sendo considerado um agente neurotóxico para o homem e animais de diferentes níveis tróficos (WHO, 1976).

Estudos relatam a neurotoxicidade do MeHg em diversas espécies, incluindo humanos (GRANDJEAN; HERZ, 2011; MORIYAMA E HANNAGA, 2013), primatas (BURBACHER et al. 1990), roedores (FAUSTMAN et al., 2002; JAYASHANKAR et al., 2013); e em aves, (BERTOSSI et al, 2004; GREENER; KOCHEN, 1983; HEINZ et al., 2009) e as alterações morfológicas decorrentes da intoxicação por MeHg são dependentes da dose e do tipo de exposição, provocando prejuízos severos em embriões, fetos ou na vida pós natal (HARADA et al., 2005). A exposição ao MeHg durante os períodos críticos do desenvolvimento do SNC, pode gerar alterações morfofuncionais severas que dificultam a sobrevivência do neonato (SAKAMOTO et al., 2013; STRINGARI et al., 2008).

As primeiras pesquisas sobre a toxicidade do MeHg em aves abordavam o contexto ambiental, descrevendo a toxicinética deste metal, no organismo e no ambiente, a partir de estudos sobre a presença desta substância na dieta e sua interferência no perfil

reprodutivo desses animais (CAMPBELL et al. 2005; BRAUNE et al., 2007).

No presente estudo foram avaliados os efeitos neurotóxicos do MeHg, utilizando-se embriões de ave da espécie *Gallus domesticus* como modelo experimental, os quais são amplamente utilizados em estudos de Biologia do Desenvolvimento e Embriologia. Esse modelo apresenta potencial para estudos experimentais, como: (i) características morfológicas externas bem definidas, que permitem o estagiamento dos embriões, descritas por Hamilton e Hamburger (1951); (ii) facilidade em realizar análises qualitativas e quantitativas de diversas estruturas anatômicas; (iii) o ovo embrionado apresenta-se independente de fatores externos e; (iv) fácil manipulação e baixo valor econômico para sua obtenção e permanência no laboratório durante a experimentação (DOMOWICZ et al., 2011; HO et al., 2011).

O Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC desenvolve pesquisas utilizando o modelo de *G. domesticus* desde a década de 1990, sendo analisados os efeitos neurotóxicos do acetato de chumbo (CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003; RIVERO, et al., 2006), e MeHg (CARVALHO et al., 2008, FERREIRA et al., 2015) no encéfalo e medula espinhal de embriões. Esses estudos e a literatura corrente demonstraram que a toxicidade do MeHg é complexa e requer diferentes abordagens experimentais.

Neste contexto, consideramos que o período de tratamento com MeHg durante a formação de duas estruturas nervosas distintas, o mesencéfalo e o cerebelo, apresentam respostas celulares características devido aos ritmos celulares de proliferação e diferenciação serem diferentes.

1.1 A PRESENÇA DO MEHG NO AMBIENTE

O MeHg é um composto orgânico altamente tóxico presente nos sedimentos aquáticos (CLARKSON, 2002, FENG et al., 2008). Uma vez formado, o MeHg entra na cadeia alimentar através das membranas celulares onde interage com grupamentos sulfidríla (SH), acumulando-se nos seres vivos, representando riscos significativos para a saúde humana e animal (AZEVEDO et al., 2012).

Os primeiros relatos de contaminação acidental por este composto orgânico ocorreram em 1860, em Londres, a partir de exposições ocorridas em laboratório durante sua produção sintética (CLARKSON, 2002), chamando assim a atenção da comunidade

científica sobre o potencial toxicológico do MeHg. Por outro lado, a descoberta dos efeitos tóxicos do MeHg foram posteriormente utilizados com sucesso na agricultura, com ação antifúngica (GOLDMAN; SHANNOM, 2001). No entanto, diversos estudos descreveram a ocorrência de muitos casos de intoxicação por MeHg, em decorrência de seu uso generalizado (ETO et al., 2010, BAKIR et al., 1973 WHO, 1976).

A contaminação com MeHg da Baía de Minamata em 1953, no Japão, provocou a intoxicação da população local. O consumo de pescados foi a principal fonte de contaminação da população costeira (NINOMYA et al., 1995). Os sintomas mais graves diagnosticados foram distúrbios neurológicos que caracterizaram uma patologia denominada como doença de Minamata, apresentando tremores ou espasmos involuntários, dormência ou insensibilidade nos membros, falhas na coordenação muscular, problemas na fala ou expressão verbal, estreitamento do campo de visão e perda do equilíbrio (EKINO et al., 2007, KURLAND et al., 1960;).

Em 1971 e 1972, no Iraque, o consumo de pão caseiro, preparado com grãos contaminados por MeHg e utilizado na época como conservante antifúngico, resultou na intoxicação de cerca de 40.000 indivíduos, os quais apresentaram distúrbios neurológicos (BAKIR et al., 1973).

A contaminação por MeHg no Brasil pode ser regionalizada, onde nas regiões Norte e Centro-Oeste a presença deste composto está relacionada principalmente com as atividades de garimpo, enquanto que nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, a principal causa de emissão é oriunda da indústria eletroquímica (PINHEIRO et al., 2009).

O acidente ambiental mais recente no Brasil ocorreu com o rompimento da barragem de Fundão/MG (2015), provocando a liberação de rejeitos no meio ambiente e atingindo Áreas de Preservação Permanente (APPs). A presença da atividade extrativista de ouro também é comum na região Sudeste e esta característica regional está associada com a utilização de mercúrio e outros elementos como ferro e manganês, oferecendo riscos consideráveis de contaminação, uma vez que ao entrarem na dinâmica do sistema hídrico e não serem degradados, estes compostos permanecem solubilizados nas águas ou precipitados junto aos sedimentos do fundo (IBAMA, 2015).

Outra fonte de contaminação por MeHg no Brasil está relacionada à ingestão de peixes e frutos do mar, sendo que o sistema

de tratamento de resíduos tóxicos é legislado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) (MICARIONI et al., 2000).

O CONAMA instituiu a Política Nacional dos Recursos Hídricos e a Resolução 357, de 17 de março de 2005, define que as águas doces destinadas ao abastecimento humano e as atividades relacionadas ao seu uso, podem apresentar a concentração de no máximo 0,0002 mg/L Hg a 0,002 mg/L de Hg.

1.2 O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Estudos descreveram que a exposição materna ao MeHg geraram danos neurológicos em sua prole (GRANDJEAN et al., 1997, MURATA et al., 2007). Os efeitos do MeHg sobre o SNC em desenvolvimento podem ser relacionados com a espécie e a idade do concepto, associado à concentração e o tempo de exposição (CHOI, 1989, JAYASHANKAR et al., 2014). A complexidade do SNC em desenvolvimento e a imaturidade dos sistemas de defesa podem contribuir para a maior susceptibilidade a compostos orgânicos tóxicos como o MeH.

O processo de neurulação é característico dos vertebrados, e ocorre precocemente, pela indução de moléculas sinalizadoras produzidas pela notocorda, que agem sobre o folheto embrionário ectoderma, formando a placa neural. Através de movimentos morfogenéticos, esta última estrutura constituirá o tubo neural, o qual apresentará características regionais bem definidas durante sua organização, pré-estabelecidas através dos processos de neurulação primária e secundária (SHOENWOLF; FRANKS, 1984).

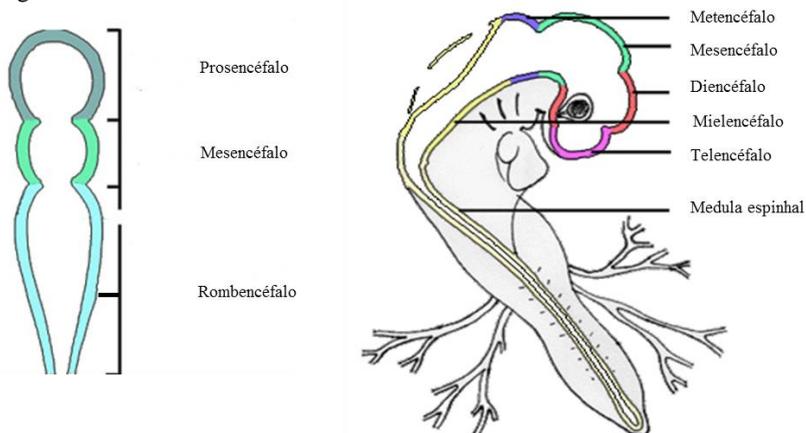
A neurulação primária se estende do encéfalo até a região truncal, envolvendo o processo de transformação da placa em sulco e tubo neural, pela fusão das pregas neurais na linha médio-dorsal (COLAS; SCHOENWOLF, 2001). A neurulação secundária envolve a formação mais caudal do tubo neural, e ocorre por processos de cavitação de uma estrutura com aspecto cordonal (SCHOENWOLF; DELONGO, 1980) podendo ocorrer de modo diferente entre as espécies (LOWERY; SIVE, 2004).

As regionalizações ântero-posterior, médio-lateral e dorsoventral do tubo neural irão definir as características morfofuncionais do SNC, com a formação do encéfalo e da medula espinhal (SCHOENWOLF; FRANKS, 1984, SHOENWOLF; ALVAREZ, 2009). Como as pregas neurais se dobram na região entre

o encéfalo e a medula, o tecido dorsal comprime o tubo neural na base do encéfalo de maneira que esta oclusão separa a região cerebral da futura medula espinhal (DESMOND; LEVITAN, 2002).

Com relação às características anatômicas, o tubo neural apresenta dilatações e constrictões, que se rearranjam para formar as diferentes regiões funcionais do encéfalo e medula espinhal. A expansão da cavidade central, em função do aumento da pressão positiva do fluido interno, garante o crescimento das vesículas encefálicas, que são mais evidentes em sua porção mais anterior, pela formação de dilatações e constrictões, que organizam as três vesículas encefálicas primárias: cérebro anterior (prosencefalo), cérebro médio (mesencefalo) e cérebro posterior (rombencefalo). O prosencefalo se subdivide em telencefalo e mais caudalmente em diencefalo. O telencefalo formará os hemisférios cerebrais e o diencefalo, o tálamo e hipotálamo, regiões estas importantes para o recebimento de informações do ambiente. O mesencefalo não se subdivide e forma o aqueduto cerebral. O rombencefalo se subdivide em duas vesículas, uma mais anterior, denominada de metencefalo que formará o cerebelo e a ponte e o mielencefalo, localizada posteriormente, que formará o bulbo (LENT, 2005; SCHOENWOLF; FRANKS, 1984) (Figura 1).

Figura 1: Vesículas encefálicas de embrião de *G.domesticus*



Fonte: Adaptado de (Tufan et al., 2004).

A parede do tubo neural é formada pelo neuroepitélio, constituído pela população de células neurais em processo de

proliferação, capazes de originar os diferentes tipos celulares presentes no SNC (GILBERT, 2010, WOLPERT; TICKIE, 2010).

Para a estruturação das diversas camadas que constituem a parede das vesículas encefálicas, ocorre um intenso processo de sinalização, oriundo dos tecidos adjacentes ao SNC. Desta maneira são constituídos os arranjos celulares, a partir de populações de células com características morfofuncionais distintas e que estabelecem na região dorsal, uma estrutura celular, denominada de placa alar, que apresenta conexões sensitivas enquanto que na região ventral (ou placa basal), se encontram as conexões motoras (GILBERT, 2010).

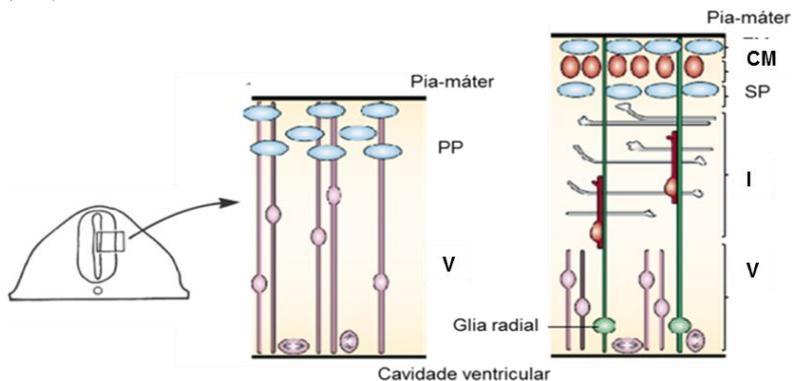
A população celular do sistema nervoso em formação apresenta características típicas de células epiteliais, apresentando-se polarizadas e com junções de adesão na porção apical (WODARZ; HUNTTNER, 2003). Durante o ciclo celular, os núcleos migram no sentido apical-basal, migração denominada de nuclear intercinética, formando um epitélio onde os núcleos das células se dispõem em diferentes alturas, dando a impressão de ser formado por diversas camadas celulares. Estas células neuroepiteliais são precursoras dos neuroblastos e dos glioblastos (GÖTZ; HUNTTNER, 2005) (Figura 2).

Com o início da neurogênese, as células neuroepiteliais originam as células da glia radial (GÖTZ; HUNTTNER, 2005). Essas células possuem processos radiais que se expandem da superfície apical à superfície ventricular do tubo neural, servindo como guia durante a migração dos neurônios, tanto na formação do encéfalo, quanto na medula espinhal. As células da glia radial mantêm propriedades de células neuroepiteliais, que incluem: a expressão de proteínas citoplasmáticas, manutenção da polaridade apical-basal da célula através da presença de junções celulares de membrana e a manutenção do contato celular com a cavidade ventricular (GÖTZ; HUNTTNER, 2005, DOMOWICZ et al., 2011).

Durante a neurogênese, as células precursoras migram através da glia radial estabelecendo na camada do manto a região onde as células se diferenciam para dar origem aos neurônios. Os neurônios imaturos passam por uma série de mudanças para se tornarem funcionais, adquirindo uma morfologia que confere a habilidade de sintetizar neurotransmissores e conduzir sinais elétricos (FARKAS; HUNTTNER, 2008). As moléculas responsáveis pelo início dessa diferenciação são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês, bone morphogenetic proteins) e o Shh (do inglês, Sonic hedgehog). A distribuição destas moléculas obedece a um gradiente ao

longo do eixo dorsoventral do tubo neural, levando à formação de diferentes classes de neurônios – motoneurônios, interneurônios e neurônios sensoriais – e orientando o crescimento axonal destes, permitindo o estabelecimento de conexões apropriadas (CHIZHIKOV; MILLEN, 2005).

Figura 2: Secção esquemática da vesícula encefálica em desenvolvimento. Demonstração das camadas ventricular (CV); subcamadas: pré-placa (PP); intermediária (I); subplaca (SP); placa cortical (PC) e camada marginal (CM).



Fonte: Adaptado de (Nadarajah; Parnavelas, 2002).

A organização básica do SNC já é reconhecida em 24h de desenvolvimento em embriões de espécie *G. domesticus* (HAMBURGER; HAMILTON, 1951), apresentando as expansões das vesículas encefálicas primordiais e organização primitiva da camada ventricular (GILBERT, 2010).

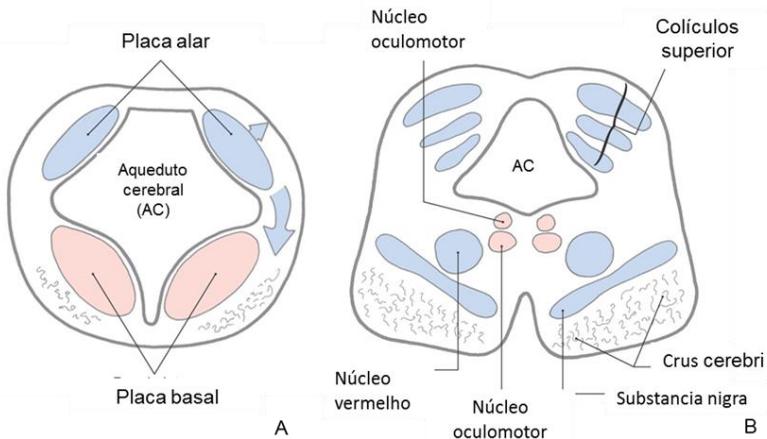
Como anteriormente apresentado, o mesencéfalo não se subdivide e é uma estrutura nervosa com menor número de modificações estruturais observadas ao longo do desenvolvimento. Sua organização celular é constituída por vias associativas sensoriais, com a presença de células ganglionares da retina (CGR), desempenhando papel central na análise da informação visual (SCICOLONE et al., 1995). Poucos estudos relacionam sua estrutura e função (NARAYANAN; NARAYANAN, 1978, GOLBERG, 1974) com a toxicidade ambiental (LEWANDOWSKI et al., 2003). Por outro lado, durante o desenvolvimento do mesencéfalo são observadas mudanças significativas na sua porção mais posterior junto ao metencéfalo, com a organização do cerebelo e da ponte, que são

estruturas relacionadas com a função associativa motora, além da estruturação do IV ventrículo cerebral (KINOSHITA; ITO, 2006).

Na estruturação do mesencéfalo, os neuroblastos migram das placas alares e constituem o teto, formando quatro grupos de neurônios, presentes em quatro projeções do tecido nervoso, os colículos superior e inferior, que estão relacionados com os reflexos visuais e auditivos, respectivamente (GOLDBERG 1974, SCICOLONE et al., 1995) (Figura 3).

Os neuroblastos das placas basais darão origem aos neurônios do tegmento (núcleos vermelhos; do terceiro e quarto nervos cranianos e, os reticulares). Além disso, a *substância nigra*, localizada adjacente ao pedúnculo encefálico, tornam-se cada vez mais proeminentes a medida que mais grupos de fibras descendentes (cortico-pontino, cortico-bulbar e cortico-espinhal) passam através do mesencéfalo para o tronco encefálico em direção a medula espinhal (MOORE, 2008).

Figura 3: Desenvolvimento do mesencéfalo. Mesencéfalo em corte transversal em duas fases do desenvolvimento: fase inicial (A) e tardia (B). As setas em (A) mostram a migração de células da placa alar. Aqueduto cerebral (AC).



Fonte: <http://clinicalgate.com/the-midbrain.>

No mesencéfalo são reconhecidos neurônios dopaminérgicos, relacionados com o controle do movimento voluntário e de associações entre as respostas comportamentais aos estímulos ambientais. O adequado funcionamento desses neurônios é importante

para o comportamento básico dos animais, e alterações relacionadas a esta população de células neurais causam algumas patologias neurológicas, representando um elo importante entre a aprendizagem, memória e a expressão de padrões cognitivos (BISSONETTE; ROESCH, 2016).

Já o cerebelo é considerado uma estrutura do sistema motor associado ao controle do movimento e aprendizagem motora (ITO, 2000). Diversos estudos demonstram a participação do cerebelo em tarefas envolvendo o processamento sensorial (GAO et al., 1996) e a memória operacional (DESMOND et al., 1997), portanto, não apenas relacionadas as funções motoras, mas também relacionados a processos cognitivos.

Durante a formação do cerebelo em E4, em aves, as células neurais do metencéfalo apresentam um espessamento, delimitado anteriormente pelo istmo e posteriormente pelo plexo coróide (AKAR; SUR, 2010, GOLDDOWITZ; HAMRE, 1998). As células migram tangencialmente pela superfície do cerebelo primitivo e formam a camada granulosa externa (CGE), surgindo às células granulares (MECHA et al., 2010). Os interneurônios da camada molecular (CM) são gerados a partir de células precursoras e migram para constituir as células da futura camada molecular. A migração celular ocorre através das fibras da glia radial, reconhecidas no cerebelo como fibras de Bergmann (GOLDDOWITZ; HAMRE, 1998).

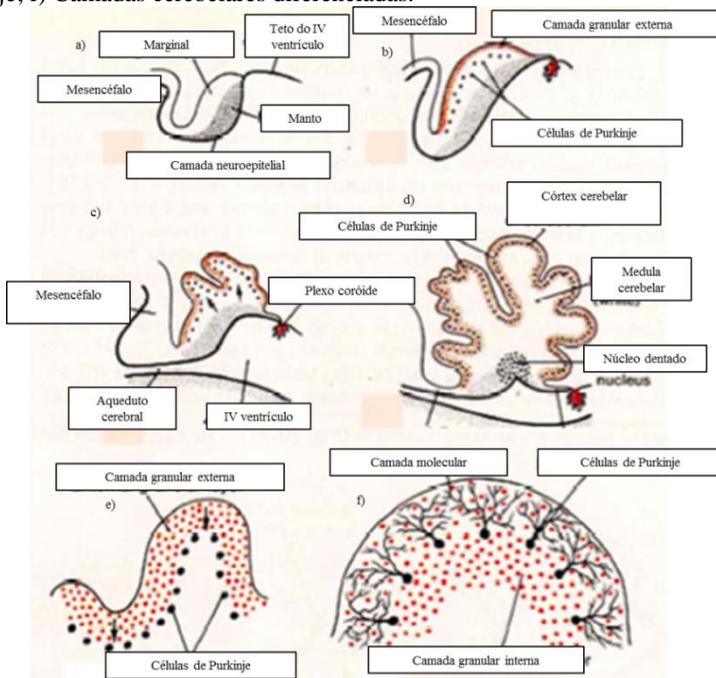
Em aves, em E10 o córtex cerebelar apresenta-se organizado em duas camadas: granular interna (CGI) e granular externa (CGE). Na CGI encontram-se as células de Purkinje em fase de diferenciação e os precursores gliais (SEPÚLVEDA, 2005). As células precursoras das células de Purkinje migram da camada endimária e durante o período de migração, tais células formam faixas longitudinais e gradualmente constituem uma estrutura plana em torno da qual se organizam as camadas do córtex cerebelar (AKAR;SUR, 2010) (Figura 4).

A atividade proliferativa é intensa na CGE entre E8 e E15, produzindo aumento do número de células e a expansão desta camada (GOLDDOWITZ; HAMRE, 1998, LUCKNER et al., 2001). Gradualmente, os precursores das células granulares da CGE saem do ciclo celular e se acumulam na região interna desta camada, migrando tangencialmente. A partir da CGE, as células granulares iniciam o processo de migração radial para a camada molecular primitiva e as células da CGI alcançam a posição final. No percurso das células da CGE para a CGI, as células granulares passam por mudanças

morfológicas e deixam para trás os processos que formarão as fibras paralelas (LUCKNER et al., 2001, SEPÚLVEDA, 2005).

A proliferação da CGE e a subsequente migração das células pós-mitóticas resultam no crescimento do cerebelo e em mudanças anatómicas. Gradualmente a estrutura lisa e encurvada do cerebelo forma dobras e as folhas cerebelares (MECHA, 2010). Em embriões de aves os lobos cerebelares só poderão ser reconhecidos entre as idades de E13 e E14.

Figura 4: Representação esquemática do desenvolvimento do cerebelo em secção sagital. a) Região de origem do cerebelo com a diferenciação da camada neuroepitelial, manto e marginal; em b) Diferenciação da camada granular externa e precursores das células de Purkinje; c) Início da formação foliácea do cerebelo e migração celular; d) Diferenciação das regiões medular e cortical e) Camada granular externa diferenciada e migração das células de Purkinje; f) Camadas cerebelares diferenciadas.



Fonte: Adaptado de <http://development-of-the-nervous-system>

A capacidade de locomoção, coordenação motora e o estabelecimento das vias sensoriais visuais e auditivas estão

diretamente relacionados com a maturidade do mesencéfalo e cerebelo. Tais estruturas nervosas mostram-se estruturalmente desenvolvidas em aves, após a eclosão (LIU; JOYNER, 2001).

O mesencéfalo e principalmente o cerebelo se caracterizam por apresentar uma complexidade estrutural e funcional resultantes dos eventos de proliferação, migração e diferenciação celulares, garantindo o estabelecimento das conexões neurais. Os compostos orgânicos como o MeHg podem afetar o desenvolvimento do SNC. Os insultos neurotóxicos gerados são variáveis, sendo dependentes da dose, do modo de tratamento, da espécie, do sistema corporal, da idade considerando-se inclusive as propriedades ambientais e biológicas as quais esta substância está inserida.

1.3 A NEUROTOXICIDADE DO MEHG

Estudos sobre a toxicidade em humanos, contribuíram para as análises clínicas dos sintomas provocados pelas intoxicações com o MeHg. As alterações histopatológicas decorrentes da intoxicação pelo metal facilitaram a compreensão das mudanças fisiológicas, celulares e sistêmicas. Os mecanismos moleculares envolvidos têm sido elucidados, principalmente através de estudos experimentais com embriões e animais adultos, que contribuem com o melhor entendimento dos aspectos absorptivos, de acumulação, biotransformação e excreção do MeHg (FARINA et al., 2011).

O desenvolvimento do SNC apresenta uma sequência temporal na formação das várias estruturas nervosas, deixando as células do SNC mais vulneráveis à ação de xenobióticos do que indivíduos adultos. Entre estas, destacam-se os componentes da barreira hematoencefálica (BHE) (RONCALI et al., 1986), que se caracteriza como uma estrutura que exerce uma função importante na manutenção da homeostase do SNC (ZHENG, 2003).

O MeHg atinge o tecido nervoso através da circulação sanguínea, tanto em embriões como em adultos (ZHENG et al., 2003). As células endoteliais da BHE formam um complexo MeHg-cisteína, estruturalmente semelhante a metionina, o qual funciona como um facilitador do transporte do metal para o interior do SNC, utilizando transportadores de L-aminoácidos (LAT-1 e 2) (SIMMONS-WILLIS, et al., 2002). O MeHg é excretado da célula na forma conjugada com GSH a partir da atividade de sistemas de transporte específicos (BALLATORI et al., 1995).

Os transportadores LAT-1 e 2, foram identificados a nível molecular, sendo compostos por heterodímeros e são expressos em muitos tecidos, incluindo o cérebro, e em níveis elevados, tanto nas membranas luminal e abluminal das células endoteliais que formam a BHE (DUELLI et al., 2000).

A afinidade com os grupamentos SH, no SNC, pode gerar danos na estrutura de membrana pela formação de ligações cruzadas entre o íon de Hg com as proteínas de membrana ou sobre a estrutura proteica, inibindo atividades enzimáticas, caracterizando seus efeitos neurotóxicos. Neste contexto, análises ultraestruturais com ensaios de permeabilidade de vasos sanguíneos, demonstraram que em aves, até a idade embrionária E12, a BHE apresenta-se permeável e imatura, favorecendo o intercâmbio entre o SNC e as substâncias presentes na circulação sanguínea (RONCALI et al., 1986).

No SNC, o MeHg pode ser dissociado e se acumular em quantidades variáveis (ASCHNER et al., 1990). Vahter e colaboradores (1995) descreveram que o MeHg no SNC apresenta um gradual processo de demetilação transformando-se em mercúrio inorgânico (HgI), sendo pouco solúvel, e favorecendo seu acúmulo nas células. O processo de demetilação parece ser não enzimático, contudo, seus mecanismos moleculares são pouco conhecidos.

Animais tratados previamente com MeHg apresentam lesões irreversíveis no SNC, e estes efeitos foram observados após a exposição aguda (CHANG, 1977, BITENCOURT et al., 2013), ou crônica (BERNTSSEN et al., 2003, STRINGARI et al., 2008).

A neurotoxicidade do MeHg é específica e os sistemas motor e visual, o hipocampo, cerebelo e a retina são alvos potenciais de ação de MeHg (BARBONI et al., 2004, DO NASCIMENTO et al., 2008). A exposição aguda ao MeHg diminui a coordenação motora, promovendo parestesia e ataxia, surdez, tremor muscular, conduzindo ao coma e morte (AMIN-ZAKI et al., 1974; GOLDMAN; 2001, EKINO et al., 2007).

A intoxicação crônica por MeHg danifica o córtex cerebral, provocando distúrbio da sensibilidade nas extremidades, disartria, surdez, constrição do campo visual, fraqueza muscular, falta de memória, ansiedade, depressão, distúrbios de coordenação e equilíbrio, além de aumentar o risco de doenças cardiovasculares (CHANG et al., 2008). Deste modo, o grau de neurotoxicidade do MeHg é dependente da dose e do tempo de exposição da espécie animal (HEWETT; ATCHISON, 1992), assim a toxicocinética e toxicodinâmica do MeHg são variáveis importantes ao se comparar o

SNC entre adultos e embriões. Fatores intrínsecos do SNC são relevantes para o estabelecimento da citotoxicidade sobre as linhagens celulares neurais (DREIEM et al., 2005).

A citotoxicidade do MeHg no SNC tem sido atribuída a três mecanismos principais: (i) alterações do Ca^{++} intracelular; (ii) indução do estresse oxidativo, tanto pela superprodução de espécie reativa de oxigênio (ERO) ou por redução da capacidade de defesa oxidativa; (iii) interações com grupamentos sulfidríla (CECCATELLI et al., 2010).

Estudos realizados por centrifugação diferencial mostraram que o MeHg não exibe uma distribuição específica na célula, uma vez que está presente em todas as frações (nucleares, mitocondriais, lisossomais e frações solúveis) (CECCATELLI et al., 2010). Ensaios bioquímicos tanto *in vivo* como *in vitro*, demonstraram que as mitocôndrias representam o principal local de deposição deste composto (ATCHISON; HARE, 1994).

1.4 A INTERFERÊNCIA DO MEHG NA ESTRUTURA E FUNÇÕES CELULARES

A neurotoxicidade induzida pelo MeHg está relacionada com a perda da homeostase intracelular, provocando alterações na morfofisiologia das células do SNC em desenvolvimento (ASCHNER et al. 2000, MANFROI et al. 2004).

As mitocôndrias têm sido reconhecidas como um importante alvo de intoxicação por MeHg (BONDY e MCKEE, 1991), bem como uma fonte principal de espécies reativas de oxigênio (ERO) (JEZEK e HLAVATA, 2005). A acumulação de MeHg na mitocôndria provoca depressão da respiração e produção de ATP, além de edema da matriz mitocondrial (POLUNAS et al., 2011)

Metais catiônicos como chumbo, cádmio, manganês e mercúrio, se acumulam nas mitocôndrias (ATCHISON; HARE, 1994, SOKOLOVA et al., 2005). A entrada do metal nas mitocôndrias ocorre através de transportadores de cálcio (Ca^{++}), por mimetismo molecular ou através de comportamento químico, como pH e carga mitocondrial (ATCHISON; HARE, 1994).

Com isso as alterações mitocondriais estão relacionadas com a mobilização do Ca^{++} dos estoques intracelulares e da entrada de Ca^{++} através dos canais de membrana. Estudos mostraram que a utilização de quelantes ou bloqueadores de Ca^{++} serviram como tratamento para a intoxicação com MeHg, reduzindo os efeitos tóxicos

do MeHg intracelulares (SARAFIAN, 1993). A liberação descontrolada de Ca^{++} das mitocôndrias pode ocorrer como consequência do estresse oxidativo, uma condição resultante do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (MARTY et al, 1997). Com a geração de ERO no tecido cerebral, há aumento dos níveis de superóxido e peroxidação lipídica (MANFROI et al., 2004), sendo as membranas lisossomais e mitocondriais alvo deste processo, podendo levar a morte celular (CECCATELLI et al., 2010, FRANCO et al., 2009, 2010;).

As alterações citosólicas, em especial aquelas decorrentes de estresses oxidativo podem atuar junto à dinâmica mitocondrial, diretamente na regulação morfológica e distribuição celular, cujos processos são diretamente mediados pela fusão e fissão mitocondriais (CHEN et al., 2011).

O mecanismo de fusão mitocondrial mantém a homogeneidade do DNA, participando da resposta ao estresse celular, havendo a coordenação da membrana externa e interna da mitocôndria, com a participação de mitofusinas Mfn-1, Mfn-2 (membrana externa) e OPA 1 (membrana interna) (CEREGHETTI et al., 2008).

O mecanismo de fissão é regulado pela proteína dinamina (Drp-1), relacionada com a proliferação, proporcionando à separação da população mitocondrial ente as células filhas. A fissão também é necessária para a renovação de partes envelhecidas ou danificadas da mitocôndria, favorecendo a autofagia (PALMER et al., 2011).

O sistema de defesa antioxidante intracelular como glutathiona (GSH) pode apresentar sua função comprometida pela toxicidade Hg (ERCAL et al., 2001), uma vez que o MeHg estabelece ligações com os grupamentos SH, diminuindo a disponibilidade de GSH, expondo as células aos danos provocados pelos radicais livre (SHANKER et al., 2005), caracterizando-se como um dos mecanismos mais importantes de toxicidade induzida pelo MeHg. A inibição das funções das proteínas do sistema antioxidante pode contribuir com a produção de danos oxidativos no SNC (CECCATELLI et al, 2010, FARINA et al., 2011).

A toxicidade do MeHg atua sob várias vias, como geração do estresse oxidativo e ligação com grupamentos sulfidril, podendo também comprometer elementos do citoesqueleto, afetando a despolimerização de microtúbulos, e com isso, alterando a neurotransmissão (CASTOLDI et al., 2001). Além disso, seus efeitos no citoesqueleto podem afetar a proliferação de precursores neuronais do cerebelo, pois o MeHg pode impedir a produção de novos

neurônios por desestabilizar o fuso mitótico, mantendo as células na fase de metáfase (FERRARO et al., 2009, PARKER et al., 2014).

Os microtúbulos parecem ser também sítios da ação do MeHg (VOGEL et al., 1989), apresentando relativa vulnerabilidade em diferentes populações de células nervosas, alterando a polimerização do citoesqueleto das células neuronais. No entanto, não está bem elucidado qual o mecanismo de ação do MeHg que compromete esta estrutura subcelular, podendo ser através do complexo tubulina-SH, o qual representa o alvo de sua toxicidade, ou pela redução do GSH intracelular, que pode levar a incapacidade de proteger efetivamente a despolimerização dos microtúbulos (HE et al., 2012).

O ciclo celular pode ser alvo de investigação da neurotoxicidade provocada pelo MeHg. Os sinais extracelulares podem estimular ou diminuir a progressão do ciclo de G1/S. Para que ocorram condições ideais de proliferação, as ciclinas interagem com Cdks, promovendo a entrada na fase S e facilitando a proliferação. Por outro lado, os sinais anti-mitogênicos atuam através de inibidores de Cdk, reduzindo a atividade do complexo ciclina-Cdk e evitar a transição G1/S (CUNNINGHAM; ROUSSEL, 2001).

Estudos têm identificado reguladores positivos e negativos de G1/S que aumentam ou restringem a proliferação celular (CAREY et al., 2002; DUTTO et al., 2015). Os efeitos do MeHg sobre o ciclo celular estão relacionados com a redução da expressão de ciclina E, a partir de exposições crônicas e subtóxica do MeHg em células progenitoras neuronais, inibindo o ciclo celular (Xu et al., 2010).

A regulação do ciclo celular influencia a posição e o número de neurônios no córtex cerebral (TAKAHASHI et al., 1995, VACCARINO et al., 1999), hipocampo (ALTMAN; BAYER, 1990), e cerebelo (HATTEN; HEINTZ, 1995). Nestas estruturas, existem regiões de células espacialmente distintas que geram neurônios específicos, os quais proliferam em períodos diferentes durante a embriogênese.

Estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciaram que a inibição da proliferação celular é um dos principais efeitos da toxicidade do MeHg (HOWARD; MOTTET, 1986; MIURA et al., 1978; XU et al., 2010), podendo interferir na organização morfológica do SNC do embrião (FALLUEL-MOREL et al., 2007).

A ativação de proteínas reguladoras do ciclo celular está relacionada com mecanismos de interrupção do ciclo celular, resultantes de interferências externas e internas ao ambiente celular. Entre os reguladores do ciclo destacam-se as proteínas p21 e p53

(HERRUP; YANG, 2007, RUSSO et al., 1995). A p21 inibe a progressão do ciclo celular pela ligação a complexos reguladores, incluindo a ciclina E- CDK/2, que controla a transição de fase G1/S (DUTTO et al., 2015). Enquanto que a p53 é uma proteína importante, capaz de induzir a parada do ciclo celular, podendo levar a apoptose. A capacidade da p53 em induzir a parada do ciclo nas fases G1, G2 e S, proporciona um período adicional para a célula reparar danos genômicos antes de entrar nas fases críticas de síntese de DNA e na mitose. As células, portanto, estacionadas nas fases podem ser liberadas de volta ao ciclo, facilitando o reparo do DNA (FAUSTMAN et al., 2002).

Alterações na homeostase celular, como aumento dos níveis de Ca^{++} provocadas pelo MeHg aumentam a expressão da p21 (ASCHNER et al., 2007, DUTTO et al., 2015), ou seja, a partir da indução direta da p21 independente da p53, que ocorre durante o estresse oxidativo (RUSSO et al., 1995). Outros modos de sinalização da p21 estão relacionados com danos ao DNA, e estes podem ser dependentes da via p53 (OU et al., 1999).

A exposição ao MeHg pode, portanto, perturbar os processos de proliferação, diferenciação e migração celular, que são altamente regulados durante o desenvolvimento do SNC. A proliferação de células progenitoras neurais pode ser considerada como o estágio-chave da neurogênese e os parâmetros do ciclo celular afetam as taxas de geração neuronal e com isso podem interferir na organização do córtex cerebral. Estudos neuroanatômicos revelam que altas doses de MeHg durante o período pré-natal podem causar diminuição no número de células e alterações na citoarquitetura das camadas encefálicas (FAUSTMAN et al., 2002).

O SNC em desenvolvimento, parece ser mais sensível aos efeitos do MeHg, pois sua organização estrutural apresenta-se imatura, como BHE associada aos mecanismos de transporte serem mais permeáveis ao metal, apresenta-se como sítios de acúmulo de metais e as injúrias nele provocadas podem causar danos irreparáveis no neonato, tanto a nível celular, como fisiológico e cognitivo (CLARKSON, 2002, DOMOWICZ et al., 2011).

1.5. JUSTIFICATIVA

O SNC em desenvolvimento parece ser o sistema mais sensível aos efeitos do MeHg, pois suas células e organização estrutural apresentam-se como sítios de acúmulo de metais e as injúrias nele provocadas podem causar danos irreparáveis no neonato, tanto a nível anatômico como fisiopatológico (FAUSTMAN et al., 2002, XU et al., 2010).

Os insultos do MeHg sobre os processos celulares do SNC dependem de vários fatores como espécie, dose, idade e podem ser atribuídos a interrupção de processos altamente regulados e sincronizados, como a proliferação, migração, diferenciação e morte celular associados com o crescimento e desenvolvimento (FERRARO et al., 2009).

O fator tempo-espaço durante o desenvolvimento do SNC é uma característica importante a ser analisada, sobretudo em estudos toxicológicos, uma vez que o período de exposição ao metal pode afetar diferentemente estruturas nervosas, uma vez que apresentam etapas de desenvolvimento distintas, caracterizadas por ritmos específicos dos processos biológicos, como proliferação e diferenciação celular, das células do mesencéfalo e cerebelo. Com isso, pôde-se estudar o desenvolvimento de duas estruturas espacialmente distintas do SNC, com períodos de maturidade diferentes sobre a influência de uma única dose de MeHg, *in ovo*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos tóxicos do MeHg sobre as características morfofuncionais das células do mesencéfalo e cerebelo durante o desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus* em E10.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Detectar a deposição e a concentração de MeHg no mesencéfalo e cerebelo de embriões em E10;

II. Investigar a interferência do tratamento com MeHg sobre a organização das camadas do mesencéfalo e cerebelo,

III. Analisar o efeito do MeHg sobre o processo de proliferação e morte celular das células do mesencéfalo e cerebelo e sobre a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular;

IV. Avaliar os efeitos do MeHg sobre a viabilidade celular, assim como ultraestrutura e a dinâmica mitocondrial nas células do mesencéfalo e cerebelo;

V. Identificar os efeitos do MeHg sobre a diferenciação da linhagem neural no mesencéfalo e cerebelo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Ovos fertilizados de *Gallus domesticus*, doados pela Empresa Tyson do Brasil alimentos-LTDA, São José/SC e Avícola Polastril-LTDA, Itajaí/SC foram transportados em bandejas de papelão com acomodações individuais até o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (BEG/CCB/UFSC). Os ovos foram higienizados, pesados, numerados e mantidos no laboratório a uma temperatura de ± 18 °C, onde permaneceram no mínimo 24 h para aclimação. Após este período, os ovos foram colocados na incubadora (marca Golden) em posição horizontal a uma temperatura de 37.5 °C e umidade de 65%.

Os ovos foram inicialmente incubados por 2 h, tempo necessário para reiniciar o processo de desenvolvimento, já que a fertilização em *G. domesticus* ocorre antes da postura dos ovos. Decorrido este período, foi adotado como critério de estagiamento, o dia embrionário (E) o qual estabelece que cada 24 h equivale a 1 dia de desenvolvimento (GREENER; KOCHEN, 1983, SCHOENWOLF, 1980).

Foram definidas as idades embrionárias de E3 - para o início do tratamento, por já se reconhecer as características morfológicas externas do embrião, de acordo com o estagiamento em aves proposto por Hamburger e Hamilton (1951), observando-se a presença das vesículas encefálicas (TAKAMATSU; FUJITA, 1987) e a idade de E10 - para encerramento do experimento, considerando que a forma de tratamento por injeção *in ovo*, utilizada no presente estudo, atingiria todos os tecidos e principalmente o nervoso durante a fase de diferenciação celular.

3.2 TRATAMENTO

Foram organizados 2 grupos experimentais, o grupo tratado com apenas uma dose MeHg 0,1 µg de ClMeHg (Sigma Aldrich®) diluído em 50 µl de solução salina, e o grupo controle, que recebeu 50 µl de solução salina NaCl 0,9% pH 7,4.

A dose utilizada no presente trabalho foi determinada a partir de estudos realizados em aves (HEINZ et al., 2006; 2009), considerando o volume aproximado de 1 µl de solução administrada por grama de ovo.

Embriões em E3 foram retirados da incubadora, colocados na posição horizontal, sendo efetuados os procedimentos de (I) abertura de orifício com agulha calibre nº16, na região da câmara de ar para aspiração do albúmen, visando o descolamento da membrana interna na face onde está o embrião; II) abertura (1 cm²) na parte superior do ovo, com tesoura ponta fina, para a administração da solução de tratamento, realizada com agulha hipodérmica ultrafina, calibre nº24. Ambas as aberturas foram seladas com fita adesiva atóxica e os ovos retornaram à incubadora por 7 dias, com acompanhamento diário da temperatura e umidade.

Foram realizadas 16 incubações independentes, e destas foram obtidas 112 embriões viáveis. Estes embriões foram utilizados nas técnicas de microscopia de luz (60 embriões, 30 por grupo), citometria de fluxo (24 embriões, 12 por grupo), microscopia eletrônica de transmissão (6 embriões, 3 por grupo), viabilidade celular (12 embriões, 6 por grupo) e espectrometria de absorção atômica (6 embriões, 3 por grupo).

Os procedimentos de incubação, tratamento e processamento dos embriões para as diversas técnicas foram realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) – Centro de Ciências Biológicas (CCB) - UFSC em parceria com Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e Laboratório de Pesquisas Toxicológicas (LPtox). Os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – 175/CEUA/PROPESQ/2014.

3.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

Os embriões foram dessensibilizados a 4° C por 15-20 min, removidos das membranas acessórias e analisados em microscópio estereoscópico (Olympus SHZ10, 35X a 70X), para reconhecimento das estruturas embrionárias, de acordo com as características descritas por Hamburger e Hamilton (1992), sendo utilizados apenas os embriões que apresentavam características morfológicas externas esperadas para a idade de E10. Os embriões (15 por grupo) foram pesados para conferir se o MeHg interferiu em características biométricas.

Os embriões foram fixados em formaldeído a 4% por 48 h, e então mantidos em etanol 70%. O encéfalo foi dissecado, pesado,

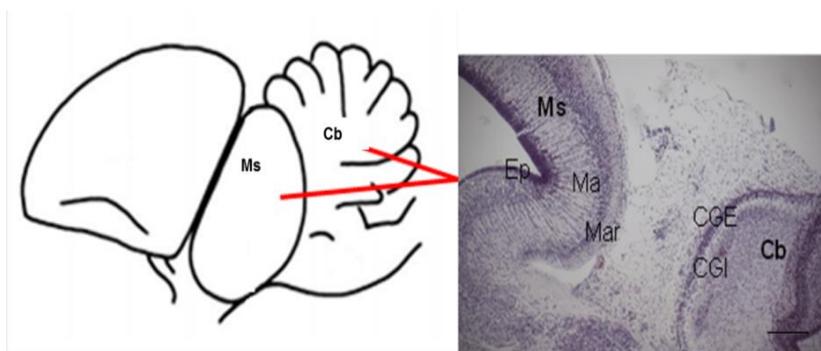
desidratado em série crescente de etanol 70 - 100%, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Foram realizadas secções sagitais (6 μ m), com micrótomo rotativo (CUT 4055 Olympus®), distendidas em banho-maria (37 °C), e colocadas em lâminas histológicas preparadas com poly-L lisina a 10% ou gelatina 0,5%.

Para que as secções fossem submetidas concomitantemente às mesmas condições de processamento para microscopia de luz, em cada lâmina foram colocadas 2 secções de cada grupo experimental. As secções foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em objetivas de 40 a 100x no microscópio Nikon® ECLIPSE 80.

A morfometria das camadas do mesencéfalo e do cerebelo foi realizada com ocular micrométrica (aumento total - 200x), considerando-se, para o mesencéfalo, a porção mais posterior e externa do tectum óptico até a cavidade ventricular internamente, enquanto que para o cerebelo determinou-se a porção mais anterior do broto cerebelar até a porção mais profunda da camada granular interna (CGI), obtendo-se as espessuras de suas camadas (Figura 5).

Para a análise morfométrica do mesencéfalo e cerebelo os dados obtidos foram relativizados, desconsiderando-se assim as variações anatômicas e de tamanho dos embriões estudados.

Figura 5: Secção Sagital do encéfalo de embriões de *G. domesticus* em E10. Mesencéfalo (Ms) e cerebelo (Cb). Mesencéfalo organizado em camadas: Camada ependimária (Ep), Camada do manto (Ma) e Camada marginal (Mar) e cerebelo em Camada Granular Externa (CGE) e Camada Granular Interna (CGI). Coloração HE. Aumento 10X.



Fonte: Adaptado de (Banfield et al., 1998).

3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HG

Os níveis de Hg presentes no mesencéfalo e cerebelo foram quantificados por Espectrofotômetro de absorção atômica (Thermo®, modelo ICE 3000 Series acoplado ao acessório VP 100 para geração de vapor de frio).

As duas estruturas foram pesadas e homogeneizadas com solução salina (NaCl 0,9%) na proporção de 1:10. Em seguida foi realizado o processo de digestão das amostras em soluções ácidas (ácido nítrico 65%; ácido sulfúrico; ácido perclórico P.A.; peróxido de hidrogênio 30 – 32%). A determinação das concentrações de mercúrio foi estimada a partir de uma curva padrão de Hg (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0 µg/L), para absorbância, obtidas a 253,7 nm, por meio de lâmpada de cátodo específica para Hg.

3.5 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Embriões a fresco foram utilizados para o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio). Os encéfalos foram dissecados, separando-se o mesencéfalo e o cerebelo, os quais foram pesados e mecanicamente fragmentados. Cada amostra, com peso médio de 20mg foi lavada com PBS (phosphate buffered saline) 0,1M (pH 7,6) por 10 min, centrifugada a 640 X g durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi coletado 50 ml da fração das células em suspensão para distribuí-las em placas de 96-poços, (em triplicata), adicionando-se 150 µl de MTT a uma concentração final de 0,5 mg/ml, e incubadas a 37 °C durante 30 min. Os cristais de formazan foram solubilizados em 1500 µl de DMSO (sulfóxido de dimetilo) e quantificadas por espectrofotometria a 540 nm. Os resultados foram comparados com amostras de tecido mesencefálico e cerebelar controle, para o qual foram atribuídas 100% de atividade.

3.6 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS

3.6.1 Deposição do MeHg - Autometalografia (AMG)

A deposição de mercúrio nas camadas do mesencéfalo e cerebelo foi avaliada pelo método de autometalografia (AMG), em que as secções foram desparafinizadas e imersas na solução de revelação AMG (60% goma arábica, 10% tampão citrato de potássio,

30% de hidroquinona e 0,5% de nitrato de prata) na ausência de luz e durante 60 min. Em seguida, as secções foram lavadas com água corrente e contrastadas com hematoxilina de Harris (5 segundos). As lâminas foram desidratadas e montadas a partir de uma série etanólica crescente (70 até 100%) e xilol, sendo montadas com bálsamo do Canadá. A deposição de Hg foi avaliada com relação à presença de precipitados marrom-claros, nas camadas do mesencéfalo e cerebelo a partir da reação histoquímica do Hg com o nitrato de prata (DANSCHER, 1981).

3.6.2 Detecção de células em apoptose por TUNEL

A detecção de células em apoptose foi realizada com o emprego dos reagentes do Kit TdT-FragEL® DNA (Tunel). As secções desparafinizadas do encéfalo foram submetidas à reação de acordo com as instruções do fabricante, submetendo-se a 3 banhos em água corrente para a remoção do meio de montagem TissueTek®. As secções foram lavadas com tampão Tris-salino (TBS, do inglês Tris buffered saline) 0,1 M, pH 7,4 e foram permeabilizadas com proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (1:500) e lavadas com TBS 20 mM e em seguida, lavadas com metanol: peróxido de hidrogênio (2:1) para o bloqueio das peroxidases endógenas. Na sequência, as secções foram preparadas para a incubação com a enzima de marcação do TUNEL® a 37°C, tratadas com DAB, contra coradas com verde de metila, e montadas com Entellan. Para os controles negativos, foram seguidos os mesmos procedimentos, suprimindo-se a adição da enzima de marcação do TUNEL®. As células apoptóticas foram identificadas ao microscópio de luz por exibirem núcleo condensado com precipitados marrom-escuros.

3.6.3 Identificação de autofagia pela reação com Laranja de Acridina

As células foram avaliadas quanto a presença de vesículas autofágicas no citosol. O Laranja de Acridina (LA) é um reagente caracterizado como lisosomotrófico e é um fluorocromo metacromático, exibindo fluorescência vermelha a fim de detectar precocemente a desestabilização de vesículas ácidas (DARÉ et al., 2001, YUAN et al., 1997).

As secções do encéfalo foram desparafinizadas e lavadas em PBS para posterior incubação com o reagente LA por 15 minutos

(1:1000). As lâminas foram então lavadas novamente em PBS por 10 minutos e incluídas em meio de montagem Gelmount (Sigma®).

3.7 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

A análise de proliferação, ciclo celular, diferenciação da linhagem neural, dinâmica mitocondrial e de danos ao DNA foram realizadas por imunohistoquímica, utilizando os anticorpos específicos (Tabela 1), para marcação das proteínas.

As secções do encéfalo foram desparafinizadas, reidratadas em série decrescente de etanol e realizado o bloqueio das peroxidases endógenas em solução metanol: peróxido de hidrogênio (4:1) seguida por banhos em PBS 0,1M pH 7.4. A permeabilização das membranas foi realizada com PBS + Triton X-100 a 0,3% e os sítios inespecíficos inativados em solução de soro fetal bovino a 5% em PBS + Triton X-100 a 0,1%. Em seguida procedeu-se a incubação com anticorpos primários, overnight, a 4°C em câmara úmida. As secções foram lavadas com PBS + Triton X-100 a 0,1%, incubadas com os anticorpos secundários (quadro 1) por 3 horas a temperatura ambiente e lavadas em PBS. Secções imunomarcadas com anticorpos fluorescentes foram montadas com meio de montagem aquoso – Gelmount (Sigma®) contendo DAPI (4,6-diamidina-2-fenilindol). As secções imunomarcadas com anticorpos secundários (quadro 1) contendo a enzima peroxidase, foram lavadas em PBS, e tratadas com solução contendo 3,3- diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (1 mg de DAB e 5 µl de H₂O₂ para cada ml de solução), posteriormente desidratadas e montadas com resina Entellan®.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nas análises por imunohistoquímica e citometria de fluxo

Anticorpos Primários	Diluição	Anticorpos Secundários	Diluição	Função
Anti-Fosfohistona H3 IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:200	Anti-coelho peroxidase IgG (Sigma®)	1:300	Proliferação celular
Anti-Ciclina E IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:50	Anti-coelho AlexaFluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Reguladora do ciclo celular

Continua

Anticorpos Primários	Diluição	Anticorpos Secundários	Diluição	Função
Anti-P21 IgG (monoclonal, Santa Cruz)	1:100	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®)	1:1000	Inibidor das CdKs, inibindo a progressão do ciclo celular
Anti-P53 IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:50	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Proteína nuclear e/ou citoplasmática, sinalizadora de estresse celular.
Anti-Fosfohistona H2A.X IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:50	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Responde a fragmentação de DNA
Anti-β-Tubulina III IgG1, (monoclonal, Santa Cruz)	1:100	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®)	1:1000	Diferenciação neuronal (marcador citoplasmático)
Anti-NeuN IgG1 (monoclonal, Chemicon®)	1:100	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®)	1:1000	Diferenciação neuronal (neurônios maduros)
Anti-GFAP IgG, (policlonal, Sigma)	1:100	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Diferenciação glial: astrócitos fibrosos e protoplasmáticos do SNC

Continua

Anticorpos Primários	Diluição	Anticorpos Secundários	Diluição	Função
Anti-Mfn1 (H65), IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:50	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Mediador da fusão mitocondrial
Anti-Drp1(H 300), IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:50	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes®)	1:1000	Mediador da fissão mitocondrial

Conclusão.

Para a análise estereológica, células imunorreativas aos anticorpos utilizados para marcar proliferação celular fosfohistona H3 (PHH3) e apoptose pela histoquímica do TUNEL®, foram detectadas por contagem direta através da grátula de Weibel nº 2 – M42 acoplada ao microscópio de luz, (Olympus®) em 200x, obtendo-se desta forma o número total de células imunorreativas em cada camada do mesencéfalo e cerebelo. Foram utilizados 11 campos alternados no mesencéfalo e 5 campos no cerebelo, onde foram identificadas as células que se localizavam no limite de cada barra. O cálculo da densidade celular por área foi feito através da fórmula:

$$NA = \frac{\text{número de células positivas}}{36,36} * 400$$

3.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO MESENCÉFALO E CEREBELO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Amostras do mesencéfalo e cerebelo de aproximadamente 5 mm foram fixadas em solução contendo 2.5 % de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7.2) overnight a 4°C. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% durante 4 h, após foram desidratadas em série crescente de soluções aquosas de acetona e infiltradas com resina Spurr® (Spurr, 1969). Secções semifinas de 700 ηm foram coradas com azul de toluidina 1% (pH 4.8%) e analisadas em microscópio de luz, delimitando a área a ser seccionada com espessura ultrafina. As

secções ultrafinas de 60-90 nm foram contrastadas em solução aquosa de acetato de uranila a 5% e posteriormente em solução aquosa de citrato de chumbo a 1%. As secções foram analisadas e as imagens capturadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo JEOL (JEM) 1011 - (JEOL® Ltda. a 80 kV).

As eletromicrografias dos grupos controle e tratado com MeHg foram analisadas em diferentes ampliações (4.000 a 100.000x) e, após uma avaliação geral foram detalhadamente analisadas as características de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, corpos de Golgi e inclusões citoplasmáticas (tipo vesiculares) por estas evidenciarem diferenças entre os grupos controle e tratado.

As mitocôndrias foram avaliadas quantitativa e qualitativa através das observações de 30 eletromicrografias (20.000x) por grupo (5 eletromicrografias por *grid*/2 *grids* por embrião/3 embriões por grupo) em campos sequenciais não repetidos, utilizando contagem direta, considerando-se todas as mitocôndrias presentes no campo. Para a análise qualitativa definiu-se escores de severidade, levando em conta a intensidade dos danos estruturais apresentados pelas imagens observadas ao MET, determinados como: ausente (-); leve (+); moderado (++) e intenso (+++) (CARLOS et al., 2012; FERREIRA, 2015; GLASER et al., 2010). A camada do manto do mesencéfalo e a camada granular externa do cerebelo foram utilizadas para a quantificação, devido a facilidade de observação.

As mitocôndrias foram analisadas e quantificadas com relação ao: (i) número total de mitocôndrias, (ii) número total de mitocôndrias sem danos; (iii) número total de mitocôndrias com danos (rupturas nas membranas, dilatações ou alterações nas cristas, variações na morfologia sugerindo alteração na dinâmica mitocondrial). Os dados foram organizados como média \pm erro padrão, onde cada eletromicrografia foi considerada como número amostral. Os dados percentuais foram estimados a partir do número total de mitocôndrias observadas em 12 eletromicrografias analisadas por grupo.

3.9 AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os encéfalos de embriões em E10 foram dissecados separando-se o cerebelo do encéfalo e homogeneizados em microtubos independentes e submetidos a lavagens consecutivas com PBS 0,1 M pH 7,8 (4°C). As células foram dissociadas utilizando Tripsina a 0,25% durante 30 min a 37°C e acrescido BSA a 5% sob agitação durante 45 min. As amostras foram centrifugadas a 640 x g durante 10

min, e o sobrenadante foi recolhido e distribuído em microtubos separados para incubação com anticorpos primários anti- γ -H2AX, anti-ciclina E, anti-p21, anti-p53, anti- β -tubulina III, anti-Neu N, anti-GFAP (todos 1:1000) e incubados durante 1 h em ambiente refrigerado e em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários (quadro 1) Alexa Fluor® 568 (anti-IgG de coelho) e Alexa Fluor® 488 (anti-IgG de camundongo) todos na concentração 1:1000, em incubação por 45 min protegida de luz. A leitura das amostras e coleta dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II® (BD® Biosciences).

As análises foram realizadas separadamente para cada anticorpo em cada tratamento. Foi utilizado iodeto de propídio para refinar a observação das áreas de interesse. Com a construção do diagrama dotplot contendo 20.000 eventos e levando em consideração parâmetros de complexidade celular (SSC-A) e tamanho celular (FSC-A), foram determinados as regiões com as populações celulares de interesse.. Os valores foram apresentados em contagem absoluta. Os dados foram processados e analisados no software livre Flowing® 3ª edição.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos controle e tratado e entre mesencéfalo e cerebelo foi utilizado teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, precedida dos testes de homogeneidade e distribuição normal das amostras e a posteriori de Tukey, considerando ($p \leq 0.05$). Para análises das diferenças médias entre dois grupos apenas, utilizou-se teste t de Student. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Para realização das análises estatísticas acima descritas, foram utilizados os programas GraphPad Prisma® versão 5.0 e Statistica® versão 10.

4. RESULTADOS

Embrões de *Gallus domesticus* (E3) tratados com uma única dose de 0,1 µg/0,05 ml de MeHg e mantidos durante uma semana na incubadora, apresentaram o desenvolvimento embrionário esperado para embriões na idade embrionária E10.

No entanto, o tratamento com MeHg foi capaz de interferir no peso corporal médio dos embriões nesta idade. Os embriões do grupo controle apresentaram peso médio de 3605,2 (\pm 138,3 mg), enquanto que os embriões do grupo tratados com MeHg exibiram diminuição de peso médio para 2367,8 (\pm 240,4 mg), diferença esta considerada estatisticamente significativa, correspondendo a uma redução de 34,32 % do peso total, em comparação com o grupo controle.

Na aferição dos pesos dos encéfalos foram constatados redução na média dos pesos do grupo tratado (194,99 \pm 25,72 mg) com relação ao grupo controle (222, 39 \pm 22,97 mg). O peso médio do mesencéfalo e do cerebelo, entre os grupos controle e tratados, também não apresentou diferenças estatísticas, onde o mesencéfalo apresentou peso médio de 65,56 (\pm 6,55 mg) enquanto que o peso médio desta estrutura no grupo tratado foi de 59,78 (\pm 3,38 mg). E o peso médio do cerebelo controle foi de 45,83 (\pm 3,20 mg) e o tratado de 40,68 (\pm 3,97 mg).

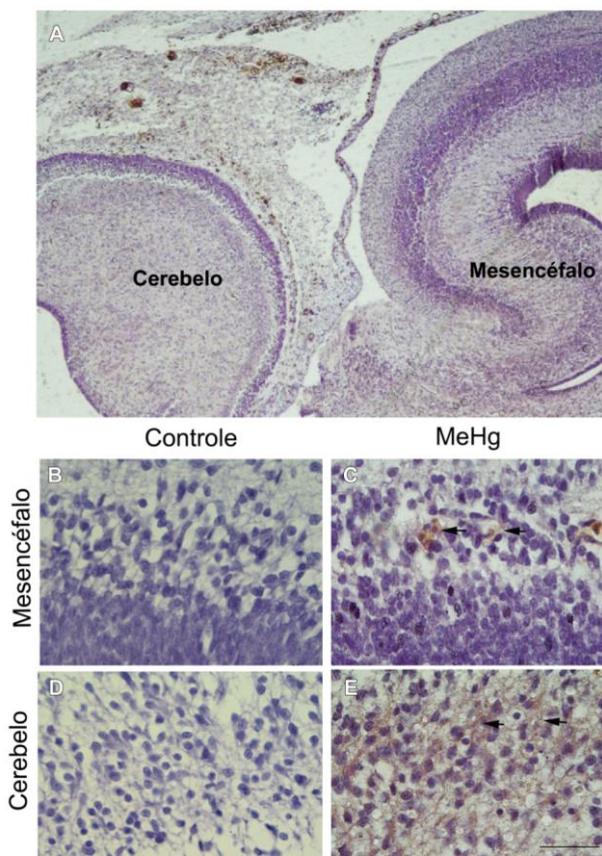
4.1 DEPOSIÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MeHg

A reação tecidual provocada pela AMG, que consiste na presença de precipitados de coloração marrom nas células e matriz extracelular, foi observada tanto no mesencéfalo como no cerebelo do grupo tratado com MeHg (Figura 6 A, C - E).

Através da espectrometria de absorção atômica, foi detectada a concentração média de Hg por grama de tecido mesencefálico e do cerebelo preparados conjuntamente, uma vez que o peso das estruturas individualmente eram insuficientes para sua detecção. O grupo controle apresentou (0,09 \pm 0,03 µg/g), enquanto que no grupo tratado foi detectado concentrações de 0,53 \pm 0,10 µg/g de tecido.

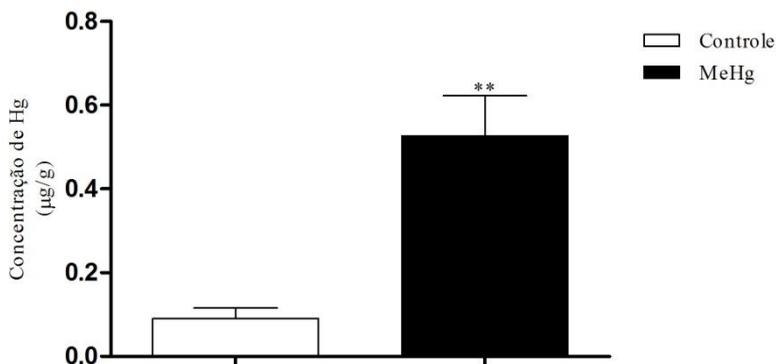
Estes resultados demonstram a capacidade do metal em se depositar e de acumular-se ao longo do período de incubação estabelecido (Figura 7) em ambas estruturas nervosas.

Figura 6: Autometalografia do mesencéfalo e cerebelo realizada pelo método de TIMM contra corado com hematoxilina.



Áreas de análises marcadas em (A), e detalhamento do mesencéfalo (B - C) e cerebelo (D - E), demonstrando a presença do MeHg precipitado nos grupos tratados (setas). N = 3 embriões/grupo, 3 secções/embrião. Barra de escala = 500 μm e 20 μm .

Figura 7: Concentração média de Hg no mesencéfalo e cerebello juntos ($\mu\text{g/g}$) através da análise no espectrofotômetro de absorção atômica.

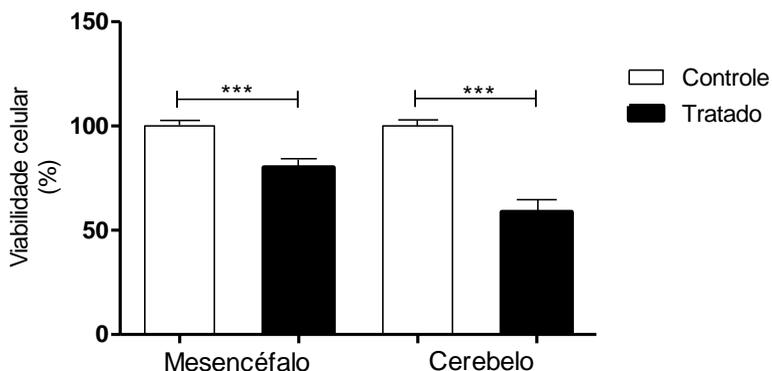


Representação gráfica com $N = 3$ embriões/grupo. Os dados foram analisados estatisticamente pelo T-Student e representados em média (\pm EPM). (***) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

4.3 AÇÃO DO MEHG SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

O MeHg afetou a viabilidade celular das estruturas nervosas analisadas, considerando-se diferenças significativas entre os grupos controle e tratado. Entretanto, observamos que a viabilidade celular diminuiu em cerca de 20% no mesencéfalo e 41,36% no cerebello (Figura 8). Estes resultados conferem uma maior susceptibilidade das células do cerebello frente à toxicidade do metal.

Figura 8: Viabilidade das células do mesencéfalo e cerebelo analisada pelo método de MTT



Os dados de viabilidade celular do mesencéfalo e cerebelo foram analisados estatisticamente pelo T-Student, individualmente e representados em valores percentuais.. (***) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

4.4 EFEITOS DO MEHG SOBRE A ORGANIZAÇÃO CELULAR

Os embriões em E10 apresentam-se em intensa atividade de diferenciação celular, sendo bem reconhecida a organização em camadas do mesencéfalo, identificando na microscopia de luz, a camada endimária (E) e a camada do manto (M) com suas subcamadas: intermediária (I), subplaca (SP), placa cortical (PC) e camada marginal (Ma). No cerebelo, identificam-se duas camadas: camada granular externa (CGE) e a camada granular interna (CGI) (Figura 9).

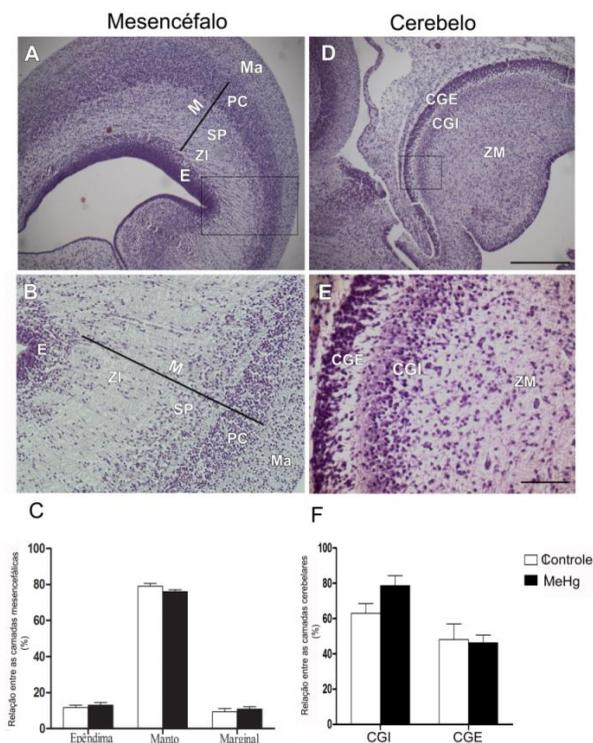
No mesencéfalo, a camada endimária do grupo controle correspondeu a 11,7% da espessura total do encéfalo, e no grupo tratado a 13%. A camada do manto do grupo controle e tratado correspondeu a 79% e a 76%, respectivamente, enquanto que a camada marginal do grupo controle apresentou 9,28% e o grupo tratado a 10,96%. As análises foram realizadas também nas subcamadas do manto. No entanto não foram observadas diferenças significativas entre as mesmas, desta forma foram avaliadas apenas as três camadas mais facilmente reconhecíveis (endimária, manto e marginal) nas análises de densidade celular (Figura 9 A – C).

No cerebelo, foi observado que a camada granular externa do grupo controle correspondeu a 48,09% e do grupo tratado a 46,33%. A

camada granular interna correspondeu 63,08% para o grupo controle e 78,63% para o grupo tratado (Figura D – F). Este conjunto de resultados mostram que o MeHg não afetou a estruturação celular das camadas do mesencéfalo e cerebello.

Na análise da organização celular, o tratamento com MeHg não provocou diferenças na densidade celular (Na) entre as camadas do mesencéfalo quando comparados os grupos controle e tratado. Entretanto, no cerebello, o MeHg causou uma redução significativa da densidade celular na CGE, onde foi observado 97,54 (\pm 9,96) células no grupo tratado, enquanto no grupo controle foi verificado uma média de 310,96 (\pm 27,88) células. Já na CGI, não foram observadas diferenças na densidade celular entre os grupos (Tabela 2). As diferenças observadas entre as camadas do mesencéfalo e cerebello estão relacionadas com a especificidade da organização celular das mesmas.

Figura 9: Morfometria das camadas do mesencéfalo e cerebello.



Área de análises no mesencéfalo (A) e cerebelo (D), e detalhamento das camadas (B – E). Gráficos de barras representando valores relativos médios (\pm EPM) das espessuras das camadas das estruturas nervosas (C – F). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. N = 3 embriões/grupo, 3 secções/embrião. Barra de escalas = 200 μm ; 50 μm . E = camada endimiária; M = camada do manto; subcamadas, I = intermediária; SP = subplaca; PC = placa cortical; Ma = camada marginal; CGE = camada granular externa; CGI = camada granular interna.

Tabela 2: Desidade da população celular (NA) das camadas do mesencéfalo e cerebelo de embriões controle e tratados com MeHg.

		Camadas mesencefalo			Camadas cerebelo	
		Epêndima	Manto	Marginal	Granular externa	Granular interna
Controle	NAtotal (nº/ μm^2)	210,02 ($\pm 23,1$)	318,7 ($\pm 19,6$)	107,68 ($\pm 17,1$)	310,96 ($\pm 27,9$)	197,29 ($\pm 17,9$)
	NARelativo (%)	33,0	50,08	16,92	61,18	38,82
MeHg	NAtotal (nº/ μm^2)	233,69 ($\pm 22,3$)	318,37 ($\pm 35,3$)	122,68 ($\pm 16,4$)	97,54 ($\pm 9,9^*$)	137,15 ($\pm 11,8$)
	NARelativo (%)	34,63	47,18	18,18	41,56	58,44

4.5 A INTERFERÊNCIA DO MEHG NA ULTRAESTRUTURA CELULAR

Foi verificado que o MeHg provocou alterações ultraestruturais em ambas as estruturas encefálicas analisadas. No mesencéfalo, as células da camada do manto do grupo controle apresentaram-se globosas, citoplasma denso com muitos ribossomas livres e polissomas com aspecto de roseta. Foram observadas mitocôndrias com aspecto morfológico característico. O núcleo apresenta cromatina frouxamente organizada e com o nucléolo evidente. Características estas que sustentam a capacidade de síntese destas células. (Figura 10 A - C - E). Nos embriões tratados com MeHg, as células do mesencéfalo apresentaram o citoplasma com formações vesiculares. Verificou-se redução de polissomas livres e em forma de roseta. O retículo endoplasmático rugoso apresentou suas cisternas tubulares dilatadas e distribuídas de forma desorganizada no citosol, com

poucos ribossomas aderidos a sua membrana. Observou-se também a heterogeneidade do núcleo, com áreas elétricas, e com aspecto edemaciado. O envelope nuclear apresentou dilatações ao longo de sua extensão (Figura 10 B – D - F).

Da mesma forma, foram analisadas características ultraestruturais da CGE do cerebelo. Nas células do grupo controle, observaram-se prolongamentos celulares e o citoplasma eletrondenso, com a presença de ribossomas e polissomas em roseta. As organelas membranosas, como as cisternas do Golgi e os túbulos do retículo endoplasmático rugoso, mostraram-se organizadas e esparsas no citosol. O núcleo apresentou variabilidade de formas, desde esféricas até reniforme, com cromatina levemente frouxa, nucléolo evidente e envelope nuclear preservado (Figura 11 A – C – E - G). As células cerebelares de embriões tratados exibiram o citoplasma heterogêneo e vesiculado. O retículo endoplasmático rugoso mostrou-se dilatado com poucos ribossomas aderidos a suas cisternas. Foram ainda observados lisossomas livres e estruturas semelhantes à autofagossomas. Os núcleos mostraram-se heterocromáticos, com nucléolo pouco evidente, além de dilatações no envelope nuclear (Figura 11 B – D – F – H).

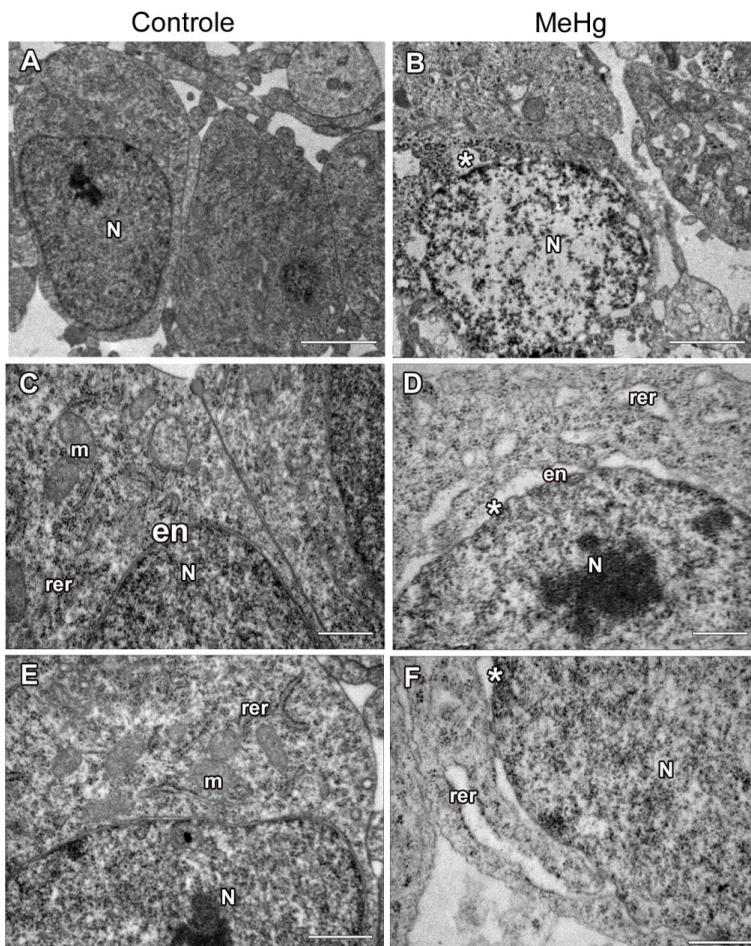
A Tabela 3 mostra a frequência da severidade dos danos ultraestruturais provocados pelo MeHg nas células mesencefálicas e cerebelares. Das alterações nucleares observadas, a dilatação do envelope nuclear foi encontrada moderadamente nas células tratadas do mesencéfalo enquanto que para o cerebelo este dano foi intenso. Para o citoplasma, a presença de vesículas e as alterações do sistema de membrana interno foram os mais frequentes, consideradas como moderadas para as células do mesencéfalo e intensas para as células do cerebelo, destacando-se nesta a grande dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e as alterações mitocondriais.

Dentre as alterações ultraestruturais observadas nas células neurais dos embriões tratados com MeHg, as mais evidente foram na estrutura mitocondrial. Tanto no mesencéfalo como no cerebelo de embriões controle, estas organelas apresentaram-se dispersas pelo citosol, sendo observada a integridade das cristas e matriz mitocondrial, bem como suas membranas internas e externas (Figura 12 A – B, F – G). Em células neurais de embriões tratados com MeHg, as mitocôndrias apresentaram-se com aspecto elétron-lúcido, sendo que a principal alteração foi constatada na membrana, apresentando danos nas cristas mitocondriais, além do rompimento das membranas interna e externa, bem como a formação de edemas na

matriz mitocondrial. Foram observados também, lisossomas associados a mitocôndrias e vesículas de autofagossomas (Figura 12 C – D, H – I).

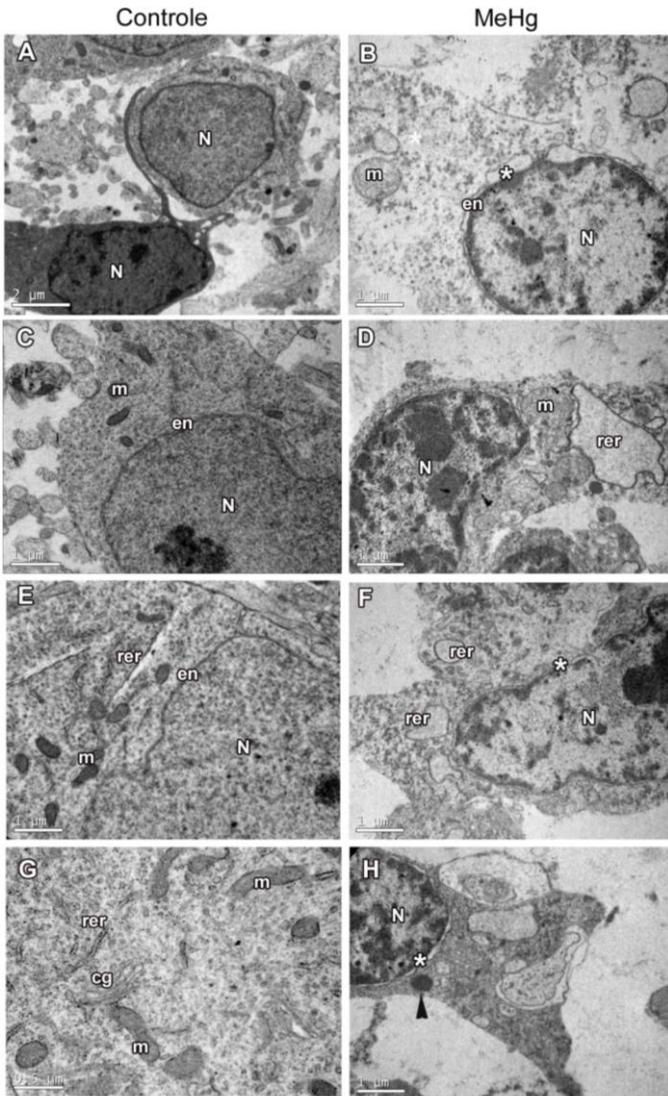
As análises quantitativas dos danos mitocondriais no mesencéfalo e no cerebelo, revelaram diferenças nas características ultraestruturais entre os grupos controle e tratados com MeHg para ambas as estruturas nervosas (Figura 12 e Tabela 4). Foram analisadas eletromicrografias e então determinadas o número total de mitocôndrias com ou sem alterações morfológicas. Para as células do mesencéfalo do grupo controle foram avaliadas 126 mitocôndrias no total, e destas, 96,8% apresentaram morfologia normal e 3,2% com alterações na ultraestrutura. Já no grupo tratado foram identificadas 112 mitocôndrias, das quais 93,75% não apresentaram danos e 6,25% com danos ultraestruturais. Nas células do cerebelo de embriões controle foram observadas 129 mitocôndrias, das quais 96,9% não apresentaram danos, enquanto que 3,1% apresentaram alterações. No entanto, no grupo tratado, das mitocôndrias analisadas, 56% não apresentaram alterações ultraestruturais e 44% apresentaram danos (Figura 14 E – J). Estes dados revelam que a mitocôndria pode ser considerada uma organela alvo da toxicidade do MeHg no SNC, podendo-se relacionar esta característica com a imaturidade das células cerebelares em relação ao mesencéfalo, uma vez que o desenvolvimento do SNC também ocorre no sentido ântero-posterior do corpo do embrião

Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão das células mesencefálicas.



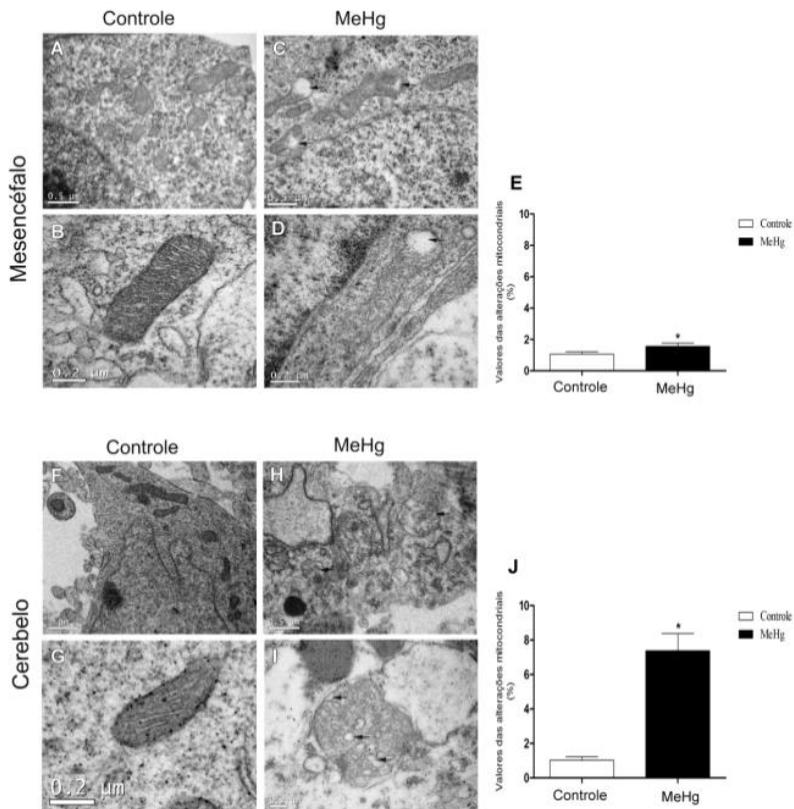
Prancha com N = 3 embriões/grupo; 2 grids/5 campos. Barra de escala: 1 μm , 0,5 μm . N = Núcleo; en = envelope nuclear; rer = retículo endoplasmático rugoso; m = mitocôndria. Dilatações do envelope nuclear (asterisco).

Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão das células cerebelares.



Prancha com N = 3 embriões/grupo; 2 grids/5 campos. Barra de escala: 1 μm, 0,5 μm. N = Núcleo; en = envelope nuclear; rer = retículo endoplasmático rugoso; m = mitocôndria; lisossomo (cabeça de seta); dilatações do envelope nuclear (asterisco).

Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão das mitocôndrias de células do mesencéfalo e cerebelo.



Prancha e representação gráfica com N = 3 embriões/grupo, 2 grids/5 campos. Gráficos de barras representando valores relativos médios (\pm EPM) das alterações mitocondriais mais frequentes. Os dados não paramétricos foram analisados pelo Teste estatístico Kruskal-Wallis. Edema (setas). Barra de escala: 0,5 μ m. (*) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 3: Frequência de danos ultraestruturais após tratamento com MeHg no mesencéfalo e cerebelo.

Compartimento celular	Dano ultraestrutural	Escore de intensidade de severidade	
		Mesencéfalo	Cerebelo
Núcleo	Edemaciado	+	-
	Dilatação do envelope nuclear	++	+++
Citoplasma	Vacuolização	++	+++
Retículo endoplasmático rugoso	Dilatação	+	+++
	Poucos ribossomos aderidos	+	++
Polissomas em roseta	Escassos formatos em roseta	+	++
Mitocôndria	Ruptura de membrana	++	++
	Edema da matriz mitocondrial	++	+++

Tabela 4: Intensidade dos danos ultraestruturais mitocondriais no mesencéfalo e cerebelo após tratamento com MeHg.

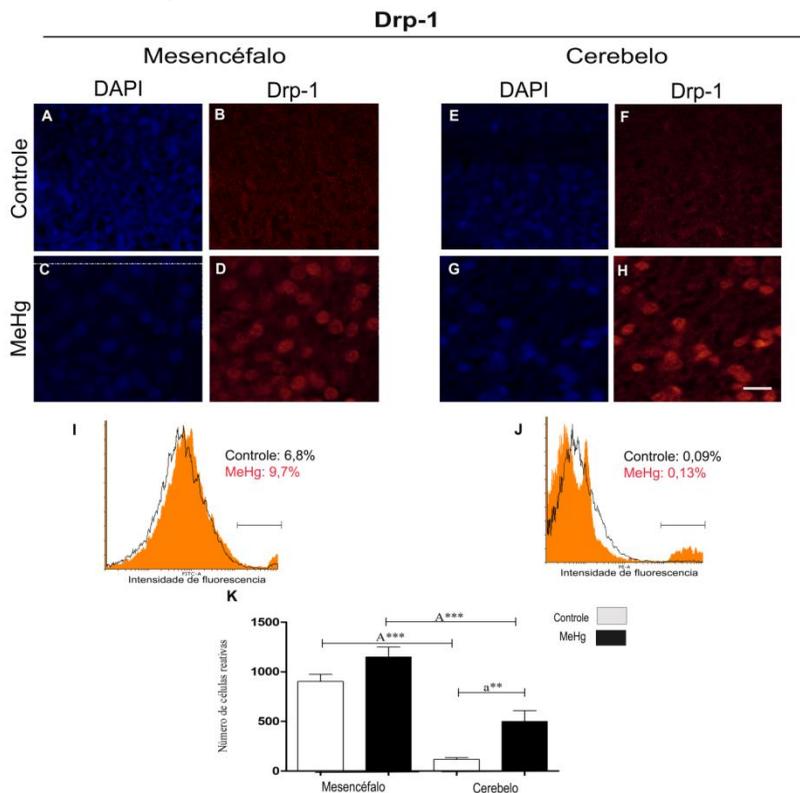
Danos no compartimento mitocondrial	Escore de intensidade de severidade	
	Mesencéfalo	Cerebelo
Edema da matriz mitocondrial	++	++
Ruptura da membrana mitocondrial	+	++
Desarranjo das cristas mitocondriais	++	+++

4.6 AÇÕES DO MEHG SOBRE OS MARCADORES DE FISSÃO E FUSÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são alvos diretos da toxicidade induzida por MeHg e neste contexto, foi avaliada a dinâmica mitocondrial, que se refere aos movimentos da organela na célula assim como a regulação de sua estrutura (distribuição e morfologia). No mesencéfalo a expressão da proteína Drp-1, envolvida com o processo de fissão mitocondrial, não apresentou diferença significativa entre o grupo controle ($1149,17 \pm 101,13$) e tratado com MeHg ($1005,0 \pm 115,01$). No cerebelo, observou-se um aumento da expressão de Drp-1 no grupo tratado com MeHg ($501,03 \pm 106,76$) quando comparado com o grupo controle ($117,17 \pm 16,84 < 0,001$) (Figura 13).

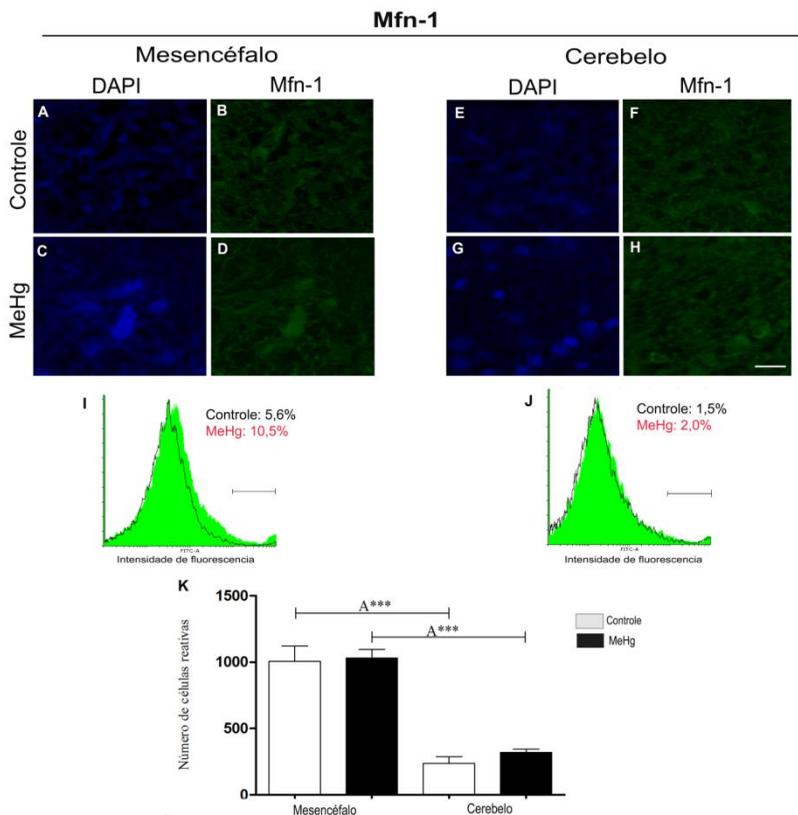
A expressão da proteína Mfn-1, envolvida com o processo de fusão mitocondrial, no mesencéfalo não diferiu entre os grupos controle e tratado ($1031,78 \pm 65,32$; $117,67 \pm 16,84$, respectivamente). O mesmo foi observado para o cerebelo de embriões controle ($236,50 \pm 50,72$) e tratado com MeHg ($320,39 \pm 24,72$) (Figura 14).

Figura 13:Quantificação do conteúdo total da proteína reguladora da fissão mitocondrial, Drp-1 no mesencéfalo e cerebelo de embrião de *G.domesticus*.



Imunolocalização demonstrada pela reatividade da fluorescência de anti-Drp-1 em microscopia confocal nas células do mesencéfalo (A – D) e cerebelo (E – H). Histogramas de perfil e frequência relativa de células Drp-1-positivas no mesencéfalo (I) e cerebelo (J). Gráfico de barras representando a média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (K). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. $N = 8$ embriões/grupo em 4 experimentos independentes. (**), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$; $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μm .

Figura 14: Quantificação do conteúdo total da proteína reguladora da fusão mitocondrial, Mfn-1 no mesencéfalo e cerebelo de embrião de *G.domesticus*.



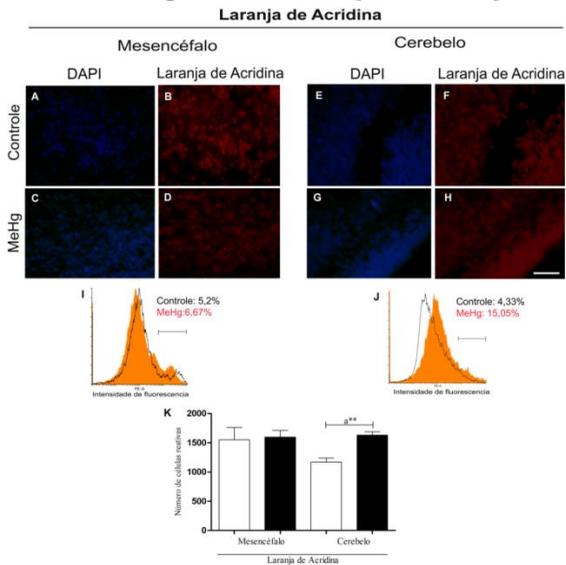
Imunolocalização demonstrada pela reatividade da fluorescência de anti-Mfn-1 em microscopia confocal nas células do mesencéfalo (A – D) e cerebelo (E – H). Histogramas de perfil e frequência relativa de células Mfn-1-positivas no mesencéfalo (I) e cerebelo (J). Gráfico de barras representando à média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (K). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. $N = 8$ embriões/grupo em 4 experimentos independentes. (***) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Barra de escala: 10 μ m.

4.7 O MEHG E O PERFIL CELULAR AUTOFÁGICO

A dinâmica entre os processos de fissão e fusão mitocondrial, em especial do cerebelo, foi marcada pelo aumento do Drp-1 (fissão mitocondrial), associada as características morfológicas ultraestruturais observadas nas células, como o aspecto vesicular do citoplasma, aos danos mitocondriais e a presença de lisossomas, que favoreceram a investigação de estruturas citoplasmáticas de caráter acidófilo, o que possibilita caracterizar um perfil celular autofágico.

Nas estruturas nervosas estudadas com reação histoquímica de LA, foi possível analisar a intensidade de fluorescência difusa no citoplasma das células reativas, por toda a camada do manto do mesencéfalo e nas CGE e CGI do cerebelo (Figura 15). Analisando-se o perfil de expressão das marcações com caráter ácido no citoplasma do mesencéfalo, não foi observado diferenças entre os grupos controle e tratados com MeHg ($1549 \pm 171,98$ e $1596 \pm 94,72$, respectivamente). Por outro lado, no citoplasma das células do cerebelo, foi verificado um aumento significativo da reatividade no grupo tratado com MeHg ($1629,60 \pm 48,93$) quando comparado com o grupo controle ($1169,80 \pm 58,27$).

Figura 15: Perfil autofágico através da reação com laranja de Acridina.



Reação histoquímica demonstrada pela reatividade da fluorescência do LA em microscopia confocal nas células do mesencéfalo (A – D) e cerebelo (E – H). Histogramas de perfil e frequência relativa de células LA-positivas no mesencéfalo (I) e cerebelo (J). Gráficos de barras representando à média (\pm EPM) do número absoluto da expressão das células reativas (K). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. N = 8 embriões/grupo em 3 experimentos independentes. (***) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,04$). Barra de escala: 10 μm .

4.8 EFEITOS DO MEHG SOBRE MORTE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.8.1 MeHg - danos ao DNA

Na análise do dano ao DNA das células neurais, os resultados obtidos mostraram poucas marcações, com fluorescência difusa nas camadas do mesencéfalo, principalmente na camada endimária e na camada do manto (Figura 16 A - D) e no cerebelo, na CGE (Figura 16 F - I).

Não foram observados danos de fragmentação do DNA provocados pelo MeHg nas células do mesencéfalo e do cerebelo. No mesencéfalo, a quantificação da expressão de γ -H2A.X foi de 41 células reativas ($\pm 5,90$) para embriões tratados, e 28,62 células reativas ($\pm 7,66$) para o grupo controle. O mesmo perfil de resposta foi observado com as células do cerebelo, onde se observou para o grupo tratado ($31 \pm 7,08$) e para o grupo controle ($28,83 \pm 7,16$) (Figura 16 K).

4.8.2 MeHg - morte e proliferação celular

A investigação dos efeitos do MeHg sobre os processos biológicos como morte, proliferação e ciclo celular, podem contribuir com o entendimento da toxicidade do metal e a plasticidade das respostas celulares.

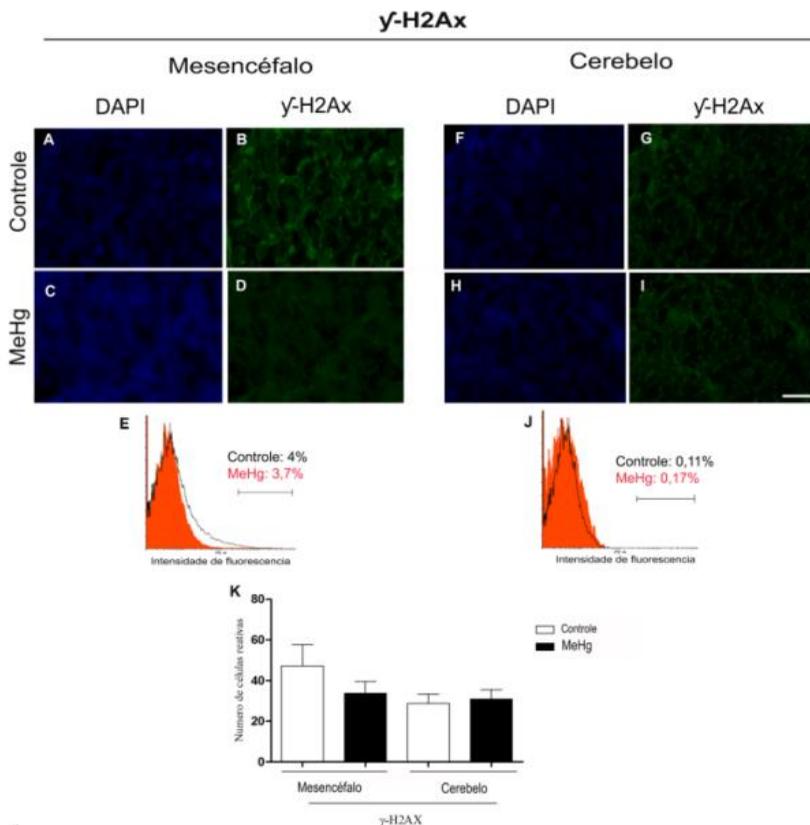
A morte celular no mesencéfalo, analisada na camada endimária, e no cerebelo na CGE, evidenciada pelo método do TUNEL, mostraram intensa marcação para células em apoptose (Figura 17 A – F). Na análise quantitativa foi verificado que o MeHg aumentou o número de células em apoptose no mesencéfalo (camada endimária), com $22,00 \mu\text{m}^2 (\pm 2,15)$ no grupo controle e $33,00 \mu\text{m}^2$

($\pm 3,87$) no grupo tratado. Já no cerebelo (CGE), não houve diferença entre o número de células em apoptose nos grupos controle e tratado, com $26,40 \mu\text{m}^2$ ($\pm 2,02$) e $29,70 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,62$), respectivamente (Figura 17 C - F).

Em relação à proliferação celular, identificaram-se células anti-fosfohistona H3 positivas, principalmente na camada endimária do mesencéfalo e na CGE do cerebelo (Figuras 17 G - L). Foi verificado que o MeHg reduziu a proliferação celular do mesencéfalo, observando-se na camada endimária a densidade celular de $108,34 \mu\text{m}^2$ ($\pm 11,99$) nos embriões controle e $81,26 \mu\text{m}^2$ ($\pm 5,57$) nos embriões tratados. Do mesmo modo, foi observado a redução das células anti-fosfohistona H3-positivas na CGE do cerebelo, onde o grupo controle apresentou ($83,08 \pm 10,14$) e o grupo tratado com MeHg ($57,30 \pm 5,35$) (Figura 17 I - L).

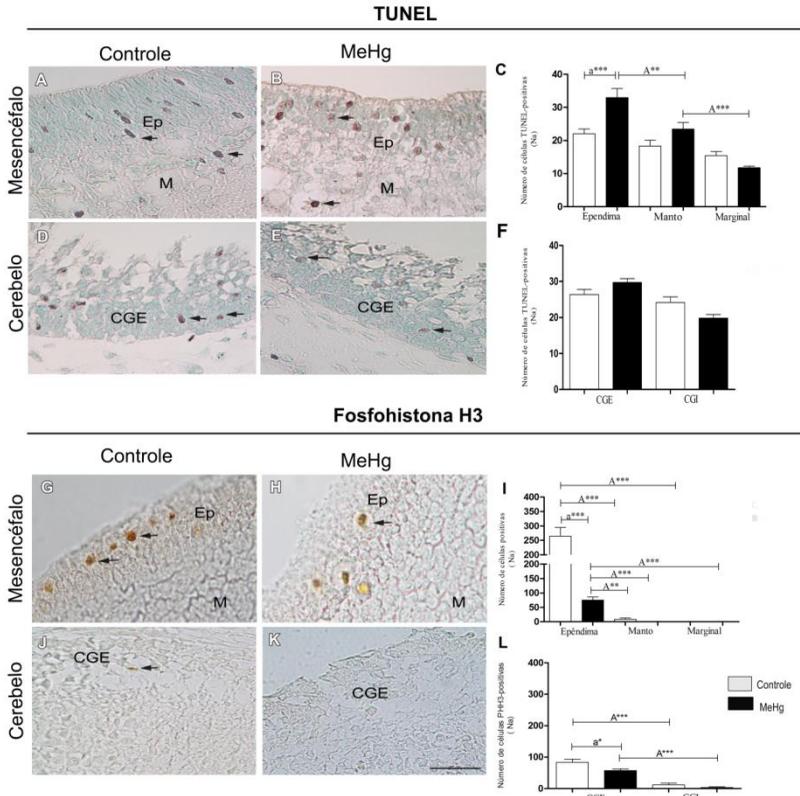
Ao se analisar a camada endimária no mesencéfalo, bem como a CGE no cerebelo, independentemente do tratamento, verifica-se a atividade proliferativa, que é intrínseca a sua função, relacionada com a geração de novas populações celulares.

Figura 16: Quantificação do conteúdo total da proteína γ -H2A.X das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões de *G.domesticus*.



Imunolocalização demonstrada pela reatividade da fluorescência de anti- γ -H2A.X em microscopia confocal nas células do mesencéfalo (A – D) e cerebelo (F – I). Histogramas de perfil e frequência relativa de células γ -H2A.X-positivas no mesencéfalo (E) e cerebelo (J). Gráfico de barras representando à média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (K). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. N = 8 embriões/grupo em 3 experimentos independentes. Barra de escala: 10 μ m.

Figura 17: Células apoptóticas pelo método do TUNEL e proliferação celular utilizando Fosfohistona H3.



Células em processo de apoptose (setas) (A – B – D - E). Células imunorreativas para Anti-Fosfohistona H3 (setas) (G – H – J – K). Gráfico de barras representando à média (± EPM) da densidade de células positivas (NA) (C – F – I – L). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. N = 8 embriões/grupo em 3 experimentos independentes. (*), (**), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

4.8.3 MeHg - ciclo celular

Como o tratamento com MeHg reduziu a proliferação celular, buscou-se examinar as proteínas envolvidas com o ciclo celular, que

foi realizado a partir de análises da expressão das proteínas reguladoras Ciclina E, p21 e p53.

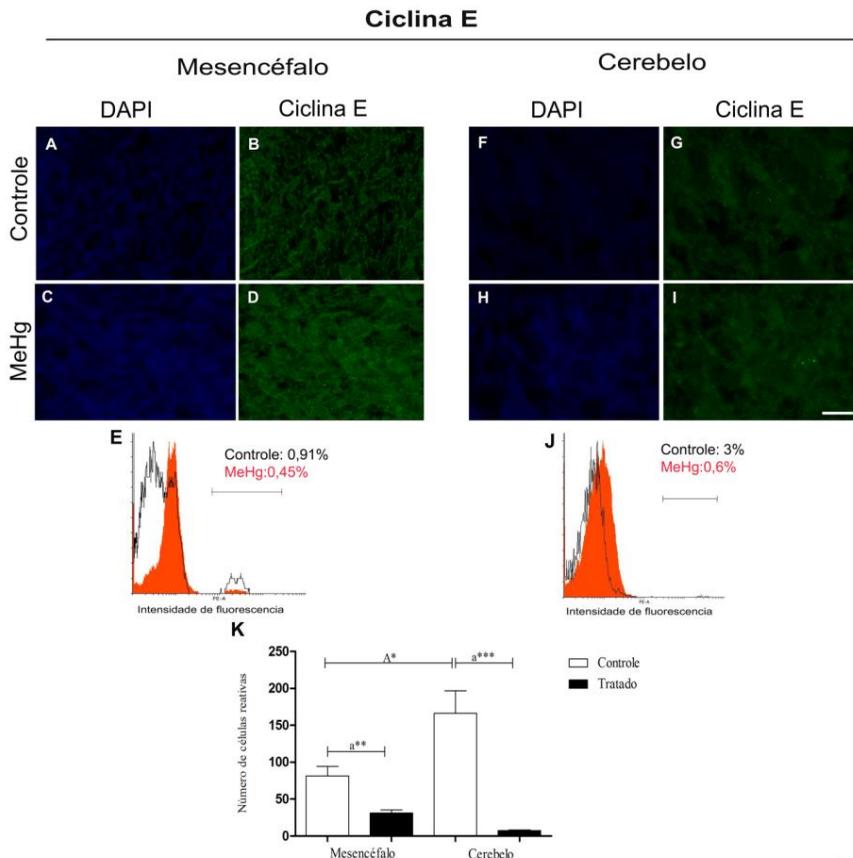
Analisou-se a expressão da Ciclina E nas células do mesencéfalo (Figura 19 A, D) e do cerebelo (Figura 18 F, E) a partir da fluorescência das células ciclina E-positivas. Foi verificada marcações difusas nas células, tanto na camada do manto do mesencéfalo como também nas camadas CGE e CGI do cerebelo. Nas células do mesencéfalo, após o tratamento com o MeHg, foi observado uma redução das células Ciclina E-positivas ($31,14 \pm 6,20$) quando comparado com o grupo controle ($81,57 \pm 18,43$). Esta redução também foi observada nas células do cerebelo, onde o grupo controle apresentou média de 173,80 ($\pm 45,05$) células reativas, enquanto que o grupo tratado obteve média de 7,60 ($\pm 1,25$) (Figura 18 K).

A análise da expressão da p21 foi realizada a partir da imunolocalização da expressão da proteína nas células da camada do manto do mesencéfalo (Figura 19 A - B) e nas camadas CGE e CGI do cerebelo (Figura 21 D, E). Os valores absolutos da expressão da p21 nas células do mesencéfalo observou-se um aumento significativo no grupo tratado ($589,62 \pm 88,62$) quando comparado com o grupo controle ($290,62 \pm 62,54$). Já no cerebelo, não foi observado diferenças na expressão da proteína p21 entre o grupo controle ($226,71 \pm 55,79$) e o grupo tratado com MeHg ($175,14 \pm 27,68$).

A expressão da p53 foi detectada na camada do manto do mesencéfalo (Figura 20 A, B) e na camada CGI do cerebelo (Figura 20 D, E). A expressão da p53 no grupo tratado do mesencéfalo foi significativamente mais baixa do que no grupo controle ($183,50 \pm 42,50$; $336,88 \pm 71,41$), respectivamente. Por outro lado, no cerebelo sua expressão foi significativamente maior no grupo tratado ($77,4 \pm 21,49$) do que no grupo controle ($28 \pm 3,11$) (Figura 20 G).

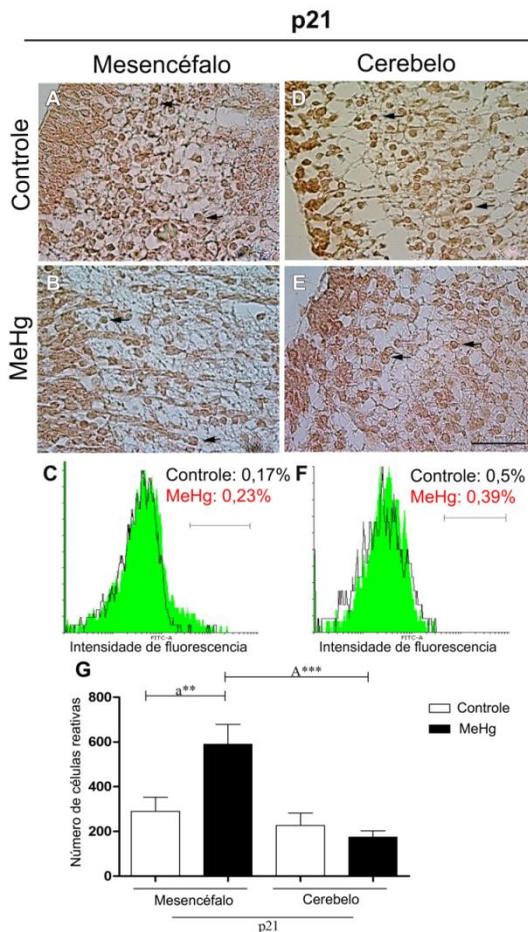
Os resultados obtidos da análise de proteínas envolvidas com o ciclo celular revelaram que o MeHg foi capaz de interferir neste processo biológico, e consequentemente atuar sobre os demais mecanismos celulares necessários para o desenvolvimento do embrião.

Figura 18: Quantificação do conteúdo total da proteína Ciclina E das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões de *G.domesticus*.



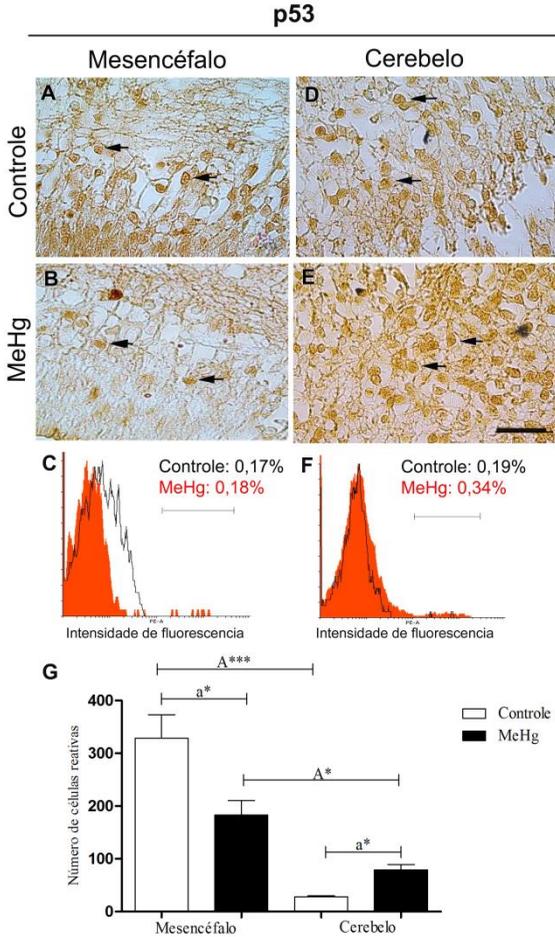
Imunolocalização demonstrada pela reatividade da fluorescência de anti-Ciclina E em microscopia confocal nas células do mesencéfalo (A – D) e cerebelo (F – I). Histogramas de perfil e frequência relativa de células Ciclina E-positivas no mesencéfalo (E) e cerebelo (J). Gráficos de barra representando à média (\pm SEM) do número absoluto de células reativas (K). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. $N = 8$ embriões/grupo obtidos a partir de 4 experimentos independentes. . (**), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 19: Quantificação do conteúdo total da proteína p21 das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões de *G. domesticus*.



Imunolocalização demonstrada pela reação da imuno-histoquímica de Anti-p21 no mesencéfalo (A – B) e cerebelo (D – E). Presença de células neurais p21-positivas (setas). Histogramas de perfil e frequência relativa de células p-21-positivas no mesencéfalo (C) e cerebelo (F). Gráfico de barra representando à média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (G). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$ $N = 8$ embriões/grupo em 4 experimentos independentes. . (**), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 20: Quantificação do conteúdo total da proteína p53 das células do mesencéfalo e cerebelo de embriões de *G.domesticus*.

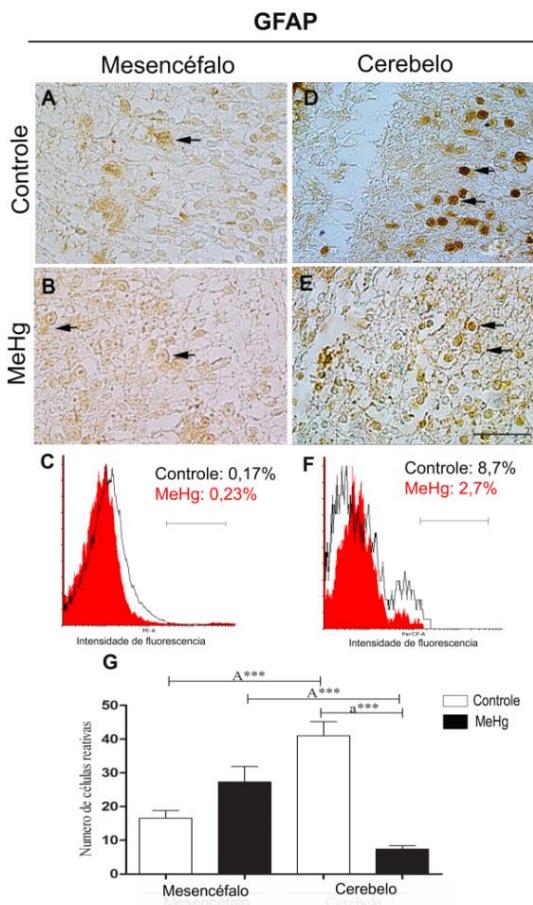


Imunolocalização demonstrada pela reação da imuno-histoquímica de Anti-p53 no mesencéfalo (A – B) e cerebelo (D – E). Presença de células neurais p53-positivas (setas). Histogramas de perfil e frequência relativa de células p53-positivas no mesencéfalo (C) e cerebelo (F). Gráfico de barra representando à média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (G).. Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. $N = 8$ embriões/grupo em 4 experimentos independentes. (*), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

4.9 EFEITOS DO MEHG SOBRE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A expressão da proteína GFAP foi identificada na camada do manto do mesencéfalo e na CGI do cerebelo (Figura 21 A - B e D - E). A reatividade de células GFAP-positivas analisadas foi superior no grupo tratado ($27,67 \pm 4,86$) do que no grupo controle ($16,57 \pm 2,42$) do mesencéfalo, porém sem diferenças significativas. Já para o cerebelo foi observado diminuição significativa do número de células imunorreativas para GFAP entre os grupos controle ($41 \pm 4,14$) e tratado ($7,43 \pm 0,98$) (Figura 21 G).

Figura 21: Quantificação do conteúdo total de proteína GFAP.



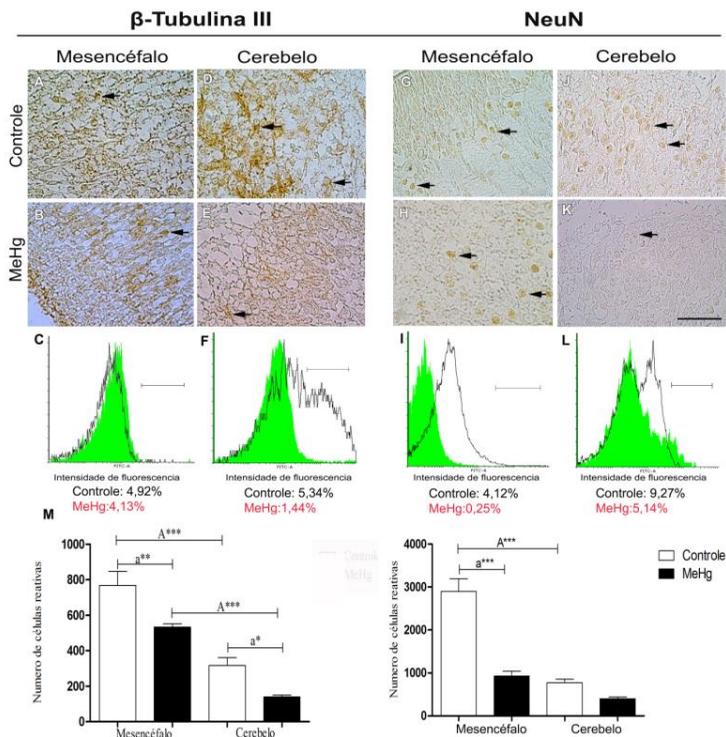
Imunolocalização demonstrada pela reação imuno-histoquímica de Anti-GFAP no mesencéfalo (A – B) e cerebelo (D – E). Presença de células neurais GFAP-positivas (setas). Histogramas de perfil e frequência relativa de células GFAP-positivas no mesencéfalo (C) e cerebelo (F). Gráfico de barras representando à média (\pm SEM) do número absoluto de células reativas (G). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. N = 8 embriões/grupo em 4 experimentos independentes. (*), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

Os anticorpos anti- β -Tubulina III, marcador de neurônio jovem, e anti-NeuN, marcador de neurônio pós-mitótico, relacionados com a diferenciação neuronal, foram utilizados na imunolocalização e na determinação do número de células reativas. Foi observada marcação citoplasmática de células localizadas na camada manto do mesencéfalo e, nas camadas CGE e CGI do cerebelo (Figura 22).

Na análise dos dados obtidos foi verificado que o MeHg reduziu a expressão da proteína β -Tubulina III no mesencéfalo de embriões do grupo tratado ($517,74 \pm 29,28$) em comparação com o grupo controle ($699,87 \pm 103,45$). Por outro lado, não foram verificadas diferenças entre os grupos controle ($298,39 \pm 56,59$) e tratado ($130,17 \pm 14,23$) nas camadas do cerebelo, apesar de ser observada uma tendência para a redução da expressão nas células Tubulina III-positivas.

Ao avaliarmos a expressão da proteína nuclear neuronal NeuN, no mesencéfalo verificou-se redução significativa nas células do grupo tratado ($459,13 \pm 93,27$) com relação do grupo controle ($2883,04 \pm 392,77$). Entretanto, para o cerebelo não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle ($894,35 \pm 99,35$) e o grupo tratado ($358,56 \pm 45,10$), embora seja observada uma tendência na redução da expressão nas células Neu-N-positivas (Figura 22).

Figura 22: Quantificação do conteúdo total da proteína de β -Tubulina III e NeuN.

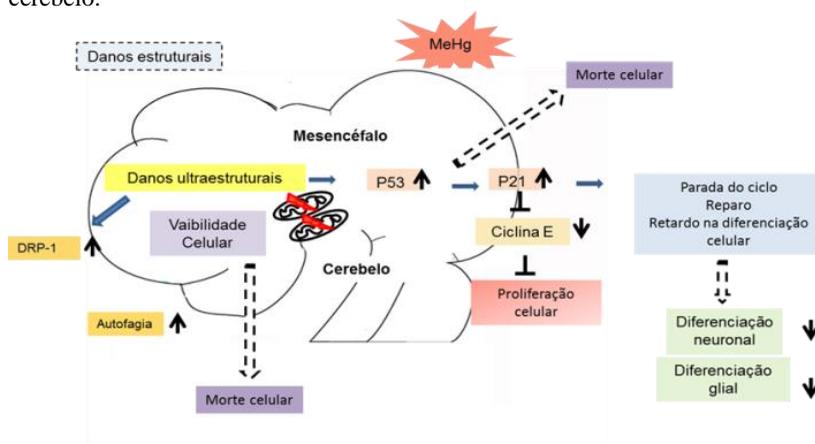


Imunolocalização demonstrada pela reação imuno-histoquímica de Anti- β -Tubulina no mesencéfalo (A – B) e cerebelo (D – E). Imunolocalização da proteína Anti-NeuN no mesencéfalo (G – H) e cerebelo (J – K). Presença de células neurais β -Tubulina III-positivas e NeuN-positivas (setas). Histogramas de perfil e frequência relativa de células β -Tubulina III-positivas no mesencéfalo (C) e cerebelo (F) e anti-NeuN-positivas no mesencéfalo (I) e cerebelo (L). Gráficos de barras representando à média (\pm EPM) do número absoluto de células reativas (M). Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e pos hoc de Tukey, considerando $p < 0,05$. $N = 8$ embriões/grupo em 4 experimentos independentes. (**), (***) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ $p < 0,0001$, respectivamente). Barra de escala: 10 μ m.

Nossos resultados demonstram que o metal atuou mais severamente na ultraestrutura das células cerebelares, reduzindo a viabilidade de suas células e atuando sobre os processos de proliferação e diferenciação celular. No mesencéfalo o MeHg agiu com menor intensidade, caracterizando o cerebello como principal alvo de toxicidade, nesta fase do desenvolvimento.

O resumo gráfico dos resultados (Figura 23), mostra de forma esquemática os efeitos do MeHg sobre os diferentes processos examinados no mesencéfalo e cerebello durante este estudo.

Figura 23: Representação gráfica da ação do MeHg sobre mesencéfalo e cerebello.



Esquema do SNC, destacando o mesencéfalo e o cerebello de embrião de *G. domesticus* em E10 tratados com MeHg.

5. DISCUSSÃO

Com a expansão da atividade industrial no mundo, principalmente dos setores elétrico e eletrônico, os riscos da exposição humana a intoxicação por MeHg tem aumentado consideravelmente. Conhecendo-se que o MeHg é a forma mais tóxica de mercúrio, muitos trabalhos têm investigado os danos causados pela exposição ao MeHg (AZEVEDO et al., 2012; CLARKSON, 1987; FAUSTMAN et al., 2002).

Estudos de neurotoxicidade realizados com embriões de aves (RUTKIEWICZ; BASU, 2013) demonstram a maior susceptibilidade das células do SNC em desenvolvimento. Os tecidos embrionários são muito sensíveis ao MeHg, devido a facilidade de entrada através das células endoteliais por carreadores da família LAT (EK et al., 2012), presentes em grande quantidade no SNC de embriões de vertebrados, além da imaturidade da BHE, provocando danos severos em neonatos (ASCHNER; CLARKSON, 1988; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005).

Como a distribuição do MeHg ocorre através do sistema circulatório, ele é facilmente transportado pelos componentes da BHE, atingindo o tecido nervoso. As ligações do MeHg com os grupamentos SH das proteínas, certos peptídeos e aminoácidos, formam complexos solúveis na água e através de carreadores LAT1 e LAT2 não encontram resistência ao atravessarem as biomembranas, podendo se acumular nos tecidos, em especial no SNC (CLARKSON, 2006).

Em embriões de aves em E10, a BHE está em formação, se tornando funcional a partir de E13 (RONCALI et al., 1986; RIBATTI et al., 2006). Quando funcional, a BHE apresenta células endoteliais com junções *tight* e com poucas vesículas de pinocitose. Em E19, os capilares já se apresentam semelhantes a um indivíduo adulto (RONCALI et al., 1986), e isto pode implicar que em análises de embriotoxicidade os resultados podem ser variáveis, dependendo da idade analisada.

O acúmulo do Hg nas células e na matriz extracelular do mesencéfalo e cerebelo, detectado pelo método de autometalografia, evidencia a vulnerabilidade do SNC em desenvolvimento, ao permitir que certas substâncias químicas possam penetrar e se depositar no tecido, e com isso interferir na dinâmica celular, como descrito por Danscher (1984); Carvalho e colaboradores (2008); Mela e colaboradores (2012); e Ferreira e colaboradores (2015).

A ligação do MeHg com grupo SH do aminoácido cisteína forma um complexo, onde as ligações de valência do átomo de mercúrio com o enxofre constituem uma estrutura química semelhante à do aminoácido metionina, facilmente transportado nas membranas endoteliais da BHE. Como este processo é seletivo, e apenas formas moleculares muito semelhantes podem ser transportadas (ASCHNER; CLARKSON, 1988), a formação do complexo Hg-aminoácido contribuiria para a facilidade de transporte por meio das barreiras cerebrais.

A injeção do MeHg diretamente no saco vitelínico favoreceu a absorção lenta e gradual do vitelo, via corrente sanguínea, distribuindo portanto o MeHg por todo o corpo do embrião. As células endoteliais do SNC, e principalmente do plexo coróide de embriões expressam mais amino transportadores do que nos adultos, contribuindo com maior acúmulo de Hg (CORNFORD; CORNFORD, 1986; EK et al., 2012). Além disso, como descrito, a afinidade com os grupamentos SH são características a serem consideradas em relação à toxicidade do MeHg no SNC em desenvolvimento, podendo explicar a sensibilidade diferencial entre tipos celulares bem como sua relação com a toxicidade do metal (SYVERSEN; KAUR, 2012).

Com relação às concentrações de Hg, foi constatado que o mesencéfalo e cerebelo de embriões tratados apresentaram concentrações superiores aos do grupo controle, demonstrando que o período de uma semana foi suficiente para a captação e acúmulo do metal no SNC, observando-se alterações sutis na ultraestrutura e em algumas funções celulares. Como já discutido, o modo gradual de absorção do vitelo ao longo do desenvolvimento, favoreceu uma distribuição do MeHg por todas as estruturas embrionárias e extraembrionárias, e de acordo com o trabalho conduzido por Greener e Kochen (1983) e Rutkiewicz e Basu (2013). Contudo, a concentração de MeHg em embriões de aves pode declinar durante o desenvolvimento, em função da redução da taxa de absorção associada ao rápido crescimento tecidual e estrutural e talvez isto tenha contribuído com a baixa concentração de Hg por grama de tecido nervoso.

Os embriões não apresentam os sistemas digestório e excretores funcionalmente maduros, deste modo pode-se inferir que por certo período de tempo, o embrião manteve-se sobre a influência do metal, e em quantidades variáveis de Hg, dependendo da constituição dos órgãos e sistemas (RUTKIEWICZ ; BASU, 2013). Contudo, de acordo com nossos resultados e os demonstrados na literatura

(BALLATORI; CLARKSON, 1982; NIELSEN; ANDERSEN, 1991 a, b; STRINGARI et al., 2008), consideramos que a distribuição do MeHg e sua eliminação pode depender da idade embrionária, assim como da espécie, da via de administração e da dose, apresentando uma diversidade de fatores que possam interferir sobre a concentração do Hg encontrada nos tecidos. Isto pode constituir um gerador de dificuldades em padronizar uma concentração que possa ser tolerável pelo modelo experimental, sobretudo quando se trata de embriões.

Ao avaliarmos o peso médio corporal dos embriões em E10, observou-se que os embriões tratados com MeHg apresentaram menor peso corporal quando comparado aos embriões controle, caracterizando os efeitos deletérios do MeHg sobre o ganho de massa corporal. Estudos realizados com embriões de galinhas domésticas, patos e faisão, demonstraram perdas de 15% do peso corporal (HEINZ et al., 2006). Neste mesmo contexto, o tratamento com MeHg em ratos machos durante o período embrionário, revelaram diminuição do peso durante a vida pós-natal (WAKABAYASHY et al., 1995).

Não foram observadas diminuição da massa encefálica, assim como do mesencéfalo e cerebelo, ou seja, o MeHg não afetou a estrutura ou organização celular de forma a reduzir a estrutura nervosa neste período embrionário e com esta dose. Estudos de Stringari e colaboradores (2008); Rutkiewicz e Basu (2013) demonstraram que doses baixas ou subletais e local de tratamento, *in ovo* podem ser determinantes no modo de ação do metal sobre o tecido embrionário, o que pode contribuir com nossos achados.

Os estudos acima relatados mostram que o MeHg pode comprometer a massa dos embriões e com isso seu peso. A perda de peso de animais expostos ao MeHg vem sendo utilizado como um parâmetro de comparação dos índices de toxicidade e vulnerabilidade da espécie, induzidos pela intoxicação por este metal, podendo estar diretamente relacionada com a redução de reserva energética e de massa muscular (CORREA et al., 2004).

5.1 OS EFEITOS DO MEHG SOBRE A ORGANIZAÇÃO CELULAR E ULTRAESTRUTURA

No presente estudo como discutido acima, não foram observados redução da massa ou danos estruturais na organização do mesencéfalo e cerebelo. Sakamoto e colaboradores (2004) também não observaram alterações estruturais no SNC de neonatos de ratos após tratamento com doses baixas ou subletais crônicas, revelando, no

entanto, déficits comportamentais, porém sem alterações histopatológicas, implicando apenas em efeitos sutis. Alguns trabalhos, entretanto, relataram a presença de alterações neuropatológicas, associadas a certas áreas encefálicas, como a área cortical pré e pós-central, os hemisférios cerebrais e cerebelo, mostrando redução estrutural em humanos (FAUSTMAN et al., 2002) e degenerações das células de Purkinje e das células da granulosa no cerebelo, além de morte celular em várias áreas do encéfalo de aves (BERTOSSI et al., 2004; DOMOWICZ et al., 2011), em doses subcrônica e crônica.

Estudos *in vivo* e *in vitro* documentados por Kunimoto, 1994; Kunimoto; Suzuki, 1997; Nagashima, 1997; Sakamoto et al., 2002, enfatizam que a capacidade migratória das células pode ser retardada ou dificultada pelo MeHg, em especial no cerebelo de neonatos e ratos adultos, sem modificar a estrutura do SNC. Portanto, o grau de neurotoxicidade do MeHg depende da dose a qual o indivíduo foi exposto, assim como do tempo de exposição (HEWETT; ATCHISON, 1991).

O efeito neurotóxico do MeHg pode ser explicado pelos danos causados na membrana plasmática, através das ligações com proteínas de membrana e inibição de algumas enzimas citosólicas (TOIMELA; TAHTI, 2004). Desta forma o Hg intracelular pode induzir a apoptose, e isto pode ser um fator importante na patofisiologia de muitas alterações neurodegenerativas.

O cerebelo é a principal estrutura nervosa alvo da toxicidade do Hg, avaliado por estudos clínicos, epidemiológicos e celulares (ATSDR, 1999, MANCINI et al., 2009; PATEL et al., 2013). No presente estudo verificou-se que a redução da densidade celular no cerebelo, achados corroboraram estes estudos (BERTOSSI et al., 2004; MANCINI et al., 2009).

No cerebelo, a camada granular externa (CGE) está relacionada com intensa proliferação celular (BUTTS et al., 2014). Desta forma, sugerimos que esta pode ter sido a característica influenciada pelos efeitos nocivos do MeHg ao interferir no ciclo celular, tanto sobre as proteínas reguladoras do ciclo celular, como na mitose, inibindo ou retardando os processos de proliferação.

Os resultados também mostraram alterações em organelas membranosas como mitocôndrias e retículo endoplasmático, no mesencéfalo e principalmente no cerebelo. As alterações morfológicas podem ter alterado a homeostase do Ca^{++} e provocado estresse oxidativo, colocando a célula em risco. O cerebelo, portanto, foi a

estrutura onde houve mais mudanças estruturais. De acordo com Syversen e Kaur (2012), essa estrutura foi considerada como sítio de mudanças patológicas, em estudos de indução de neurotoxicidade em modelos *in vivo* e *in vitro* (COSTA et al., 2007).

A neurotoxicidade do MeHg parece ser mediada por alvos decorrentes do estresse oxidativo, pela alteração do Ca^{++} intracelular e homeostase de glutamato (ASCHNER et al., 2007; SANTOS et al., 2016,). Estudos de Franco e colaboradores (2007); Carvalho et al., (2008) e Ferreira et al., (2015) e os dados aqui apresentados sugerem que o MeHg induz a toxicidade no mesencéfalo e cerebelo, por comprometer a estrutura e o funcionamento de organelas, principalmente as mitocôndrias.

Foi observado diminuição da viabilidade celular no mesencéfalo e cerebelo dos embriões E10. Estes achados podem estar relacionados aos danos mitocondriais observados, em ambas as estruturas nervosas, com destaque para o cerebelo. Em estudos realizados em cultura celular e *in vivo* (FRANCO et al., 2007; FRANCO et al., 2009; GLASER et al., 2010) foram observados resultados semelhantes quanto as alterações mitocondriais no córtex cerebral de camundongos expostos ao MeHg. A exposição ao MeHg pode também resultar em depósitos do metal nas membranas, seguida de alterações ultraestruturais (MORI et al., 2007).

Ao analisar a ultraestrutura do mesencéfalo e cerebelo percebe-se que as alterações foram comuns para ambas às estruturas, acometendo núcleo e principalmente o sistema de endomembranas. No entanto a severidade dos danos foi mais perceptível nas células do cerebelo, evidenciando-se ainda, o aparecimento de lisossomas, que podem estar relacionadas com autofagia. As alterações ultraestruturais nas células do mesencéfalo e cerebelo, como o aparecimento de vesículas, distensões nas membranas de organelas como RER, rupturas e edemas nas membranas interna e externa de mitocôndrias, correspondem a alterações relacionadas com mudanças no padrão estrutural do envelope nuclear. Essas alterações podem ser caracterizadas como o reflexo da afinidade química do MeHg por grupos tióis, presente nas membranas, e danos resultantes da produção de EROs, comprometendo o compartimento mitocondrial e alterando, alterando todo o ambiente celular (MORI et al., 2007; GLASER et al., 2010).

Foram observadas dilatações do sistema de endomembranas, principalmente no envelope nuclear. Tais alterações podem ter ocorrido em função de desequilíbrio hídrico, provocado pela ação do

MeHg sobre a estrutura de membrana. A concentração do metal nas membranas, de acordo com Yoshino e colaboradores (1966), ocorre devido a afinidade bioquímica da membrana com o MeHg e Cassano e colaboradores (1969) observaram grânulos eletrôn-densos de Hg no envelope nuclear e em outros sistemas de endomembranas em neonatos de ratos, justificando a afinidade do MeHg a membrana e talvez esta afinidade bioquímica tenha contribuído com alguma mudança na estrutura molecular, provocando alterações ultraestruturais.

Considerando as análises ultraestruturais, neste estudo, o cerebelo pode ser caracterizado como principal alvo de toxicidade, sendo os danos mitocondriais, provavelmente responsáveis pela cascata de alterações na célula. Muitos metais, incluindo o Hg agem diretamente sobre enzimas como ATPases de membrana por combinação via grupamentos sulfidríla. Assim, as células de tecidos alvo podem apresentar diminuição da capacidade energética, como um interruptor na síntese de proteínas. Tais funções estruturais e enzimáticas podem inevitavelmente se tornadas inativadas pelos metais (LAWSON et al., 1995).

A especificidade morfológica do MeHg sobre as células do cerebelo foi analisada em trabalhos realizados com roedores adultos e neonatos, cuja toxicidade do MeHg tem como alvo as células granulares (FONNUM; LOCK, 2000, GLASER et al., 2010, MOKRZAN et al., 1995), justificada pela facilidade de entrada do MeHg através das células endoteliais da BHE como descreveu Clarkson (2006).

Sugerimos com isso, que a proximidade anatômica do cerebelo em desenvolvimento, com o plexo coróide, no 4º ventrículo cerebral pode ter contribuído com a entrada do metal no interior das suas camadas e células, uma vez que neste período o plexo coróide esta desprovido de qualquer tipo de modificação estrutural dado pela BHE, provocando os danos celulares observados.

Durante o desenvolvimento, a organização do SNC ocorre por meio dos processos celulares de proliferação, diferenciação e migração ao longo do eixo ântero-posterior do embrião. Com isso, na idade embrionária estudada, pode-se observar que o cerebelo apresenta uma organização citoarquitetônica mais tardia, quando comparada ao mesencéfalo e com isso o ambiente celular e os eventos neurogênicos podem ter sido mais comprometidos pela ação do MeHg, como descrito por Schoenwolf (1991), uma vez que os eventos da neurogênese ocorrem ao longo do eixo ântero-posterior, durante a

organização do SNC e a disposição espacial das estruturas nervosas estudadas apresentam maturidade celular diferente.

Assim, no desenvolvimento do SNC, a localização espacial das estruturas nervosas podem caracterizar-se críticas sobre a ação de determinados agentes, como os metais. Na célula as mitocôndrias foram alvo da ação do MeHg, em especial a estrutura membranosa (FOWLER; WOODS, 1977, GOYER; KRALL, 1969;). E, atualmente, vários estudos abordam a mitocôndria como principal alvo da toxicidade do MeHg no SNC, com a observação de alterações ultraestruturais e bioquímicas destas organelas em astrócitos e neurônios, levando a uma série de alterações morfofuncionais com efeitos mais amplos no SNC (CLARKSON, 2002, CASTOLDI et al., 2007, FRANCO et al., 2009).

Variações nos perfis mitocondriais podem refletir estados extremos, caracterizando uma população homogênea de mitocôndrias e por outro lado, mudanças estruturais que possam caracterizar danos mitocondriais, através de uma rede de mitocôndrias fusionadas ou a de um arranjo fragmentado (PALMER et al., 2011). Estes eventos são controlados por proteínas reguladoras envolvidas em eventos da fusão (Mfn-1) e fissão (Drp-1), na manutenção da distribuição mitocondrial. O equilíbrio destes eventos afeta o DNA mitocondrial, a manutenção do metabolismo celular, a transmissão de energia na célula e a homeostase do cálcio intracelular (PALMER et al., 2011).

Como o número de mitocôndrias com danos foi representativo no mesencéfalo e principalmente no cerebelo, com a prevalência de mitocôndrias fragmentadas espalhadas no citosol, pode-se propor que a intoxicação por MeHg pode ter induzido a fissão mitocondrial no cerebelo, caracterizando-a como organela alvo principal de toxicidade. Os efeitos do tratamento com MeHg sobre o perfil mitocondrial representa uma novidade importante neste trabalho. Embora alguns estudos mostrem que o MeHg é tóxico para a mitocôndria (GLASER et al., 2010, MORI et al., 2007), este é o primeiro estudo a apresentar o número de alterações morfológicas do perfil mitocondrial após a exposição ao metal. Este resultado está de acordo com resultados obtidos de estudos de indução do estresse oxidativo e com déficit energético, sendo observado em modelos experimentais, tratados com MeHg (FARINA, 2011, GLASER et al., 2014) e parece também estar relacionado com a dinâmica mitocondrial no ambiente celular.

A fissão mitocondrial é um importante processo de remoção de mitocôndrias envelhecidas e danificadas, direcionando-as ao processo de autofagia, denominado como mitofagia (KIM et al., 2007). O

aumento de fissão pode gerar uma população heterogênea de organelas com distribuição não uniformes do DNA mitocondrial, com geração aumentada de ERO, conseqüentemente mais susceptíveis a apoptose (PARONE et al., 2008).

A relação entre as alterações na ultraestrutura mitocondrial, podem ter relação direta com a intoxicação pelo metal, devido a deposição do MeHg, que ocorreu principalmente nas membranas mitocondriais. O desequilíbrio interno pode levar a alterações da cadeia respiratória levando a produção excessiva de ERO, e finalmente a fissão mitocondrial.

A desestabilização da homeostase mitocondrial, controlada principalmente pelo Ca^{++} pode estar relacionada também com mudanças na morfologia mitocondrial, como propôs Cereghetti e colaboradores (2008), causando aumento da expressão da Drp-1 e sua associação com a membrana mitocondrial.

A toxicidade do MeHg esta intimamente relacionada com alterações morfológicas mitocondriais, e desta forma as mitocôndrias que estiverem despolarizadas poderiam estimular a autofagia. Paralelamente a isto foram verificadas na ultraestrutura a presença de lisossomas e grande quantidade de vesículas citoplasmáticas, principalmente no cerebelo. Com estes resultados pode-se sugerir que a neurotoxicidade do MeHg no cerebelo é mais severa, atingindo principalmente as funções mitocondriais. Glaser e colaboradores (2014) observaram que alterações nas organelas seriam geradoras de ERO, e permaneceriam na célula neural. Caso estas mitocôndrias não conseguissem recuperar este potencial, elas não seriam reincorporadas à malha mitocondrial e poderiam induzir a autofagia.

As características que indicaram autofagia no cerebelo, associadas ao aumento da fissão mitocondrial, nos leva a relacionar que a remoção de partes de mitocôndrias danificadas da rede mitocondrial, sugerem autopreservação celular, evitando assim a apoptose, conforme descreveram Twig e colaboradores (2008). Este processo, como referenciado anteriormente, é controlado pelas proteínas PINK1 e parkina. A PINK1 acumula-se na membrana mitocondrial externa das mitocôndrias que não conseguem recuperar seu potencial de membrana após a fissão desta, a partir da malha mitocondrial (LAZAROU et al., 2012).

5.2 O MEHG INTERFERE NO CICLO CELULAR

O SNC em desenvolvimento apresenta plasticidade celular e isto pode ser caracterizada como uma forma de defesa embrionária a

partir da estruturação de um tecido muito dinâmico. Assim, enfatizamos que a neurotoxicidade induzida pelo MeHg pode provocar alterações no ciclo celular, porém estas são independentes de danos ao DNA, como também constatou Kim e colaboradores (2007) em experimentos em cultura de células.

No mesencéfalo a proliferação celular foi reduzida, enquanto que no cerebelo, não foram observadas alterações significativas. O MeHg interferiu nas divisões celulares, principalmente nas camadas onde estas são mais intensas (camada ependimária do mesencéfalo e CGE do cerebelo). Ao longo do desenvolvimento, a capacidade proliferativa do mesencéfalo se inicia a partir de E4 (DOMOWICZ et al., 2012, NARAYANAN; NARAYANAN, 1978), enquanto que no cerebelo tal função ocorre mais tardiamente, a partir de E8 (KORDES et al., 2005, LUCKNER et al., 2011). Vale ressaltar que em E10 a diferenciação e migração são os processos celulares mais significativos, e por esta razão podem evidenciar insultos mais característicos sobre tais processos celulares (KIM et al., 2007).

Os efeitos do MeHg podem ser distintos sobre a proliferação celular nas várias estruturas do SNC (BOSE et al., 2010). Pode-se, portanto, de acordo com os resultados já apresentados, relacionar características estruturais e celulares como densidade celular, a expressão da ciclina E e de PHH3 para ambas as estruturas do SNC e constatar que o cerebelo se apresentou como alvo da toxicidade do MeHg. Embora existam muitas variáveis que possam influenciar a toxicidade do MeHg, e com isso, interferir nos processos celulares alvo, essa especificidade não está relacionada apenas com o bloqueio ou interferência de vias de sinalização, mas principalmente pelo aspecto da temporalidade dado pela formação das estruturas do SNC ao longo do desenvolvimento embrionário.

Estudos mostram que as células do cerebelo tanto *in vivo* como *in vitro* são alvos da toxicidade do Hg, e como consequência, apresentam redução da proliferação e no número total de células, inclusive com diminuição da estrutura nervosa (BURKE et al., 2006, GOLDOWITZ; HAMRE, 1998; LEWANDOVISKY et al., 2003), em ratos e camundongos, com idades e modos de administração diferentes aos realizados no presente trabalho.

O MeHg parece induzir a parada da mitose na metáfase. Sinais extracelulares podem interferir na divisão celular, alterando a fase de transição G1/S do ciclo celular, alterando neurogênese, incluindo a inibição da proliferação celular e provocando distúrbios na progressão

do ciclo celular das células neurais (BURKE et al., 2006; FALLUEL-MOREL et al., 2007; SOKOLOWSKI et al., 2011).

A proliferação e migração celular são necessariamente co-regulados para assegurar o desenvolvimento adequado da espécie e qualquer perturbação do ciclo celular poderia explicar os efeitos tóxicos, potenciais do MeHg sobre o desenvolvimento do SNC (OU et al., 1999). Ao se identificar danos sutis, presumivelmente associados às baixas doses MeHg, pode-se também relacionar moléculas sensíveis ao MeHg envolvidas no ciclo ou na migração celular (OU et al., 1999)

O MeHg interferiu no ciclo celular, reduzindo de modo significativo a expressão da ciclina E, tanto nas células do mesencéfalo como do cerebelo. Estes resultados corroboram estudos que utilizaram baixas doses do MeHg como os de Xu e colaboradores (2010), que indicaram que a baixa concentração de MeHg provocou redução no número de células entrando na fase S do ciclo celular, com a degradação da ciclina E. Em condições favoráveis, o complexo ciclina E / CDK-2 promove a transição G1/S do ciclo celular, facilitando a proliferação (FUJIMURA; USUKI, 2015).

O processo de proliferação com a progressão do ciclo celular tem sido bastante estudado *in vivo* e *in vitro* (LEWANDOWSKI et al., 2002) e mostram que a exposição aguda ao MeHg impede a transição da fase G1 / S, reduzindo a expressão da ciclina E (FALLUEL-MOREL et al., 2007). Baixas concentrações de MeHg suprimem a proliferação neuronal, sem contudo afetar a sobrevivência neuronal. O MeHg parece atuar sobre a ciclina E, sem comprometer as CDKs, sugerindo então que a ciclina E é o alvo da toxicidade do MeHg. Estudos *in vitro* confirmam os resultados de que a toxicidade do MeHg é seletiva sobre alvos moleculares na célula, provocando a parada do ciclo com diminuição da expressão de ciclina E (BURKE et al., 2006; XU et al., 2010).

O MeHg compromete a progressão normal do ciclo celular durante o desenvolvimento (PONCE et al., 1994). A exposição a baixas doses de MeHg tem implicado no aumento da expressão da p21, e a sua expressão observada no mesencéfalo no presente estudo, é consistente com os efeitos descritos anteriormente

A toxicidade do MeHg está relacionada com insultos aos reguladores do ciclo celular, destacando-se as proteínas p21 e p53. A proteína p21 foi significativamente expressa nas células da camada do manto do mesencéfalo de embriões tratado com MeHg e com isto, a inibição das quinases dependentes de ciclinas, havendo um retardo ou

paralização do ciclo celular. Com a expressão da p21, portanto, há inibição da atividade da ciclina CDK2, CDK1 e CDK4/6, funcionando como um regulador da progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S, parando a divisão celular (OU et al., 1999) e com isso, promovendo a parada do crescimento, inclusive podendo mediar a senescência celular.

A p53 foi mais expressa nas células do cerebelo de embriões tratados com MeHg. Desta forma, podemos constatar que o MeHg pode agir de maneira diferenciada sobre as proteínas reguladoras do ciclo celular nas estruturas estudadas, provocando respostas celulares também distintas. A p21 aumentada no mesencéfalo proporcionou a parada do ciclo, provocando uma redução significativa da expressão de ciclina nas células, sugerindo que este processo ocorreu de modo independente da p53, uma vez que esta foi pouco expressa nesta estrutura.

A p21 foi pouco expressa nas células cerebelares, verificamos também diminuição da expressão das ciclina E, e aumento significativo da p53, sugerindo que há *dowregulation* da degradação da ciclina E. Este processo parece ocorrer via ubiquitina ligase Fbw7 (BISTEAU et al., 2014, CHENG; LI, 2012) e este gene alvo pode ser ativado em função do estresse ou sinal extracelular. O cerebelo pode ter respondido a toxicidade do MeHg, com aumento da p53, retirando a célula do ciclo e levando a senescência, como descreveu Faustman (2002), uma vez que não foram observadas alterações no aumento de células diferenciadas.

A proteína p21 parece ser dependente de p53 para a parada do ciclo celular, embora ambas possam agir de forma independente uma da outra. A p21 pode ser ativada após estresse oxidativo (BURKE et al., 2006), assim como a p53. A p21 é também um substrato para mediar a ubiquitina/proteossomo, e sugere-se que o MeHg interfira na degradação proteica, devido a presença do grupamento tiol na estrutura da proteína.

A p53 e p21 apresentam funções importantes na transição G1/S, e podem estar envolvidas também no controle da transição G2/M, ou seja, o aumento de p53 não só pode estacionar as células em G1 como também em G2/M (GRIBBLE et al., 2005), sugerindo que por interferência do MeHg, o ciclo pode estar comprometido em dois pontos de controle, retardando a progressão do ciclo celular e por conseguinte na diferenciação celular.

Na camada endodimária do mesencéfalo de embriões tratados foi verificado aumento da morte celular, enquanto que no cerebelo foi

observada apenas uma tendência ao aumento da morte celular. De acordo com estudos sobre a intoxicação por MeHg, principalmente com roedores (FALLUEL-MOREL et al., 2007, FERRARO et al., 2009) e em cultura celular (XU et al., 2010), o MeHg provocou aumento da morte celular. A apoptose deve seguir mecanismos específicos e qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de alterações celulares e teciduais.

O desenvolvimento estrutural e funcional do SNC requer um equilíbrio entre os processos de proliferação, diferenciação e morte celular e a regulação destes processos depende da interação entre múltiplos fatores de origens endógenas e exógenas (KANDEL, 2000). Esses fatores podem exibir efeitos região-específica em várias porções do SNC, dependendo do estágio de desenvolvimento e da vulnerabilidade das células ou estrutura nervosa (FALLUEL-MOREL et al., 2007).

5.3 OS EFEITOS DO MEHG NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células do mesencéfalo e do cerebelo respondem de modo distinto aos danos provocada pelo MeHg. Foi observado no mesencéfalo de embriões tratados com MeHg, aumento na expressão da proteína GFAP, enquanto que no cerebelo houve redução da expressão desta proteína com relação aos grupos controle. O aumento de células GFAP-positivas está relacionado com a maturação ser mais precoce ao longo do eixo ântero-posterior e o fator de defesa, a qual pode estar associada com a perda de células neuronais durante a organização das camadas mesencefálicas. A gliose reativa inicial pode estar relacionada a esta maior expressão de GFAP (KARIMI-ABDOLREZAAEE; BILLAKANTI, 2012).

No cerebelo a redução pode estar relacionada também com a desestabilização do citoesqueleto da população astrogliar no período analisado, caracterizada pelas ligações do MeHg-SH, contribuindo com esta alteração (CASTOLDI et al., 2001, FERRARO et al., 2009).

Os efeitos tóxicos do MeHg sobre a diferenciação celular da linhagem neuronal, foram mais expressivas no mesencéfalo do que no cerebelo, apresentando reduções significativas no número de células β -Tubulina III e NeuN-positivas. A toxicidade do MeHg geralmente interfere nas características morfológicas, e por consequência na diferenciação celular. Os neurônios são diferenciados precocemente (E2) ao longo do desenvolvimento do SNC de aves (DOMOWICZ et

al., 2011), e isto, relacionando-se com o desenvolvimento ântero-posterior, justificando o efeito danoso do MeHg sobre a diferenciação da linhagem neuronal.

A toxicidade espacial pode ser analisada ao se tratar de duas estruturas nervosas distintas e em períodos de maturação diferentes, cujas respostas celulares podem ser expressas também de modo diferente (BURKE et al., 2006, FALLUEL-MOREL et al., 2007, FAUSTMAN et al., 2002, GUO et al., 2013, SOKOLOWSKI et al., 2011).

Os astrócitos são os principais sítios de acúmulo de MeHg (ASCHNER, 1996) e os neurônios são os mais susceptíveis a sua toxicidade ao longo do desenvolvimento do SNC (BURKE et al., 2006, FALLUEL-MOREL et al., 2007). Com relação às alterações histopatológicas foram observadas reduções significativas do número de neurônios, descritas por Ferraro e colaboradores (2009) e Guo e colaboradores (2013).

Conforme citado anteriormente, a redução na expressão β -Tubulina III e NeuN no mesencéfalo e no cerebelo estão relacionados com as alterações das proteínas reguladoras do ciclo celular provocadas pelo MeHg, retardando a diferenciação dos neuroblastos. Carvalho e colaboradores (2008) e He e colaboradores (2012), demonstraram a perda de células neuronais em recém-nascidos de *G. domesticus* e camundongos, além de danos motores e comportamentais.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho corroboraram com estudos sobre a toxicidade induzida por MeHg e sua relação com a organização do SNC. A organização espacial do SNC pode apresentar ritmos distintos dos processos celulares envolvidos com a estruturação das populações celulares no mesencéfalo e cerebelo, tendo-se obtidas as seguintes conclusões:

- O MeHg penetrou nas camadas do mesencéfalo e cerebelo através do sistema circulatório e se depositou nas células e matriz extracelular;

- Houve deposição de Hg no mesencéfalo e cerebelo, a qual causou alterações ultraestruturais, afetando os processos celulares de proliferação e diferenciação da linhagem neural;

- O tratamento com MeHg não provocou alterações estruturais do mesencéfalo e cerebelo, porém reduziu o peso médio dos embriões em E10;

- Os danos ultraestruturais observados foram mais evidentes no cerebelo, principalmente sobre as mitocôndrias, relacionados com as alterações na dinâmica mitocondrial e a indicação de autofagia;

- As alterações observadas foram acompanhadas com modificações na regulação proteica do ciclo celular, como redução de ciclina E e aumento da p21 no mesencéfalo e no cerebelo houve aumento da p53;

- O MeHg afetou a diferenciação neural, reduzindo a expressão de β -tubulina III, NeuN e GFAP, no mesencéfalo e cerebelo;

- As análises das estruturas nervosas permitiram verificar o estabelecimento do eixo ântero-posterior, e com isso avaliar a toxicodinâmica do MeHg no SNC em desenvolvimento, observando-se respostas das populações celulares de modo distinto;

- A neurotoxicidade do MeHg é dependente do período do desenvolvimento de cada estrutura do SNC, e esta características deve ser ponderada diante de todas as variáveis desta forma de intoxicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAR, S., SUR, E. The development of chicken cerebellar cortex and the determination of AgNOR activity of the Purkinje cell nuclei. *Belg. J. Zool.*, 140 (2): 216-224, 2010.

ALTMAN, J., BAYER, S.A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301, 365–381, 1990.

AMIN-ZAKI, I., ELHASSANI, S., MAJEED, M.A., CLARKSON, T.W., DOHERTY, R.A., GREENWOOD, M. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics New York.* 54, 587–595, 1974.

AMOS, H.M., JACOB, D.J., STREETS, D.G., SUNDERLAND, E.M. Legacy impacts of all-time anthropogenic emissions on the global mercury cycle. *Global Biogeochem. Cycles.* 27 (2), 410–421, 2013. doi.org/10.1002/gbc.20040

ANTHONY, T.E., KLEIN, C., FISHELL, G. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron.* 41, 881–890, 2004.

ASCHNER, M. Methylmercury in astrocytes - what possible significance? *Neurotoxicology.* 17 (1), 93–106, 1996

ASCHNER, M., CLARKSON, T.W. Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. *Brain Research.* 462, 31-39 31, 1988.

ASCHNER, M., EBERLE, N., GODERIE, S., KIMELBERG, H.K.. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. *Brain Research.* 521, 221-228, 1990.

ASCHNER, M., SYVERSEN, T., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B., FARINA, M., 2007. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz.J. Med. Biol. Res.* 40, 285–291, 2007.

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

ASTDR. Toxicological profile for mercury. US. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, 1999. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>

ATCHINSON, W. D., HARE, M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *The FASEB Journal*. 8, 622-628, 1994.

AZEVEDO, B. F., FURIERI L. B., PEÇANHA, F. M., WIGGERS, G. A., VASSALLO, P. F., SIMÕES, M.R., FIORIM, J., DE BATISTA, P. R., FIORESI, M., ROSSONI, L., STEFANON, I., ALONSO, M. J., SALAICES, M., VASSALLO, D. V. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 949048, 1-11, 2012.
doi:10.1155/2012/949048

BAKIR, F., DAMLUJI, S.F., AMIN-ZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWI, N.Y., TIKRITI, S., DHAHIR, H.I., CLARKSON, T.W., SMITH, J.C., 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 181, 230–24, 1973.

BALLATORI, N., CLARKSON, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science*. 216, 61–63, 1982

BARBONI, M.T.S., COSTA, M.F., MOURA, A.L.A., FEITOSA-SANTANA, C., GUALTIERI, M., LAGO, M., MEDRADO-FARIA, M.A., SILVEIRA, L.C.L., VENTURA, D.F. Visual field losses in workers exposed to mercury vapor. *Environmental Research* 107, 124–131, 2008.

BASU, N., SCHEUHAMMER, A.M., ROUVINEN-WATT, K., GROCHOWINA, N., KLENAVIC, K., EVANS, R.D., CHAN, H.M.. Methylmercury impairs components of the cholinergic system in captive mink (*Mustela vison*). *Toxicol. Sci*. 91, 202–209, 2006.

BASU, N., SCHEUHAMMER, A.M., ROUVINEN-WATT, K., GROCHOWINA, N., EVANS, R.D., O'BRIEN, M., CHAN, H.M. Decreased N-methyl-Daspartic acid (NMDA) receptor levels are associated with mercury exposure in wild and captive mink. *Neurotoxicology*. 28, 593–597, 2007.

BAATRUP, E., DANSCHER, G. Cytochemical demonstration of mercury deposits in trout liver and kidney following methylmercury intoxication. Differentiation of two mercury pools by selenium. *Ecotox. Environ. Saf*. 14, 129-141, 1987.

BERTOSSI, F., GIROLAMO, M., ERREDE, D., VIRGINTINO, G., ELIA, L., AMBROSI, L. Effects of Methylmercury on the Microvasculature of the Developing Brain. *Neurotoxicology*. 25, 849–857, 2004.

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

BITENCOURT, P.E.R., ABDALLA, F.H., KARINE S., DE BONA, K.S., MORETTO, M.B. Acute exposition of developing rats to Methylmercury: a mini-review. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina. 34 (2), 137-148, 2013.

BISSONETTE, G.B., ROESCH, M. R. Review Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes, Brain and Behavior*. 15, 62-73, 2016

BISTEAU, X., CALDEZ, M.J., KALDIS, P. The Complex Relationship Between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. *Cancers*. 6, 79-111, 2014. doi:10.3390/cancers6010079.

BJÖRNBERG, K.A., VAHTERA, M., GRAWE, K.P., BERGLUND, M. Methyl mercury exposure in Swedish women with high fish consumption. *Sci. Total Environ*. 341, 45-52, 2005.

BONDY SC, MCKEE M. Disruption of the potential across the synaptosomal plasma membrane and mitochondria by neurotoxic agents. *Toxicol Lett.*;58:13-21, 1991.

BOSE, R., ONISHCHENKO, N., EDOFF, K., LANG, A.M.J., CECCATELLI, S. Inherited Effects of Low-Dose Exposure to Methylmercury in Neural Stem Cells. *Toxicological Sciences*. 130 (2), 383-390, 2012. doi:10.1093/toxsci/kfs257.

BRAUNE, B.M, OUTRIDGE, P.M., FISK, A.T., MUIR, D.C.G., HELM, P.A., HOBBS, K., HOEKSTRA, P.F., KUZYK, Z.A., KWAN, M., LETCHER, R.J., LOCKHART, W.L., NORSTROM, R.J., STERN, G.A., STIRLING, IPersistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic. An overview of spatial and temporal trends. *Sci. Total Environ*. 56 (4), 351-352, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.034>.

BRAUNE, B.M., SCHEUHAMMER, A.M., CRUMP, D., JONES, S., PORTER, E., BOND, D. Toxicity of methylmercury injected into eggs of thick-billed murres and arctic terns. *Ecotoxicology*. 21, 2143-2152, 2012.

DOI 10.1007/s10646-012-0967-3

Burbacher, T.M., Rodier, P.M., Weiss, B. Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicol. Teratol*. 12, 191-202, 1990.

BURKE, K., CHENG, Y., LI, B., PETROV, A., JOSHI, P., BERMAN, R., REUHL, K.R., DICICCO-BLOOM, E. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. *Neurotoxicology*. 27 (6), 970–981,2006.

BUTTS, T., GREEN, M.J., WINGATE, R.J.T. Development of the cerebellum: simple steps to make a ‘little brain. *Development*. 141, 4031-4041, 2014. doi: 10.1242/dev.106559

CAMPBELL, L.M., NORSTROM, R.J., HOBSON, K.A., MUIR, D.C.G., BACKUS, S., FISK, A.T. Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay). *Sci. Total. Environ.* 351, 352: 247–263, 2005.

CAMPOS, F.F.C., PAIVA, D., MOREIRA P., Barbosa, H.H., PEREZ, R., TERRA, C., ARECO, L.F.F.,FIGUEIREDO, F. A. F. Técnicas histopatológicas semiquantitativas e de análise de imagens digitais na avaliação do estadiamento de pacientes portadores de hepatite crônica pelos vírus B e C. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ, ANO11*, 2012.

CAREY, R.G., LI, B., DICICCO-BLOOM, E. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide anti-mitogenic signaling in cerebral cortical progenitors is regulated by p57Kip2-dependent CDK2 activity. *J. Neurosci.* 22 (5), 1583–91, 2002.

CARVALHO, M.S.L. Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*, com ênfase na Morfologia e organização das células Microgliciais do telencéfalo. *Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.*

CARVALHO, M.C., NAZARI, E.M., FARINA, M., MULLER, Y.M.R. Behavioral, Morphological, and Biochemical Changes after In Ovo Exposure to Methylmercury in Chicks. *Toxicological Sciences*. 106 (1), 180–185, 2008. <http://dx.doi:10.1093/toxsci/kfn158>

Cassano, G.B., Viola, P.I., Ghett B., Amaducc I. The distribution of inhaled mercury vapors in brain of rats and mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26, 308-320, 1969.

CASTOLDI, A.F., COCCINI, T., CECCATELLI, S., MANZO, L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury .*Brain Res Bull.* 15; 55 (2):197-203, 2001.

CAZZALINI, O., SCOVASSI, A.I., SAVIO, M., STIVALA, L.A., PROSPERI, E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat. Res.* 704 (1–3), 12–20, 2010. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009

CECCATELLI, S., DARE, E., MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 188, 301–308, 2010.

CEREGHETTI, G.M., STANGHERLIN, A., MARTINS DE BRITO, O., CHANG, C.R., BLACKSTONE, C., BERNARDI, P., SCORRANO, L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *PNAS.* 105, 15803-15808, 2008.

CHANG, L.W. Neurotoxic effects of mercury - a review. *Environ. Res.* 14, 329–373, 1977.

CHANG, J.W., PAI, M.C., CHEN, H.L., GUO, H.R., SU, H.J., LEE, C.C., 2008. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. *Environmental Research.* 108, 334-339, 2008.

CHANGANDHENRIK, L.W., HARTMANN, A. Electron Microscopic Histochemical Study on the localization and Distribution of Mercury in the Nervous System after Mercury Intoxication. *Experimental Neurology.* 35, 122-137, 1972.

CHEN, Y., LIU, Y., DORN, G.W. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation Research.* 109 (12), 1327-1331, 2011.

CHENG, Y., LI, G. Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression *Cancer. Metastasis Rev.* 31, 75–87, 2012. doi: 10.1007/s10555-011-9330-z

CHENG, J., ZHAO, W., WANG, Q., LIU, X., WANG, W. Accumulation of mercury, selenium and PCBs in domestic duck brain, liver and egg from a contaminated area with an investigation of their redox responses. *Environmental toxicology and pharmacology.* 35, 388–394, 2013.

CHIZHIKOV, V.V., MILLEN, K.J. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Developmental Biology.* 277, 287–295, 2005.

CHOI, B.H. The effects of methylmercury on the developing brain. *Progress in Neurobiology.* 32 (6), 447–470, 1989.

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

CLARKSON, T., MAGOS, L., MYERS, G.J. The Toxicology of Mercury - Current Exposures and Clinical Manifestations. *N. Engl. J. Med.* 349, 18, 2003.

CLARKSON, T. The toxicology of mercury and Its chemical compounds - Critical Reviews. *Toxicology*. 36, 8, 2006.

COHEN, B. Pharmacologic effects on mitochondrial function. *Developmental disabilities research reviews*. 16: 189 – 199, 2010.

COLAS, J.F.; SCHOENWOLF, G.C. Towards a Cellular and Molecular Understanding of Neurulation. *Developmental Dynamics*. 221:117–145, 2001.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso: 05/10/2016.

CORREA, M.; ROIG-NAVARRO, A. F.; ARAGON C. M. G. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sciences*. 74 (16): 2009-2021, 2004.

CORNFORD, E.M., BRAUN, L.D., OLDENDORF, W.H. Developmental modulations of blood–brain barrier permeability as an indicator of changing nutritional requirements in the brain. *Pediatr. Res*. 16, 324–8, 1982.

CORNFORD, E.M., CORNFORD M.E. Nutrient transport and the blood–brain barrier in developing animals. *Fed. Proc*. 45, 2065–72, 1986.

COSTA, A.T. Geoquímica das águas e dos sedimentos da bacia do Rio Gualaxo do Norte, Leste-Sudeste do quadrilátero ferrífero (MG): Estudo de uma área afetada por atividades de extração mineral. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Evolução Crostal e Recursos Naturais. Universidade Federal de Ouro Preto, 2001.

COSTA, L.G., FATTORI, V., GIORDANO, G., VITALONE, A. An in vitro approach to assess the toxicity of certain food contaminants: methylmercury and polychlorinated biphenyls. *Toxicology*. 237, 65–76, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M.E., CORVELO, T.C., DO NASCIMENTO, J.L. 2005. Mercurio y neurotoxicidad. *Ver. Neurol*. 40 (7), 441-447, 2005.

CUNNINGHAM, J.J., ROUSSEL, M.F. Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ*. 12, 387–96, 2001

DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry*, 71, 1, 1-16, 1981.

DARÉ, E., LI, W., ZHIVOTOVSKY, B., YUAN, X., CECCATELLI, S. Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 30 (12), 1347–1356, 2001.

DESMOND, M.E., LEVITAN, M.L., 2002. Brain Expansion in the Chick Embryo Initiated by Experimentally Produced Occlusion of the Spinal Neurocoel. *The Anatomical Record*. 268, 147–159.

DICICCO-BLOOM, E., SONDELL, M. Neural development and neurogenesis. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 8, 33-49, 2005.

DOMOWICZ, M.S., HENRY, J.G., WADLINGTON, N., NAVARRO, A., KRAIG, R.P., SCHWARTZ, N.B. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain Research*. 1389, 35-49, 2011.

DANSCHER, G. Autometallography: A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry*. 81, 331-335, 1984.

DANSCHER, G., MÖLLER-MADSEN, B. Silver amplification of mercury sulphide and selenide. A histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue. *J. Histochem. Cytochem*. 33, 219-228, 1985.

DESMOND, J.E., GABRIELI, J.D., WAGNER, A.D., GINIDER, B.L., GLOVER, G.H. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J. Neurosci*. 17, 9675-85, 1997.

DOMOWICZ, M.S.; HENRY, J.G., WADLINGTON, N., NAVARRO, N., KRAIG, R.P., SCHWARTZ, N.B. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain Research*. 1389, 35-49, 2011.

DO NASCIMENTO, J.L., OLIVEIRA, K.R. CRESPO-LOPEZ, M.E. MACCHI, B.M., MAUÉS, L.A., PINHEIRO, M.D.A.C., SILVEIRA, L.C., HERCULANO, A.M., Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian Journal Medical Research*, 128 (4), 373-82, 2008.

DREIEM, A., GERTZ, C.C., SEEGAL, R.F. The Effects of Methylmercury on Mitochondrial Function and Reactive Oxygen Species Formation in Rat Striatal Synaptosomes Are Age-Dependent. *Toxicological Sciences*. 87(1), 156–162, 2005. doi:10.1093/toxsci/kfi224.

DUELLI, R., ENERSON, B. E., GERHART, D. Z. AND DREWES, L. R. Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1557–1562, 2000.

DUTTO, I., TILLHON, M., CAZZALINI, O., STIVALA, L.A. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch. Toxicol.* 89, 155–178, 2015. doi: 10.1007/s00204-014-1430-4

EK, C.J., KATARZYNA, M., DZIEGIELEWSKA, M., HABGOOD, D., SAUNDERS, N.R. Barriers in the developing brain and neurotoxicology. *NeuroToxicology.* 33, 586–604, 2012.

EKINO, S., NINOMIYA, T., IMAMURA, K., SUSU, A.M. Methylmercury causes diffuse damage to the somatosensory cortex: how to diagnose Minamata disease. *Seishin Shinkeigaku Zasshi.* 109 (5), 420-437, 2007.

EPA-452/R-97-007; Mercury study report to congress: health effects of mercury and mercury compounds, United States, 1997.

ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., BURNS, N.A. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 1, 529-539, 2001.

ETO, K., MARUMOTO, M., TAKEYA, M. The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). *Neuropathology.* 30, 471–479, 2010. doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01119.x

FAIR, P.H., BALTHROP, J.E., BRADDON-GALLOWAY, S. The toxicity, distribution and elimination of methylmercury in mice following intracerebral injection. *Neurotoxicology.* 8, 281–289, 1987.

FALLUEL-MOREL, A., SOKOLOWSKI, K., SISTI, H.M., ZHOU, X., SHORS, T.J., Diccico-Bloom, E. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. *J. Neurochem.* 103, 1968–1981, 2007.

FARINA, M., ROCHA, J.B.T., ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci.* 10 (15-16), 555–563, 2011. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.019.

FARINA, M., AVILA, D.S., ROCHA, J.B.T., ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International.* 62 (5), 575 - 594, 2013.

FARKAS, L.M., HUTTNER, W., 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Current Opinion in Cell Biology*. 20, 707–715.

FAUSTMAN, E.M., PONCE, R.A., YING, C., OU, M., MENDOZA, A. C., LEWANDOWSKI, T., KAVANAGH, T. Investigations of Methylmercury-Induced Alterations in Neurogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 110, 5, 2002.

FENG, X., LI, P., QIU, G., WANG, S., LI, G., SHANG, L., MENG, B., JIANG, H., BAI, W., LI, Z., FU, X. Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou province, China. *Environ Sci Technol*. 1;42(1):326-32, 2008.

FERRARO, L., TOMASINI, M.C., TANGANELLI, S., MAZZA, R., COLUCCIA, A., CARRATU, M.R., GAETANI, S., CUOMO, V., ANTONELLI, T. 2009. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. *J. Devl. Neuroscience*. 27, 165–174, 2009.

FERREIRA, F.F. Toxicidade do metimercúrio (MeHg) sobre a organização das camadas da medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus*. Florianópolis, SC (tese). 2015.

FERREIRA, F.F., AMMAR, D., BOURCKHARDT, G., KOBUS-BIANCHINI, K., MULLER, M.R., NAZARI, E. MeHg Developing Exposure Causes DNA Double-Strand Breaks and Elicits Cell Cycle Arrest in Spinal Cord Cells. *Journal of Toxicology*. 9- 10, 2015.

FONNUM, F., LOCK, E.A., 2000. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicology Letters*. 112–113: 9–16.

FONSECA, E. T., SILVA, F.M.O., ALCÂNTARA, D., CARDOSO, R. C., FRANCIOLLI, A. L., SARMENTO, A. P., FRATINI, P., FERREIRA, A. J.P., MIGLINO, A. Embryonic Development of Chicken (*Gallus Gallus Domesticus*) From 1st to 19th Day - Ectodermal Structures. *Microscopy research and technique*. 76 (12), 1217-25, 2013.

FOWLLER, B. A., WOODS, J. Ultrastructural and Biochemical Changes in Renal Mitochondria during Chronic Oral Methyl Mercury Exposure: The Relationship to Renal Function. *Experimental and Molecular*. 27, 403-410, 1977.

FRANCO, J.L., BRAGA HDE, C., NUNES, A.K., RIBAS, C.M., STRINGARI, J., SILVA, A.P., GARCIA POMBLUM, S.C., MORO, A.M., BOHRER, D., SANTOS, A.R., DAFRE, A.L.,

FARINA M. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 360–367, 2007.

FRANCO, J.L., POSSER, T., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W., MATTOS, J.J., MARTINS, R., BAINY, A.C., MARQUES, M.R., DAFRE, A.L., FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 449–457, 2009.

FRANCO, J.L., POSSER, T., MISSAU, F., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., SOUZA, D.O., ASCHNER, M., ROCHA, J.B.T., DAFRE, A.L., FARINA, M. Structure–activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 272–278, 2010.

FUJIMURA, M., CHEN, G.B., WENCH J., ZHAO, W. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. *Brain Reseach.* 1464, 1-7, 2012.

FUJIMURA, M., USUKI, F. Low concentrations of methylmercury inhibit neural progenitor cell proliferation associated with up-regulation of glycogen synthase kinase β and subsequent degradation of cyclin E in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 288, 19–25, 2015.

GAO, J.H., PARSUN, L.M., BOWER, J.M., XIONG, J., LI, J., FOX, P.T. Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science.* 272, 545-547, 1996.

GILBERT, S. F. *Developmental Biology.* 9. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 711, 2010.

GLASER, V., NAZARI, E.M., MULLER, Y.M.R., FEKSAC, L., WANNMACHERD, C.M.D., ROCHA, J.B.T., DE BEM, A.F., FARINA, M., LATINI, A. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int. J. Devl Neuroscience.* 28, 631–637, 2010.

GOLDBERG, S. 1974. Studies on the mechanisms of development of the visual pathways in the chick embryo. *Dev. Biol.* 36, 24-43, 1974.

GOLDMAN, L.R., SHANNON, M.W. American academy of pediatrics: committee on environmental health technical report: mercury in environment: implications for pediatricians. *Pediatrics.* 108, 197–205, 2001.

GOLDOWITZ, D., HAMRE, K. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* 21, 375–382, 1998.

GÖTZ, M., HUTTNER, W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (10), 777-88, 2005.

GOYER, R.A.; IALL, R. Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead-intoxicated rats. *J. Cell BioZ.* 41, 393-400, 2011.

GRANDJEAN, P., HERZ, K.T. Brain development and methylmercury: underestimation of neurotoxicity. *Mt. Sinai. J. Med.* 78 (1), 107–118, 2011. doi:10.1002/msj.20228.

GRANDJEAN, P., WEIHE, P., WHITE, R.F., DEBES, F., ARAKI, S., YOKOYAMA, K., MURATA, K., SORENSEN, N., DAHL, R., JORGENSEN, P.J., Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 417–28, 1997.

GRANDJEAN, P., SATOH, H., MURATA, K., ETO, K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environmental Health Perspectives.* 118 (8), 1137–1145, 2010.

GREENER, Y., KOCHEN, J. Methylmercury Toxicity in the Chick Embryo. *Teratology.* 28, 23-28, 1983.

GRIBBLE, E.J., HONG, S.W., FAUSTMAN, E.M. The magnitude of methylmercury-induced cytotoxicity and cell cycle arrest is p53-dependent. *A Clin Mol Teratol.* 73, 29–38, 2005.

GUO, B.Q., YAN, C.H., CAI, S.Z., YUAN, X.B., SHEN, X.M. Low level prenatal exposure to methylmercury disrupts neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. *Toxicology.* 304, 57–68, 2013.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics.* 195, 231-272, 1992.

HARADA, M. Congenital Minimaya disiese: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology.* 18: 285 - 288, 1978.

HATTEN, M.E., HEINTZ, N., 1985. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 385–408.

HE, X., IMANISHI, S., SONE, H., NAGANO, R., QIN, X.Y., YOSHINAGA, J., AKANUMA, H., YAMANE, J., FUJIBUCHI, W., OHSAKO, S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicology Letters.* 212, 1– 10, 2012.

HEINZ, G. H., HOFFMAN, D. J., KONDRAD, S. L. Factors Affecting the Toxicity of Methylmercury Injected into Eggs. *Arch.*

Environ. Contam. Toxicol. 50, 264–279, 2006. DOI: 10.1007/s00244-005-1002-y.

HEINZ, G., HOFFMAN, D.J., KLIMSTRA, J.D., STEBBINS, K.R., KONDRAD, S., ERWIN, C.A. 2009. Species Differences in the Sensitivity of Avian Embryos to Methylmercury. Arch Environ Contam Toxicol. 56:129–138.

DOI 10.1007/s00244-008-9160-3

HERRUP, K., YANG, Y., 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? Neuroscience. 8, 368 – 378.

HEWETT, S.L., ATCHINSON, W.D. Effects of charge and lipophilicity on mercurial-induced reduction of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated nerve terminals of the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 113 (2), 267-73, 1992.

HILL, M.A. Embryology Book - The Early Embryology of the Chick 13, 2016 Recuperado: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Book_-_The_Early_Embryology_of_the_Chick_13.

HOWARD J.D, MOTTET N.K. Effects of methylmercury on the morphogenesis of the rat cerebellum. Teratology 34:89–95, 1986.

HUGHES, W.L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. Ann N Y Acad Sci 65:454-460, 1957.

HUETTNER, A.F. Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates. Macmillan Company, Canadá, 1969.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Laudo Técnico Preliminar Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Novembro, 1-38, 2015.

ITO, M. 2000. Mechanisms of motor learning in the cerebellum. Brain Research. 886, 237–245, 2000.

JANSEN, S., JERNELOV, A. Biological Methylation of mercury in aquatic organism. Nature. 22, 189-192, 1969..

JAISHANKAR, M., TSETEN, T., ANBALAGAN, N., . MATHEW, B.B., BEEREGOWDA, K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip Toxicol. 7(2): 60–72, 2014. doi: 10.2478/intox-2014-0009.

JEZEK P, HLAVATA L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. Int J Biochem Cell Biol. 37:2478–503, 2005.

JOHANSSON, C., CASTOLDI, A.F., ONISHCHENKO, N., MANZO, L., VAHTER, M., CECCATELLI, S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox. Res.* 11, 241–260, 2007.

KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., SU, M., YONEOKA, Y., SAKAMOTO, M., IKUTA, F., TAKAHASHI, H. Intrauterine methylmercury intoxication: Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. *Brain Res.* 877, 322–30, 2000a.

KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., SU, M., SAKAMOTO, M., IKUTA, F., TAKAHASHI, H. Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury. *Brain Res.* 859, 233–9, 2000b

KANDEL, E., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. *Principles of Neural Science.* Elsevier, New York. 2000.

KARAGAS, M.R., CHOI, A.L., OKEN, E., HORVAT, M., SCHOENY, R., KAMAI, E., COWELL, W., GRANDJEAN, P., KORRICK, S. Evidence on the Human Health Effects of Low-Level Methylmercury Exposure. *Environmental Health Perspectives.* 120, 6, 2012

KARIMI-ABDOLREZAEI, S., BILLAKANTI, R. Reactive Astrogliosis after Spinal Cord Injury—Beneficial and Detrimental Effects. *Mol. Neurobiol.* 46, 251–264, 2012. DOI 10.1007/s12035-012-8287-4

KEHRIG, H.A., FERNADES, K.W.G., MALM, O., SEIXAS, T.G., DI BENEDITTO, A.P.M., SOUZA DE C.M.M., Transferência trófica de mercúrio e selênio na costa norte do Rio de Janeiro. *Quim. Nova.* 32 (7), 1822-1828, 2009.

KIM, Y.J., KIM, Y.S., KIM, M.S., RYU, J.C. The inhibitory mechanism of methylmercury on differentiation of human neuroblastoma cells. *Toxicology.* 234, 1–9, 2007.

KINOSHITA, M.; ITO, E. Roles of periventricular neurons in the optic tectum. *Progress in Neurobiology.* 79, 112–121, 2006

KORBAS, M., MACDONALD, T.C., PICKERING, I.J., GEORGE, G.N., KRONE, P.H., Chemical form matters: differential accumulation of mercury following inorganic and organic mercury exposures in zebrafish larvae. *ACS Chemical Biology.* 7, 411- 420, 2011.

KORDES, U., CHENG, Y.C., SCOTTING, P.J. Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages

of glial cells in developing chick and mouse. *Developmental Brain Research*. 157, 209–213, 2005.

KUNIMOTO, M.. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 310–7, 1994

KUNIMOTO, M., SUZUKI, T. Migration of granule neurons in cerebellar organotypic cultures is impaired by methylmercury. *Neurosci. Lett.* 226, 183–6, 1997.

KURLAND, L.T., FARO, S.N., SIEDLER, H. Minamata disease. The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurol.* 1, 370–9, 1960.

LAZAROU, M., JIN, S.M., KANE, L.A., AND YOULE, R.J. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell.* 22, 320-333, 2012.

LAWSON, S.L., JONES, M.B., MOATE, R.M. Effect of Copper on the Ultrastructure of the Gill Epithelium of *Carcinus mae* (Decapoda: Brachyura). *Marine Pollution Bulletin.* 31, 63-72, 1995.

LEFAUCONNIER, J.M, TROUVE, R. Developmental changes in the pattern of amino acid transport at the blood–brain barrier in rats. *Brain Res.* 282, 175–82, 1983.

LETO, K., ARANCILLO, M., BECKER, E.B.E., BUFFO, A., CHIANG, C., DING, B., DOBYNS, W.B., DUSART, I., HALDIPUR, P., HATTEN, M.E., HOSHINO, M., JOYNER, A. L., KANO, M., KILPATRICK, N., MARINO, S., MARTINEZ, S., MILLEN, K.J., MILNER, T.O., MIYATA, T., PARMIGIANI, E., SCILLING, K., SEKERKOVÁ, G., SILLITOE, R.V., SOTELO, C., UESAKA, N., WEFERS, A., WINGATE, R.J., HAWKES, R. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum.* 2015. doi: 10.1007/s12311-015-0724-2

LEWANDOWSKI, T.A., PONCE, R.A., CHARLESTON, J.S., HONG, S., FAUSTMAN, E.M. Effect of Methylmercury on Midbrain Cell Proliferation during Organogenesis: Potential Cross-Species Differences and Implications for Risk Assessment. *Toxicological Sciences.* 75, 124–133. 2003. doi: 10.1093/toxsci/kgf151.

LIU, A., JOYNER, A. L. Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu Rev Neurosci.* 24:869-96, 2001.

LOWERY, L.A., SIVE, H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of Development*. 121, 1189–1197, 2004.

LUCKNER, R., OBST-PERNBERG, K., HIRANO, S., SUZUKI, S.T., REDIES, C. Granule cell raphes in developing mouse cerebellum. *Cell Tissue Res*. 303, 159-172, 2011.

MAHAFFEY, K.R., SUNDERLAND, E.M., CHAN, H.M., CHOI, A.L., GRANDJEAN, P., MARIEN, K., OKEN, E., SAKAMOTO, M., SCHOENY, R., WEIHE, P., YAN, C.H., YASUTAKE, A. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutrition Reviews*. 69, 493–508, 2011.

MACDONALD, R.W., BARRIE, L.A., BIDLAMANB, T.F., DIAMOND, M.L., GREGORD, D.J., SEMKINE, R.G., STRACHANE, W.M.J., LIB, Y.F., WANIAF, F., ALAEEEE, M., ALEXEEVAG, L.B., BACKUSE, S.M., BEWERSI, J.M., GOBEILJ, C., HALSALLB, C.J., HARNERB, T., HOFFB, J.T., JANTUNENB, L.M.M., LOCKHARTK, W.L., MACKAYL, D., MUIRE, D.C.G., PUDYKIEWICZB, J., REIMERM, K.J., SMITHI, J.N., STERNK, G.A., SCHROEDERB, MANCINI, J. D., AUTIO, D.M., ATCHISON, W.D. Continuous exposure to low concentrations of methylmercury impairs cerebellar granule cell migration in organotypic slice culture. *NeuroToxicology* 30, 203–208, 2009.

MAGOS, L., BROWN, A.W., SPARROW, S., BAILEY, E., SNOWDEN, R.T., SKIPP, W.R. The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. *Arch. Toxicol.* 5, (57), 260–7, 1985.

MANCINI, J.D., AUTIO, D.M., ATCHINSON, W.D. 2009. Continuous exposure to low concentrations of methylmercury impairs cerebellar granule cell migration in organotypic slice culture. *NeuroToxicology*. 30, 203–208, 2009.

MANFROI, C.B., SCHWALM, F.D., CERESER, V., ABREU, F., OLIVEIRA, A., BIZARRO, L., ROCHA, J.B., FRIZZO, M.E., SOUZA, D.O., FARINA, M. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol. Sci.* 81, 172–178, 2004.

MARTY, M.S., ATCHISON, W.D. Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 319–330, 1997.

MECHA, M., PENA-MELIAN, A.L., BLANCO, M.J. Microarchitectural changes during development of the cerebellar cortex. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 691- 698, 2010

MELA, M., GRÖTZER, S.R., LEGEAY, A., MESMER-DUDONS, N., VENTURA, D.F., DE OLIVEIRA, C.A. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. *NeuroToxicology*. 33, 407–415, 2012.

MELA, M., NETO, F.F., GRÖTZNER, S.R., RABITTO, I.S., VENTURA, F., DE OLIVEIRA, C.A. Localization of inorganic and organic mercury in the liver and kidney of *Cyprinus carpio* by autometallography. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 7 (2), 73-78, 2012. doi: 0.5132/jbse.2012.02.011

MEYER, J.N., LEUNG, M.C.K., ROONEY, J.P., SENDOEL, A., HENGARTNER, O.M., KISBY, G.E., BESS, A.S. Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants. *Toxicological sciences*. 134 (1), 1–17, 2013.

MICARIONI, R.C.C.M., BUENO, M.I.M.S., JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, 23 (4), 487-495, 2000.

MIURA K, SUZUKI K, IMURA N. Effects of methylmercury on Mitotic mouse glioma cells. *Environ res* 17:453–471, 1978.

MOODY, S.A. Cell lineage and fate determination. London: Academic Press. 1999.

MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. *Embriologia Clínica*. 8ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 887p., 2008.

MOKRZAN, E.M., KERPER, L.E., BALLATORI, N., CLARKSON, T.W. Ethylmercury-thiol uptake into cultured brain capillary endothelial cells on amino acid system. *L. J. Pharmacol. Exp. Therap.* 272, 2177–2184, 1995.

MOREST, D.K., SILVER, J. Precursors of Neurons, Neuroglia, and Ependymal Cells in the CNS: What Are They? Where Are They From? How Do They Get Where They Are Going? *Glia*. 43, 6 –18, 2003.

MORI, N., YASUTAKE, A., HIRAYAMA, K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch Toxicol* 81, 769–776, 2007. doi:10.1007/s00204-007-0209-2

MORIYAMA, H., HANNAGA, K. The Minamata Convention on Mercury A First Step toward Protecting Future Generations. *Environmental Health Perspectives*. 121, 10, 2013.

MURATA, K., DAKEISHI, M., SHIMADA, M., SATOH, H. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child

development: messages from the newborn. *Journal of Experimental Medicine*. 213 (3), 187-202, 2007.

MURPHY, M.P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1777, 1028–1031, 2008.

MYERS, G.J., DAVIDSON, P.W., COX, C., SHAMLAYE, C.F., PALUMBO, D., CERNICHIARI, E., SLOANE-REEVES, J., WILDING, G.E., KOST, J., HUANG, L.S., CLARKSON, T.W. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet*. 361, 1686–1692, 2003.

NADARAJAH, B., PARNAVELAS, J.G. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *nature reviews. Neuroscience*. 3, 423- 432, 2002.

NAGASHIMA, K.A. Review of experimental methylmercury toxicity in rats: Neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol*. 25, 624–31, 1997.

NARAYANAN, C.H., NARAYANAN, Y. Determination of the embryonic origin of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in birds. *Embryol. Exp. Morph*. 43, 85-105, 1978.

NIELSEN, J.B., ANDERSEN, O. Methyl mercuric chloride toxicokinetics in mice: I. Effects of strain, sex, route of administration and dose. *Pharmacol. Toxicol*. 68, 201–207, 1991a

NIELSEN, J.B., ANDERSEN, O. Methyl mercuric chloride toxicokinetics in mice: II. Sexual differences in whole-body retention and deposition in blood, hair, skin, muscles and fat. *Pharmacol. Toxicol*. 68, 208–211, 1991b.

NINOMIYA, T., OHOMORI, H., HASHIMOTO, K., TSURUTA, K., EKINO, S., 1995. Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: an epidemiological study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. *Environ Res*. 70, 47–50, 1995.

NITSAN, Z., BEN-AVRAHAM, G., ZOREF, Z., NIR, I. Growth and development of digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *British Poultry Science*. 32, 515-523, 1991.

NOELLE, P., SELIN, E., SUNDERLAND, E.M., KNIGHTES, M., CHRISTOPHER, D., MASON R. P. Sources of Mercury Exposure for U.S. Seafood Consumers: Implications. *Environmental Health Perspectives*. 118, 1, 2010.

OU, Y.C. THOMPSON, S.A., PONCE, R.A., SCHROEDER, J., KAVANAGH, T.J., FAUSTMAN, E.M. Induction of the Cell

Cycle Regulatory Gene p21 (Waf1, Cip1) Following Methylmercury. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157, 203–212, 1999.

PADHI, B.K., PELLETIER, G., WILLIAMS, A., BERNDT-WEIS, L.C., YAUK, W.J., BOWERS, I. 2008. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicology Letters*. 176, 93–103.

PALMER, C.S., OSELLAME, L.D., STOJANOVSKI, D., RYAN, M.T. 2011. The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular Signaling*. 23, 1534–1545.

PANCHISION, D.M., MCKAY, R.D.G. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (4), 478–487, 2002.

PARONE, P.A., DA CRUZ, S., TONDERA, D., MATTENBERG, Y., JAMES, D., MAECHLER, P., BARJA, F., MARTINOU, J. Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA. *PLOS ONE*. 3 (9), 3257, 2008.

PARKER, A.L., KAVALLARIS, M., MCCARROLL, J.A. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol*. 18 (4), 153, 2014.doi: 10.3389/fonc.2014.00153.

PATEL, E., REYNOLDS, M. Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*. 222, 265–272, 2013

PINHEIRO, M.C.N, NASCIMENTO, J.L.M., SILVEIRA, L.C.L., ROCHA, J.B.T., ASCHNER, M. 2009. Mercury and selenium—a review on aspects related to the health of human populations in the Amazon. *Environmental Bioindicators*, 4 (3), 222–245, 2009.

POLUNAS, M., HALLADAY, A., TJALKENS, R.B., PHILBERT, M.A., LOWNDES, H., REUHL, K. Role of oxidative stress and the mitochondrial permeability transition in methylmercury cytotoxicity. *NeuroToxicology*, 32, 526–534, 2011.

RADIC, P. Elusive radial glial cells: Historical and evolutionary perspective. *Glia*. 43, 19–32, 2003

RIBATTI, D., NICO, B., CRIVELLATO, E., ARTICO, M. Development of the Blood-Brain Barrier: A Historical Point of View. *The anatomical record (part b: New Anat.)*. 289b, 3–8, 2006.

RIVERO, L. B. D.; SCHATZ, J. C.; CARVALHO, M. S. L.; CARVALHO, M.C.; MÜLLER, Y. M. R. Ação do Acetato de

chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 1: 83 - 87, 2006.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S., KIM, I., LEMASTERS, J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462, 245–253, 2007.

RONCALI, L., NICO, B., RIBATTI, D., BERTOSI, M., MANCINI, L. Microscopical and ultrastructural investigations on the development of the blood-brain barrier in the chick embryo optic tectum. *Acta Neuropathol*. 70, 193–201, 1986.

RUSSO, T., ZAMBRANO, N., ESPOSITO, F., AMMENDOLA, R., CIMINO, F., FISCELLA, M., JACKMAN, J., O'CONNOR, P. M., ANDERSON, C. W., AND APPELLA, E.A. p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 270, 29386–29391, 1995.

RUTKIEWICZ, J., BASU, N. Methylmercury egg injections: Part1-Tissue distribution of mercury in the avian embryo and hatchling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 93: 68–76, 2013.

RUTKIEWICZ, J., BRADLEY, M., MITTAL, K., BASU, N. Methylmercury egg injections: Part2-Pathology, neurochemistry, and behavior in the avian embryo and hatchling. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 93 (1), 77-86, 2013.

SAKAMOTO, M., NAKANO, A., KAJIWARA, Y., NARUSE, I., FUJISAKI, T. Effects of methylmercury in postnatal developing rats. *Environmental Research*. 61 (1), 43-50, 1993.

SAKAMOTO, M., KAKITA, A., OLIVEIRA, R. B., PAND, H. S., TAKAHASHI, H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Developmental Brain Research*. 152, 171–176, 2004.

SAKAMOTO, M., KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., TAKAHASHI, H., NAKANO, A., AKAGI, H. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res*. 949: 51–9, 2002.

SAKAMOTO, M., YASUTAK, E., KAKITA, A., RYUFUKU, M., CHAN, H.M., YAMAMOTO, M., OUMI, S., KOBAYASHI, S., WATANABE, E.C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environmental Science & Technology*. 47 (6), 2862-2868, 2013.

SANTOS, A.A., HORT, M.A., CULBRETHA, M., LÓPEZ-GRANERO, C., FARINA, M., ROCHA, J.B.T., ASCHNER, M. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *J Trace Elem Med Biol*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.001>.

SARAFIAN, T. A. Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 61, 648–657, 1993.

SCHATZ, J.C. Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHEUHAMMER, A.M., BASU, N., BURGESS, N.M., ELLIOTT, J.E., CAMPBELL, G.D., WAYLAND, M., CHAMPOUX, L., RODRIGUE, J. Relationships among mercury, selenium, and neurochemical parameters in common loons (*Gavia immer*) and bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Ecotoxicology*. 17, 93–100, 2008.

SCHEUHAMMER, A.M., MEYER, M., SANDHEINRICH, M. B., MURRAY, M. W. Effects of Environmental Methylmercury on the Health of Wild Birds, Mammals, and Fish. *Ambio*, 36, 12-18, 2007.

SCHOENWOLF, G.C.; ALVAREZ, I.S. Specification of neurepithelium and surface epithelium in avian transplantation chimeras. *Development* 112, 713-722, 1991.

SCHOENWOLF, G.C., DELONGO, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *Am J Anat.*158(1):43-63, 1980.

SCHOENWOLF, G.C.; DESMOND, M.E. 1984. Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *J Exp Zool.* 230 (3):405-7.

SCHOENWOLF, G.C; FRANKS, M.V. Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Developmental Biology.* 105, 2, 257-272, 1984.

SCICOLONE, S., PEREYRA, A., BRUSCO, A., SAAVEDRA, J.P., FLORES, S. Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 13 (8), 845-858, 1995.

SEPÚLVEDA, R., HIDALGO-SÁNCHEZ, M., MATA, A.M. A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *Journal of Neurochemistry.* 95, 673–683, 2005.

SHANKER, G., SYVERSEN T., ASCHNER J.L., ASCHNER, M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res. Mol.* 137, 11–22, 2005.

SILVEIRA, L.C.L., VENTURA, D.F., PINHEIRO, M.C.N. Toxicidade mercurial: avaliação do sistema visual em indivíduos expostos a níveis tóxicos de mercúrio. *Ciência e Cultura.* 56 (1), 36–38, 2004.

SIMMONS-WILLIS, A.S., CLARKSON, T.W., BALLATORI, N. 2002. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury–L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J.* 367, 239–246, 2002.

SMIRNOVA, E., GRIPARIC, L., SHURLAND, D.L., BLIEK, A.M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell.* 12 (8), 2245–56, 2001.

SOKOLOWSKI, K., FALLUEL-MOREL, A., ZHOU, X., DICICCO-BLOOM, E. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. *Neurotoxicology.* 32, 535–544, 2011.

SOKOLOVA, I.M., RINGWOOD A.H., JOHNSON, C. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology.* 74, 218–228, 2005.

SOUZA, J.S., BATISTA, G., BERNSTEIN, A. Mercúrio na Amazônia: a bomba relógio bioquímica. *Química, Visto dia 07/06/2016.* <http://www.educacaopublica.rj.gov.br/biblioteca/quimica/0019.html>

SPALDING, M.G., FREERICK, P.C., MCGILL, H.C., BOUTON, S.N., RICHEY, L.J., SCHUMACHER, I.M., BLACKMORE, C.G.M., HARRISON, J. Histologic, neurologic, and immunologic effects of methylmercury in captive great egrets. *Journal of Wildlife Diseases.* 36 (3), 423–435, 2000.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31–43, 1969

STOLENBERG, M., DANSCHER, G. Histochemical differentiation of autometallographic traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *Histochem. J.* 32, 645–652, 2000.

STRINGARI, J., NUNES, A.K.C., FRANCO, J.L., BOHRER, D., GARCIA, S.C., ALCIR L., DAFRE, A.L., MILATOVIC, D., SOUZA, D.O, JOÃO B.T., ASCHNER, M., FARINA, M. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 227, 147–154, 2008.

SYVERSEN, T., KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 26, 215–226, 2012.

TAKAHASHI, T., NOWAKOWSKI, R.S., CAVINESS, V.S. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci*. 15, 6046–57, 1995.

TAKAMATSU, T., FUJITA, S. Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Chicken Embryo. *Develop. Growth and Differ.*, 29, 5, 497-502, 1987.

TARUN, K., JASON, Y., CHANG, L. Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: Attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2. *Journal of Neuroimmunology*. 17, 17–28, 2006.

TCHOUNWOU, P.B., AYENSU, W.K., NINASHVILI, N.D.S. Environmental Exposure to Mercury and Its Toxicopathologic Implications for Public Health. *Environ. Toxicol.* 18 (3), 149-75, 2003.

TETSUROU, T., FUGJITA, S. 1987. Growth of notochord and formation of cranial and mesencephalic flexures in chicken embryo. *Develop. Growth and Differ.* 29 (5), 497-502.

TOIMELA, T., TAHTI, H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch. Toxicol.* 78, 565–574, 2004.

TUFAN, C. AKDOGAN, I., ADIGUZEL, E. Shell-less culture of the chick embryo as a model system in the study of developmental neurobiology. *Neuroanatomy*. 3, 8–11, 2004.

TWIG, G., ELORZA, A., MOLINA, A.J., MOHAMED, H., WIKSTROM, J.D., WALZER G., STILES, L., HAIGH, S.E., KATZ S., LAS, G. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446, 2006.

VACCARINO, F.M., SCHWARTZ, M.L., RABALLO, R., NILSEN, J., RHEE, J., ZHOU, M., DOETSCHMAN, T., COFFIN, J.D., WYLAND, J.J., HUNG, Y.E. Changes in cerebral cortex size are

governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci.* 2, 245–53, 1999.

VAHTER, M.E., MOTTET, N.K., FRIBERG, L.T., LIND, S.B., CHARLESTON, J.S., BURBACHER, T.M. Demethylation of Methyl Mercury in Different Brain Sites of Macaca-fascicularis Monkeys during Long-Term Subclinical Methyl Mercury Exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 134, 2, 273–284, 1995.

VAN DEURS, B. Structural aspects of brain barriers, with special reference to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal epithelium. *Int Rev Cytol.* 65, 117–191, 1980.

VOGEL, D.G., MARGOLIS, R.L., MOTTET, N.K. Analysis of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro. *Pharmacol. Toxicol.* 64, 196–201, 1989.

XU, M., YAN, C., TIAN, Y., YUAN, X., SHEN, X. Effects of low level of methylmercury on proliferation of cortical progenitor cells. *Brain Res.* 1359, 272–280, 2010.

ZHENG, W., ASCHNER, M., GHERSI-EGEA, J.F. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 192, 1–11, 2003.

WAGEMANNK, W.H., YUNKERN, M.B. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total. Environ.* 254, 93–234, 2000.

WAKABAYASHI, K., KAKITA, A., SAKAMOTO, M., SU, M., IWANAGA, K., IKUTA, F. Variability of brain lesions in rat administered methylmercury at various postnatal developmental phases. *Brain Res.* 705:267–72, 1995.

Weiss, B., Clarkson, T.W., Simon, W. Silent latency periods in methylmercury poisoning and in neurodegenerative disease. *Environ Health Perspect.* 110 (5), 851–4, 2002.

WODARZ, A., HUTTNER, W.B.. Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. *Mech Dev.* 120 (11), 1297–1309, 2003..

WOLFE, M.F., SCHWARZBACH. S., SULAIMAN, R.A. Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 146–160, 1998.

WOLPERT, L.; TICKLE, C. 2010. Principles of Development. 4. Oxford: Oxford University Press. 656, 2010.

WHO. Environmental Health Criteria 1. Mercury. International Program on Chemical Safety. Geneva: World Health Organization, 1976.

WHO. World Health Organ.
<http://www.who.int/bulletin/volumes/93/2/en/>. 93:132A–132B, 2015.

YING, C., OU, Y.C., THOMPSON, S.A., PONCE, R.A., KAVANAGH, J. T., FAUSTMAN, E.M., 1999. Induction of the Cell Cycle Regulatory Gene p21 (Waf1, Cip1) Following Methylmercury Exposure in Vitro and in Vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157, 203–212, 1999.

YOSHINO, Y., MOZAI, T., NAKAO, K., 1966. Distribution of mercury in the brain and its subcellular units in experimental organic mercury poisonings. *J. Neurochem.* 13, 397-306, 1966.

YUAN, X. M., LI, W., OLSSON, A.G., BRUNK, U.T. The toxicity to macrophages of oxidized low-density lipoprotein is mediated through lysosomal damage. *Atherosclerosis*. 133, 153–161, 1997.