

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

**MARITANA MELA PRODOCIMO**

**Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de  
duas espécies de teleósteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*,  
utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos**

**SÃO PAULO  
2009**

**MARITANA MELA PRODOCIMO**

**Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de  
duas espécies de teleósteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*,  
utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos**

Tese apresentada ao Programa de Neurociência e  
Comportamento do Instituto de Psicologia da  
Universidade de São Paulo, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Doutor em  
Psicologia.

Orientadora: Dora Fix Ventura

Co-orientador: Ciro A. de Oliveira Ribeiro

**SÃO PAULO**

**2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Mela Prodocimo, Maritana.

Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de duas espécies de teleósteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*, utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos / Maritana Mela Prodocimo; orientadora Dora Selma Fix Ventura. -- São Paulo, 2009.

138 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

**1. Intoxicação por mercúrio 2. Compostos de metilmercúrio 3. Retina 4. Peixes I. Título.**

**RA1231.M5**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Maritana Mela Prodocimo**

“Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de duas espécies de teleósteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*, utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos”

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Neurociência e Comportamento

Tese defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

## **AGRADECIMENTOS**

Como agradecer a todos e a cada um, quando tantos contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, me permitindo uma aprendizagem gratificante.

Por isso, obrigada:

A minha orientadora, Dora Fix Ventura, cuja extraordinária competência nunca lhe diminuiu a compreensão para com as dificuldades da mestranda. Obrigada pela riqueza de sabedoria e conhecimento que me proporcionou durante esses anos, por acreditar no meu trabalho, pelo carinho, paciência... Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por me ensinar os primeiros passos na pesquisa. Você serviu como primeiro degrau em minha escada, ao qual se acrescentam os demais, possibilitando minha formação pessoal e profissional. Obrigada por sempre acreditar em meu trabalho e em minha competência.

A Professora Sonia Regina Grötzner, obrigada pela dedicação e companheirismo nos momentos difíceis e pela amizade e carinho nos momentos alegres e descontraídos. De alguma maneira você sabe que esta tese também é sua.

A Professora Dânia Emi Hamassaki por abrir as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

Ao Professor Marco Randi, pela parte da estatística, obrigada pela atenção e disponibilidade.

Obrigada A Universidade de São Paulo pelo incentivo e condições práticas para que eu pudesse realizar o meu doutorado.

Ao Instituto de Psicologia e todos os funcionários, em especial Idalina Delvale e Claudiel dos Santos pela ajuda e dedicação sempre que eu precisei.

Ao centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

A CAPES, FAPESP e PROCAD pelo apoio financeiro concedido.

A Universidade de Bordeaux e a Estação Marinha de Arcachon – França, que me receberam para a realização do meu estágio de doutorado no exterior.

A Jean-Charles Massabuau, Alexia Legeay e Nathalie Mesmer-Dudons. Merci Beaucoup à vous tous!

A Inês Rabitto, minha amiga e companheira de todas as horas que acompanhou de perto o desenvolvimento deste trabalho, contribuindo com suas críticas, questionamentos e sugestões.

A Rosani Teixeira, pela amizade e carinho que tornaram amenos os momentos difíceis longe de casa.

A todos os meus colegas de laboratório que estiveram comigo nesta caminhada. Obrigada por todos os momentos de descontração e estudos.

Agradeço ao meu marido Vinicius Prodocimo, pela paciência nestes quatro anos de doutorado, pelo incentivo, por toda a ajuda nos momentos de dúvidas, por todas as críticas e soluções. Sem você tudo seria muito mais difícil.

Aos meus familiares, junto a eles restauro as forças da minha alma e encontro solidariedade e estímulo para prosseguir o meu caminho tendo a certeza de que nunca estarei sozinha. O meu amor e gratidão para cada uma das minhas irmãs e meus pais.

Sobretudo agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela família, pelos amigos, pelo trabalho, por tudo que sou e por tudo que conquistei.

"Não sei... se a vida é curta  
ou longa demais pra nós,  
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,  
se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:  
Colo que acolhe,  
Braço que envolve,  
Palavra que conforta,  
Silêncio que respeita.

Alegria que contagia,  
Lágrima que corre,  
Olhar que acaricia,  
Desejo que sacia,  
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,  
é o que dá sentido à vida.  
É o que faz com que ela  
não seja curta, nem longa demais  
Mas que seja intensa  
Verdadeira, pura...  
Enquanto durar"

**Cora Coralina**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de um corte transversal de olho humano (A) e de olho de peixe (B).	7
Figura 2 - Diagrama esquemático da retina de vertebrados.	9
Figura 3 - Representação esquemática das alterações foto-mecânica em retinas adaptadas ao escuro (a) e à luz (b).	10
Figura 4 - Propriedades da retina dupla.	11
Figura 5 - Representação esquemática de uma seção transversal de bastonete (a) e cone (b) de peixes.	13
Figura 6 - Exemplos de células horizontais encontradas na retina de peixes.	15
Figura 7 - Isoformas do retinol.	19
Figura 8 - O ciclo do mercúrio na Amazônia.	25
Figura 9 - Representação de um exemplar de <i>Hoplias malabaricus</i> .	34
Figura 10 - Laboratório de bioensaio da Universidade Federal do Paraná.	35
Figura 11 - Retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.	41
Figura 12 - Retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.	42
Figura 13 - Retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.	43
Figura 14 - Eletromicrografias de varredura da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra.	44
Figura 15 - Eletromicrografias de varredura de retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra.	45
Figura 16 - Eletromicrografias de varredura de retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra.	46
Figura 17 - Eletromicrografias da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> .	47
Figura 18 - Eletromicrografias da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , traíra.	48
Figura 19 - Eletromicrografias da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> .	49
Figura 20 - Exemplar de <i>Danio rerio</i> .	80
Figura 21 - Desenho experimental para <i>Danio rerio</i> realizado no Laboratório de ecofisiologia e ecotoxicologia dos sistemas aquáticos da Universidade de Bordeaux - França.	81
Figura 22 - Fotomicrografias da retina de <i>Danio rerio</i> .	86
Figura 23 - Fotomicrografias da retina de <i>Danio rerio</i> .	87
Figura 24 - Eletromicrografias da retina de <i>Danio rerio</i> após a aplicação da técnica de autometalografia.	88
Figura 25 - Fotomicrografias da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> .	90
Figura 26 - Fotomicrografias da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> - Demonstração autometalografica do MeHg.	91
Figura 27 - Representação gráfica da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> .	114
Figura 28 - Representação esquemática do sistema de coordenadas polares retinianas e da divisão por quadrantes retinianos.	115
Figura 29 - Imunoreatividade observada nos segmentos externos dos cones pareados de <i>Hoplias malabaricus</i> tanto em corte radial (a), quanto em montagem plana da retina (b).	116
Figura 30 - Imagem em montagem plana da marcação inespecífica do segmento interno demonstrando a morfologia dos cones pareados da retina de <i>Hoplias malabaricus</i> , utilizada para contagem e consequentemente construção dos mapas topográficos.	117
Figura 31 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo controle de <i>Hoplias malabaricus</i> representando a distribuição topográfica dos cones pareados.	119
Figura 32 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo intoxicado com metilmercúrio (0,75 µg Hg/g).	120
Figura 33 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo intoxicado com metilmercúrio (0,075 µg Hg/g).	121
Figura 34 - Comparação da estimativa da densidade média dos cones pareados de retinas controles com retinas de traíras intoxicadas com MeHg.	122
Figura 35 - Proporção de cones pareados em porcentagem, entre os quadrantes retinianos. Grupo controle e Grupos contaminados com MeHg (0,75 µg Hg/g e 0,075 µg Hg/g).	123
Figura 36 - Comparação da estimativa da densidade média por quadrante dos cones pareados de retinas do grupo controle com retinas de traíras intoxicadas com MeHg.	124

---



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMG – autometalografia  
CA – célula amácrina  
CB – célula bipolar  
CCG – camada de células ganglionares  
CEP – camada do epitélio pigmentado  
CF – camada dos fotorreceptores  
CFN - camada das fibras nervosas  
CG – célula ganglionar  
CH – célula horizontal  
CNE - camada nuclear externa  
CNI – camada nuclear interna  
CPE – camada plexiforme externa  
CPI – camada plexiforme interna  
EP – epitélio pigmentado  
GABA – *Gamma - aminobutyric acid*, ácido amino butírico  
H.E – Hematoxilina e Eosina  
Hg – *Hidrargirum*, Mercúrio  
MeHg – metilmercúrio  
MET – microscopia eletrônica de transmissão  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
ML – microscopia de luz  
MLE – membrana limitante externa  
MLI – membrana limitante interna  
SNC – sistema nervoso central

---

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>2</b>
<b>RESUMO</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
1.1 O sistema visual	5
1.1.1 O sistema visual de peixes	5
1.1.2 O olho	6
1.1.3 A retina de peixes como modelo de estudo	7
1.1.4 Morfologia da retina	8
1.1.5 Epitélio pigmentado	9
1.1.6 Neurônios de primeira ordem	11
1.1.7 Neurônios de segunda ordem	13
1.1.8 Neurônios de terceira ordem	16
1.1.9 O processo visual	18
1.2 Intoxicação mercurial	19
1.2.1 Ocorrência	20
1.2.2 Mercúrio orgânico	22
1.2.3 Contaminação dos ambientes	22
1.2.4 O Mercúrio no Brasil	23
1.2.5 Toxicidade do mercúrio	25
1.2.6 O mercúrio em peixes	27
1.2.7 Efeitos da intoxicação mercurial no sistema visual	28
1.3 Estudos de toxicidade subcrônica	29
1.4 O uso do bioensaio	29
1.5 O modelo animal	30
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivo específico	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1 Animal experimental: <i>Hoplias malabaricus</i>	33
4.2 Desenho experimental – bioensaio	34
4.3 Coleta de material biológico	36
4.4 Processamento morfológico do material biológico	36
4.4.1 Histopatologia	36
4.5 Concentração de Hg em músculo de <i>Hoplias malabaricus</i>	38
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1 Condições experimentais	39
5.2 Concentração de Hg em músculo de <i>Hoplias malabaricus</i>	39
5.3 Organização estrutural e ultraestrutural da retina de <i>Hoplias malabaricus</i>	39
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>56</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>71</b>
<b>RESUMO</b>	<b>71</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>72</b>

---

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>73</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>74</b>
1.1 O sistema visual de <i>Danio rerio</i> como modelo de estudo	75
1.1.1 Anatomia da retina de <i>Danio rerio</i>	75
1.1.2 Fotorreceptores	75
1.1.3 Células bipolares	76
1.1.4 Células horizontais e amácrinas	76
1.1.5 Células ganglionares	76
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>77</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>78</b>
3.1 Objetivo geral	78
3.2 Objetivo específico	78
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>79</b>
4.1 Animal experimental: <i>Hoplias malabaricus</i>	79
4.2 Animal experimental: <i>Danio rerio</i>	79
4.3 Desenho experimental – bioensaio de <i>Hoplias malabaricus</i>	80
4.4 Desenho experimental – bioensaio de <i>Danio rerio</i>	80
4.5 Coleta do material biológico – <i>Hoplias malabaricus</i>	82
4.6 Coleta do material biológico – <i>Danio rerio</i>	82
4.7 Processamento do material biológico	82
4.7.1 Técnica de autometalografia	82
4.7.2 Concentração de Hg nos olhos	83
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>84</b>
5.1 <i>Danio rerio</i>	84
5.1.1 Condições experimentais	84
5.1.2 Bioacumulação de Hg	84
5.1.3 Distribuição do metilmercúrio	84
5.2 <i>Hoplias malabaricus</i>	89
5.2.1 Condições experimentais	89
5.2.2 Distribuição do metilmercúrio	89
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>97</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>104</b>
<b>RESUMO</b>	<b>104</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>105</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>106</b>
1.1 Especializações da retina	107
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>109</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>110</b>
3.1 Objetivo geral	110
3.2 Objetivo específico	110
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>111</b>
4.1 Animal experimental: <i>Hoplias malabaricus</i>	111
4.2 Desenho experimental – bioensaio	111
4.3 Coleta de material biológico	111
4.4 Processamento morfológico do material biológico	111
4.4.1 Imunocitoquímica	111
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>116</b>
5.1 Topografia dos cones pareados da retina de <i>Hoplias malabaricus</i>	116

---

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>132</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>138</b>

---

## INTRODUÇÃO GERAL

Neste terceiro milênio, o processo de globalização reflete o nível de desenvolvimento tecnológico alcançado como consequência da troca de informações em tempo real. Questões antigas puderam ser discutidas e reavaliadas de forma dinâmica e suas respostas exigem mudanças urgentes no comportamento da sociedade em relação aos aspectos básicos como educação, saúde e meio ambiente.

A produção e o consumo cada vez maior de produtos industrializados geram quantidades enormes de resíduos que são destinados para o meio ambiente como se este fosse um depósito de capacidade infinita para o lixo produzido diariamente pelo homem. A partir dessa idéia, inúmeros acidentes ambientais e o uso indiscriminado de materiais tóxicos trouxeram graves consequências para a saúde dos seres vivos devido à contaminação dos recursos naturais.

Os metais são utilizados em diversas áreas industriais, agrícolas e manufatureiras. Sem o devido controle na utilização e a falta de estudos a respeito do potencial toxicológico de metais como o mercúrio, muitas pessoas foram afetadas, fato que ainda ocorre nos dias de hoje. A liberação destes produtos no ambiente causa impacto ecológico pela sua incorporação nos tecidos vivos e assimilação na cadeia alimentar.

A utilização do mercúrio ainda é uma prática nos dias de hoje. Ainda não chegamos a um consenso a respeito dos limites que asseguram o uso do mercúrio, pois, as consequências da contaminação mercurial em baixos níveis ainda são questionáveis.

Dentro deste contexto, este trabalho trata de um assunto de saúde pública urgente, pois traz em questão os efeitos causados pela intoxicação mercurial, particularmente no sistema nervoso central.

## CAPÍTULO I

### **Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio nos fotorreceptores da retina de *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794), traíra, através de técnicas histopatológicas**

#### **RESUMO**

Em exposições especificamente relacionadas ao metilmercúrio (MeHg), o principal órgão alvo é o Sistema Nervoso Central (SNC). Os efeitos morfológicos do metilmercúrio nos fotorreceptores da retina de *Hoplias malabaricus*, traíra, foram investigados através de técnicas histopatológicas. Os exemplares de traíra foram distribuídos em três grupos: um grupo controle e dois grupos expostos ao MeHg. A contaminação trófica e subcrônica foi realizada através de exemplares vivos de *Astyanax* sp os quais receberam intraperitonealmente um volume de solução aquosa de MeHg correspondente a (0,075µg/g de traíra) ou (0,75µg/g de traíra). Quinze peixes por condição experimental foram sacrificados após 70 dias de exposição e os olhos foram coletados para as análises de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Através de análises químicas quantificamos o mercúrio em músculo e observamos em ambas as doses um acúmulo do metal. Para a maior dose do metal (0,75µg/g), as análises histopatológicas revelaram alterações nas membranas que unem os dois elementos de um cone pareado, degeneração da camada dos fotorreceptores e alterações morfológicas no segmento interno e segmento externo dos bastonetes. As análises também demonstraram alterações estruturais na membrana plasmática do segmento externo e alterações no processo de eliminação dos discos membranosos dos fotorreceptores. No momento da eliminação dos discos antigos foi observada a formação de vacúolos e também uma anormal eliminação dos discos membranosos pelas partes laterais do segmento externo. Para a menor dose do metal (0,075µg/g) além da alteração observada nas membranas que unem os cones pareados e da degeneração celular na camada dos fotorreceptores, observamos uma descontinuidade estrutural dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores. Todas estas alterações histopatológicas nos levam a concluir que o metilmercúrio induz alterações histopatológicas nas células da camada dos fotorreceptores podendo consequentemente trazer danos fisiológicos para toda a retina.

**Palavras-chave:** Metilmercúrio, retina, técnicas histopatológicas, *Hoplias malabaricus*.

## **Evaluation of toxic effects of methylmercury in the retina of fotorreceptores *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794), trahira, through histopathological techniques**

### **ABSTRACT**

In exposures specifically related to methylmercury (MeHg), the main target organ is the Central Nervous System (CNS). In this study, morphological effects of methylmercury in retinal photoreceptors of *Hoplias malabaricus*, trahira, through histopathological techniques were investigated. Some mature fish were divided in three groups - one control group and the other two which were exposed to MeHg. The trophic and subchronic contamination was performed by live specimen of *Astyanax* sp which received a volume of aqueous solution of MeHg corresponding to (0,075µg /g trahira) or (0,75µg /g trahira). In an experimental condition, fifteen fish were sacrificed after 70 days of exposure and their eyes were collected for analysis of light microscopy, electron transmission microscopy and scanning electron microscopy. Through chemical analysis the amount of mercury found in muscle was quantified. In both doses an accumulation of the metal in the muscle of these animals was observed. For the highest dose of metal (0,75µg /g), the histopathological analysis revealed changes in the membrane that connects the two elements of a paired cone, cellular degeneration in the layer of photoreceptors and morphological changes in the internal and outer rod segments. The analysis also showed structural changes in the plasma membrane of the outer segment and changes in the process of removal of membranous discs in the apical region of a photoreceptor. At the time of disposal of old discs, the formation of vacuoles and also an abnormal membranous discs removal through the sides of the outer segment were observed. For the smallest dose of the metal (0,075µg/g) besides the morphological changes observed in the membrane which unites the paired cones and cellular degeneration throughout the layer of photoreceptors, a structural discontinuity of the membranous discs of the outer segment were observed in radial sections of rods. All these histopathological changes lead us to conclude that methylmercury induces morphological changes in cells of the layer of photoreceptors, and therefore causing physiological damage to the smooth functioning of the retina.

**Keywords:** Methylmercury, retina, histopathological techniques, *Hoplias malabaricus*.

## 1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático acaba refletindo com facilidade os efeitos de várias atividades que ocorrem ao seu redor, ou seja, estão expostos aguda e cronicamente a agentes químicos que são poluentes e que por sua vez prejudicam o desenvolvimento da biota. O comprometimento de processos fisiológicos vitais como respiração, reprodução e crescimento são exemplos de perturbações metabólicas causadas por contaminantes ambientais aos organismos aquáticos (Stegman *et al.*, 1992).

Vários fatores têm colaborado para o aumento significativo dos lançamentos de despejos e resíduos nos cursos d'água como: o alto nível de industrialização, a intensa atividade agrícola e a concentração das atividades humanas próximas de áreas onde encontramos a maioria dos recursos hídricos.

Entre as substâncias químicas mais estudadas em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos estão os metais pesados, devido à sua toxicidade aos sistemas biológicos e sua persistência no ambiente, sendo estes considerados potencialmente perigosos (Kehring *et al.*, 2002).

O problema da contaminação dos ambientes naturais por metais alcança hoje dimensões globais, sendo observado tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A ausência de controle dos rejeitos contaminados por metais pesados alterou o solo, a água e o ar, trazendo como consequência a contaminação dos diferentes ecossistemas.

Estudos têm demonstrado a toxicidade do mercúrio (Hg) e concentrado a atenção dos pesquisadores devido à sua toxicidade e facilidade de bioacumulação na biota. O mercúrio apresentou um aumento considerável nos níveis ambientais desde o início da revolução industrial e atualmente está disperso mundialmente em níveis que potencialmente podem colocar em risco a vida de diferentes espécies de organismos vivos (Carlyn *et al.*, 2007).

O Sistema Nervoso é altamente afetado pela contaminação mercurial, assim se faz necessário estudos aprofundados de suas causas e efeitos, visto que os danos observados nas células nervosas são irreversíveis e letais à estas. Quando o sistema nervoso sofre algum tipo de alteração provocada por agentes externos ou por processos biológicos pode-se dizer que o sistema de percepção do meio ambiente também de



alguma forma é danificado tornando-se menos eficaz ou até totalmente ineficiente, dependendo da amplitude das causas.

Em exposições especificamente relacionadas ao metilmercúrio (MeHg), o principal órgão alvo é o Sistema Nervoso Central (SNC) em todas as espécies estudadas, inclusive no homem (Carta *et al.*, 2003). Vários estudos, realizados com humanos expostos ao MeHg demonstraram que os sintomas visuais, dentre eles, perdas visuais, são uma característica constante desta afecção neurológica (Kjellstrom *et al.*, 1989; Grandjean, 1999; Sakamoto *et al.*, 2000).

Alterações visuais também foram observadas em primatas não-humanos, gatos e ratos após exposição mercurial (Helberg & Hystrom 1972; Merigan 1980), assim como danos morfológicos no cérebro e na retina de ratos (Slotkin *et al.* 1985).

Peixes que foram cronicamente expostos ao metilmercúrio exibiram uma série de sintomas, incluindo: redução na sensibilidade visual, coordenação motora anormal e variações comportamentais. Segundo Weis & Weis (1998) isto está relacionado com uma distinta distribuição regional de MeHg no cérebro, principalmente nas áreas relacionadas com o campo visual e motor. Para Hawryshyn *et al.*, (1982) a disfunção visual é atribuída à visão escotópica, através de lesões no SNC, e influência seletiva de fotorreceptores na retina.

## **1.1 O sistema visual**

### **1.1.1 O sistema visual de peixes**

Há muito já se sabe que muitas espécies de peixes têm não só um sistema visual desenvolvido, como também capacidade para a visão em cores (Hart *et al.*, 2004).

A diversidade espectral deste grupo de vertebrados não é somente causada pela variação casual, isso pode ser considerada também uma resposta evolucionária sistemática de adaptações aos hábitos e habitat das espécies (Munz, 1965). De fato, os peixes são adaptados a diferentes nichos na hidrosfera. Cerca de 95% dos peixes pertencem à classe dos Teleósteos sendo que destes alguns vivem em águas limpas ou então em águas turvas. Destes alguns vivem nas profundezas do mar, onde a luz não penetra, outros em regiões de luz crepuscular e ainda temos aqueles que ocupam a zona fotópica, próxima a superfície (Kusmic & Gualtieri, 2000).

Ao longo da evolução uma grande diversidade de pigmentos visuais foram selecionados entre as diversas espécies de peixes (Hawryshyn 1997; Reckel *et al.*, 2002;

Hart *et al.*, 2004), e conseqüentemente, o processamento neural de informação luminosa nesses animais está funcionalmente organizado de forma complexa e diversificada. Esse processamento inicial de informação luminosa ocorre na retina, localizada na parte posterior do globo ocular.

### 1.1.2 O olho

O olho de um peixe teleósteo (Figura 1A) é adaptado à visão na água e difere em alguns aspectos dos olhos dos vertebrados terrestres (Figura 1B) adaptados à visão no ar. O olho de um peixe teleósteo é caracterizado por uma esclera fraca, uma córnea plana e um cristalino quase globular (Kraaij, 2000). No entanto os componentes básicos não diferem da maioria dos vertebrados. Entretanto, algumas variações entre as espécies são observadas: tamanho, posição e estrutura dos olhos. Isto ocorre não somente devido o grande número de espécies, mas também devido às estratégias adaptativas. (Takashima & Hibiya, 1998).

O olho é um órgão constituído por três camadas dispostas concêntricamente. A camada mais externa é formada pela esclera, uma camada espessa e firme. A camada média, ou túnica vascular é constituída pela coróide, a qual é altamente vascularizada, pelo corpo ciliar e pela íris. A camada mais interna é a retina fotossensitiva, o componente mais importante dos olhos (Takashima & Hibiya, 1998).

Junto a esse envoltório, encontra-se o cristalino ou lente, uma estrutura biconvexa transparente, mantida em posição por um ligamento que se insere sobre o corpo ciliar.

Em peixes o foco da imagem na retina é realizado pelo movimento do cristalino com um músculo retrator (Kraaij, 2000). A cavidade do olho é preenchida com um meio transparente chamado de humor vítreo.

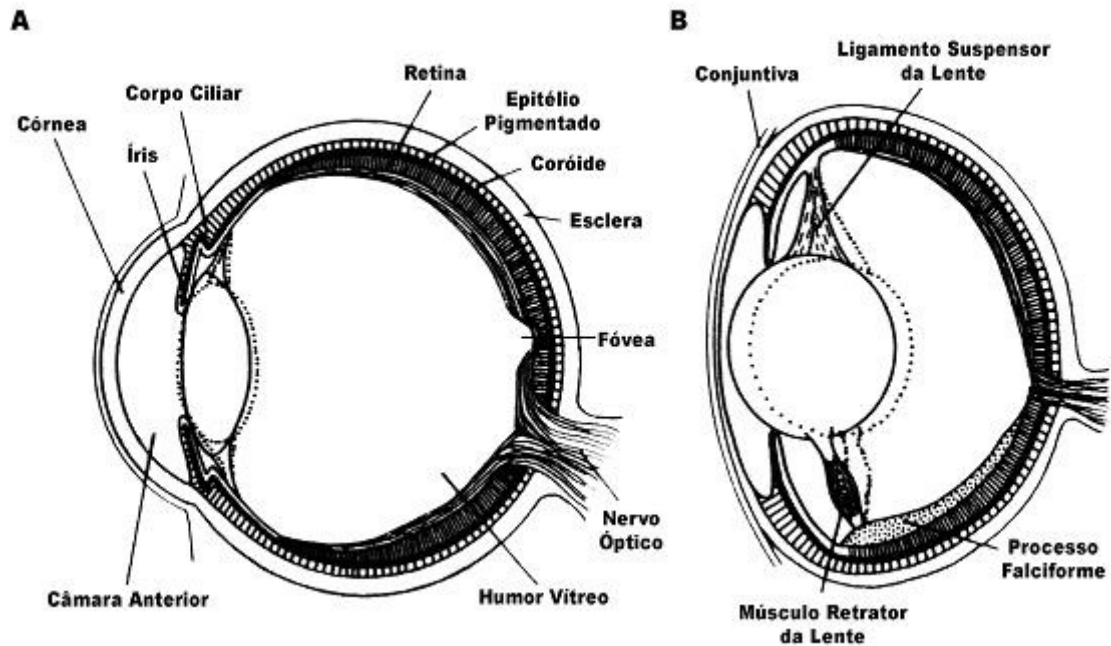


Figura 1 - Representação esquemática de um corte transversal de olho humano (A) e de olho de peixe (B). Modificado de Kraaij (2000).

### 1.1.3 A retina de peixes como modelo de estudo

Toda forma de vida animal, desde um ser unicelular até os mamíferos superiores, reage de algum modo à luz, sendo que o órgão mais importante para a fotorrecepção dos peixes são os olhos, embora outros sítios fotossensíveis como a pele, a coluna vertebral, o cérebro e o complexo pineal sejam também conhecidos (Teyke & Schaerer, 1994). A visão para quase todos os animais é um meio de sobrevivência.

O sistema visual é um alvo importante na intoxicação mercurial. Os mecanismos fisiológicos que causam alterações visuais como: comprometimento severo do campo visual periférico, disfunção da visão central, perda da sensibilidade ao contraste espacial e temporal e perda da discriminação de cores, ainda não foram totalmente esclarecidos (Merigan, 1979; Castoldi *et al.*, 2003). Porém, mesmo com todos estes estudos os efeitos da intoxicação mercurial na retina de vertebrados ainda não foram bem elucidados.

Os organismos aquáticos, dentre eles os peixes, são um dos primeiros alvos da contaminação por mercúrio neste tipo de ecossistema, constituindo um elo importante entre a poluição dos recursos hídricos e a saúde humana. Assim, peixes atingidos pela contaminação mercurial constituem um modelo interessante para a investigação dos

efeitos neurotóxicos do metilmercúrio assimilado em condições naturais sobre o tecido nervoso, sobretudo seus efeitos na retina.

A retina promove uma ótima oportunidade de examinarmos isoladamente uma rede neural, pois está separada do resto do SNC (Bilotta & Saszik, 2001).

#### **1.1.4 Morfologia da retina**

Esta estrutura foi descrita há mais de cem anos pelo anatomista Santiago Ramón y Cajal, através da técnica de Golgi, desenvolvida pelo médico Italiano Camilo Golgi cujo princípio consiste na impregnação das estruturas nervosas por sais de prata. A partir deste estudo a retina foi dividida em 10 camadas histológicas (Figura 2), baseadas na laminação dos corpos celulares dos neurônios e seus processos neuronais. A retina dos teleósteos é uma estrutura neural de aproximadamente 250 µm, composta pelas seguintes camadas: (1) camada do epitélio pigmentado -EP; (2) camada de fotorreceptores -CF, constituída pelos segmentos externos e internos dos bastonetes e cones; (3) membrana limitante externa-MLE, formada pelos processos das células de Müller os quais circundam o segmento interno dos fotorreceptores unindo-se firmemente às membranas celulares destes através das junções de adesão; (4) camada nuclear externa-CNE, onde estão localizados os núcleos dos fotorreceptores – cones e bastonetes; (5) camada plexiforme externa-CPE, local onde os pedículos dos cones e/ou as esférulas sinápticas dos bastonetes fazem sinapses com os dendritos das células bipolares e/ou células horizontais; (6) camada nuclear interna-CNI, formada pelos núcleos das células horizontais, bipolares, amácrinas e Müller, local onde também podem ser encontradas células ganglionares deslocadas (Raymón y Cajal, 1893) e as células interplexiformes; (7) camada plexiforme interna-CPI, segundo plexo com contato sináptico das células bipolares-CB, amácrinas-CA e ganglionares-CG; (8) camada de células glanglionares-CCG, constituída pelos núcleos das células ganglionares e, em algumas espécies por células amácrinas e células horizontais deslocadas; (9) camada de fibras nervosas-CFN, formada pelos axônios das células ganglionares os quais irão se reunir num único ponto, a papila óptica, para formar o nervo óptico; (10) membrana limitante interna-MLI, constituída pelas porções mais internas dos prolongamentos das células de Müller.

Estas camadas são indistintas na região do nervo óptico, e a espessura tende a diminuir perto da periferia onde o limite entre uma e outra torna-se obscuro (Takashima & Hibiya, 1998).

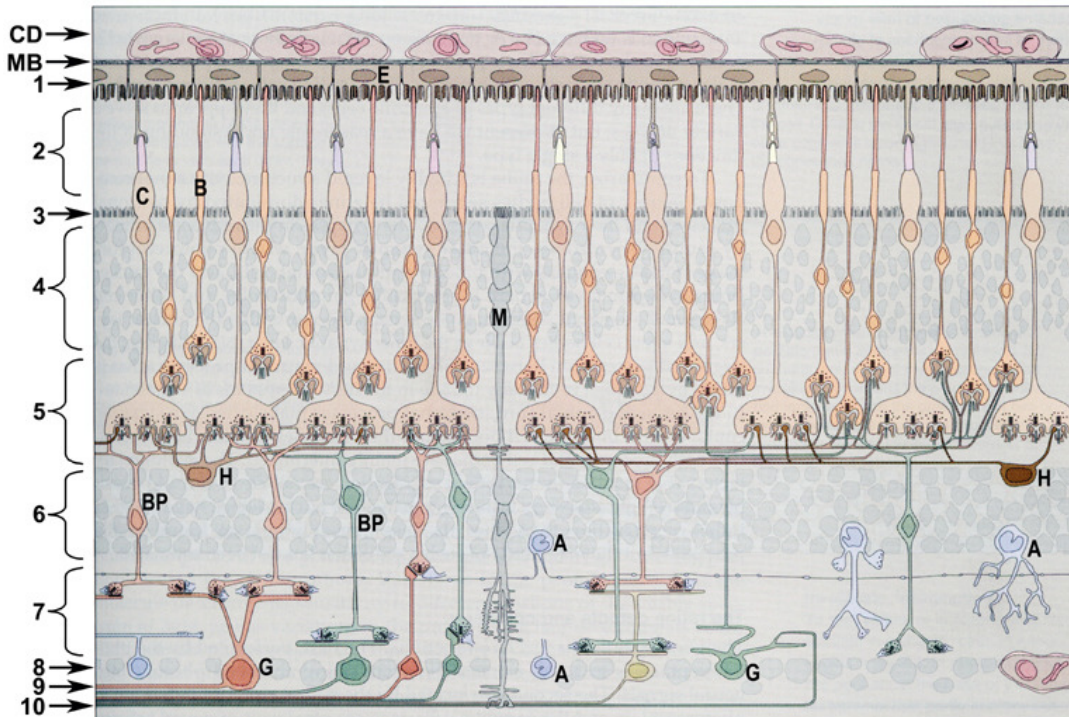


Figura 2 - Diagrama esquemático da retina de vertebrados. Pode-se observar a coróide (CD), as 10 camadas histológicas da retina, epitélio pigmentar (E), cones (C), bastonetes (B), células de Müller (M), células horizontais (H), células bipolares (BP), células amácrinas (A) e células ganglionares (G). Modificado de Rodieck (1998).

### 1.1.5 Epitélio pigmentado

Entre a coróide e a retina encontra-se a camada do epitélio pigmentado, constituída por células arranjadas de maneira regular tendo cada célula uma forma hexagonal.

A camada do epitélio pigmentado forma uma barreira resistente à travessia de substâncias para as células da retina, formando assim uma barreira hematoencefálica (Lamb & Pugh, 2004). Em adição a esta proteção e a de mediar a reciclagem do retinol, o epitélio também tem outras importantes funções, que incluem: transporte ativo de materiais (como vitamina A) dos capilares da coróide para os fotorreceptores; fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores; adesão da retina a coróide; manutenção do espaço intracelular e absorção da luz pelos dos grânulos de melanina com a função de proteger os fotorreceptores contra a intensidade luminosa através da

dispersão e retração dos grânulos de pigmentos ao longo das projeções do corpo celular em peixes, anfíbios e aves. Esse mecanismo permite um controle da luminosidade que atinge a retina, diferente do que ocorre em animais que possuem um controle pupilar (Lamb & Pugh, 2004).

Em teleósteos a adaptação da retina ao escuro e à luz é responsável pelas diferentes características histológica no epitélio pigmentar e na camada dos fotorreceptores respectivamente. Adaptação ao escuro causa a migração dos grânulos do epitélio da face do vítreo para a face da coróide. Simultaneamente, os segmentos externos e internos dos cones mudam sua posição para a direção da coróide e os segmentos externos e internos dos bastonetes mudam em direção ao vítreo (Figura 3). Estes processos são revertidos pela adaptação à luz. Estas mudanças posicionais em condição de luminosidade são chamadas de movimentos retinomotores (Takashima & Hibiya, 1998). Essa mobilidade celular altera a quantidade de luz absorvida pelos fotorreceptores modificando, portanto, a sensibilidade retiniana (Dearyy & Barlow Jr., 1987).

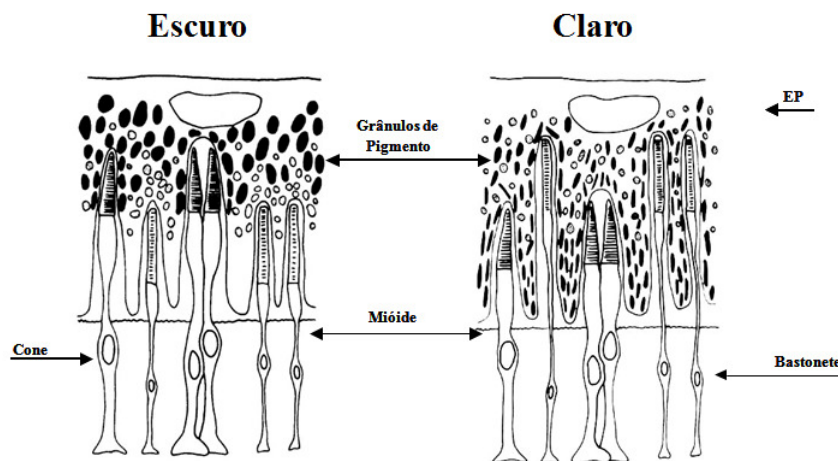


Figura 3 - Representação esquemática das alterações foto-mecânica em retinas adaptadas ao escuro (a) e à luz (b). Mudanças posicionais nos fotorreceptores e grânulos do epitélio pigmentado. Modificado de Ali & Klyne (1985).

### 1.1.6 Neurônios de primeira ordem

#### Fotorreceptores

Há 130 anos, Schultze (1866) propôs a existência de dois tipos morfológicamente distintos de fotorreceptores na retina de vertebrados (cones e bastonetes) e formulou a existência de dois sistemas visuais independentes em humanos e em muitos outros vertebrados.

Os bastonetes compõem o sistema escotópico, responsável pela alta sensibilidade à luz e pela baixa acuidade visual. Os cones por sua vez, são responsáveis pelo sistema de alta acuidade, chamado de sistema fotópico apresentando baixa sensibilidade e alta acuidade visual (Figura 4).

Assim, a idéia de dois sistemas visuais: um escotópico e um fotópico é usualmente chamada de teoria dupla da visão. A retina que contém ambos os fotorreceptores é chamada de retina dupla (Ebrey & Koutalos, 2001). Como em muitos vertebrados, a maioria dos peixes apresenta uma retina dupla, ou seja, com ambos os tipos de fotorreceptores. Porém, algumas exceções como os peixes de profundidade possuem retinas compostas apenas por bastonetes e outras espécies por retinas compostas apenas por cones.

Aspectos do sistema visual	Escotópico	Fotópico
Ambiente fotópico	escuro	claro
Células fotorreceptoras	bastonetes	cones
Sensibilidade espectral	500nm	altera para o vermelho
Sensibilidade absoluta	alta	baixa
Velocidade de resposta	lenta	rápida
Atividade visual	baixa	alta
Adaptação ao escuro	lenta	rápida
Resposta de saturação	sim	não
Pigmento visual	tipo bastonetes	tipo cones
Discriminação de cores	não	sim

Figura 4 - Propriedades da retina dupla. Modificado de Ebrey & Koutalos (2001).

Todos os fotorreceptores apresentam uma estrutura comum, com um segmento externo que corresponde a um cílio modificado durante o desenvolvimento embrionário, formado por uma grande quantidade de membranas celulares onde se encontram os pigmentos visuais, um segmento interno, contendo organelas celulares básicas como o

núcleo e as mitocôndrias, e o terminal sináptico, onde estão presentes as vesículas com neurotransmissor, o glutamato.

Os dois segmentos se comunicam através de um cílio formado por nove pares de microtúbulos ciliares, o qual não apresenta o par central comum nos cílios motores (Bowmaker, 1991). A porção distal do segmento interno, chamado de elipsóide, é o centro metabólico do fotorreceptor, região de maior densidade de mitocôndrias. A conexão entre o elipsóide e o núcleo chama-se mióide e em certas espécies atua nos movimentos retinomotores em resposta à diferentes intensidades luminosas (Ali & Klyne, 1985).

A partir da sua forma, os fotorreceptores são classificados em: cones, com estreitamento do sentido vitreal-escleral, com formato cônico, ou bastonetes: cujo diâmetro uniforme e similar ao do segmento interno confere um formato cilíndrico (Ali & Klyne, 1985) (Figura 5). Outra forma de classificação dos fotorreceptores é baseada na sensibilidade espectral dos seus fotopigmentos (Kraaij, 2000).

Teleósteos típicos possuem tanto cones como bastonetes. Entretanto, além dos cones simples podem apresentar cones pareados, os quais podem ser classificados em: cones duplos, onde cada elemento do cone possui um pigmento visual diferente ou em cones gêmeos, onde os elementos possuem pigmentos visuais idênticos (Engström, 1960). Em *Hoplias malabaricus* utilizaremos o termo cones pareados quando não for possível diferenciá-los em cones duplos ou cones gêmeos.

Os peixes apresentam tipicamente cinco tipos de cones, incluindo os cones pareados. Os cones simples são sensíveis à comprimentos de onda curtos (cones S), médios (cones M) ou longos (cones L), podem ser pareados (duplos e/ou gêmeos) (Cones M e/ou L) e um quinto tipo de cone simples com sensibilidade ao ultravioleta foi descrito (cone UV) em todas as espécies de água doce e em algumas espécies marinhas (Kraaij, 2000).

Na CPE, os fotorreceptores estabelecem conexão com as células bipolares e/ou com as células horizontais.



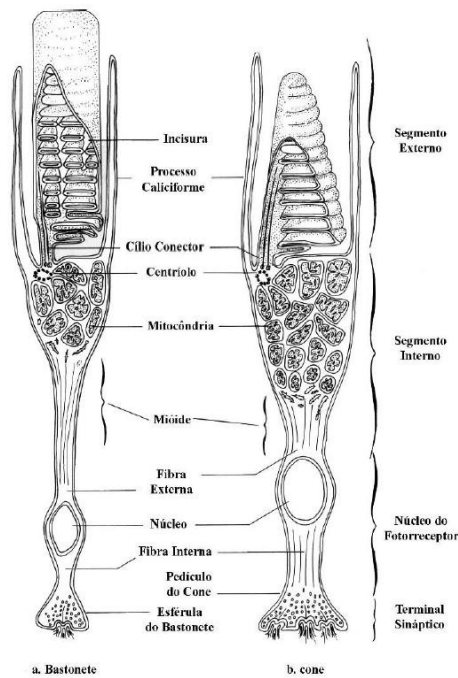


Figura 5 - Representação esquemática de uma seção transversal de bastonete (a) e cone (b) de peixes. Modificado de Ali & Klyne (1985).

### 1.1.7 Neurônios de segunda ordem

#### Células horizontais

As células horizontais são interneurônios que se estendem horizontalmente na margem externa da CNI e são caracterizadas por extensos processos laterais, com ou sem axônio, que têm como alvo dendritos de outras células horizontais, células bipolares e pedículos de fotorreceptores. Morfologicamente, dividem-se em dois grandes grupos, sendo que o primeiro, com axônio, ligam-se aos cones, e o segundo, sem axônio e localizado mais internamente em relação ao primeiro, ligam-se aos bastonetes.

Os terminais axônicos das células horizontais são acoplados eletricamente por “gap junctions” (Kaneko, 1971), o que proporciona um aumento significativo do campo receptivo (Piccolino *et al.*, 1982). Os contatos com os pedículos são feitos por meio de sinapses convencionais ou de tríade sináptica (Granda & Dvorak, 1977). As sinapses em tríade ocorrem geralmente em invaginações do terminal do fotorreceptor numa organização específica. Normalmente, o elemento central é um dendrito de célula bipolar e os dois elementos laterais são dendritos de células horizontais (Dowling &

Boycott, 1966). A invaginação poderia facilitar a interação entre células horizontais, células bipolares e fotorreceptoras. (Leeper & Copenhagen, 1979).

Os campos receptivos das células horizontais são caracteristicamente grandes e as suas respostas são lentas e graduadas, cuja polaridade varia conforme o comprimento de onda em alguns casos. Sua função aparente é transmitir informação sobre a atividade de células fotorreceptoras horizontalmente distantes, na forma de um efeito de periferia sobre os fotorreceptores adjacentes ou células bipolares.

De forma geral, o funcionamento do sistema de transmissão sináptica da retina distal ocorre em duas vias principais de comunicação: a via de alimentação direta, dos cones para as células horizontais e a via de retroalimentação ou feedback, das células horizontais para os cones (Piccolino, 1996). Ou seja, as células horizontais interagem com os terminais dos cones de maneira recíproca e ainda, parecem mediar o antagonismo na periferia das células bipolares pré-sinápticamente através dos fotorreceptores, ou por interações diretas com as bipolares (Dowling, 1987).

Na maioria dos peixes quatro tipos de células horizontais foram identificadas e classificadas de acordo com a sua profundidade na CNI da retina e características morfológicas (Figura 6). A CH mais externa (H1), com grande corpo celular e árvore dendrítica relativamente pequena contém um axônio (H1AT) o qual muitas vezes é referido como uma célula horizontal intermediária por ter aparentemente uma fisiologia separada do corpo celular. Esta célula caracteriza-se por ser de luminosidade e recebe aferências de três tipos de cones (Dowling, 1987; Kolb *et al.*, 2001). Dois tipos de células horizontais mais internos (H2 e H3) recebem aferências de cones e são tipicamente de cromaticidade. Na maioria dos peixes, H2 tem corpo celular pequeno e grande árvore dendrítica, enquanto H3 tem árvore dendrítica muito extensa e corpo celular pequeno, em relação às outras, ambas apresentam um longo axônio. A célula H4 é a única célula horizontal da retina de peixes que não possui axônio, e conecta-se exclusivamente aos bastonetes (Neguishi *et al.*, 1997).

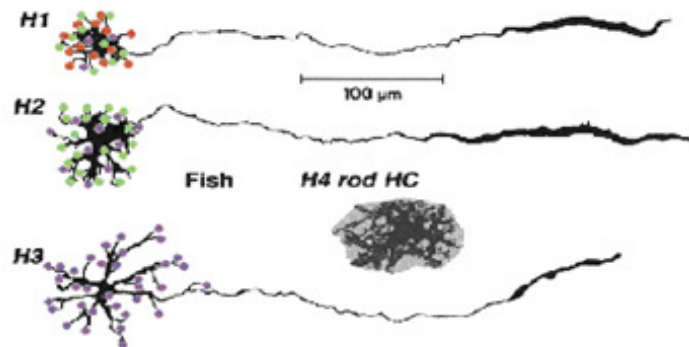


Figura 6 - Exemplos de células horizontais encontradas na retina de peixes. Modificado de Twing *et al.* (2003)

### Células Bipolares

Células bipolares são neurônios de segunda ordem que se comunicam com fotorreceptores e células horizontais na CPE, com células ganglionares e células amácrinas na CPI. A estimulação luminosa provoca uma resposta cuja amplitude depende da intensidade de luz (Kaneko, 1970).

Na retina de peixes as células bipolares podem receber aferências apenas de cones ou uma mistura de cones e bastonetes, estas conhecidas como bipolares mistas, descritas principalmente por Ramón Y Cajal em 1893 e posteriormente estudadas por outros autores (Sherry & Yazulla 1993; Tachibana, 1999). Assim as células bipolares com aferências predominantes de bastonetes podem conectar cones sensíveis a comprimento de onda longo (M1) ou cones sensíveis a comprimento de onda médio (M2) (Wagner *et al.*, 1998).

A resposta da célula bipolar à luz pode ser de dois tipos: despolarizante e hiperpolarizante. O tipo de contato sináptico com os fotorreceptores irá determinar a resposta da bipolar: contatos invaginantes estão associados a uma resposta despolarizante à luz, chamadas de células bipolares tipo ON; célula com contatos via junções basais têm resposta hiperpolarizante e são chamadas de células bipolares tipo OFF.

O campo receptivo de uma célula bipolar é constituído por duas porções: uma área circular da retina que proporciona aferências diretas do fotorreceptor, chamada de

centro do campo receptivo, e uma área da retina adjacente, que proporciona aferências através de células horizontais, chamada periferia do campo receptivo. As respostas do potencial de membrana de uma bipolar à luz no centro receptivo são opostas as promovidas pela luz na periferia apresentando, portanto, campos receptivos organizados anatomicamente em centro-periferia. Neste contexto, as células bipolares podem ser separadas em dois grupos: células bipolares centro-ON e centro-OFF. Nas células bipolares do centro-ON, a iluminação do centro do campo receptivo causa despolarização da célula, enquanto que se a periferia for iluminada, a célula irá responder com uma hiperpolarização. O oposto ocorre nas células centro-OFF. Essa oposição de campo receptivo é transmitida para as células ganglionares na camada plexiforme interna, com a influência das células amácrinas as quais também contribuem para a elaboração dos campos receptivos das células ganglionares (Kaneko, 1970; Shimbo *et al.*, 2000).

Na CPI, o tamanho e a localização dos terminais axonais das células bipolares refletem a sua funcionalidade na organização desta camada em sublâminas as quais estão presentes em todas as retinas dos vertebrados. A primeira descrição destas sublâminas foi feita por Cajal.

De uma maneira geral, a CPI pode ser dividida funcionalmente em duas sublâminas: **a** e **b**. A primeira sublâmina, é distal às células ganglionares e próxima ao corpo celular das células amácrinas, compondo os estratos 1 e 2 de Ramón y Cajal (1983). Na sublâmina **a** as células bipolares centro-OFF estabelecem conexão com as células ganglionares centro-OFF. A sublâmina **b** inclui o estrato 3 e, nas espécies que apresentam mais de 3, os estratos 3 a 5; nela se encontra o terminal axonal das bipolares centro-ON que estabelece sinapses com as células ganglionares centro-ON (Kolb *et al.*, 2001).

### **1.1.8 Neurônios de terceira ordem**

#### **Células amácrinas**

No final do século 19, Ramón y Cajal descreveu na retina um tipo celular neural caracterizado pela ausência de axônio, ao qual nomeou de células amácrinas. A grande maioria das células amácrinas descritas até o presente momento foram descritas dentro deste padrão morfológico. Porém alguns trabalhos (Freed *et al.*, 1996; Rodiek 1998; Volgyi *et al.*, 2001) trazem a descrição de um tipo de célula amácrina que possui vários

axônios. Estes axônios permanecem dentro da retina, na CPI, ao contrário dos axônios das células ganglionares que se dirigem para formar o nervo óptico e levar a informação para locais externos à retina, como os centros neurais superiores.

A grande maioria das células amácrinas são neurônios inibitórios. Elas modulam a informação que passa das bipolares para as ganglionares através da ação de neurotransmissores como GABA, acetilcolina e glicina.

Ao se considerar morfologia, tamanho e campo retiniano, as células amácrinas constituem o grupo mais diversificado de células da retina. Estima-se que existam cerca de 30 a 40 subtipos distintos dependendo da espécie; em Ciprinídeos já foram encontrados 43 tipos morfológicos diferentes (Wagner & Wagner, 1988).

A classificação pode ser feita segundo a sua morfologia, com base na natureza dos seus processos em: estratificadas (mono ou bi-estratificadas) ou difusas.

Fisiologicamente podem ser caracterizadas como ON ou OFF de acordo com a organização do campo receptivo da bipolar e/ou da ganglionar as quais estabelecem conexão na camada plexiforme interna. Assim, a estratificação na sublâmina **a** e **b** desta camada plexiforme, como descrito no tópico das bipolares, indica a via de processamento em que determinada amácrina está envolvida. Recentemente, Connaughton & Nelson (2004) utilizaram esta estratificação na CPI para classificar os tipos celulares encontrados na retina de peixes (*Danio rerio*), determinando desta forma sete tipos de amácrinas divididas em três grupos: ON, com corpo celular puriforme foram as mais abundantes, cujos processos estratificavam na sublâmina **b** da CPI; OFF, com dendritos primários estratificando próximo a CNI e na parte mais proximal da CPI, na sublâmina **a**; e difusas, com ramificações em todas as camadas da CPI, encontradas em menor número e muito semelhantes às encontradas em tartarugas (Kolb, 2001).

Durante o processo evolutivo, a seleção das células amácrinas resultou numa variedade de morfologia, de neurotransmissores e de conexões permitindo uma diversidade de análises visuais na população de células ganglionares (Thompson, 1991).

### **Células Ganglionares**

Células ganglionares são neurônios de terceira ordem e os últimos a receberem e processarem a informação luminosa na retina. Transmitem mensagens na forma de potenciais de ação para o próximo estágio do processamento da informação visual no SNC através do nervo óptico, o qual conduz os axônios para áreas centrais.

Cajal no seu trabalho de impregnação por Golgi em retina de vertebrados classificou diferentes variedades de células ganglionares baseado em critérios morfométricos como forma (morfologia dendrítica) e o número de sublâminas na qual estas células ramificam seus dendritos (níveis de estratificação na CPI).

Atualmente sabe-se que existe um caminho evolutivo comum tomado por diferentes tipos de células ganglionares, no qual diferentes classes morfológicas e fisiológicas são similares entre as espécies.

Um aspecto importante da arquitetura das células ganglionares é o arranjo dos seus dendritos nas sublâminas ON e OFF da CPI que reflete o tipo de informação vinda das bipolares centro ON e centro OFF. Elas também apresentam o campo receptivo organizado em centro e periferia que respondem antagonicamente ao estímulo luminoso (Nelson *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1993).

### **1.1.9 O processo visual**

Nos segmentos externos dos bastonetes encontram-se os pigmentos visuais responsáveis pelas respostas à luz. Os bastonetes têm um funcionamento sob baixa intensidade, ou visão escotópica, sendo, portanto mais sensíveis, havendo normalmente apenas um tipo espectral na retina.

Os cones, por sua vez, existem no mínimo em dois tipos espectrais diferentes e são responsáveis pela visão de cores, ou fotópica, mas necessitam de estímulos luminosos de maior intensidade para responder (Dowling, 1987).

O processo visual é iniciado quando a luz atinge os fotorreceptores, após passar através das várias camadas da retina e fótons são absorvidos pelas moléculas fotossensíveis, os pigmentos visuais. Esses pigmentos são chamados de rodopsina nos bastonetes e opsinas nos cones. Cada pigmento visual consiste de um complexo formado por uma proteína integral transmembrânica, chamada opsina que possui sete regiões que atravessam a membrana, e um cromóforo normalmente o 11-cis-retinal, um derivado da vitamina A.

A absorção do fóton da luz é o primeiro estágio da foto transdução, levando a ativação das opsinas com uma mudança na configuração do retinal da forma 11-cis para todo-trans (Figura 7). Esta reação é o único evento dependente da luz no processo visual. Como resultado dessa mudança conformacional, ocorre sequencialmente uma série de eventos bioquímicos que resultam na alteração da propriedade da membrana, de

maneira que se torna possível à passagem da informação do fotorreceptor para outros tipos neuronais através de sinais eletroquímicos.

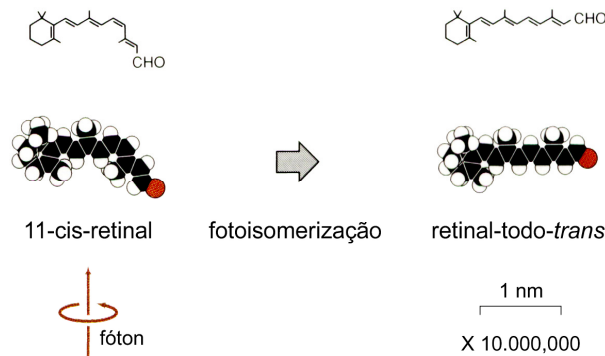


Figura 7 - Isoformas do retinol. Modificado de Rodieck (1998).

## 1.2 Intoxicação mercurial

O mercúrio, elemento com a propriedade de ser líquido à temperatura ambiente e com sua cor mágica, fascina o ser humano. Essa antiga relação entre homem e o mercúrio foi e ainda hoje é objeto de vários estudos (Clarkosn, 1997; Mela *et al.*, 2007; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999, 2002, 2006, 2008).

O nome mercúrio é uma homenagem ao planeta Mercúrio. Já na mitologia romana, mercúrio é o mensageiro dos deuses. No intuito de evitar confusões (metal, planeta, outros) os gregos chamaram o metal de Hidrargiro, palavra introduzida por Aristóteles, do grego hydro (água) e árgyros (prata). Já os romanos transcreveram essa expressão para o latim como *Hidrargyrum*. Posteriormente, os árabes utilizaram a denominação azougue, ainda empregada popularmente (Clarkosn, 1997). No Brasil também empregamos essa designação, termo comum na linguagem de mineradores e garimpeiros do ouro, que aplicam o mercúrio no processo de amalgamação (Bueno, 1976).

Na antiguidade os minérios de mercúrio eram valorizados por sua densidade e por sua cor, vermelho-dourada, muito requerida como pigmento de decoração. Esta talvez tenha sido sua primeira forma de utilização, que perdurou até o início do século XX. O primeiro uso não decorativo do mercúrio foi na amalgamação, processo estudado por Vitruvius, famoso arquiteto romano. Ele observou que o mercúrio dissolvia prontamente o ouro e descreveu o método para a recuperação deste metal nobre usado nas vestimentas (Graeme & Pollock, 1998).

Os antigos faziam uso terapêutico do mercúrio, desconhecendo seus efeitos tóxicos, sendo que no século XVI seus compostos foram empregados na tentativa de cura de quase todas as doenças. Ele foi muito utilizado no tratamento da sífilis em pomadas para massagem cutânea (Waldron, 1983).

Por ser pouco absorvido pelos intestinos e não causar efeito nocivo local, o mercúrio metálico, até o século XIX, foi empregado no tratamento da obstrução intestinal (Cantor, 1947). O mercurocromo, anti-séptico de composto organomercurial, continua sendo usado em algumas partes do planeta.

O mercúrio foi a primeira entidade química a ser objeto de legislação para controle de doenças causadas em trabalhadores. O Hidrargirismo ou mercurialismo (intoxicação crônica por mercúrio), a mais antiga das doenças profissionais conhecidas, foi descrito por Pope em 1665, embora Paracelso já o tivesse mencionado em 1567 (Azevedo, 2003).

No que concerne à história da toxicologia dos compostos organomercuriais, a síndrome neurotóxica causada pelo Metilmercúrio foi documentada provavelmente pela primeira vez em 1940 (Hunter *et al.*, 1940). Hunter *et al.* (1940) descreveram a inalação e intoxicação por Metilmercúrio em quatro trabalhadores de uma indústria produtora de fungicidas mercuriais. A autópsia de um dos trabalhadores revelou acentuada lesão neuronal e atrofia cerebral com perda cortical. Assim este tipo de intoxicação por mercúrio orgânico passou a ser conhecida pela síndrome de Hunter-Russel.

### **1.2.1 Ocorrência**

O mercúrio ocorre no meio ambiente associado a outros elementos. O mais comum é o enxofre, com quem forma o minério cinabre (HgS), composto de cor vermelha ou preta cujas maiores reservas encontram-se na Espanha (Almadén) e na Itália (Azevedo, 2003). Outras fontes naturais de mercúrio são: erupções vulcânicas, evaporação natural e minas de mercúrio. O aporte antrópico ocorre através de indústrias que queimam combustíveis fósseis, produção eletrolítica de cloro-soda, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de mercúrio, baterias, produtos odontológicos, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, entre outros (Malm *et al.*, 1990; Clarkson, 1997).

A distribuição das diversas espécies de mercúrio que entram no ambiente aquático é regulada por processos físicos, químicos e biológicos, os quais ocorrem nas



interfaces ar/água e água/sedimento (Clarkson, 1997). A conversão entre as diferentes formas é a base do complexo padrão de distribuição de mercúrio em ciclos locais e globais e de seu enriquecimento biológico (Horvat, 1996).

Sejam quais forem os processos que regulam estes ciclos, o mercúrio que aporta nos diferentes compartimentos ambientais pode apresentar-se como inorgânico e/ou orgânico. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar ( $\text{Hg}^0$ ), o qual se encontra principalmente na forma de gás, o íon mercurioso ( $\text{Hg}_2^{+2}$ ), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{+2}$ ) (Clarkson, 1997, 2002). Na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o Metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) e o dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) os mais comuns, ou ainda com ligantes orgânicos naturais (Jardim, 1988; Horvat, 1996).

A troca de espécies inorgânicas para formas metiladas é o primeiro passo no processo aquático de bioacumulação. Considera-se que estes processos ocorram tanto na coluna de água quanto no sedimento (Azevedo, 2003). O mecanismo de síntese do metilmercúrio ainda não foi completamente elucidado e, apesar deste composto ser a forma predominante do mercúrio em organismos superiores, este representa apenas uma pequena fração do mercúrio total em ecossistemas aquáticos e atmosféricos (Lacerda, 1995).

Assume-se que as reações de metilação e desmetilação ocorram em todos os compartimentos ambientais, sendo que cada ecossistema atinge seu próprio estado de equilíbrio com respeito às espécies individuais de mercúrio. No entanto, devido à bioacumulação de metilmercúrio, a metilação prevalece sobre a desmetilação em ambientes aquáticos (Lacerda, 1995; Horvat, 1996).

Uma vez formado, o metilmercúrio entra na cadeia alimentar através da rápida difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática, atingindo sua concentração máxima em tecidos de peixes do topo da cadeia alimentar aquática devido à biomagnificação. Os principais fatores que afetam os níveis de metilmercúrio em peixes são: dieta, nível trófico da espécie, idade do peixe, atividade microbiana, concentração de mercúrio na camada superior do sedimento local, conteúdo de carbono orgânico dissolvido, salinidade, pH e potencial redox (Anderson *et al.*, 1995; Horvat, 1996; Mela *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Mercúrio orgânico**

Os compostos orgânicos formam uma importante classe de organometálicos, os quais recebem atenção especial. Eles se caracterizam pela união do mercúrio a um ou dois átomos de carbono, por meio de ligação covalente, para formar moléculas do tipo R-HG-X e HG-R', em que R e R' representam agrupamentos orgânicos. A ligação carbono-mercúrio é quimicamente estável, não sendo rompida em água e nem por ácidos ou bases fracas (Azevedo, 2003).

Algumas vezes, a expressão metilmercúrio é adotada para designar os compostos monometilmercuriais. Em alguns casos, a identidade exata desses compostos não é conhecida, exceto que contem metilmercúrio,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , associado tanto a um simples ânion, como o cloreto, quanto a moléculas de alto peso molecular, como proteínas com cargas negativas ou positivas (Who, 1990).

Deve-se salientar que os organomercuriais são os derivados mais considerados do ponto de vista toxicológico.

### **1.2.3 Contaminação dos ambientes**

Muito do mercúrio descartado no ambiente pelas atividades antrópicas certamente está se incorporando aos ciclos geoquímicos e às cadeias tróficas, aumentando suas concentrações nos ecossistemas e passando a representar perigo para vegetais, animais e o próprio homem, o qual, contudo, parece que tem ignorado tal situação. Portanto, é necessário conhecermos o nível de risco ao qual estamos expostos para então vigiarmos todas as atividades emissoras de mercúrio no ambiente. O crescimento econômico precisa ser feito de forma controlada, sem pôr em risco a existência do planeta. Além disso, não se deve esquecer que o homem pertence à níveis tróficos superiores e pode ser um dos organismos mais afetados na contaminação das cadeias alimentares pelo mercúrio.

O mercúrio resiste à processos naturais de degradação, podendo permanecer por muitos anos sem perder sua toxicidade. Ao atingir ambientes aquáticos, a forma inorgânica do mercúrio pode sofrer reações mediadas principalmente por microorganismos que alteram seu estado inicial, resultando em compostos organomercuriais, como o metilmercúrio, mais tóxico que as espécies inorgânicas. O metilmercúrio é facilmente absorvido por peixes e outros animais aquáticos, o que provoca a deposição dessa substância química nos tecidos desses animais, a qual se

acumula ao longo do tempo, atingindo, na cadeia biológica, concentrações bem maiores que as originalmente encontradas no ambiente (Câmara *et al.*, 1998; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999, 2002).

#### **1.2.4 O Mercúrio no Brasil**

A corrida do ouro no Brasil data do século XVII, quando o país era o principal produtor mundial. Após a quase exaustão das reservas conhecidas, a partir do final do século XIX o Brasil passou a produzir apenas cinco toneladas anuais até a década de 70 quando, pelos fatos socioeconômicos do país e pelo aumento do preço internacional do ouro, a região norte foi invadida por cerca de 600 mil garimpeiros, chegando a produzir 180 toneladas anuais de ouro.

Nos últimos 20 anos o garimpo de ouro na região norte do Brasil pode ter liberado três mil toneladas de mercúrio para o meio ambiente, gerando grave problema de contaminação. Desde então, o garimpo revelou-se como um assunto polêmico, em função da diversidade das questões sociais, políticas, econômicas e dos problemas ambientais gerados, com a utilização do mercúrio no processo de extração e a emissão do mercúrio para o ambiente (Santos *et al.*, 2002).

O risco de contaminação por mercúrio, originada nos garimpos de ouro, ainda é alvo de preocupação na área ambiental e da saúde pública. Em relação às populações humanas, uma das possíveis vias de exposição é por meio da ingestão de alimentos contaminados. Este aspecto cresce em importância quando se trata de comunidades ribeirinhas, onde o pescado é a base da dieta protéica diária (Dorea, 2003).

Aproximadamente 2g de mercúrio são usados na produção de 1g de ouro, dos quais 50% são introduzidos nos rios pelos efluentes. Estudos já demonstraram que ocorre contaminação dos sedimentos dos rios e águas próximas de zonas de mineração, além da evidência de contaminação de peixes carnívoros da região que são consumidos pela população ribeirinha. Observou-se também uma elevada exposição dos mineiros e comerciantes de ouro ao Hg inorgânico, resultante da queima do amálgama de Au/Hg (Pfeiffer *et al.*, 1990).

Estudos mais recentes indicam que o homem não é o único responsável pelas emissões de mercúrio na Amazônia. Em avaliações de características climáticas há 30.000 anos atrás foi possível associar o clima mais seco predominante na Amazônia neste período à emissões mais importantes de mercúrio (Lacerda & Salomons, 1997). A

explicação dada por Lacerda & Salomons indica que a presença mais intensas de incêndios florestais laçaria o mercúrio presente nos solos e na biomassa vegetal na atmosfera, aumentando assim as concentrações do metal em ambientes menos sujeitos à queima (igarapés, por exemplo).

Uma discussão foi lançada por pesquisadores brasileiros e canadenses que encontraram concentrações bastante elevadas de mercúrio nos solos amazônicos (Roulet & Loucotte, 1996,1998). Segundo estes pesquisadores o mercúrio formaria algum tipo de complexo com o ferro. A natureza destes complexos é ainda incógnita, já que a relação entre estes dois metais foi detectada a partir de coeficientes de correlação feitos em perfis de solo. Segundo estes autores esta associação seria amplamente verificável em toda a Amazônia e assim o mercúrio teria uma origem natural e não antropogênica como se imaginava. Nestes mesmos estudos, foram realizados balanços das emissões oriundas da retirada de ouro na Amazônia e os autores chegaram à conclusão de que seria necessário dez vezes mais garimpo para justificar as quantidades observadas, concluindo assim, que 90% do mercúrio presente nos solos seria natural (Roulet & Loucotte, 1998).

Observamos que as concentrações de mercúrio nas águas devem ser baixas, em razão da baixa solubilidade do elemento (Lechler *et al.*, 2000). Por outro lado a parte atmosférica do ciclo do mercúrio deve ter importância significativa dada a baixa pressão de vapor (Amouroux *et al.*, 1999). A Figura 8 indica que ele deve ser volatilizado para a atmosfera como mercúrio metálico ( $Hg^0$ ), sofre oxidação, e deve retornar junto com a água de chuva na forma iônica ( $Hg^{+2}$ ) (Amouroux *et al.*, 1999). Os solos representam um reservatório de mercúrio onde a sua permanência é mais longa do que nos outros compartimentos, justificando assim sua maior concentração. Nos sedimentos do fundo dos rios as concentrações de mercúrio observadas são relativamente baixas demonstrando que o meio aquático não é uma via de transporte importante para este elemento (Lechler *et al.*, 2000). Outro ponto é a metilação do mercúrio. O mercúrio inorgânico apresenta uma toxicidade relativamente baixa, mas a ação das bactérias organificam este elemento formando o metilmercúrio.

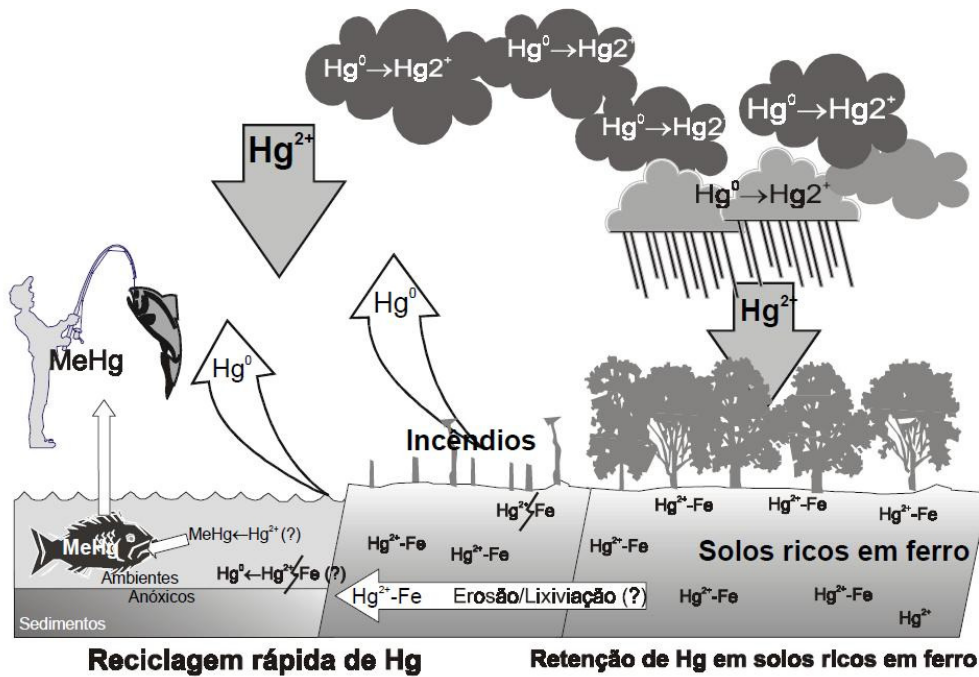


Figura 8 - O ciclo do mercúrio na Amazônia. Modificado de Wasserman *et al.* (2001)

### 1.2.5 Toxicidade do mercúrio

Particularmente na última década do século XX, cientistas, legisladores, políticos e o público aumentaram sua consciência da poluição causada pelo Hg. As emissões antropogênicas aumentaram a contaminação por Hg em escala local, regional e global.

O Hg, poluente tóxico e ubíquo, encontra-se entre os mais biomagnificados metais da cadeia alimentar e está sendo apontado por várias agências nacionais, internacionais e comissões para possível controle de emissões (Azevedo, 2003).

Muitos artigos publicados enfocam a toxicidade e a ecotoxicidade do mercúrio e do metilmercúrio, os quais se centram no conhecimento dos efeitos nos organismos resultantes das doses e concentrações de mercúrio administradas. Os dados são em maior parte, de estudos laboratoriais e epidemiológicos. Apesar do grande número de investigações da toxicidade do mercúrio sobre a vida aquática e terrestre, os efeitos deste metal na organização biológica não são bem compreendidos (USEPA, 1997).

O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial que expôs o risco eminente do mercúrio ocorreu por volta de 1953 na baía de Minamata, sudoeste do Japão. Uma planta química da Chisso Corporation utilizava sulfato de mercúrio como catalisador para a produção de ácido acético e seus derivados e cloreto de mercúrio como catalisador na produção de cloreto de vinila, sendo que o metilmercúrio era um subproduto na síntese de acetaldeído (Lacerda, 1997). O metilmercúrio que era

despejado no efluente contaminou a biota marinha e águas de suas vizinhanças, chegando até a população através da ingestão de peixes e frutos do mar (Clarkson, 2002). A “Doença de Minamata” foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados, sendo então vários casos similares encontrados, atingindo níveis epidêmicos. Desde 1953 fatos até então inexplicáveis estavam sendo observados próximos à baía de Minamata: um número de pessoas passou a sofrer entorpecimento de seus dedos, lábios e línguas; mortes de peixes e mariscos foram observadas, enquanto pássaros e gatos morriam violentamente com desordens nervosas (Sakamoto *et al.*, 2000).

A proporção exata deste acidente é incerta, uma vez que os números variam nas diversas fontes da literatura consultadas. No entanto, as estimativas mais pessimistas apontam que a Chisso descartou na baía algo em torno de 200 a 600 toneladas de metilmercúrio em seu afluente, até a interrupção do uso deste processo de produção de acetaldeído em 1968 (Jardim, 1988). Até 1997 o número de vítimas fatais já havia chegado a 887, sendo que mais de 2209 casos da chamada “Doença de Minamata” haviam sido registrados (Tubino & Magalhães, 1997). Somente em Setembro de 1997, mais de 40 anos após a descoberta oficial do problema, foram retiradas as redes que dividiam a baía em uma área de peixes contaminados e outra livre do metal (Lacerda, 1997).

Outros acidentes no Irã, Paquistão e Guatemala, causados pelo uso de metilmercúrio como fungicida para tratamento de sementes de grãos, permitiram confirmar o problema do uso intensivo do mercúrio, principalmente na forma de compostos organomercuriais (Clarkson, 2002).

Todavia, a toxicidade do mercúrio varia nos seus diferentes compostos. A forma orgânica é extremamente tóxica, não apenas para o ser humano, mas para toda a biota. Devido ao radical orgânico, esta espécie pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso central (Carta *et al.*, 2003).

No plasma a alta afinidade do MeHg com os compostos contendo o grupo sulfidríla, como a cisteína, resulta em um conjugado metilmercurio-cisteína o qual é transportado através da barreira hematoencefálica chegando ao SNC (Aschner *et al.*, 1988). Uma vez no organismo, ele rapidamente se converte em um complexo protéico, mantendo grande mobilidade através dos tecidos animais. A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais também facilita a sua passagem através dos tecidos. Estes

compostos também podem ser absorvidos pela pele, e aproximadamente 95% (comparado com menos de 10% para compostos inorgânicos) pelo trato gastrointestinal (Who, 1989).

O mercúrio orgânico ultrapassa facilmente a barreira placentária, sendo o feto mais sensível a menores concentrações de mercúrio como observado nos adultos. O quadro clínico típico das crianças geradas sob tais exposições é também dose-dependente e inclui microcefalia, hiper-flexia, deficiência visual, auditiva, mental e motora (IPCS, 1990).

No Brasil, estudos sobre a contaminação de mercúrio em peixes da Amazônia mostram que o metilmercúrio corresponde a 90% da concentração total de Hg analisado e a dieta da maioria da população indígena e ribeirinha é constituída de peixe, aumentando assim a exposição desta população às fontes de contaminação de mercúrio. No entanto, o consumo de peixe por esta população é dez vezes menor que em Minamata, onde a concentração de mercúrio em peixes era de 2 a 10 vezes maior que as encontradas atualmente nos peixes mais contaminados da Amazônia. Todavia, estes últimos apresentam concentrações até cinco vezes as máximas permitidas em peixes para o consumo humano (Micaroni *et al.*, 2000).

### **1.2.6 O mercúrio em peixes**

Tem-se observado concentrações bastante elevadas de mercúrio em peixes, particularmente aqueles carnívoros e que têm maior longevidade (Akagi *et al.*, 1995; Bidone, 1997). O fenômeno é explicado pela elevada bioacumulação do mercúrio ao longo da cadeia trófica. Assim, as algas e plantas aquáticas apresentam concentrações poucas vezes maiores do que as das águas. Os peixes que consomem exclusivamente estas algas e plantas têm concentrações algumas vezes maiores que as das algas e plantas e assim por diante até atingirmos peixes como o pintado ou a piranha, que apresentam concentrações até um milhão de vezes superiores as da água. O enriquecimento dos peixes de maior longevidade está relacionado ao fato de o mercúrio ser muito dificilmente eliminado pelo organismo (Lacerda, 1995). Assim, à medida que o organismo envelhece, suas concentrações em mercúrio aumentam constantemente e os organismos que vivem mais tempo vão ter maiores concentrações de mercúrio.

Outro aspecto que aumenta ainda mais o potencial de contaminação dos peixes é que à medida que subimos a cadeia trófica, não apenas a concentração de mercúrio

umenta, mas também vai ocorrendo transformação em metilmercúrio. Em um peixe carnívoro adulto podemos encontrar mais de 90% de mercúrio na forma metilada, porém na água este valor não ultrapassa os 2% (Diego *et al.*, 1999).

### **1.2.7 Efeitos da intoxicação mercurial no sistema visual**

O sistema visual é um importante alvo da intoxicação mercurial (Iwata & Abe 1986). Investigações de aspecto neuro-oftalmológicos após a intoxicação mercurial foram inicias por Iwata & Abe com análises do campo visual onde significativas diminuições nas funções visuais foram observadas em crianças e adultos expostos ao metal, incluindo cegueira. (Iwata & Abe 1986).

A avaliação das funções visuais após administração de mercúrio já foi estudada em vários modelos animais: peixes (Hawryshyn *et al.*, 1982; Tanan *et al.*, 2006, Bonci *et al.*, 2006), anfíbios (Tessier-Lavigne *et al.*, 1985), mamíferos como gatos (Gitter *et al.*, 1988) e primatas não-humanos (Rice & Gilbert 1992; Warfing & Bruun 1996, 2000).

Em humanos, existem vários relatos sobre os efeitos tóxicos da exposição mercurial nas funções visuais (Lebel *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 1999, 2003; Ventura *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c, 2004, 2005; Lago, 2005). Nos estados tardios existe comprometimento severo do campo visual periférico (Igata, 1993), disfunção da visão central, compreendendo perda da sensibilidade ao contraste acromático para modulações espacial e temporal (Lebel *et al.*, 1998). Em estágios precoces ocorreu diminuição da sensibilidade ao contraste espacial acromático, cromático verde-azul e verde-vermelho e os limiares de discriminação de cores apresentaram perdas difusas, todos testados com técnicas modernas de psicofísica computadorizada (Silveira *et al.*, 1999, 2003).

Em um estudo neurológico realizado no Iraque com 53 adultos contaminados com MeHg, 60% dos sujeitos apresentaram distúrbios visuais (Rustam & Hamdi, 1974). Os sintomas incluem constrição do campo visual, redução da acuidade e cegueira. Em humanos em desenvolvimento expostos à altos níveis de MeHg, além desses sintomas a exposição pode causar distúrbios oculomotores (Amin-Zaki *et al.*, 1979; Marsh *et al.*, 1980); enquanto que baixos níveis de exposição estão associados à diminuição da acuidade visual (Harada *et al.*, 1968).



Em peixes existem poucas evidências dos efeitos da exposição ao Hg na visão. Hawryshyn *et al.* (1982) demonstraram a redução da sensibilidade espectral em truta arco-íris contaminadas através de injeção intraperitoneal com MeHg. A redução da sensibilidade envolve ambos os mecanismos: fotópico e escotópico. Estes não coincidem com os resultados obtidos por Fox & Sillman que sugeriram alterações apenas no mecanismo escotópico (Fox & Sillman, 1979).

Um estudo recente usando a retina de *Hoplias malabaricus*, expostas ao MeHg (Tanan *et al.*, 2006) examinou a fisiologia das células horizontais e encontrou alterações nas respostas eletrofisiológicas tanto na exposição aguda como na exposição subcrônica ao MeHg. Outro trabalho realizado com a mesma espécie (Bonci *et al.*, 2006) descreveu a diminuição da imunoreatividade das células amácrinas e células bipolares após altas doses intraperitoneais de MeHg (2 µg/g e 6 µg/g).

Apesar dos casos relatados durante séculos a respeito dos efeitos tóxicos do mercúrio, atualmente ainda faz-se uso deste metal em diversas áreas expondo a população à sua toxicidade.

### **1.3 Estudos de toxicidade subcrônica**

Experimentos de toxicidade subcrônica são realizados para se obter informações sobre a toxicidade de uma substância após exposições repetidas num período de tempo que pode durar de 21 até 90 dias. Esses estudos objetivam estabelecer os níveis nos quais não se observam os efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados assim como a severidade após exposições repetidas, observar se os efeitos são devidos a um acúmulo da substância ou não e se eles são reversíveis. A via de administração geralmente é oral. Esses testes servem não apenas para caracterizar a relação dose/resposta após administrações repetidas, mas também fornecem dados para escolha de doses nos estudos de exposição crônica, pois geralmente não avaliam o potencial mutagênico da substância.

### **1.4 O uso do bioensaio**

O uso do bioensaio contribui com importantes informações para estudos em toxicologia ambiental, sendo uma ferramenta relevante para o diagnóstico de áreas impactadas. Este método minimiza a influência de variáveis ambientais, possibilitando a obtenção de dados e padronização de metodologias que possam prever ou avaliar o efeito do contaminante. Apesar de não ser possível extrapolar todos os resultados

obtidos integralmente para o ambiente, estes auxiliam na construção de um banco de dados úteis para a compreensão dos fatores que interferem na saúde dos organismos aquáticos e do ambiente em que vivem (Akaishi, 2007).

### **1.5 O modelo animal**

Os peixes exibem variações morfofuncionais múltiplas, constituindo por esta razão uma das classes animais que mais oferece oportunidades de estudo. Esta realidade é consistente principalmente quando trabalhamos com uma única espécie, a qual poderá se tornar objeto perene de estudo de um pesquisador. Para tanto, basta considerar que, embora filogeneticamente sejam os vertebrados mais inferiores, os peixes constituem o grupo mais numeroso, formando ao todo cerca de 25.000 espécies. Perfazem aproximadamente 42% do total de vertebrados conhecidos, o que os torna uma superclasse.

Essa realidade já seria suficiente para justificar o grande número de pesquisadores que dedica sua atividade científica tentando esclarecer uma vasta gama de dúvidas. Deve-se acrescentar que tal atenção científica recebe um enorme reforço ao se considerar a importância econômica destes animais, tendo em vista seu valor nutritivo e facilidade de criação.

Muitos trabalhos em toxicologia utilizam os peixes como modelo animal de toxicidade. Fatores como a manutenção em laboratório, cuidados com a limpeza, alimentação, baixos custos para manutenção dos animais e a fácil aquisição dos exemplares favorece a utilização deste grupo em bioensaios.

Neste trabalho, a escolha da espécie para modelo experimental baseou-se principalmente na sua posição trófica em relação à cadeia alimentar sendo que esta posição reflete os efeitos de bioacumulação e biomagnificação do mercúrio. Peixes carnívoros situados no topo da cadeia alimentar apresentam altos níveis de mercúrio observados em análises de músculo quando comparados com animais onívoros e herbívoros sendo consumidos principalmente por populações ribeirinhas (Lima *et al.*, 2005). Outro critério foi sua ampla distribuição geográfica que ocorre em toda a América do Sul, principalmente nos rios da Amazônia intimamente relacionados com a atividade do garimpo (Fowler, 1950).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Peixes, intoxicados com metilmercúrio, apresentam efeitos negativos em todo o sistema nervoso central e existe um grande interesse em se estabelecer o mecanismo neuropatológico da intoxicação pelo mercúrio, respondendo a questões como: em que regiões do sistema nervoso este neurotóxico atua e qual a função celular primordialmente atingida.

O uso da histopatologia como biomarcador dos efeitos tóxicos do metilmercúrio não reside somente na sua sensibilidade em termos de níveis tóxicos, mas, sobretudo na divulgação de órgãos alvos e nos mecanismos de ação dos contaminantes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), traíra, visando conhecer o potencial tóxico deste composto, através de exposição experimental trófica e subcrônica.

#### **3.2 Objetivo específico**

Analisar, através de análises histopatológicas, os efeitos do metilmercúrio nos fotorreceptores da retina de *Hoplias malabaricus*, utilizando a técnica de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura;

Analisar o acúmulo de mercúrio total em músculo axial de *Hoplias malabaricus*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animal experimental: *Hoplias malabaricus*

A traíra (Figura 9) é um peixe teleósteo da classe Actinopteryii, ordem Characiformes, família Erythrinidae, gênero *Hoplias*, espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794).

Segundo Santos (1981) habita lugares com pouca profundidade onde haja vegetação aquática abundante, em águas calmas como açudes e lagoas e apresenta hábitos noturnos. Durante os primeiros anos de seu desenvolvimento são onívoras alimentando-se de micro crustáceos, algas e insetos aquáticos. Na fase adulta tornam-se essencialmente carnívoras, alimentando-se preferencialmente de peixes de pequeno porte como o lambari (*Astyanax* sp.) (Rios, 2001).

Segundo Hensley & Moody (1975) se os critérios para o sucesso de uma espécie forem abundância e distribuição ampla, *Hoplias malabaricus* pode ser considerada bem sucedida devido a sua grande plasticidade ecológica.

Esta espécie conta com uma resistência física privilegiada, capaz de afrontar variações climáticas das regiões que passa a habitar. A traíra pode sobreviver em ambiente pouco oxigenado o que explica sua grande capacidade de dispersão e ajuste além de apresentarem grande resistência aos períodos de privação de alimento (Paiva 1972; 1974; Machado *et al.*, 1989; Rios, 2001; Rios *et al.*, 2002).

Alguns estudos toxicológicos já foram realizados com esta espécie: análises histopatológicas de animais intoxicados cronicamente por MeHg (Mela *et al.*, 2007), análises hematológicas (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006), análises enzimáticas (Alves Costa *et al.*, 2006) e estudos histopatológicos de animais expostos ao chumbo (Rabbitto *et al.*, 2005). Avaliações toxicológicas do sistema visual também foram realizadas através de estudos eletrofisiológicos (Tanan *et al.*, 2006) e morfológicos (Bonci *et al.*, 2006) de animais expostos ao MeHg, mostrando a viabilidade da utilização deste animal em bioensaios, podendo ser considerado um excelente bioindicador de poluição ambiental.

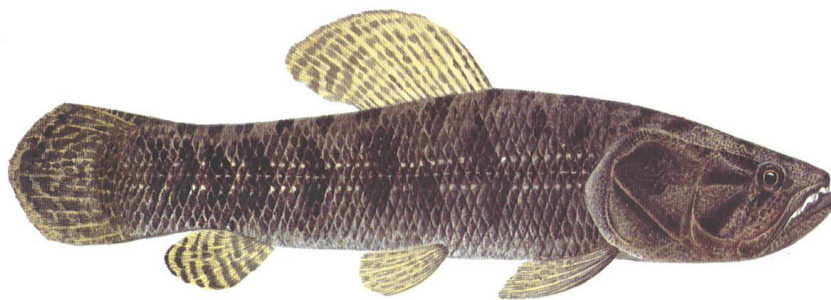


Figura 9 - Representação de um exemplar de *Hoplias malabaricus*. Modificado de Britzki *et al.* (1999).

#### 4.2 Desenho experimental – bioensaio

Os exemplares de *Hoplias malabaricus* foram capturados em uma estação de piscicultura na cidade de Araucária - PR e transportados para o Laboratório de bioensaio do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, onde cada indivíduo ocupou um aquário de 30L, contendo água filtrada (filtro de resina e carvão ativado) e aeração constante. A temperatura foi controlada e mantida através de aquecedores controlados por termostatos a uma temperatura média de 23°C. Um sistema de timer permitiu manter um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (Figura 10).

Antes do início do experimento, os exemplares foram pesados e divididos em três grupos. Um grupo foi utilizado como controle (n=15) e dois foram expostos ao MeHg (n=15) via alimento. As doses foram calculadas com base na massa de cada exemplar.

A exposição trófica e subcrônica foi realizada através de exemplares vivos de lambaris (*Astyanax* sp), os quais receberam intraperitonealmente um volume de solução aquosa de MeHg correspondente a doses de 0,075 µg Hg/g de traíra ou 0,75 µg Hg/g. A contaminação trófica foi realizada durante 70 dias correspondendo a 14 doses aplicadas após período de 5 dias de jejum. O grupo controle foi alimentado com a mesma espécie (*Astyanax* sp.) os quais receberam uma injeção intraperitoneal de água destilada. A dose de testada de 0,075 µg Hg/g foi baseada em concentrações do organometal encontradas em espécies forrageiras como o lambari proveniente de ambientes impactados por este contaminante.(Oliveira Ribeiro, 1995). A dose mais elevada de 0,75 µg Hg/g foi utilizada com intuito comparativo.



Figura 10 - Laboratório de bioensaio da Universidade Federal do Paraná. A; B; C: Aquários com aeração, oxigenação e temperatura controlada. D: aquários com as presas utilizadas (*Astyanas* sp.) para alimentar os exemplares de *Hoplias malabaricus*. E: exemplar de *Astyanas* sp recebendo injeção intraperitoneal de MeHg. F: exemplar de *Hoplias malabaricus*.

### **4.3 Coleta de material biológico**

Após 70 dias de exposição ao MeHg, os animais foram anestesiados com MS222 0,02% (ácido etil-éter-3-amino-benzóico, Sigma), sacrificados após secção medular, e os olhos coletados para as análises seguintes.

### **4.4 Processamento morfológico do material biológico**

#### **4.4.1 Histopatologia**

##### **Microscopia de Luz**

Após a remoção dos olhos, estes foram imersos em fixador Alfac durante um período de 16 horas. Após a fixação o material foi transferido para álcool a 70%, substituído várias vezes antes da desidratação. Após esta fase, as peças passaram pelo processo da desidratação em série alcoólica crescente, o que ocasionou uma retirada lenta e suave da água, para evitar uma alteração tecidual e celular. Na seqüência, as peças sofreram diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Paraplast Plus® (Sigma) 56°C. Na última fase, a emblocagem, o material foi posicionado em formas específicas, com o intuito de se obter cortes longitudinais ou radiais à retina durante o processo de confecção das lâminas histológicas permanentes. Os blocos obtidos foram trimados para a obtenção dos cortes histológicos com espessuras de cinco micrômetros. Os cortes feitos foram colocados em lâminas recobertas com uma fina camada de albumina de Mayer e água, sendo que a distensão destes foi realizada em placa aquecedora. Para a montagem das lâminas permanentes realizou-se as seguintes etapas: desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e montagem. As colorações utilizadas nas análises foram: Coloração de Hematoxilina e Eosina, a qual permite a identificação e a localização dos tipos celulares existentes na retina. Nesta coloração os elementos basófilos nucleares e citoplasmáticos foram corados com a hematoxilina, enquanto que as estruturas acidófilas citoplasmáticas foram coradas pela eosina. A técnica de Novelli ou método de verde luz foi empregada para evidenciação das mitocôndrias nas células fotorreceptoras. As lâminas foram analisadas e fotografadas no fotomicroscópio Leica DME da Universidade Federal do Paraná.



### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Finalizada a remoção dos olhos os mesmos foram enucleados e a cuia óptica foi seccionada ao meio em placa de Petri. Uma determinada parte da retina foi seccionada em porções de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e fixada durante duas horas em fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2% + tampão cacodilato 0,1M). Após o tempo de fixação o material foi transferido para tampão cacodilato 0,1M onde permaneceu até o momento do processamento. O processamento do material seguiu com a pós-fixação em tetróxido de ósmio durante 1 hora. A retirada do ósmio foi realizada com lavagens em cacodilato e água destilada. Nova pós-fixação foi feita com acetato de uranila 2% também por um período de 1 hora, com lavagens consecutivas em água destilada. Em seguida deu-se início a desidratação do material, em série alcoólica em concentrações crescentes e a subsequente substituição do etanol por óxido de propileno. Na sequência, procedeu-se a pré-infiltração do material em uma mistura com partes iguais de resina Polyembed 812 Polyscience co. e óxido de propileno por um período de 24 horas em temperatura ambiente. Seguiu-se a infiltração e inclusão do material em resina pura, a qual foi polimerizada em estufa regulada para 60°C por um período mínimo de 24 horas. Depois da total polimerização da resina, os blocos foram trimados com lâminas metálicas e auxílio de uma lupa, removendo dessa forma o excesso de resina ao redor do material e de maneira a posicioná-lo no ápice de uma pirâmide. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalhas de diamante, tendo estes a espessura entre 50 e 70 nm. Após estarem secos, os cortes foram contrastados com solução de acetato de uranila 2% e em solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação e captura de imagens no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200 EX II, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Após a remoção dos olhos uma determinada parte da retina foi seccionada e imersa no fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2% + tampão cacodilato 0,1M) onde permaneceram por vários meses. No início do protocolo o material foi colocado em tampão cacodilato 0,1M para lavagem e remoção do fixador, seguindo com a desidratação do material em bateria com diferentes concentrações alcoólicas. Após esta fase, as peças passaram pelo processo do ponto crítico de CO<sub>2</sub>

(CDP-Blazers) e em seguida pelo processo de metalização do material com ouro (SCD-030-Blazers-Union). A observação e captura de imagens foi realizada no Microscópio Eletrônico de varredura Philips-XL (LAB LAOTEC/UFPR), do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

#### **4.5 Concentração de Hg em músculo de *Hoplias malabaricus***

Uma parte de músculo foi removida de cada animal e individualmente congelada para posterior análise de mercúrio total nestes tecidos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de absorvância atômica ICP-EAS da Varian - modelo liberty II com um acessório de geração de vapor a frio (Flow Injection Mercury System-FIMS-400-Perkin Elmer, Ueberlingen, Germany). O procedimento de extração química de mercúrio total em amostras de tecido de peixe utilizada foi descrita por Bastos *et al.* (1998). As análises foram desenvolvidas na Universidade de Rondônia (UNIR) no laboratório de biogeoquímica ambiental. A precisão e exatidão das amostras foram asseguradas pelo uso de padrões preparados e confirmados por material de referência (Dogfish Muscle-DORM-2-National Research Council of Canadá, Ottawa) e pelo uso de intercalibração entre laboratórios brasileiros e amostras de referência interna AFPX 5130. A concentração total de metilmercúrio foi analisada estatisticamente através do programa estatístico GraphPad InStat V.3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Condições experimentais

Não houve mortalidade de *Hoplias malabaricus* durante o bioensaio de exposição subcrônica, e os indivíduos testados permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento.

### 5.2 Concentração de Hg em músculo de *Hoplias malabaricus*

Houve um aumento significativo da concentração de mercúrio (ANOVA, pós-teste Tukey) no músculo de ambos os grupos expostos ao MeHg quando comparados com o controle. A concentração média de Hg em músculos foi de  $0,14 \pm 0,05$   $\mu\text{g Hg/g}$  para o controle,  $1,45 \pm 0,39$   $\mu\text{g Hg/g}$  para a menor dose ( $0,075$   $\mu\text{g Hg/g}$ ) e  $4,56 \pm 0,63$   $\mu\text{g Hg/g}$  para a maior dose ( $0,75$   $\mu\text{g Hg/g}$ ).

### 5.3 Organização estrutural e ultraestrutural da retina de *Hoplias malabaricus*

Nos cortes histológicos foi encontrado o típico arranjo do mosaico dos cones apresentado pela maioria dos teleósteos. Neste mosaico em forma de quadrado foram identificados cones pareados (duplos ou gêmeos) e cones simples (Figura 11A; Figura 11B). Através de análises estruturais e ultraestruturais foi possível observar a morfologia dos fotorreceptores: bastonetes (Figura 13A; Figura 13B; Figura 13C); cones pareados (Figura 12C; Figura 13E) e cones simples (Figura 13D). Os cones pareados são uma característica proeminente em *H. malabaricus*. São células compostas por dois elementos unidos por duas membranas justapostas na região dos segmentos internos. Estas membranas são paralelas e separadas por um espaço extracelular (Figura 11C ; Figura 11D).

Os fotorreceptores apresentam uma morfologia padrão. O segmento externo com os discos lamelares contendo o pigmento visual (Figura 17A; Figura 17B) está ligado ao segmento interno por um cílio conector (Figura 17D; Figura 17E). O segmento interno apresenta mitocôndrias, ribossomos, complexo de golgi, microtúbulos e o núcleo da célula (Figura 11C; Figura 12A; Figura 12B; Figura 12E).

O terminal sináptico dos bastonetes apresenta uma forma esférica e é chamada de esférula do bastonete (Figura 18B). Estas sinapses são muito menos complexas que

as sinapses dos terminais dos cones e uma ou duas sinapses são observadas. As sinapses dos cones são chamadas de pedículo dos cones (Figura 18A).

Longos filamentos membranosos conhecidos como processos caliciformes partem da região apical dos segmentos internos de ambos os fotorreceptores (cones e bastonetes) para envolver o segmento externo, exceto na porção terminal (Figura 13F; Figura 17F). Observa-se também o segmento externo acessório ao longo do segmento externo dos cones (Figura 12D).

Nos organismos expostos ao MeHg observa-se o mesmo conjunto de células, ou seja, grande quantidade de bastonetes, cones simples e cones pareados (cones duplos ou gêmeos). Áreas com tecido alterado em ambas as doses utilizadas neste estudo foram encontradas: alterações nas membranas que unem os dois elementos (cone principal e cone acessório) de um cone pareado (Figura 14A; Figura 15A) e nítida degeneração celular na camada dos fotorreceptores (Figura 14B; Figura 15B) cuja intensidade foi maior na dose de 0,75 µg Hg/g. Além destas alterações, alterações na morfologia do segmento interno (Figura 16A) e do segmento externo (Figura 16B) dos bastonetes foram observadas na dose de 0,75 µg Hg/g.

As membranas dos discos dos bastonetes não apresentam continuidade com a membrana plasmática do segmento externo (Figura 17C). Já nos cones, os discos são invaginações da membrana plasmática e apresentam contato direto com o meio extracelular. Na maior dose (0,75 µg Hg/g) encontramos nítidas alterações estruturais nesta membrana (Figura 19F).

Como já descrito na literatura, nos fotorreceptores os discos membranosos localizados no segmento externo migram para a extremidade da célula para serem fagocitados pelas células do epitélio pigmentar (Figura 19A), porém na dose de 0,75 µg Hg/g houve a formação de vacúolos nestas extremidades (Figura 19B) e a eliminação dos discos membranosos pelas partes laterais das células fotorreceptoras (Figura 19C; Figura 19D). Também houve uma descontinuidade na estrutura dos discos lamelares nos bastonetes na menor dose testada (0,075 µg Hg/g) (Figura 19E).

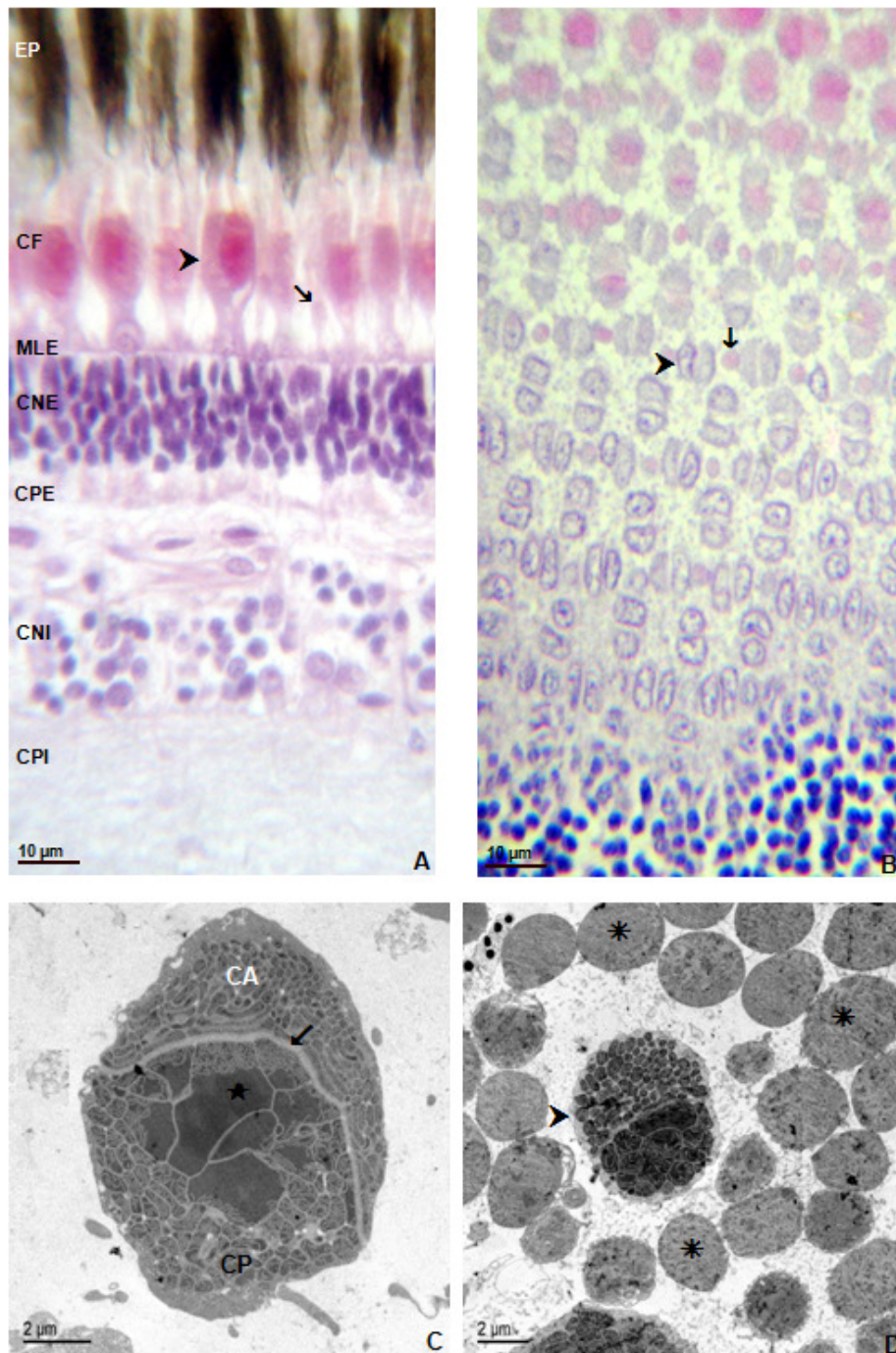


Figura 11 - Retina de *Hoplias malabaricus*, traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Grupo controle. A: Fotomicrografia de corte radial de retina, cone duplo (>) e cone simples (>). Coloração: H.E. B: Fotomicrografia de corte tangencial da retina, no nível dos segmentos internos dos fotorreceptores. Cone simples (↓), cone pareado (>). Coloração H.E. C: Eletromicrografia de um corte tangencial de um cone duplo, composto por dois elementos, cone principal (CP) e cone acessório (CA). As membranas de cada unidade são justapostas na região do segmento interno e separadas por um espaço extracelular (↖), mitocôndrias (★). D: Eletromicrografia de corte tangencial de um cone duplo (>) e bastonetes (\*).

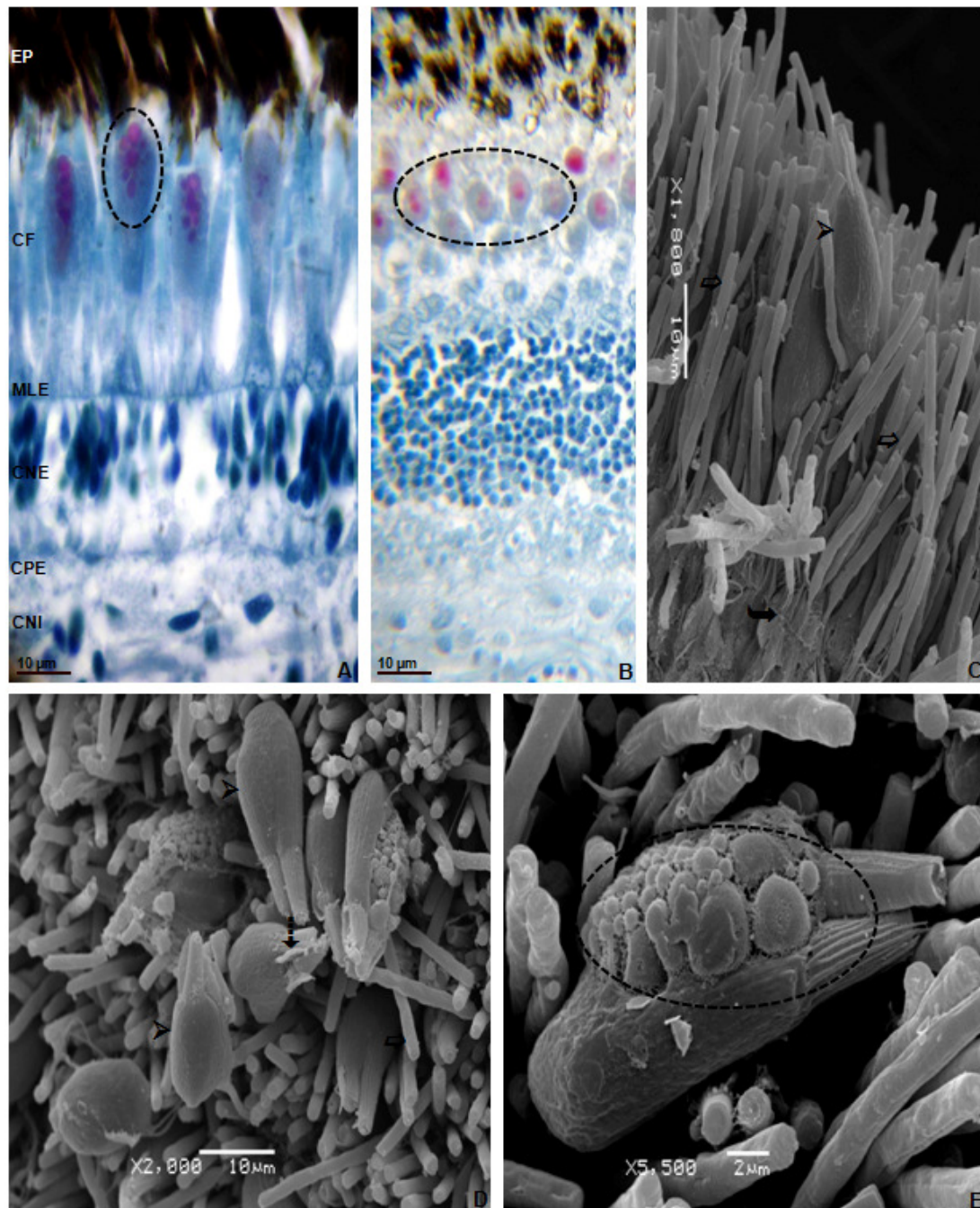


Figura 12 - Retina de *Hoplias malabaricus*, traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Grupo controle. A: Fotomicrografia de corte radial de retina com evidênciação das mitocôndrias no interior dos segmentos internos dos fotorreceptores. Coloração de Novelli. B: Fotomicrografia de corte tangencial da retina. Evidênciação das mitocôndrias no interior dos segmentos internos. Coloração de Novelli. C e D: Eletromicrografia de varredura mostrando a morfologia da retina de traíra. Cones pareados (>), bastonetes (⇄), membrana limitante externa (↪) e segmento externo acessório (↓). E: Eletromicrografia de varredura de um cone pareado com mitocôndrias expostas no segmento interno.



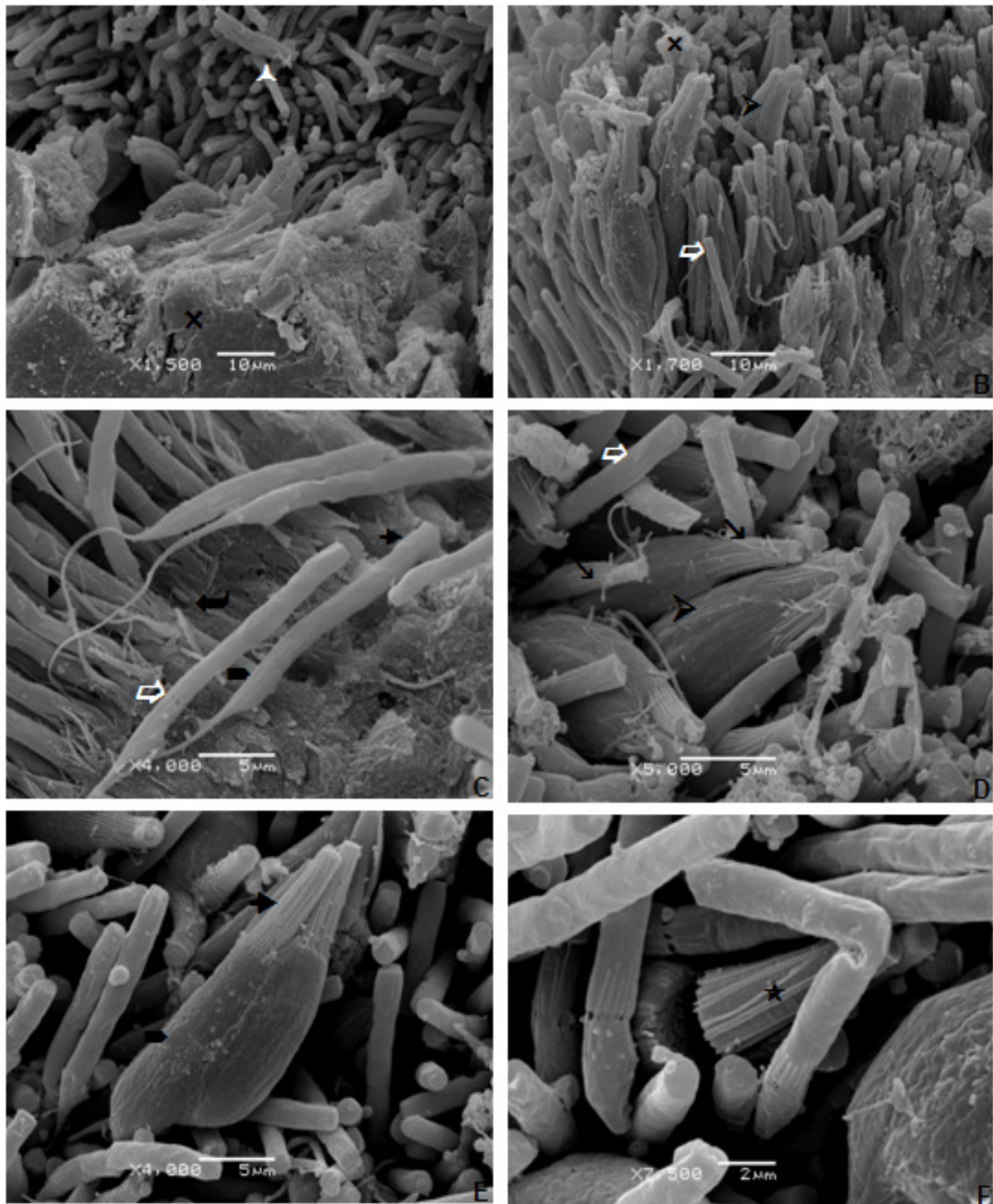


Figura 13 - Retina de *Hoplias malabaricus*, traíra, sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Grupo controle. A: Epitélio pigmentar (x) fotorreceptores (▲). B: Grânulo de melanina (x), cone pareado (➤), bastonete (⇨). C: Bastonete (⇨), segmento interno (●), segmento externo (➤), fibra externa do bastonete (⋄) e microvilosidades das células de Muller (↖). D: Cone pareado (➤), cones simples (↘), bastonete (⇨). E: Cone pareado evidenciando o segmento interno (●) e o segmento externo (➤). F: processos caliciformes de um cone (★).

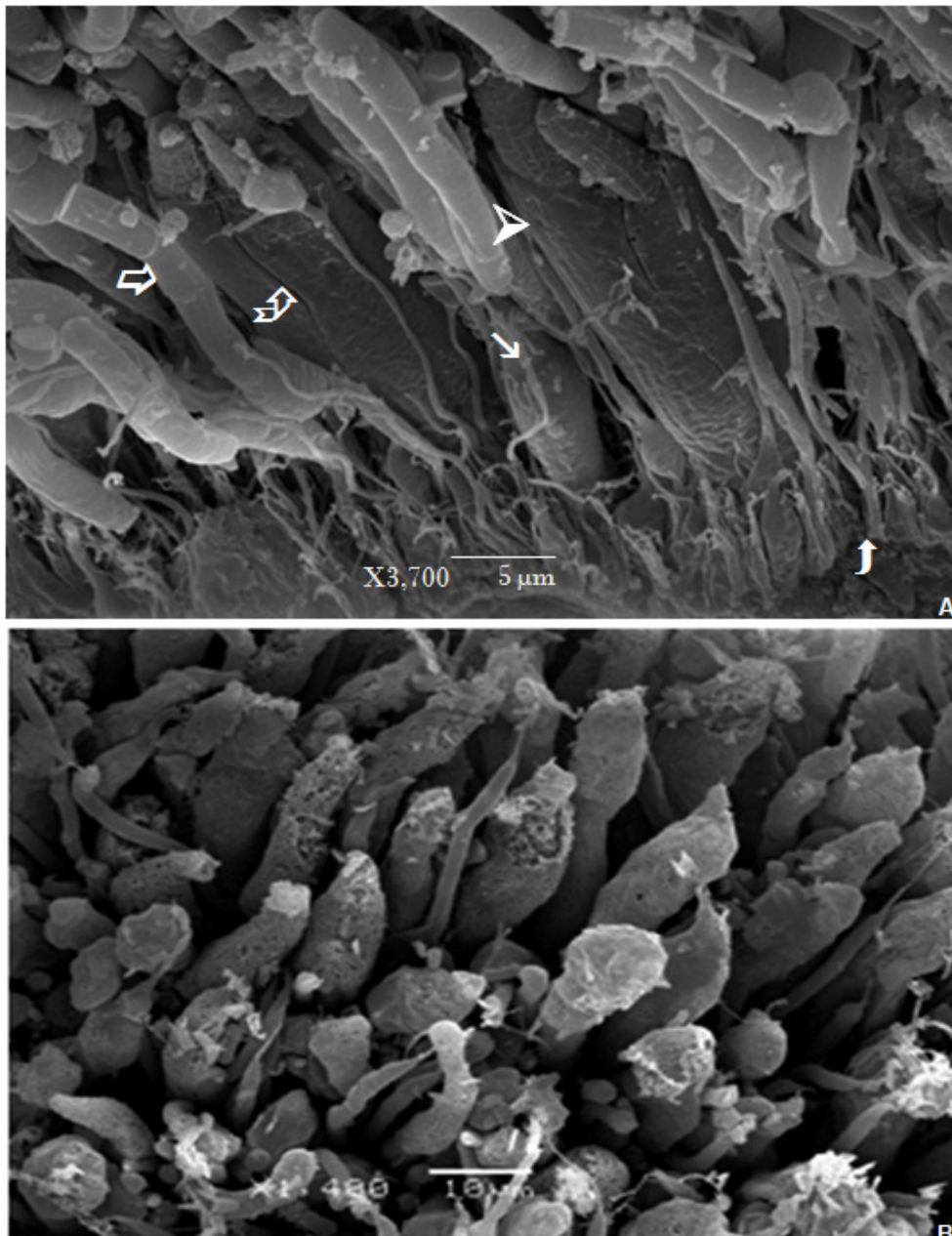


Figura 14 - Eletromicrografias de varredura da retina de *Hoplias malabaricus*, traíra. Grupo contaminado com MeHg (0,075 μg Hg/g). A: Bastonete (⇨), cone simples (↘), cone pareado (⇨), membrana limitante externa (↪) e alteração morfológica observada na região de junção entre os dois elementos de um cone pareado (⇨). B: Degeneração celular observada na camada dos fotorreceptores da retina de traíra.



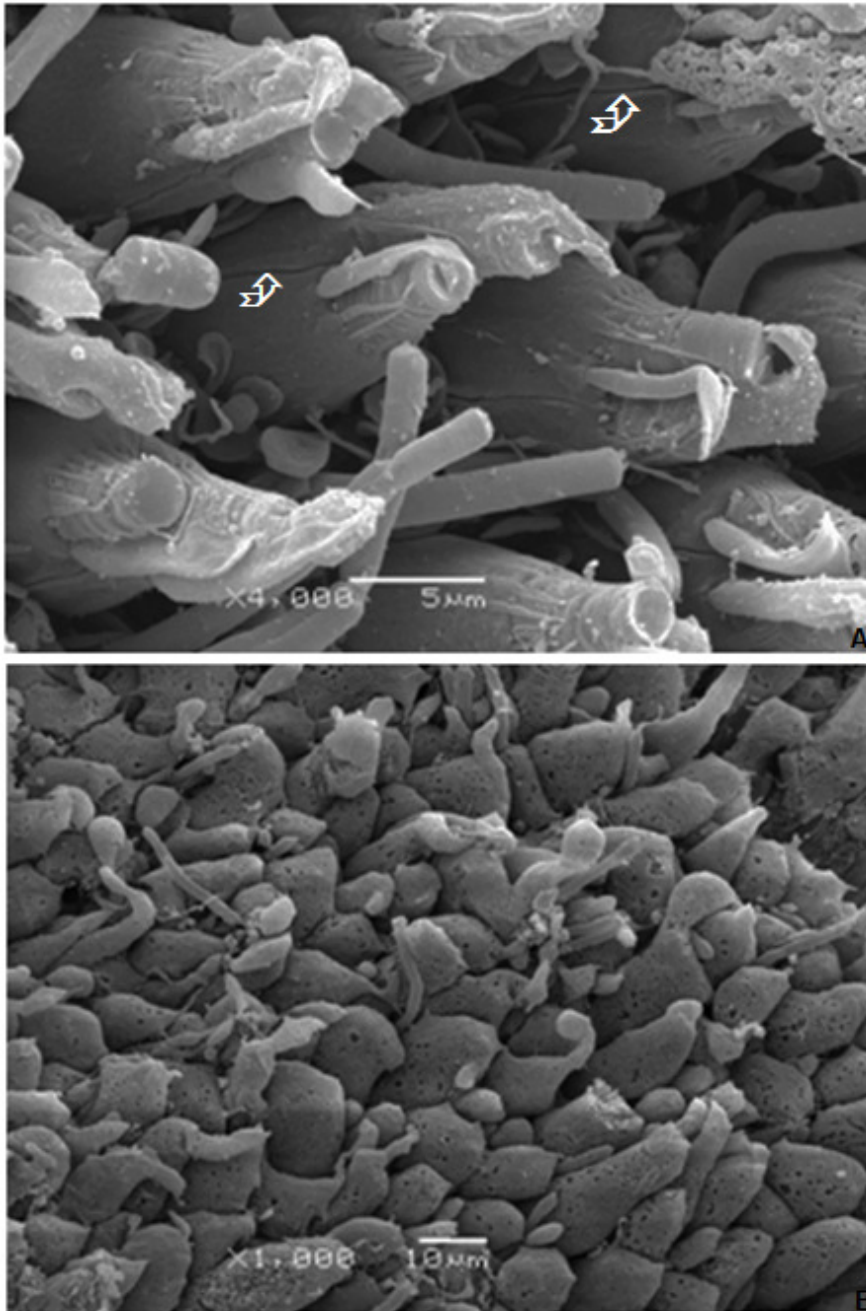


Figura 15 - Eletromicrografias de varredura de retina de *Hoplias malabaricus*, traíra. Grupo contaminado com MeHg (0,75 µg Hg/g). A: nítida alteração morfológica observada na região de junção entre os dois elementos de um cone pareado (↗). B: Degeneração celular intensa na camada dos fotorreceptores da retina de traíra.

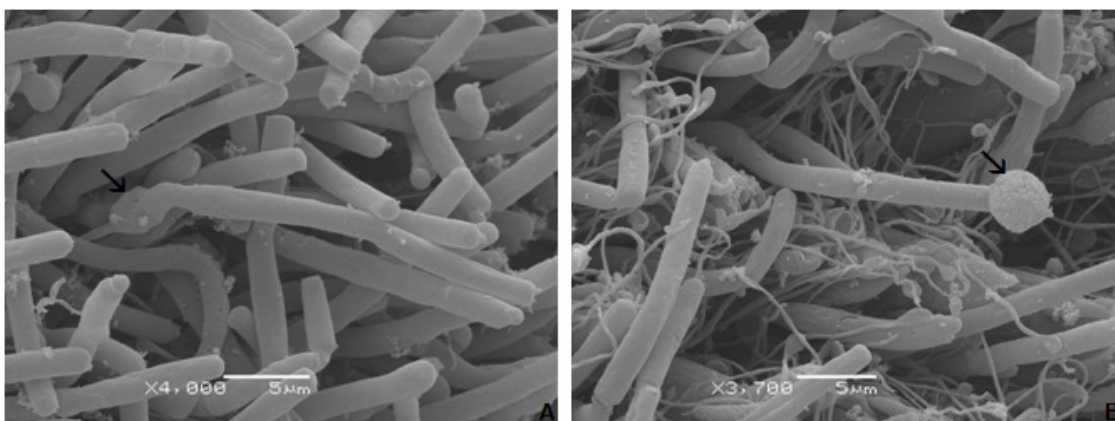


Figura 16 - Eletromicrografias de varredura de retina de *Hoplias malabaricus*, traíra. Grupo contaminado com MeHg (0,75  $\mu\text{g}$  Hg/g). A: Alteração morfológica observada na região do segmento interno de um bastonete (↘). B: Alteração morfológica observada na região do segmento externo de um bastonete (↘).

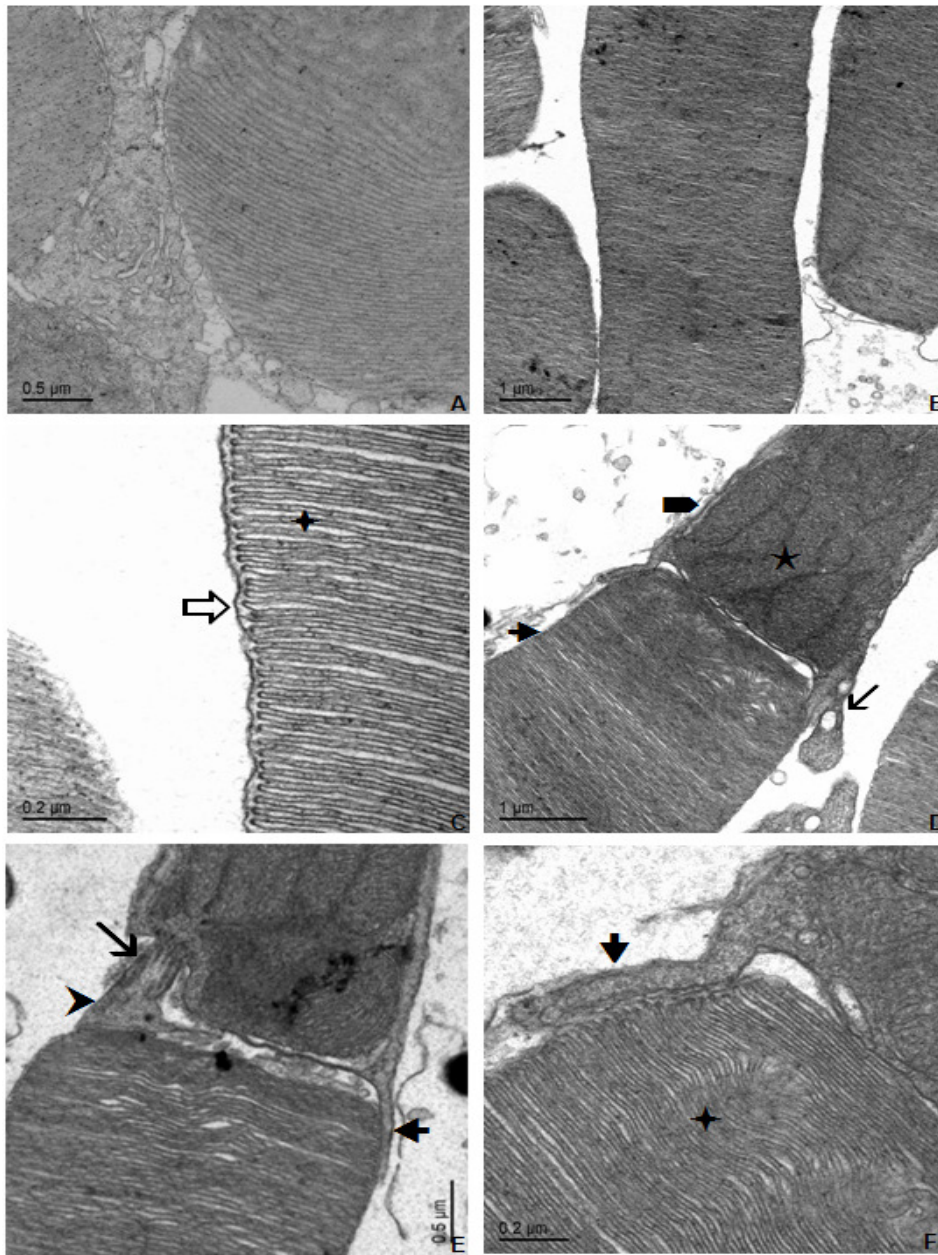


Figura 17 - Eletromicrografias da retina de *Hoplias malabaricus*. Grupo controle. A: Corte tangencial dos fotorreceptores na região do segmento externo. B: Corte radial dos bastonetes na região do segmento externo. C: Corte radial da região fotossensível de um bastonete, constituído por microvesículas achatadas (↕), membrana plasmática do segmento externo (⇔). Não existe continuidade entre a membrana dos discos dos bastonetes e a membrana plasmática do segmento externo. D: Corte radial de um bastonete, segmento interno (▀), rico em mitocôndrias localizadas perto da constrição (★) e cílio conectivo (↙), o qual conecta o segmento interno ao segmento externo (↗). E: Corte radial de um bastonete. Processos caliciformes (↔), cílio conectivo (↘) e corpo basal do cílio (↗). F: Corte radial de um bastonete. Processos caliciformes (↔) e discos membranosos (↕).

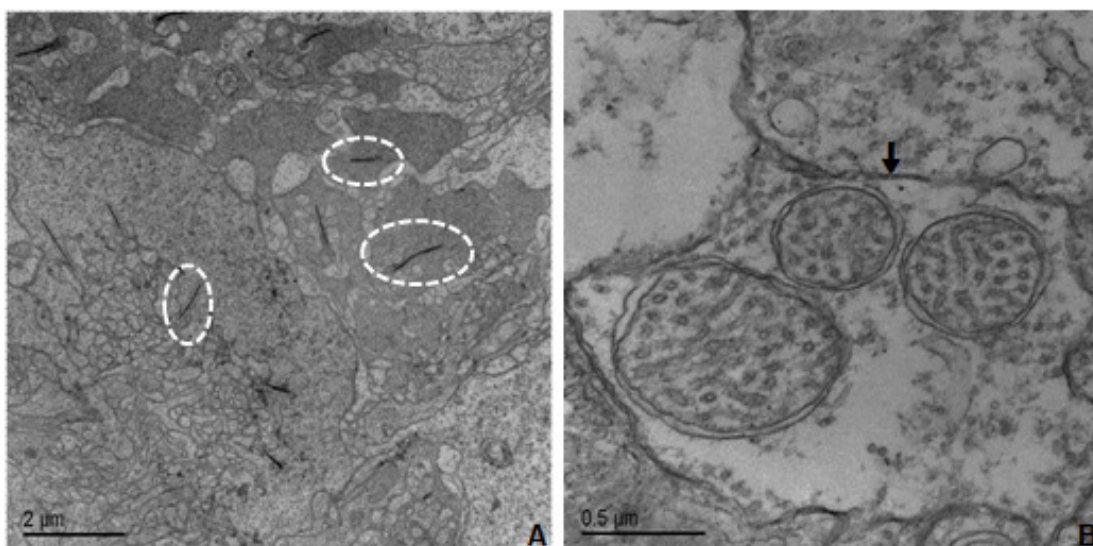


Figura 18 - Eletromicrografias da retina de *Hoplias malabaricus*, traíra. Grupo controle. A: Detalhe do pedículo de um cone com sinapses. B: Esférula sináptica de um bastonete (↓).



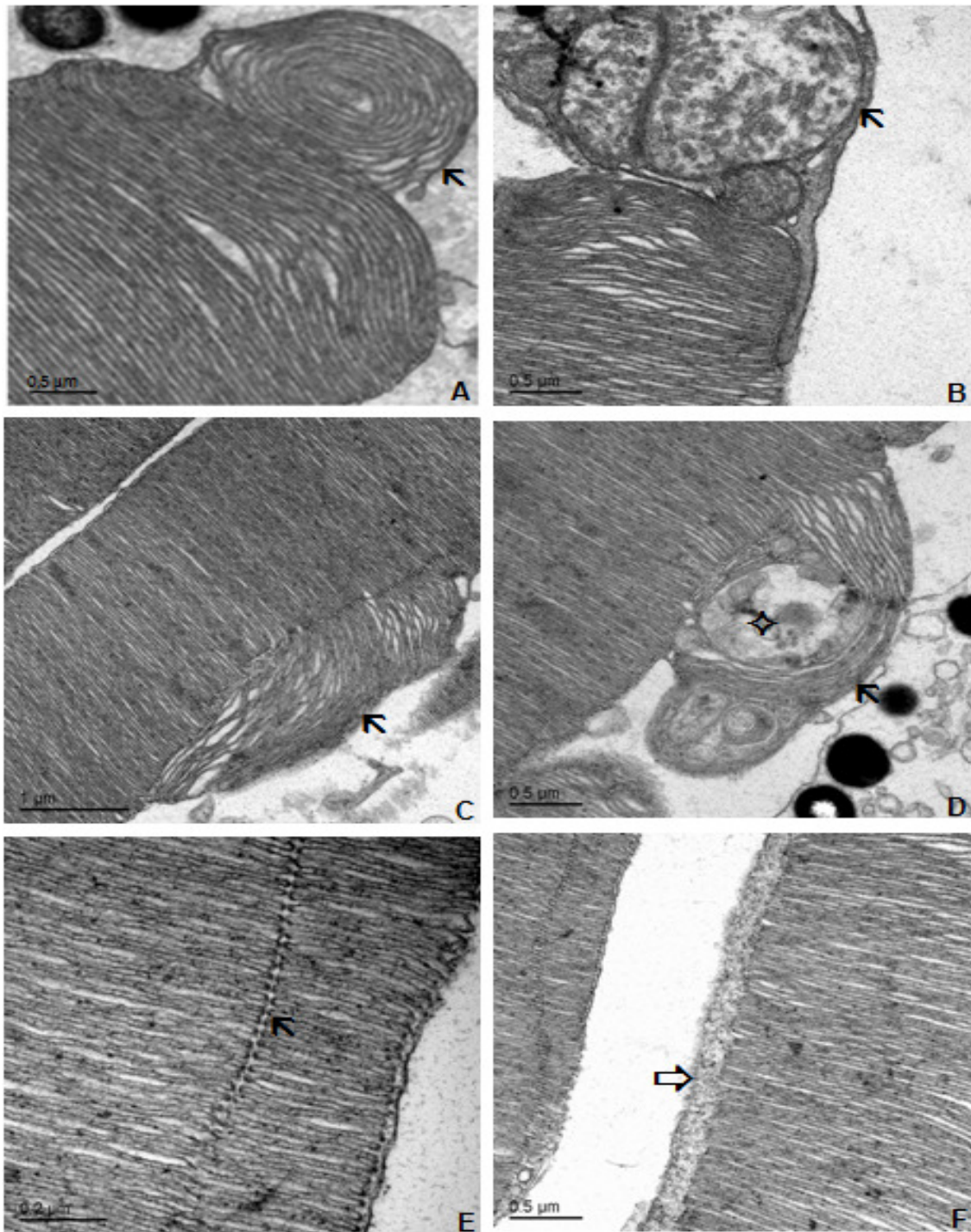


Figura 19 - Eletromicrografias da retina de *Hoplias malabaricus*. A: Grupo controle. Corte radial de bastonete controle. Discos membranosos migrando para a extremidade do fotorreceptor (↖). B: Corte radial de bastonete exposto ao metilmercúrio (0,075 µg Hg/g). Formação de vacúolo membranoso na extremidade do fotorreceptor (↖). C, D: Corte radial de bastonetes expostos ao metilmercúrio (0,75 µg Hg/g). Discos membranosos sendo eliminados pelas partes laterais dos fotorreceptores (↖) e formação de vacúolo (◊). E: Corte radial de bastonete exposto ao metilmercúrio (0,075 µg Hg/g). Discos membranosos do segmento externo apresentam uma descontinuidade em sua estrutura (↖). F: Corte radial de bastonete exposto ao metilmercúrio (0,75 µg Hg/g). Alteração na estrutura da membrana plasmática do segmento externo do bastonete (⇒).

## 6 DISCUSSÃO

A relação causa/efeito entre a presença de um metal e lesões em peixes é difícil de ser estabelecida nos estudos toxicológicos (ICES, 1986) e isso, juntamente com a relação entre pesquisa de laboratório e aplicação prática de biomarcadores, representa um desafio para os estudos de toxicologia ambiental (Wester *et al.*, 1994; Moore, 2002).

O metilmercúrio é absorvido e bioacumulado pelos peixes através da cadeia alimentar e a maior concentração encontrada em peixes predadores reflete a biomagnificação do mercúrio nas cadeias tróficas. De todo o mercúrio encontrado em peixes, 75 a 95% encontram-se na forma de metilmercúrio (Aschner, 2002).

Muitos dados sobre o acúmulo de mercúrio em peixes de clima temperado têm sido relatados, porém dados em peixes de clima tropical ainda são escassos, e no Brasil concentram-se em algumas regiões onde o mercúrio é amplamente utilizado como na região norte do país. Sendo assim, no Brasil muitos autores têm utilizado o músculo de peixes para verificar o nível de mercúrio, inclusive em *Hoplias malabaricus* (Brado *et al.*, 2000; Mela *et al.*, 2007). Brado *et al.* (2000) relataram que a traíra é a segunda espécie de peixe tanto em concentração de metilmercúrio como em consumo pela população indígena do Pará.

Embora tenhamos detectado uma pequena bioacumulação de mercúrio no músculo do grupo controle em consequência da exposição inevitável a concentrações-traço do metal, o aumento da bioacumulação do mercúrio nos grupos expostos ao metal foi evidente, mostrando uma alta biodisponibilidade trófica, como já fora descrito por Oliveira Ribeiro *et al.* (1999).

Após 70 dias de exposição, a dose de 0,075 µg Hg/g apresentou um acúmulo de mercúrio em músculo de *H. malabaricus* de 1,8 vezes, valor menor que a dose de 0,75 µg Hg/g (6 vezes). O fator de biomagnificação (Hg no predador / Hg na presa) chegou a 21 na menor dose e a 66 na maior. A rápida absorção do MeHg por via trófica já foi relatada em *H. malabaricus* (Mela *et al.*, 2007) e em outras espécies de peixes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999; Berntssen *et al.*, 2003), e pode ser atribuída à capacidade desta molécula lipofílica em difundir-se através da barreira intestinal e atingir tecidos ricos em lipídeos.

Berntssen *et al.* (2003), descreveram uma alta biomagnificação de MeHg em fígado (56 vezes) e rim (27 vezes) de salmão após um período de 120 dias de exposição à 5 e 100 mg MeHg/g. Porém estes níveis são observados somente em lagos e rios

expostos diretamente a resíduos industriais. A dose de 0,075 µg Hg/g utilizada neste trabalho representa uma condição real encontrada em peixes predatórios dos rios amazônicos impactados por mercúrio, como relatado por Mela *et al.* (2007).

Os resultados de bioacumulação apresentados demonstram que as concentrações encontradas em ambos os grupos expostos ao MeHg estão acima do limite máximo estabelecido pela O.M.S. (Organização mundial da saúde) para consumo humano e este limite deve ser adotado com cautela, visto que está associado a uma ingestão máxima de 400 gramas semanais de consumo de peixe e/ou produtos de pescado (WHO, 1990). Segundo Brado *et al.* (2000) níveis abaixo de 1 ug/g já podem causar danos importantes dependendo da quantidade de pescado consumido.

O uso de biomarcadores é considerado uma ótima ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental. Através destes, é possível detectar os efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis básicos de organização biológica, mesmo que tais xenobióticos estejam em uma baixa concentração no ambiente (Stegeman *et al.*, 1992). A associação de diversos biomarcadores possibilita uma melhor interpretação das respostas do organismo frente ao contaminante e configura-se numa valiosa estratégia para o estudo do impacto de contaminantes sobre os sistemas naturais (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002).

A histopatologia contribui para a determinação de danos primários e permite avaliar as consequências nas funções vitais dos organismos expostos a contaminantes (Adams, 2002). Além disso, o estudo histopatológico pode ainda colaborar com o diagnóstico da saúde do indivíduo, objetivando a identificação da presença de danos irreversíveis ao organismo o que poderia levar à morte dos mesmos ou colocar em risco a extinção da espécie. De acordo com Hinton *et al.* (1992) a histopatologia é um dos mais rápidos e eficientes métodos para detectar o nível dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos. Entretanto, os efeitos histopatológicos, quando utilizados de forma isolada, não são suficientes para um diagnóstico preciso sobre a ação de contaminantes tóxicos, fazendo-se necessário a associação com outros biomarcadores presentes em outros níveis de organização biológica. Apesar da importância desta técnica em estudos toxicológicas, existem poucos relatos sobre o efeito de metais pesados e outros agentes tóxicos em tecidos de peixes nativos brasileiros (Rabitto *et al.*, 2005; Alves Costa *et al.*, 2006; Mela *et al.*, 2007).

Para fins de estudos toxicológicos, os peixes são muito estudados, principalmente por estarem em contato direto com os xenobióticos dissolvidos ou incorporados à cadeia biológica do meio contaminado. Os tecidos de peixes têm sido utilizados por diversos autores na identificação e avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes (Khan *et al.*, 1994; Hongxia *et al.*, 1998; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Rabitto *et al.*, 2005; Mela *et al.*, 2007).

A retina exerce um papel imprescindível para a percepção sensorial em vertebrados. Sua estrutura estratificada, diversidade de componentes e riqueza de interações refletem sua complexidade funcional. Em contrapartida, exatamente devido a esta estrutura altamente diferenciada e em conjunção com sua posição anatômica, a retina é susceptível a uma variedade de danos que resultam em patologias que afetam a acuidade visual.

O mercúrio é altamente tóxico para peixes e causa inúmeras alterações estruturais, fisiológicas e bioquímicas no sistema nervoso central (Baatrup *et al.*, 1991). Os resultados desta investigação laboratorial demonstraram, pela primeira vez, evidências histopatológicas dos efeitos tóxicos do metilmercúrio nos fotorreceptores de *Hoplias malabaricus*. Alterações morfológicas nos fotorreceptores podem causar alterações fisiológicas em toda a retina desta espécie.

Na literatura foram descritas varias alterações histopatológicas em peixes expostos à xenobióticos (Myers *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996), principalmente relacionadas ao mercúrio (Banerjee & Bhattacharya, 1995; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Devlin, 2006; Mela *et al.*, 2007). Estas alterações são frequentemente observadas em fígado, rim, intestino, brânquias e cérebro, e incluem: vacuolizações, alterações mitocondriais, alterações celulares, alterações nucleares, neoplasias, proliferação celular, degeneração celular e necrose (Moore *et al.*, 1994,1996; Myers *et al.*, 1994, 2002; Alves Costa *et al.*, 2006; Mela *et al.*, 2007; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008). Estas lesões foram estabelecidas como biomarcadores histopatológicos em resposta ao mercúrio (Moore *et al.*, 1994,1996; Myers *et al.*, 1994, 2002). Porém dados sobre alterações histopatológicas em retina de vertebrados expostos ao mercúrio são raros e dificultam o entendimento dos efeitos tóxicos deste metal neste tecido.

Stehr *et al.* (1998) observaram em fígado de peixes expostos ao mercúrio inorgânico, vacúolos em todo o tecido hepático com poucas áreas de citosol remanescentes. Vacuolização, seguida de necrose e alterações das membranas celulares



foram observadas por Paulose & Maheshwari (2006) no parênquima hepático de peixes expostos ao metilmercúrio. De acordo com Bertssen *et al.* (2003), a vacuolização celular é resultado de alterações no metabolismo celular e pode ser considerada um bom biomarcador histopatológico em tecidos de peixes expostos à diferentes contaminantes. Chun-Yang *et al.* (2006) observaram vacúolos em fígado de *Oryzias latipes* expostos ao metilmercúrio e sugeriu que a presença de vacúolos em tecidos animais representa uma resposta ao mercúrio. Em diversos estudos utilizando peixes expostos ao metilmercúrio, a presença de vacúolos foi considerada uma resposta ao metal (Banerjee & Bhattacharya, 1994; Bertssen *et al.*, 2003; Mela *et al.*, 2007). Em intestino de peixes expostos ao mercúrio, Giari *et al.* (2008) também observaram a presença de vacuolização e degeneração celular.

Em *Hoplias malabaricus* a presença de vacúolos foi uma constante nas células fotorreceptoras dos indivíduos expostos ao metilmercúrio e como sugerido por diversos autores, esta alteração esta relacionada à exposição mercurial.

Como já descrito na literatura, os discos membranosos localizados no segmento externo dos fotorreceptores migram para a extremidade da célula para serem fagocitados pelas células do epitélio pigmentar e também para que possa ocorrer a renovação dos fotorreceptores. Nos fotorreceptores de *H. malabaricus* expostas ao MeHg, observamos que a eliminação dos discos membranosos ocorre pelas partes laterais das células fotorreceptoras e não na região apical como normalmente observado. Este processo é considerado decisivo e essencial para a visão, e perturbações nesta relação normal entre o epitélio pigmentado e os fotorreceptores da retina de traíra pode trazer graves consequências para a visão desta espécie animal.

Zook *et al.* (1989) observaram em cérebro de macacos expostos ao metilmercúrio, degeneração celular seguida de necrose e diminuição do número de neurônios. Para o autor, a diminuição do número de neurônio e células gliais no cerebelo é uma característica de exposições ao metilmercúrio. Segundo Goyer (1986) a intoxicação por metilmercúrio esta associada à degeneração celular e necrose dos neurônios, sendo que os neurônios lesados mostram alterações muito evidentes. Segundo Miura & Imura (1987) a degeneração celular neural provocada pela exposição ao mercúrio pode ocorrer tanto por necrose como por apoptose. Bertossi *et al.* (2004) observaram em cérebros de embriões de galinha expostos ao metilmercúrio áreas degenerativas, necrose e vacuolização do tecido neural. Bennett *et al.* (2009)

observaram em cérebro de pássaros expostos ao metilmercúrio alterações histopatológicas, sendo que a alteração mais evidente foi a degeneração celular. Em *Hoplia malabaricus* expostas ao MeHg áreas de degeneração celular foram observadas em grande parte da camada dos fotorreceptores e estas alterações podem prejudicar o funcionamento dessas células.

O mercúrio também interfere na integridade estrutural e propriedades físicas das membranas celulares (Baatrup *et al.*, 1991). Segundo os mesmos autores, a intoxicação por mercúrio leva a uma fragilização da arquitetura das membranas, podendo causar uma desorganização estrutural.

Em retinas de salamandras expostas ao mercúrio Tessier-Lavigne *et al.* (1985) observaram alterações histopatológicas em bastonetes. Os segmentos externos mostraram-se inchados e com alterações estruturais da membrana celular. Além disso, alguns segmentos externos mostraram-se completamente dobrados, o que conseqüentemente prejudicou o processo de fotorrecepção. Segundo os autores, o inchaço observado nos segmentos externos e subseqüente alterações histopatológicas foram induzidos pelo mercúrio. As alterações estruturais observadas nas membranas celulares levaram a um desequilíbrio osmótico, produzindo um maior influxo de sódio através da membrana do segmento externo e conseqüentemente um maior efluxo de potássio através da membrana do segmento interno, causando o inchaço observado.

Depois que os fótons de luz são absorvidos pelos fotopigmentos, o sinal é transmitido via GMP cíclico para a membrana do segmento exterior, onde leva ao fechamento dos canais de sódio, gerando um potencial de ação na retina interna. As alterações observadas na estrutura da membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores de *Hoplias malabaricus* poderiam alterar o transporte de íons através destas membranas e conseqüentemente o processo de fototransdução, alterando e prejudicando a visão destes animais.

Alterações celulares observadas em peixes podem comprometer a sobrevivência e conseqüentemente a estrutura da população, afetando o ecossistema como um todo. As alterações histopatológicas observadas na retina de traíra demonstraram severos danos aos fotorreceptores dos organismos expostos ao MeHg. Considerando esta alteração celular é sensato assumir que o MeHg exerceu uma ação tóxica sobre as células fotorreceptoras.

Recentemente vem ocorrendo o enriquecimento da literatura relacionada ao uso de biomarcadores histopatológicos de estresse ambiental. Isto tem aumentado os argumentos quanto ao uso deste biomarcador como indicador de adversidades, efeitos crônicos subletais e injúrias para vertebrados aquáticos (especialmente peixes) em ambientes biomonitorados ou mesmo em experimentos laboratoriais (Myers & Fournie, 2002). Infelizmente, ainda são poucos os trabalhos que avaliam os efeitos histopatológicos do metilmercúrio na retina de vertebrados. Sendo assim, este trabalho espera ampliar os conhecimentos científicos sobre a toxicidade do metilmercúrio na retina de vertebrados.

## **7 CONCLUSÕES**

Os dados obtidos através do estudo histopatológico em retinas de *Hoplias malabaricus* expostas ao metilmercúrio demonstraram que este contaminante é tóxico nas doses e tempo de exposição testado, causando uma variedade de lesões nas células fotorreceptoras;

A análise da concentração de mercúrio em músculo mostrou que *Hoplias malabaricus* acumulou metilmercúrio durante o tempo de exposição e a intensidade do efeito dependeu da dose de MeHg administrada.

## 8 REFERÊNCIAS

- Adams, S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Am. F. Soc. 3:104-112.
- Akagi, H.; Malm, O.; Kinjo, Y.; Harada, M.; Branches, F.G.P.; Pfeiffer, W.C. & Kato, H. 1995. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. Sci. Total Environ. 175: 85-95.
- Akaishi, F.M.; Bishay, F.; Clarke, J.; Rabitto, I.S. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. Aquat. Toxicol. 82: 1-14.
- Ali, M.A. & Klyne, M.A. 1985. Vision in vertebrates. Olenum Press, New York, 272 p.
- Alves Costa, J.R.M.; Mela, M.; Silva De Assis, H.C.; Pelletier, P.E & Oliveira Ribeiro C.A. 2006. Enzymatic inhibitions and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67: 82-88.
- Amin-Zaki, L.; Majeed, M.A.; Elhassani, S.B.; Clarkson, T.W.; Greenwood, M.R. & Doherty, R.A. 1979. Prenatal methylmercury poisoning. Clinical observations over five years. Am. J. Disab. Child. 133: 172-177.
- Amouroux, D.; Wasserman, J.C.; Tessier, E. & Donard, OFX. 1999. Elemental mercury in the atmosphere of a tropical Amazonian forest (French Guyana). Environ. Sci. Technol. 33: 3044-3048.
- Ancil, M. 1969. Structure de la retine chez quelques poissons marins du plateau continental. Water, Air, Soil Pollut. 26: 597-628.
- Anderson, P.; Borg, H. & Karrhage, P. 1995. Mercury in fish muscle in acidified and limed lakes. Water, Air, Soil Pollut. 80: 889-892.
- Aschner, M. & Clarkson, T.W. 1988. Uptake of methylmercury in the rat brain: Effects of amino acid. Brain Res. 462: 31-39.
- Aschner, M. 2002. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. Environ. Toxicol. Pharmacol. 12: 101-104.
- Azevedo, F.A. 2003. Toxicologia do mercúrio. Editora Rima, São Carlos-SP. p 272.
- Baatrup, E. 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system including sense organs, of fish. Comp. Biochem. Physiol. 100: 253-257.

- Banerjee, S. & Bhattacharya, S. 1994. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, Mercury and Ammonia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29: 265-275.
- Banerjee, S. & Bhattacharya, S. 1995. Histopathological changes induced by chronic levels of mercury and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31: 62-68.
- Barbosa, A.C.; Boischio, A.A.P.; East, G.A.; Ferrari, I.; Golçalves, A.; Silva, P.R.M. & Cruz, T.E.M. 1995. Mercury contamination in the Brazilian Amazon: environmental and occupational aspects. *Water, Air, Soil Pollut.* 80: 108-121.
- Bastos, W.R.; Malm, O.; Pfeiffer, W.C. & Cleary, D. 1998. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brasil. *Ciência e Cultura.* 50: 255-260.
- Bennett, R.S.; French, J.B.; Rossmann, R. & Haebler, R. 2009. Dietary toxicity and tissue accumulation of methylmercury in American Kestrels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 149-156.
- Bertossi, M.; Girolamo, F.; Errede, M.; Virgintino, D.; Elia, G.; Ambrosi, L. & Roncali, L. 2004. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *Neurotoxicol.* 25: 849-857.
- Bertssen, M.H.G. 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat. Toxicol.* 65:55-72.
- Bertssen, M.H.G.; Atland, A. & Handy, R.D. 2003. Chronic dietary Mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behavior in Atlantic salmon (*Salmo solar*) parr. *Aquat. Toxicol.* 65: 55-72.
- Bidone, E.D.; Castilho, Z.C.; Cid de Souza, T.M. & Lacerda, L.D. 1997. Fish contamination and human exposure to Mercury in the Tapajos river basin, Para state, Amazon, Brazil: A screening approach. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 194-201.
- Bilotta, J. & Saszik, S. 2001. The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Devel. Neurosci.* 19: 621-629.
- Bonci, D.M.; Lima, S.M.; Grotzner, S.R.; Ribeiro, C.A.; Hamassaki, D.E & Ventura D.F. 2006. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive alphaprotein kinase C bipolar cells caused by methylmercury

- chloride intoxication in the retina of the fish *Hoplias malabaricus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 39: 405-410.
- Bowmaker, J.K & Kunz, Y.W. 1987. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): age –dependent changes. Vision Res. 12: 2101-2108.
- Bowmaker, F.K. 1991. The evolution of vertebrate visual pigments and photoreceptors. In: Vision and visual dysfunction: Evolution of the eye and visual system. Editors: John R. Cronly-Dillon e Richard L. Macmillan Press Ltd. 399-420.
- Brado, E.S.; Oliveira Santos, E.; Moura de Jesus, M.; Mascarenhas, A.F.S. & Faila, A., K.F. 2000. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Pará state, Brazil. Environ. Res. 84: 197-203.
- Britski, H.A.; Silimon, K.Z.S. & Lopes, B.L. 1999. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília, Embrapa. 120p.
- Bueno, F.S. 1976. Dicionário escolar da língua portuguesa. 11 ed. Rio de Janeiro. Ministério da educação e cultura. 720p.
- Bueno, M.I.M.S. 1990. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas. 112p.
- Câmara, V.M.; Silva, A.P. & Cancio, J.A. 1998. Notas para a constituição de um programa de vigilância ambiental dos riscos e efeitos da exposição do mercúrio metálico em áreas de produção de ouro. IESUS, VII. 2:35-44.
- Cantor, M.O. 1947. Mercury: its role in intestinal decompression tubes. Am. J. Surg. 73: 690-694.
- Carlyn, J.M.; Ronald, G.T & Patric, H.K. 2007. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebra fish following acute exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 66: 44-48.
- Carta, P.; Flore, C.; Alinovi, R.; Ibba, A.; Tocco, M.G.; Aru, G.; Carta, R.; Girei, E.; Mutti, A.; Lucchini, R. & Randaccio, F.S. 2003. Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. Neurotoxicol. 24: 617-623.
- Castoldi, A.F.; Coccini, T. & Manzo, L. 2003. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. Rev. Environ. Health. 18:19-31.
- Chapman, P.M.; Allen, H.; Godtfredsen, K. & Gragger, M.N. 1996. Avalution of bioaccumulation factors in regulating metals. Environ. Sci. Technol. 30: 448-452.

- Chun-Yang, L.; Jian-Jie, F.; Jian-Bo, S.; Qun-Fang, Z.; Chun-Gang, Y. & Gui-Bin, J. 2006. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22: 225-233.
- Clarkson, T.W. 1997. The toxicology of mercury. *Critical reviews clinical laboratory Science.* 43: 369-403.
- Clarkson, T.W. 2002. The Three modern faces of mercury. *Environ. Health Perspect.* 110: 11-23.
- Connaughton, V.P. & Nelson, R. 2004. Axonal stratification patterns and glutamate-gated conductance mechanisms in zebra fish retinal bipolar cells. *J. Physiol.* 524:153-146.
- Dearry, A. & Barlow, R.B. Jr. 1987. Circadian rhythms in the green sunfish retina. *J. Physiol.* 89: 745-770.
- Devlin, E.W. 2006. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methylmercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicol.* 15: 97-110.
- Diego, A.; Tseng, C.M.; Dimov, N.; Amouroux, D. & Donard, O.F.X. 1999. Distribution of methylmercury and inorganic mercury between the aqueous phase and suspended particulate matter under simulated estuarine conditions. *Environ. Health Perspect.* 108: 257-263.
- Dorea, J.G. 2003. Fish is central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? *Environ. Res.* 92:232-244.
- Dowling, J. E. & Boycott, B. B. 1966. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Environ. Health Perspect.* 166: 80-111.
- Dowling, J. E. 1987. *Neuronal Responses.* Cambridge: Harvard University Press.
- Ebrey, T. & Koutalos, Y. 2001. Vertebrata photoreceptors. *Prog. Retinal, Eye Res.* 21:149-94.
- Engeström, K. 1960. Cone types and cones arrangement in the retina of some cyprinids. *Acta Zoológica.* 41:277-295.
- Fowler, H.W. 1950. Os peixes de água doce do Brasil. São Paulo, *Arquivos de Zoologia do estado de São Paulo.* 6: 205-404.
- Fox, D.A. & Silman, A.J. 1979. Heavy metals affect rod, but not cone, photoreceptors. *Science.* 21: 78-80.



- Freed, M. A.; Nakamura, Y. & Sterling, P. 1996. Four types of amacrine in the cat retina that accumulate GABA. *J. Comp. Neurol.* 219: 295-304.
- Garg, T.K. & Chang, J.Y., 2006. Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: Attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2. *J. Neuroimmunol.* 171: 17-28.
- Giari, L.; Simoni, E.; Era, B.S. & Dezfuli, B.S. 2008. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax*. Following mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70: 400-410.
- Gitter, S.; Pardo, A.; Kariv, N. & Yinon, U. 1988. Enhanced electroretinogram in cats induced by exposure to mercury acetate. *Toxicol.* 51: 67-76.
- Goyer, R.A. 1986. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D.; Amdur, M.O. & Doull, J. eds. *Casarett and Doull's toxicology – The basic science of poisons*. 3rd. Ed. New York, Toronto, London, Macmillan Pub. 605-609.
- Graeme, A.K. & Pollock, C.V. 1998. Heavy metal toxicity, part In: arsenic and mercury. *J. Emerg. Med.* 16: 45-56.
- Granda, A. M. & Dvorak, C. A. 1977. Vision in turtles. In: Crescitelli, F. (Ed.) *Handbook of Sensory Physiology: The Visual System in Vertebrates*. Springer, Heidelberg. 211p.
- Grandjean P. 1999. Mercury risks: Controversy or just uncertainty. *Public Health Reports.* 114: 512-515.
- Harada, Y.; Miyamoto, Y.; Nonaka, I.; Ohta, S. & Ninomiya, T. 1968. Electroencephalographic studies of Minamata disease in children. *Dev. Med. Child. Neurol.* 10: 257-258.
- Hart, H.N.; Lisle, T.J.; Marshall, N.J & Collin, S.P. 2004. Multiple cone visual pigments and the potential for trichromatic color vision in two species of elasmobranchs. *J. Exp. Biol.* 207: 4587-94.
- Hawryshyn, C.W. 1997. Vision. In: *The Physiology of Fishes*. Editor Evans D.H 2Ed. CRC Press, EUA. P. 345-374.
- Hawryshyn, C.W.; Mackay, W.C. & Nilsson, T.H. 1982. Methylmercury induced visual deficits in rainbow trout. *Can. J. Zool.* 60: 3127-3133.
- Helberg, J. & Hystrom, M. 1972. The influence of methylmercury exposure on learning set behavior of squirrel monkeys. *Psychol. Res. Bull.* 3: 11-17.

- Hensley, D.A. & Moody, D.P. 1975. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. *Florida scientist*. 38: 122-128.
- Hinton, D.E.; Baumann, P.C.; Gardiner, G.R.; Hawkins, W.E.; Hendricks, J.D.; Murchelan, R.A. & Okihira, M.S. 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress. Lewis Publishers.155-208.
- Hongxia, L.; Gnolan, H. & Shugui, D. 1998. Toxicity and accumulation of tributyltin chloride on tilapia. *Environ. Sci. Technol.* 12: 109-119.
- Horvat, M. 1996. Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances. *Environ. Sci. Technol.* 15: 89-94.
- Hunter, D.; Bomford, D.S. & Russel, R.R. 1940. Poisoning by methylmercury compounds. *Quart. J. Méd.* 9: 493-503.
- ICES, International council for the Exploration of the Sea. 1986. Report of the ICES Workshop on the of pathology in studies of the effects of contaminations. Project CM/ICES E. 401-464.
- Igata, A. 1993. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. *Environ Res.* 63: 157-69.
- IPCS International Programme on Chemical Safety. 1990. Methylmercury-environmental health criteria 101. Geneva: World health organization.
- Iwata, K. & Abe, H. 1986. Neuroophthalmological and pathological studies of organic mercury poisoning "Minamata disease" in Japan. In: Tsubaki, T. & Takahashi, H. (Editors), recent advances in Minamata disease studies. Methylmercury poisoning in Minamata and Nigata Japan. Tokyo. *Neurotoxicol.* 58-74.
- Jardim W.F. 1988. *Ciência Hoje*. 41-78.
- Kaneko, A. 1970. Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.* 3: 623-33.
- Kaneko, A. 1971. Electrical connections between horizontal cells in the dogfish retina. *J. Physiol.* 213: 95-108.
- Kehring, H.A.; Costa, M.; Moreira, I. & Malm, O. 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Mar. Pollu. Bull.* 44: 1018-1023.

- Khan, R. A.; Barker, E. E. Hooper, R.; Lee, E. M.; Ryan, K. & Nag, K. 1994. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Aqua. Toxicol.* 26: 95-102.
- Kjellstrom, T.; Kennedy, P.; Wallis, S.; Stewart, A.; Friberg, L.; Lino, B.; Witherspoon, T. & Mantell, C. 1989. Physical and metal developed of children with prenatal exposure to mercury from fish. National Swedish Environment Protect Board Report. 3642: 75-89.
- Kolb, H.; Nelson, R.; Ahnelt, P. & Cuenca, N. 2001. Cellular organization of the vertebrate retina. In: Kolb H., Ripps H. and Wu S. (Eds.). Concepts and challenges in retinal biology: a tribute to John E. Dowling. *Prog. Brain Res.* 31: 23-31.
- Kraaij, D.A. 2000. Spectral and dynamic properties of cones/horizontal cell interaction in goldfish retina. *Academisch Proefschrift.* 125p.
- Kusmic, C. & Gualtieri, P. 2000. Morphology and spectral sensitivities of retinal and extraretinal photoreceptors in freshwater teleosts. *Mícron.* 31: 183-200.
- Lacerda, L.D. 1995. Amazon mercury emissions. *Nature.* 374: 20-21.
- Lacerda, L.D. & Salomons, W. 1997. Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical time bomb. Springer verlag, Berlim. *Ciência Hoje.* 23-35.
- Lago, M. 2005. Sensibilidade ao contraste espacial de luminancia e cromático em pacientes intoxicados por vapor de mercúrio: evolução após dois anos. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. 103p.
- Lamb, A.T.D & Pugh, Jr. B.E.N. 2004. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog. Retinal, Eye Res.* 23: 307-380.
- Lebel, J.; Mergler, D.; Branches, F.; Lucotte, M.; Amorim, M.; Larribe, F. & Dolbec, J. 1998. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian Basin. *Environ. Res.* 79: 20-32.
- Lechler, P.J.; Miller, J.R.; Lacerda, L.D.; Vinson, D.; Bozongo, J-C.; Lyons, W.B & Warwick. 2000. Elevated mercury concentrations in solis, sediments, water and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments. *Sci. Total Environ.* 260: 87-96.
- Leeper, H. F. & Copenhagen, D. R. 1979. Mixed rod-cone responses in horizontal cells of snapping turtle retina. *Vision Res.* 19: 407-410.

- Lima, A.P.; Sarkis J.E.; Shihomatsu, H.M & Muller, R.C. 2005. Mercury and selenium concentrations in fish samples from cachoeira do Piria Municipality, para State, Brazil. *Environ Res.* 3: 236-44.
- Lyall, A.H. 1956. Occurrence of triple and quadruple cones in the retina of the minnow (*Phoxinus laevis*). *Nature.* 177: 1086-1087.
- Machado, C.R.; Garófalo, M.A.R.; Roselino, J.E.S.; Kettelhut, I.C. & Migliorini R.H. 1989. Effects of fasting on glucose turnover in carnivorous fish (*Hoplias malabaricus*). *Am. J. Physiol.* 256: 612-615.
- Malm, O. 1998. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ. Res.* 77: 73-78.
- Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; Souza, C.M.M & Rether, R. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. *Ambio.* 19: 11-15.
- Marsh, D.O.; Myers, G.J.; Clarkson, T.W.; Amin-Zaki, L.; Tikriti, S. & Majeed, M.A. 1980. Fetal methylmercury poisoning: clinical and toxicological data on 29 cases. *Ann. Neurol.* 7: 348-353.
- Mela, M.; Randi, M.A.; Ventura, D.F.; Carvalho, C.E.; Pelletier, E.; Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68: 426-435.
- Merigan, W.H. 1979. Effects of toxicants on visual systems. *Neurobehavioral Toxicol. Teratol.* 1: 12-22.
- Merigan, W.H. 1980. Visual fields and flicker thresholds, in methylmercury poisoned monkeys. In: W.H. Merigan and W. Weiss (eds.) *Neurotoxicity of the visual system*, Raven Press, New York. p.149.
- Micaroni, R.C.C.M.; Bueno, M.I.M.S. & Jardim, W.F. 2000. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova.* 23-28.
- Moore, M.J & Stegman, J.J. 1994. Hepatic neoplasms in winter flounder *Pleuronectes americanus* from Boston Harbor, Massachusetts, USA. *Dis. Aquat. Org.* 20: 33-48.
- Moore, M.J.; Shea, D.; Hillman R.E. & Stegman J.J. 1996. Trends in hepatic tumors and htdropic vacuolation , fin erosion, organic chemical and stable isotope ratios in winter flounder from Massachusetts, USA. *Mar Pollut. Bull.* 32: 458-470.

- Moore, M.N. 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aqua. Toxicol.* 59 :1-15.
- Munz, F.W. & Swanson, R.T. 1965. Thyroxine-induced changes in the properties of visual pigments. *Am. Zool.* 5: 683- 688.
- Munz, F.W. 1971. Vision: Visual Pigments. In: Hoar, W.S. & Randall, D.L. *Fish Physiology*. 1-32. New York: Academic Press.
- Myers, M.S.; Stehr, C.M.; Olson, O.P.; Johnson L.L.; McCain, B.B.; Chan, S.L. & Varanasi, U. 1994. Relationship between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleronectes stellatus*) and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coast, USA. *Environ. Health Perspect.* 102: 200-215.
- Myers, M.S. & Fournie, J.W. 2002. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* (Adams S.M.) *Am. Soc.* 24: 221-287.
- Negishi, K.; Salas, R. & Laufer, M. 1997. Origins of horizontal cell spectral responses in the retina of marine teleosts (*Centropomus* and *Mugil* sp). *J. Neurosci. Res.* 47: 68-76.
- Nelson, R.; Famiglietti, E.V. & Kolb, H. 1978. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on-center and off-center ganglion cells in the cat retina. *J. Neurophysiol.* 4: 427-483.
- Nelson, R.; Kolb, H. & Freed, M.A. 1993. OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina. In: *Intracellular electrophysiology and HRP stains*. *J. Comp. Neurol.* 1: 68-84.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Guimarães, J.R.D. & Pfeiffer, W.C. 1995. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*), *Environ. Sci. Technol.* 4: 45-52.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Rouleaus, C.; Pelletier, E.; Audet, C. & Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.* 33: 902-907.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Belger, L.; Pelletier, E. & Rouleau, C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Res.* 90: 217-25.

- Oliveira Ribeiro, C. A.; Filipack Neto, F.; Mela, M.; Silva, P.H.; Randi, M. A. F. Costa, J.R.A. & Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101: 74-80.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Mesmer-Doudons, N.; Gonzalez, P.; Dominique, Y.; Bourdineaud, J-P.; Boudou, A.; Massabuau, J-C. 2008. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25: 304-309.
- Paiva, M. P. 1972. Fisiocologia da Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch ,1794), no Nordeste Brasileiro. São Paulo, Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 121p.
- Paiva, M.P. 1974. Crescimento, alimentação e reprodução da Traíra, *Hoplias malabaricus* no Nordeste Brasileiro. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 132p.
- Paulose, P.V. & Maheshwari, K. 2006. Hepatocity damage in Indian Major Carp, Labeo rohita with respect to accumulation and elimination of mercury. *Asian J. Exp. Sci.* 20: 369- 374.
- Pfeiffer, W.C.; Malm, O.; Souza, C.M.; Lacerd, L.D & Silveira, E.G.A. 1990. Ameaça de mercúrio nos garimpos. *Ciência hoje.* 12-16.
- Piccolino, M.; Neyton, J.; Witkovsky, P. & Gerschenfeld, H. M. 1982. Gama-aminobutyric acid antagonists decrease junctional communication between L-horizontal cells of the retina. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States America Natl. Acad. Sci.* 79: 3671-3675.
- Piccolino, M.; Byzov, A.L.; Kurennyi, D.E.; Pignatelli, A.; Sappia, F.; Wilkinson, M. & Barnes, S. 1996. Low-calcium-induced enhancement of chemical synaptic transmission from photoreceptors to horizontal cells in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 6: 2302-2306.
- Rabitto, I. S.; Alves Costa, J.R.M.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, F.M.; Akaishi, F.M.; Anjos, A.; Randi, M.A.F. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopatological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25: 304-309.
- Ramón Y Cajal, S. 1983. La retine des vertebres. *La cellule.* 9:17-257.

- Reckel, F.; Melzer, R. R.; Parry, J.W. & Bowmaker, J.K. 2002. The retina of five atherinomorph teleosts: photoreceptors patterns and spectral sensitivities. *Brain Behav. Evol.* 5: 249-64.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. *Cell Biol.* 17: 208-212.
- Rice, D.C. & Gilbert. 1992. Early chronic low-level methylmercury poisoning in monkeys impairs spatial vision. *Science.* 216: 759-761.
- Rios, F.S. 2001. Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Boch, 1794) (Erythrinidae) submetida à privação de alimento e à realimentação. São Carlos-SP. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 138p.
- Rios, F.S.; Kalinin, A.L. & Rantin, F.T. 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *J. Fish Biol.* 61: 85-95.
- Rodieck, R.W. 1998. The first steps in seeing. Sinauer associates.
- Roulet, M.; Lucotte, M.; Rheault, I.; Tran, S.; Farella, N.; Canuel, R.; Mergler, D. & Amarin, M. 1996. Mercury in Amazonian soils: accumulation and release. IV international conference on the geochemistry of the Earth's surface. pp. 453-457.
- Roulet, M. & Lucotte, C. 1998. The geochemistry of mercury in central Amazonia soils developed on the Atler do chão formation of the lower tapajós river valley, Para state, Brazil. *Sci. Total Environ.* 223: 1-24.
- Rustam, H. & Hamdi, T. 1974. Methyl mercury poisoning in Iraq. A neurological study. *Brain.* 97: 500-510.
- Sakamoto, M.; Nakano, A. & Akagi, H. 2000. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environ. Res.* 87: 92-98.
- Santos, E. 1981. Peixes de agua doce, Belo Horizonte, Itatiaia Ltda. 89p.
- Santos, E.C.O.; Maura de Jesus, I.; Brado, E.S.; Loureiro, E.B.; Mascarenhas, A.F.S.; Weirich J.; Câmara, V.C. & Cleary, D. 2002. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. *Environ. Res.* 84: 100-107.
- Sherry, D. M. & Yazulla, S. 1993. Goldfish bipolar cells and axon terminal patterns: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 329: 188-200.
- Shimbo, K.; Toyoda, L.I.; Kondo, H. & Kujiraoka, T. 2000. Color-opponet responses of small and giant bipolar cells in the carp retina. *Vis Neurosci.* 17: 609-621.

- Silveira, L.C.L.; Pinheiro, M.C.N.; Damin, E.B.; Moura, A.L.; Rodriguez, A.R.; mello, G.A. 1999. Visual dysfunction in Amazonian gold miners suffering from metallic mercury poisoning. *Invest. Ophthalmol. Sci.* 40: 436-439.
- Silveira, L.C.L.; Damin, E.T.B.; Pinheiro, M.C.N.; Rodrigues, A.R.; Moura, A.L.A.; Cortes, M.I.T. & Mello, G.A., 2003. Visual dysfunction following mercury exposure by breathing mercury vapour or by eating mercury-contaminated food. In: Mollon, J.D., Pokorny, J., Knoblauch, K. (Eds.), *Normal and Defective Colour Vision*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 407–417.
- Slotkin, T.A.; Pachaman, S.; Kavlock, R.J. & Bartolome, J. 1985. Effects of neonatal methylmercury exposure en development of nucleic acids and proteins in rat brain: Regional specificity. *Brain Res. Bull.* 14: 397-401.
- Stegman, J.J.; Brouwer, M.; DI Giulio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; SAanders, B.M. & Van Veld, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers Biochemical, Physiological, and histological markers of antropogenic stress* (Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle Jr.; P. P. & Bergman, H. L.). Eds. Lewis Publishers. 235-234.
- Stehr, C.M.; Johnson, L.L. & Myers, M.S. 1998. Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the U.S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. *Dis. Aquat. Org.* 32: 119-135.
- Tachibana, M. 1999. Regulation of transmitter release from retinal bipolar cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 17: 551-67.
- Takashima, F. & Hibiya, T. 1998. *Na Atlas of fish histology: normal and pathological features*. Second edition. 121p.
- Tanan, C.L.; Ventura, D.F.; DE Souza, J.M.; Ribeiro, C.A.O.; Mela, M. 2006. Electrophysiological study of the effects of mercury intoxication in the retina of the traíra (*Hoplias malabaricus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 987-995.
- Tessier-Lavigne, M.; Mobbs, P. & Attwell, D. 1985. Lead and mercury toxicity and the rod light response. *Invest. Ophthalmol. Sci.* 26: 1117-1123.
- Teyke, T. & Schaerer, S. 1994. Blind Mexican cave fish (*Astynas hubbsi*) respond to moving visual stimuli. *J. exp. Biol.* 11: 89-101.



- Thompson, I. 1991. Considering the evolution of vertebrate neural retina. In: John R. Cronly-Dillon e Richard L. Gregory (Eds.). *Vision and Visual Dysfunction: Evolution of the Eye and Visual System*. Macmillan Press Ltd.
- Tubino, M. & Magalhães, M.E.A. 1997. Mercúrio: Um caminho para a toxicidade. *Ciência hoje*. 20-22.
- Twing, G.; Levy, H. & Perman, I. 2003. Color opponency in horizontal cells of the vertebrate retina. *Prog. Retina Eye Res.*1: 31-68.
- USEPA – United States environmental protection agency. 1997. Mercury study report to congress: health effects of mercury and mercury compounds.
- Ventura, D. F.; Simões, A. L.; Costa, M. F.; Costa, M. T. V.; de Souza, J. M.; Canto-Pereira, L. H. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L.C. L. 2003a. Hue and saturation discrimination and electroretinograms of mercury contaminated industry workers in Brazil. *Proceedings of the 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association (INA)*.
- Ventura, D. F.; Berezovsky, A.; Salomão, S. R.; Costa, M. T. V.; Simões, A. L.; Canto-Pereira, L. M.; Costa, M. F.; de Souza, J. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L. C. L. 2003b. Multifocal electroretinograms (mfERGs) correlate with color vision losses in mercury contaminated workers. *Proceedings of the 17th Symposium of the International Color Vision Society (ICVS)*.
- Ventura, D. F.; Simões, A. L.; Costa, M. T. V.; Costa, M. F.; de Souza, J. M.; Canto-Pereira, L. H. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L. C. L. 2003c. Occupational mercury contamination produces loss of color-and contrast-vision but no effect in full field ERG. *Annual Meeting Abstract www.arvo.org. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Abstract 4112.*
- Ventura, D.F.; Costa, M.T.V.; Costa, M.F.; Berezovsky, A.; Salomão, S.R. & Simoes, A.L. 2004. Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Vis. Neurosci.* 21: 421–429.
- Ventura, D.F.; Simões, A.L.; Tomaz, S.; Costa, M.F.; Lago, M.; Costa, M.T.V. 2005. Colour vision and contrast sensitivity losses of mercury intoxicated industry workers in Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19: 523–529.
- Verity, M.A., Sarafian, T., Pacifici, E.H., Sevanian, A., 1994. Phospholipase A2 stimulation by methyl mercury in neuron culture. *J. Neuroche.* 62: 705–714.

- Volgvi, B.; Xin, D.; Amarillo, Y. & Bloomfield, S. A. 2001. Morphology and physiology of the polyaxonal amacrine cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 44: 109-125.
- Wagner, H.J. & Wagner, E. 1988. Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a golgi study on differentiation and layering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 321: 263-324.
- Wagner, H.J.; Erohlich, E.; Negishi K. & Collin, S.P. 1998. The eyes of deep-sea fish. Functional morphology of the retina. *Prog. Retinal, Eye Res.* 4: 637-85.
- Waldron, H.A. 1983. Did the mad hatter have mercury poisoning? *Br. Méd. J.* 18: 209-211.
- Walls, G.L. 1942. The vertebrate eye and its adaptative radiation, Bloomfield Hills, Michigan.
- Warfvinge, K. & Bruun, A. 1996. Mercury accumulation in the squirrel monkey eye after mercury vapour exposure. *Toxicol.* 107: 189-200.
- Warfvinge, K. & Bruun, A. 2000. Mercury distribution in the squirrel monkey retina after in utero exposure to mercury vapour. *Environ. Res.* 83: 102-109.
- Wasserman, J.C.; Hacon, S.S. & Wasserman, M.A. 2001. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo e vida.* 46-53.
- Weis, J.S. & Weis, P. 1998. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:1-10.
- Wester, P. W.; Vethaak, A. D. & Muiswunkel, W.B. 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicol.* 86: 213-232.
- Who – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1989. Mercury – environmental aspects. Geneva. Environment health Criteria. 115p.
- Who – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1990. Methylmercury. Geneva. Environment health Criteria. 144p.
- Zook, B.C.; Wilpizeski, C.R. & Albert, E.N. 1989. Brain lesions in experimental methylmercury poisoning of Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Toxicol.* 107: 189-200.

## CAPÍTULO II

### Localização do metilmercúrio na retina de *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio* através da técnica de autometalografia

#### RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é um conhecido neurotóxico que afeta as funções visuais. A localização do MeHg na retina de *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio* foi investigada através da técnica de autometalografia (AMG). No desenho experimental para *Danio rerio*, os exemplares (n=20) foram distribuídos em dois grupos: um controle e um grupo contaminado com MeHg (13,5 µg Hg/g). Os olhos foram enucleados e os cortes de retina foram processados. A distribuição do mercúrio foi mapeada utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. A distribuição do mercúrio na retina revelou depósitos do metal na camada dos fotorreceptores (segmento interno e externo) e abundante depósito do metal na camada nuclear externa e interna. Ocasionalmente foi observada a presença de mercúrio nas camadas plexiformes e nos corpos celulares das células ganglionares. Também foi observado a presença do metal na região do disco óptico, porém não foi observada a presença de mercúrio na região das fibras do nervo óptico. Uma interessante diferença de acúmulo de mercúrio foi observada entre a região central e a região periférica da retina desta espécie. No desenho experimental para *Hoplias malabaricus* os exemplares foram distribuídos em três grupos: um grupo controle e dois grupos expostos ao MeHg (n=15). A contaminação foi realizada através de exemplares vivos de *Astyanax* sp, os quais receberam intraperitonealmente um volume de solução aquosa de MeHg correspondente à dose de 0,075 µg Hg/g de traíra ou 0,75 µg Hg/g. Os cortes de retina foram processados e a distribuição do mercúrio foi mapeada utilizando microscopia de luz. Para a maior dose do metal (0,75 µg Hg/g), as análises revelaram uma alta densidade de depósitos de mercúrio na camada plexiforme interna, camada dos fotorreceptores, camada nuclear externa e camada plexiforme externa. Muito ocasionalmente foi observado depósitos de mercúrio na camada nuclear interna e raramente na camada das células ganglionares. Para a menor dose do metal (0,075 µg Hg/g) foi observado a presença de depósitos de mercúrio na camada dos fotorreceptores e na camada nuclear externa. Raramente observou-se a presença de mercúrio nas camadas plexiformes. Não foi observado o acúmulo do metal na camada nuclear interna. Em ambas as doses não foi observada diferença no acúmulo do metal entre a região central e a região periférica da retina de traíra. Estes resultados demonstraram que o metilmercúrio acumulou-se nas células da retina de ambas as espécies, sendo visualizado através da técnica de autometalografia, uma importante ferramenta em estudos toxicológicos.

**Palavras-chave.** Metilmercúrio, retina, autometalografia, *Hoplias malabaricus*, *Danio rerio*.

## **Methylmercury distribution in *Hoplias malabaricus* and *Danio rerio* retina determined by autometallography**

### **ABSTRACT**

Methylmercury (MeHg) is a known neurotoxic organometal which affects visual functions. The localization of methylmercury in the retina of the fish *Hoplias malabaricus* and *Danio rerio* was investigated through autometallography (AMG). In *Danio rerio*, adult male specimens were distributed in two groups (n=20): a control group and a MeHg-contaminated group fed with food containing (13,5 µg Hg/g). The AMG methylmercury distribution in the retina was mapped using light and electron microscopy. Mercury deposits were found in the photoreceptor layer (outer and inner segments) and an abundant mercury deposit in the inner and outer nuclear layers. Occasionally, the presence of mercury in plexiform layers was observed and very rarely in the ganglion cell layer. Also the occurrence of mercury in cells from the disc region was observed, but not in the nerve fiber layer. An interesting difference was found between mercury accumulation in the central and peripheral regions of the retina. In *Hoplias malabaricus* three groups (n=15) mature fish (two tested and one control group) were acclimatized for four weeks to laboratory conditions and then the tested groups fed prey fish previously contaminated at an additional level of 0,75 µg Hg/g and 0,075 µg Hg/g at 5-day intervals and over 14 successive intervals whereas control group fed uncontaminated fish. *Hoplias malabaricus* specimens were then dissected for morphological analyses of light microscopy. In the highest dose mercury deposits were found in inner nuclear layer, photoreceptors layer, outer nuclear layer and outer plexiform layer. Occasionally was observed mercury deposits in the inner nuclear layer and rarely in the ganglion cell layer. In the lowest dose was observed Mercury deposits in photoreceptors layer and outer nuclear layer. Rarely was observed mercury deposits in plexiform layers. Was not observed the accumulation of mercury in inner nuclear layer. In both doses there was no difference in the accumulation of mercury in the central and peripheral regions of the retina. These results demonstrate that organic mercury is able to cross the blood-retina barrier. The present method is an important tool for physiological and toxicological studies in fish in both cell and tissue levels.

**Key words:** Methylmercury, retina, autometallography, *Hoplias malabaricus*, *Danio rerio*.

## **Localisation du méthylmercure dans la rétine chez *Hoplias malabaricus* et *Danio rerio* par la technique de l'autometallographie**

### **RÉSUMÉ**

Les études sur la distribution cellulaire du mercure dans la rétine des vertébrés sont rares. Pour apporter de nouveaux éléments cette étude a été réalisée avec l'objectif de déterminer la localisation du méthylmercure dans la rétine chez les poissons *Danio rerio* et *Hoplias malabaricus* par la technique d'autometallographie. Pour *Danio rerio* les animaux ( $n = 20$ ) ont été contaminés par voie trophique pendant 50 jours ( $13,5 \mu\text{g Hg/g}$ ). Les poissons étaient nourris deux fois par jour avec de la nourriture artificielle (correspondant à 2.5% de la masse du poisson). En parallèle un groupe témoin était nourri avec de la nourriture artificielle indemne de toute contamination. Après la période d'exposition, les yeux de chaque animal ont été prélevés, traités pour l'autometallographie puis observés en microscopies optique et électronique. La couche des photorécepteurs a montré des dépôts de mercure (segment interne et externe des cônes et bâtonnets), une grande quantité de dépôt de mercure a été observée sur la couche granuleuse externe, ainsi que dans la couche granuleuse interne. De plus, nous avons observé, ponctuellement la présence de mercure dans les couches plexiformes et très rarement dans la couche des ganglionnaires. Il n'a pas été signalé de dépôt de mercure dans la couche de fibres du nerf optique, cependant un marquage important a été observé dans la région du disque optique. Nous avons pu remarquer la présence de métal dans toute la longueur du tissu, avec un marquage plus important dans les régions centrales de la rétine. Pour *Hoplias malabaricus*, les animaux ( $n = 15$ ) ont été contaminés par voie trophique pendant 70 jours ( $0,075 \mu\text{g Hg/g}$  ou  $0,75 \mu\text{g Hg/g}$ ), en ayant un groupe témoin en parallèle. La contamination a été réalisée en donnant des poissons vivants, *Astyanax* sp, a chaque 5 jours. Après la période d'exposition, les yeux de chaque animal ont été prélevés, traités pour l'autometallographie et observés par la microscopie optique. Pour la dose de  $0,75 \mu\text{g Hg/g}$ , les analyses ont montré des dépôts de métaux sur la couche plexiforme interne, suivi par la couche des photorécepteurs, couche granuleuse externe et couche plexiforme externe. Occasionnellement ont été observés des dépôts de mercure sur la couche granuleuse interne et plus rarement sur la couche des ganglionnaires. Pour la dose de  $0,075 \mu\text{g Hg/g}$  nous avons observé une quantité inférieure de dépôt de mercure sur la couche des photorécepteurs et dans la couche granuleuse externe. La présence de mercure a rarement été observée dans les couches plexiformes. Nous n'avons pas observé de mercure dans la couche granuleuse interne. Pour les 2 niveaux de contamination nous avons observé la présence de mercure dans toute la longueur du tissu de façon équivalente. D'après ces résultats, l'effet de l'accumulation de méthylmercure dans le système visuel ne peut pas être exclu, et la technique de l'autometallographie pourrait être proposée comme un outil intéressant dans l'étude de la distribution des métaux sur la rétine chez les poissons exposés au mercure.

**Mots clés:** Méthylmercure, rétine, autometallographie, *Hoplias malabaricus*, *Danio rerio*.

## 1 INTRODUÇÃO

Existem algumas técnicas histológicas utilizadas para localizar metais pesados em tecidos, uma delas é o método desenvolvido por Lillie (1965), aplicado para demonstrar cobre em tecidos biológicos. Outra técnica é o método desenvolvido por Pearse (1980), utilizado para demonstrar zinco em tecidos animais. Estes métodos são bastante específicos, porém não muito sensíveis, sendo incapazes de detectar pequenas quantidades de metais em tecidos biológicos (Zalewski *et al.*, 1994).

Na década de 80 um grande número de trabalhos começou a ser apresentado com a técnica de autometalografia (AMG), baseada na amplificação de vestígios de prata em tecidos (Danscher & Zimmer, 1978; Danscher, 1981; Hacker *et al.*, 1988; Danscher & Montagnese, 1994). O princípio básico da técnica pode ser resumido como a formação de cristais ou grânulos de prata ao redor dos vestígios de metal, depois do material ter sido coberto com uma emulsão e colocado em uma solução de desenvolvimento (Danscher, 1984). Com estes trabalhos a AMG passou a ser uma poderosa ferramenta na preparação de tecidos que serão avaliados sob técnicas de microscopia (Danscher, 1984; Dimitriadis & Papadaki, 2004).

A técnica de AMG pode ser utilizada em estudos de distribuição de metais em tecidos animais expostos à baixas e à elevadas concentrações. Esta técnica não é específica para certos metais, mas é altamente sensível e tem sido utilizada em tecidos de vertebrados para determinar os locais de acúmulo do metal (Kodama *et al.*, 1993; Soto *et al.*, 1998; Horkey *et al.*, 2002; Dimitriadis & Papadaki, 2004). Esta técnica pode ser aplicada em cortes de parafina, microscopia eletrônica de transmissão, bem como em tecidos processados em criostato.

Danscher & Möller-Madsen (1985) estudaram através da técnica de AMG comparativamente diferentes formas químicas de Hg, principalmente o MeHg e os resultados demonstraram que a técnica permite visualizar o metal em níveis teciduais e celulares após a contaminação por derivados orgânicos.

## **1.1 O sistema visual de *Danio rerio* como modelo de estudo**

O sistema visual de *Danio rerio* é similar ao de outros vertebrados (Cepko *et al.*, 1996), exibe um comportamento visual precoce (Easter & Nicola 1997) e em adição possui uma retina dupla (Branchek *et al.*, 1984). Anatomicamente a retina desta espécie continua a se desenvolver após a eclosão dos ovos, promovendo uma oportunidade de correlacionar o desenvolvimento das estruturas da retina com a fisiologia e o comportamento visual (Bilotta & Saszik, 2001). Os olhos dos animais adultos são similares aos olhos de outras espécies, aparecendo 12 horas após a fertilização (Schmitt & Dowling, 1994).

Todas estas características fazem de *Danio rerio* um modelo não somente para estudos de desenvolvimento visual, mas também para estudos de desenvolvimento neural.

### **1.1.1 Anatomia da retina de *Danio rerio***

A retina dos vertebrados consiste em três camadas nucleares e duas camadas plexiformes, camada plexiforme externa (CPE) e camada plexiforme interna (CPI) (Dowling, 1987). A camada nuclear externa (CNE) contém os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes). A camada nuclear interna (CNI) contém os corpos celulares das células horizontais (CH), bipolares (CB) e amácrinas (CA). A camada de células ganglionares (CCG) contém os corpos celulares das células ganglionares (CG). As camadas plexiformes localizam-se entre as camadas nucleares e é neste local que ocorrem as conexões sinápticas entre os neurônios da retina. A camada plexiforme externa consiste nas conexões entre fotorreceptores, células bipolares e células horizontais. A camada plexiforme interna consiste nas conexões entre células bipolares, amácrinas e ganglionares (Bilotta & Saszik, 2001).

### **1.1.2 Fotorreceptores**

Estudos anatômicos demonstraram que *Danio rerio* adulto possui cones simples e cones duplos, organizados em um mosaico padrão (Raymond *et al.*, 1995). Trabalhos com microespectrofotometria demonstraram que o zebra fish adulto possui quatro fotopigmentos para os cones, cada um contido em um cone anatomicamente distinto. O pigmento sensível ao comprimento de onda ultravioleta ( $\lambda_{max} = 362\text{nm}$ ; cones-UV), encontrado nos cones simples curtos, o pigmento sensível ao comprimento de onda

curto ( $\lambda_{\max} = 415\text{nm}$ ; cones-S), encontrado nos cones simples longos, o pigmento sensível ao comprimento de onda médio ( $\lambda_{\max} = 480\text{nm}$ ; cones-M), e o pigmento sensível ao comprimento de onda longo ( $\lambda_{\max} = 570\text{nm}$ ; cones-L), encontrados respectivamente nos membros acessório e principal dos cones duplos (Vihtelic *et al.*, 1999). Estudos também mostraram que *Danio rerio* possui duas diferentes opsinas verdes (cones-M) (Vihtelic *et al.*, 1999). Os bastonetes apresentam rodopsina, uma condição normal (Schawanzara, 1967).

### 1.1.3 Células bipolares

Connaughton & Nelson (2000), identificaram 13 tipos diferentes de células bipolares na retina de *Danio rerio* adulto. A classificação é baseada na terminação dos axônios destas células nas sublâminas da camada plexiforme interna bem como nos mecanismos receptores de glutamato das células dendríticas. Na sublâmina **b** encontramos as células bipolares ON que possuem no mínimo dois tipos diferentes de receptores de glutamato. Algumas células bipolares ON possuem ambos os tipos de mecanismo receptor. Na sublâmina **a** encontramos as células bipolares OFF que respondem com um AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) em resposta ao glutamato. Algumas células bipolares terminam em ambas as sublâminas **a** e **b** são chamadas de células multiestratificadas (Bilotta & Saszik, 2001).

### 1.1.4 Células horizontais e amácrinas

*Danio rerio* adulto possui dois tipos de células horizontais, o tipo A que possui um corpo redondo com muitos processos dendríticos e um tipo B com o corpo celular alongado e com poucos processos dendríticos (Connaughton & Dowling, 1997). Estas células possuem baixa condutância elétrica quando comparadas com outras espécies de peixes (McMahon, 1994). Os neurotransmissores encontrados nas células horizontais e amácrinas são similares aos encontrados em outras espécies de vertebrados, GABA nas células horizontais e amácrinas e glicina nas células amácrinas (McMahon, 1994).

### 1.1.5 Células ganglionares

As células ganglionares têm sido classificadas através das propriedades de suas respostas, como fásica ou tônica (Sajovic & Levinthal, 1982). São os primeiros neurônios a aparecerem na retina desta espécie e desenvolvem-se 28 horas após a fertilização (Hu & Easter, 1999).



## **2 JUSTIFICATIVA**

Informações sobre a localização subcelular do mercúrio são importantes para um entendimento mais detalhado dos processos metabólicos envolvidos na biotransformação e nas diferentes origens de absorção deste metal. Existe um grande número de estudos descrevendo a distribuição do mercúrio em tecidos animais, porém uma menor quantidade descrevendo esta distribuição em células da retina. A autometalografia é uma técnica que nos permite evidenciar a localização e a quantidade de metais pesados em vários sistemas, caracterizando-se como importante método para o estudo do sistema nervoso central.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*, visando conhecer o potencial tóxico deste composto, através de exposição experimental trófica e subcrônica.

#### **3.2 Objetivo específico**

Analisar, com o auxílio de técnicas de autometalografia a localização tecidual e celular do metilmercúrio na retina de *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*.

## **4 MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 Animal experimental: *Hoplias malabaricus***

Descrição no capítulo I, subitem 4.1

### **4.2 Animal experimental: *Danio rerio***

O zebra fish (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822), conhecido como peixe zebra ou paulistinha é um ciprinídeo (família Cyprinidae) com padrão de coloração característico, apresentando listras preto-azuladas que o fazem semelhante a uma zebra (Figura 20). É um peixe tropical originário do continente Asiático: Paquistão, Índia, Bangladesh e Nepal. É uma espécie facilmente mantida em condições controladas de laboratório, não requer muitos cuidados para sua criação e é facilmente encontrada em lojas comerciais.

Nos últimos 20 anos o zebra fish emergiu como um eminente modelo animal para estudos de genética e de desenvolvimento (Fishman, 2001) e mais recentemente para estudo de doenças humanas (Penberthy *et al.*, 2002). Existe um grande número de atributos favoráveis para que esta espécie tenha se tornado um modelo animal: alcançam maturidade sexual com 10 a 12 semanas e pico de desova de 5 a 10 dias – cada fêmea produzindo, em média, 150 a 400 ovos por dia. Os ovos, transparentes e pequenos são fertilizados externamente. A eclosão se dá entre 48 e 96 horas. O embrião do zebra fish é transparente nos primeiros estágios de desenvolvimento permitindo fácil identificação, estudo das estruturas neurais e observação de más formações. Tal transparência é ideal para localização imunohistoquímicas e para técnicas de marcação de proteínas (Fishman, 2001).

Apresentam o sistema nervoso central relativamente simples, quando comparado com roedores e por isso podem ser utilizado em pesquisas de comportamento, controle motor, aprendizado e interações sociais. É uma espécie que apresenta um rápido crescimento, sendo possível estudar a maioria dos órgãos nos primeiros dias de vida do peixe (Goldsmith, 2004).

Possuem uma genética similar aos humanos (Lamason *et al.*, 2005) isso os torna populares em estudos biomédicos, porém o seu uso continua crescendo em outras áreas de pesquisa.

As similaridades do sistema visual do Zebrafish com outros vertebrados fizeram deste animal um válido modelo visual. Sua anatomia, fisiologia, genética e comportamento visual têm sido estudados em animais adultos e em fase de desenvolvimento (Bilotta & Saszik, 2001).



Figura 20 - Exemplar de *Danio rerio*. Fonte: [www.animalpicturesarchive.com/view](http://www.animalpicturesarchive.com/view)

#### **4.3 Desenho experimental – bioensaio de *Hoplias malabaricus***

Descrição no capítulo I, subitem 4.2

#### **4.4 Desenho experimental – bioensaio de *Danio rerio***

Animais adultos machos (n=20) com peso ( $0,88 \pm 0,03$  g) e tamanho ( $3,63 \pm 0,05$  cm) padrão foram transportados para o laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia dos Sistemas Aquáticos da Universidade de Bordeaux - França (Estação Marinha de Arcachon) e distribuídos em 2 tanques de 100 litros cada. Um dos tanques recebeu os animais referentes ao grupo controle e o outro os animais referentes ao grupo contaminado com MeHg ( $13,5 \mu\text{g Hg/g}$ ). Os animais foram aclimatados por um período de um mês e as fêmeas foram excluídas do experimento para evitar interferência do período reprodutivo (Figura 21).

Durante o experimento a temperatura ( $24 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) e os níveis de oxigenação foram controlados. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com alimento artificial (Dr. Bassleer Biofish, Telgte, Netherlan), correspondendo a 2,5% do peso do peixe, durante um período de 50 dias. A cada dois dias 1/3 do volume de água de cada tanque foi trocado e o fundo dos mesmos higienizados para eliminar as fezes e os resíduos de comida.

Os olhos de cada animal foram retirados e dissecados em gelo para as posteriores análises: AMG e concentração de Hg.

O alimento utilizado no experimento foi contaminado através do método descrito por Hammerchmidt *et al.* (2002), o qual resulta da mistura de comida artificial (Dr. Bassleer Biofish, Telgte, Netherlan) com etanol 100% (Prolabo) contendo MeHg clorídrico dissolvido (Alltech). A dieta do grupo controle foi obtida pela mesma mistura, porém utilizando etanol livre de MeHg. A quantidade total de MeHg foi analisada em amostras de alimento contaminado e não contaminado antes e durante o experimento. Os resultados demonstraram que a concentração de MeHg no alimento contaminado não variou durante o período de experimentação. A concentração de MeHg encontrada na dieta do grupo controle foi de 0,06  $\mu\text{g Hg/g}$  e 13,5  $\mu\text{g Hg/g}$  no grupo contaminado.

A concentração utilizada neste trabalho foi baseada em concentrações do organometal encontradas em espécies de peixes (*Hoplias aimara*) provenientes de áreas contaminadas da Guiana Francesa.



Figura 21 - Desenho experimental para *Danio rerio* realizado no Laboratório de ecofisiologia e ecotoxicologia dos sistemas aquáticos da Universidade de Bordeaux - França. A: Tanques de PVC utilizados durante o experimento. B: Tanques com aeração, oxigenação e temperatura controlada. C: Exemplar de *Danio rerio* anestesiado para a remoção do material utilizado nas análises. D: Bateria de reagentes utilizados na técnica de autometalografia.

#### **4.5 Coleta do material biológico – *Hoplias malabaricus***

Descrição no capítulo I, subitem 4.3

#### **4.6 Coleta do material biológico – *Danio rerio***

Após 50 dias de exposição, os animais foram anestesiados através de imersão em gelo, sacrificados após secção medular e os olhos coletados para a análise de autometalografia.

#### **4.7 Processamento do material biológico**

##### **4.7.1 Técnica de autometalografia**

##### **Microscopia de Luz**

Após a remoção dos olhos, estes foram imersos no fixador Bouin, durante 24 horas. Após a fixação o material foi colocado em álcool 70% e foram realizadas várias lavagens do material na mesma concentração alcoólica. Após esta fase, as peças passaram pelo processo da desidratação e em seguida a fase da diafanização do material. Na fase seguinte, a infiltração, o material foi imerso em Paraplast Plus® (Sigma) 56°C, em dois banhos consecutivos. Na última fase, a emblocagem, o material foi posicionado em formas específicas, com o intuito de se obter cortes longitudinais ou radiais à retina durante o processo de confecção das lâminas histológicas permanentes. Após a inclusão, os blocos foram trimados, para a obtenção dos cortes histológicos com espessuras de 10 micrometros. Seguiu-se o processo de hidratação dos cortes histológicos e secagem em estufa (30-40°C) durante duas horas. O processo de autometalografia utilizado foi modificado de Danscher (1984) e desenvolveu-se em uma sala escura onde os cortes receberam uma solução de prata (Emulsion L4, Ilford Nuclear Emulsion TAAB) durante 15 minutos. Para a técnica de microscopia de luz a solução de prata foi colocada sobre os cortes com a ajuda de um pincel e em seguida com a ajuda de um rolo. Para a técnica de microscopia eletrônica de transmissão a solução de prata foi colocada sobre os cortes com a ajuda de um pincel e posteriormente colocados sobre uma placa de silicone para facilitar o manuseio. Na fase seguinte as lâminas passaram pelo revelador (Tetenal ultrathin, AGFA) 15 minutos, solução de parada (ácido acético 1%) 1 minuto,

solução de fixação (B&W Fixer, AGE, AGFA) 10 minutos e para finalizar, lavagem em água destilada durante 15 minutos. Os passos seguintes incluíram a coloração do material com Hematoxilina e Eosina, desidratação do material, montagem das lâminas permanentes e observação em microscópio. A aquisição das imagens foi realizada através do programa Meta Imagem (Meta View serie 5.0 Universal Imaging Corporation, USA) na Universidade de Bordeaux, França.

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Finalizada a remoção dos olhos os mesmos foram enucleados e a cuia óptica foi seccionada e fixada durante 24 horas em Glutaraldeído 3%. Após o tempo de fixação foi realizada a lavagem do material em tampão Cacodilato 0,1M. O processamento do material seguiu-se com a pós-fixação em solução de ósmio durante 2 horas, desidratação do material, em série alcoólica em concentrações crescentes e a subsequente substituição do etanol por óxido de propileno. Na sequência, procedeu-se a pré-infiltração do material em uma mistura com partes iguais de resina (Araldita) e óxido de propileno em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a infiltração e inclusão do material em resina pura, a qual foi polimerizada em estufa regulada 60°C por um período de três dias. Depois da total polimerização da resina, os blocos foram trimados (ultramicrotomo Reichert) e os cortes foram preparados para a técnica de autometalografia. O processo de autometalografia para microscopia eletrônica de transmissão segue o mesmo protocolo utilizado para microscopia de luz. A observação e captura das imagens foi realizada no Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM10 na Universidade de Bordeaux, França.

#### **4.7.2 Concentração de Hg nos olhos**

A concentração total de Hg nos olhos de *Danio rerio* foi determinada através de espectrofotometria de absorção atômica. As análises foram realizadas automaticamente após a decomposição térmica (750°C) com fluxo de oxigênio (AMA 254, Prague, Czech Republic). O limite de detecção do método foi de 0,01 ng.Hg. Foram utilizadas três réplicas para cada órgão e para cada condição experimental. A validade do método foi verificada durante cada série, tendo como padrão de referência biológica TORT2 (Cambier *et al.*, 2009).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 *Danio rerio***

#### **5.1.1 Condições experimentais**

Não houve mortalidade de *Danio rerio* durante o bioensaio de exposição subcrônica e os indivíduos testados permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento.

#### **5.1.2 Bioacumulação de Hg**

A concentração total de Hg foi determinada nos olhos de *Danio rerio* e expressos em microgramas por grama de massa total do olho. A concentração de Hg nos olhos do grupo controle foi muito baixa ( $0,03 \pm 0,003 \mu\text{g}$  de Hg/g), enquanto que nas amostras do grupo exposto ao MeHg o acúmulo do metal foi 264 vezes mais alta ( $7,92 \pm 0,36 \mu\text{g}$  de Hg/g).

#### **5.1.3 Distribuição do metilmercúrio**

Nenhum grânulo ou zona densa correspondente a prata foram visualizados no seio das estruturas teciduais dos indivíduos utilizados como controles, tanto para as análises de microscopia de luz (ML, Figura 22A; Figura 23A) quanto para as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET, Figura 24A; Figura 24B).

As amostras provenientes dos indivíduos contaminados com MeHg colocaram em evidência a presença de mercúrio, facilmente detectado pela presença de depósitos negros sobre o tecido e com uma localização heterogênea do metal na retina. Cortes não corados com Hematoxilina e Eosina para os indivíduos expostos ao mercúrio também foram utilizados nas análises e evidenciaram depósitos de mercúrio sem interferência do corante (Figura 22B). A necessidade da utilização de cortes mais espessos e ausência de coloração em algumas lâminas limitaram a definição das imagens.

Uma alta densidade de depósitos de mercúrio foi encontrada na camada nuclear interna e na camada nuclear externa. Ocasionalmente foi observada a presença de mercúrio nas camadas plexiformes externa e interna e, muito raramente, na camada de células ganglionares (Figura 22B; Figura 22C ; Figura 22D ; Figura 24b). As análises da MET demonstraram depósitos de prata no segmento interno e nos discos dos segmentos



externos dos fotorreceptores (Figura 24a), porém a mesma região não pôde ser observada através da ML, devido à presença de uma grande quantidade de grânulos de melanina. A posição destes pigmentos é modificada pelos movimentos retinomotores e pelo papel do tapetum do epitélio pigmentado. Também observamos a presença do metal em células da região do disco óptico (Figura 23B; Figura 23b), porém não a presença do mercúrio na região das fibras do nervo óptico. Uma diferença interessante no acúmulo do metilmercúrio foi observada entre a região central e a periférica da retina desta espécie (Figura 22C; Figura 22D).

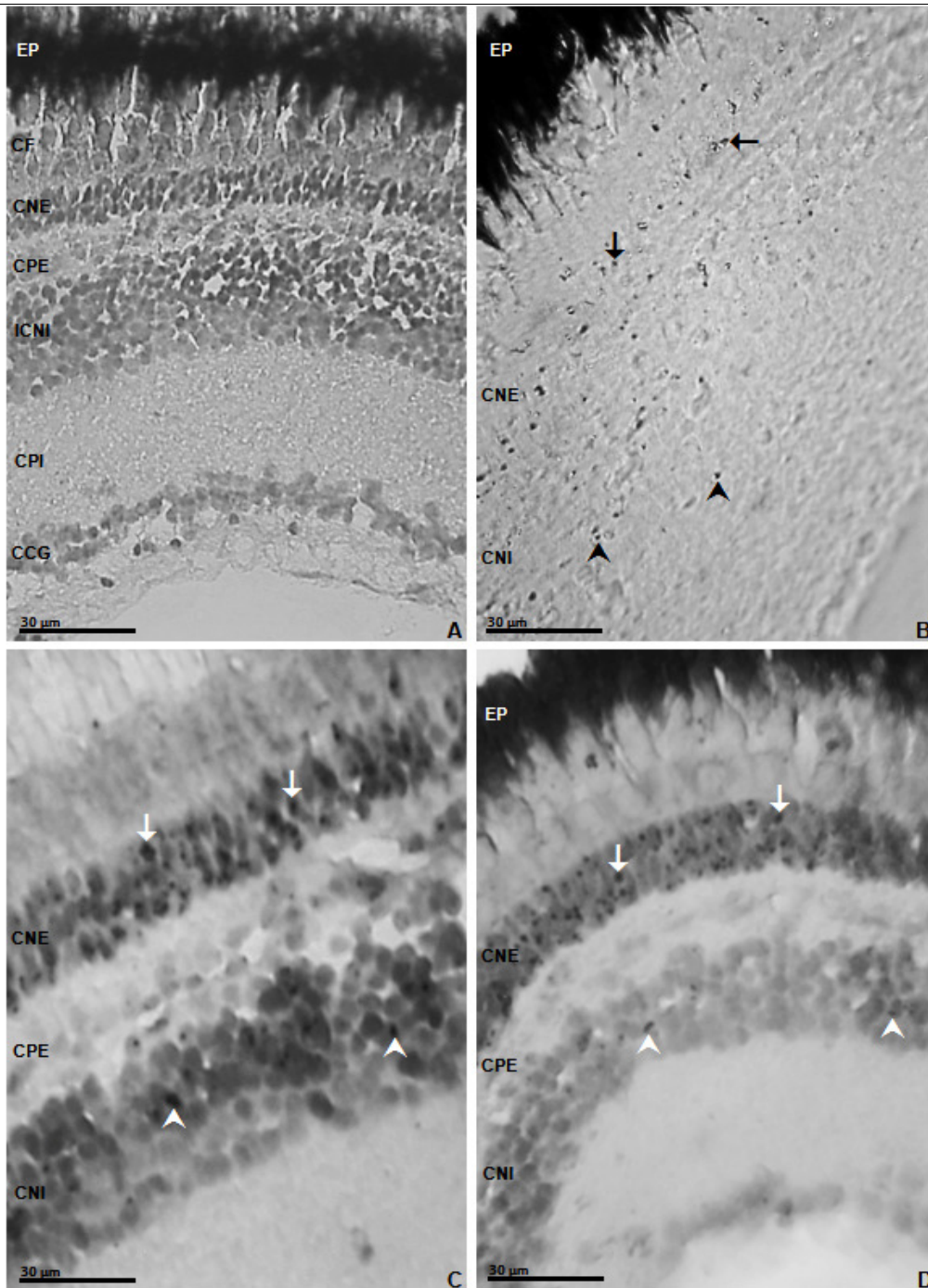


Figura 22 - Fotomicrografias da retina de *Danio rerio*. A: Grupo controle. O metal não foi visualizado. EP epitélio pigmentado; CNE camada nuclear externa; CPE camada plexiforme externa; CNI camada nuclear interna; CPI camada plexiforme interna; CCG camada das células ganglionares. B: Grupo contaminado com MeHg. Demonstração autometalografica do MeHg. Corte não corado com H.E. com depósitos de mercúrio observados na CNE (▼) e na CNI (▲). C: Grupo contaminado com MeHg. Região central da retina corada com H.E. Depósitos de mercúrio observados na CNE (▼) e na CNI (▲). D: Grupo contaminado com MeHg. Região periférica da retina apresentando uma quantidade menor de mercúrio na CNE (▼) e na CNI (▲). Aumento: 63X.

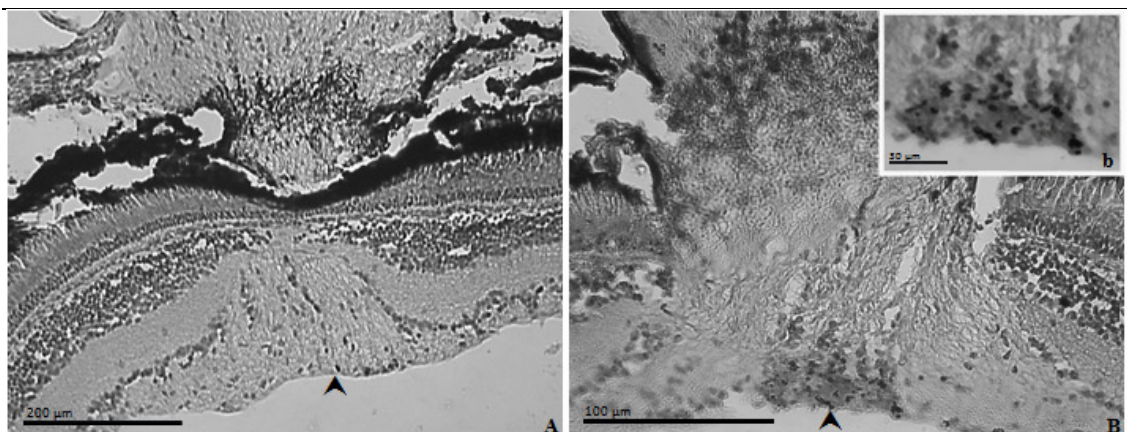


Figura 23 - Fotomicrografias da retina de *Danio rerio*. A: Grupo controle. O metal não foi visualizado na região do disco óptico (▲). Aumento 10x. B: Grupo contaminado com MeHg. Aumento 25X. b: em detalhe uma considerável quantidade de depósitos de mercúrio visualizados em células da região do disco óptico (▲). Aumento 63X.

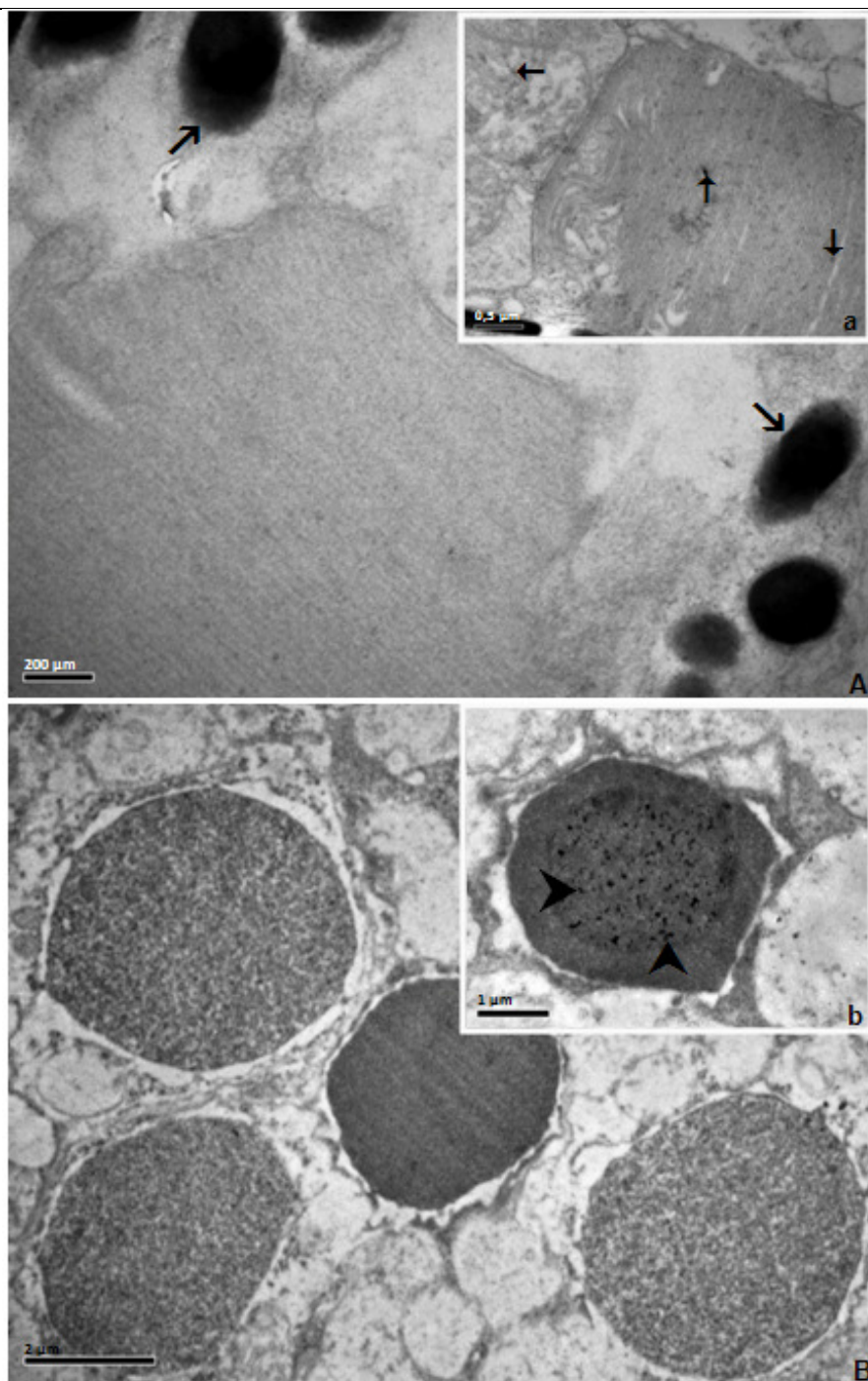


Figura 24 - Eletromicrografias da retina de *Danio rerio* após a aplicação da técnica de autometalografia. A: Grupo controle. Observamos a ausência de depósitos de mercúrio e a presença de grânulos de melanina próximos a célula fotorreceptora (↘). a: Em detalhe célula fotorreceptora com presença de depósitos de mercúrio (↔) na região do segmento interno e externo. B: Grupo controle. O metal não foi visualizado na camada nuclear interna. b: em detalhe uma fração da camada nuclear interna com depósito de mercúrio no interior dos corpos celulares (▲).

## 5.2 *Hoplias malabaricus*

### 5.2.1 Condições experimentais

Descrição no capítulo I, subitem 5.1

### 5.2.2 Distribuição do metilmercúrio

Nenhum grânulo ou zona densa correspondente à prata foi visualizado no seio das estruturas teciduais dos indivíduos utilizados como controles (Figura 25A).

As amostras provenientes dos indivíduos contaminados com ambas as doses de MeHg colocaram em evidência a presença de mercúrio, facilmente detectado por depósitos negros sobre o tecido e com uma distribuição homogênea do metal na retina. Cortes não corados com Hematoxilina e Eosina para os indivíduos expostos ao mercúrio também foram utilizados nas análises e evidenciaram os grânulos de prata sem interferência do corante (Figura 25B).

Para a maior dose do metal (0,75 µg Hg/g), um maior depósito de mercúrio foi encontrado na camada plexiforme interna, seguida pela camada dos fotorreceptores, camada nuclear externa e camada plexiforme externa. Muito ocasionalmente observaram-se depósitos de mercúrio na camada nuclear interna e raramente na camada das células ganglionares (Figura 25C; Figura 26A; Figura 26B).

Para a menor dose do metal (0,075 µg Hg/g) foi observado um menor acúmulo de mercúrio na retina de *H. malabaricus*. Em menor intensidade observou-se a presença do metilmercúrio na camada dos fotorreceptores e na camada nuclear externa. Raramente observou-se a presença de mercúrio nas camadas plexiformes (Figura 25D). Nesta dose não foi observado o acúmulo do metal na camada nuclear interna. Em ambas as doses utilizadas do metal não foram observadas diferenças no acúmulo do metal entre a região central e a periférica da retina.



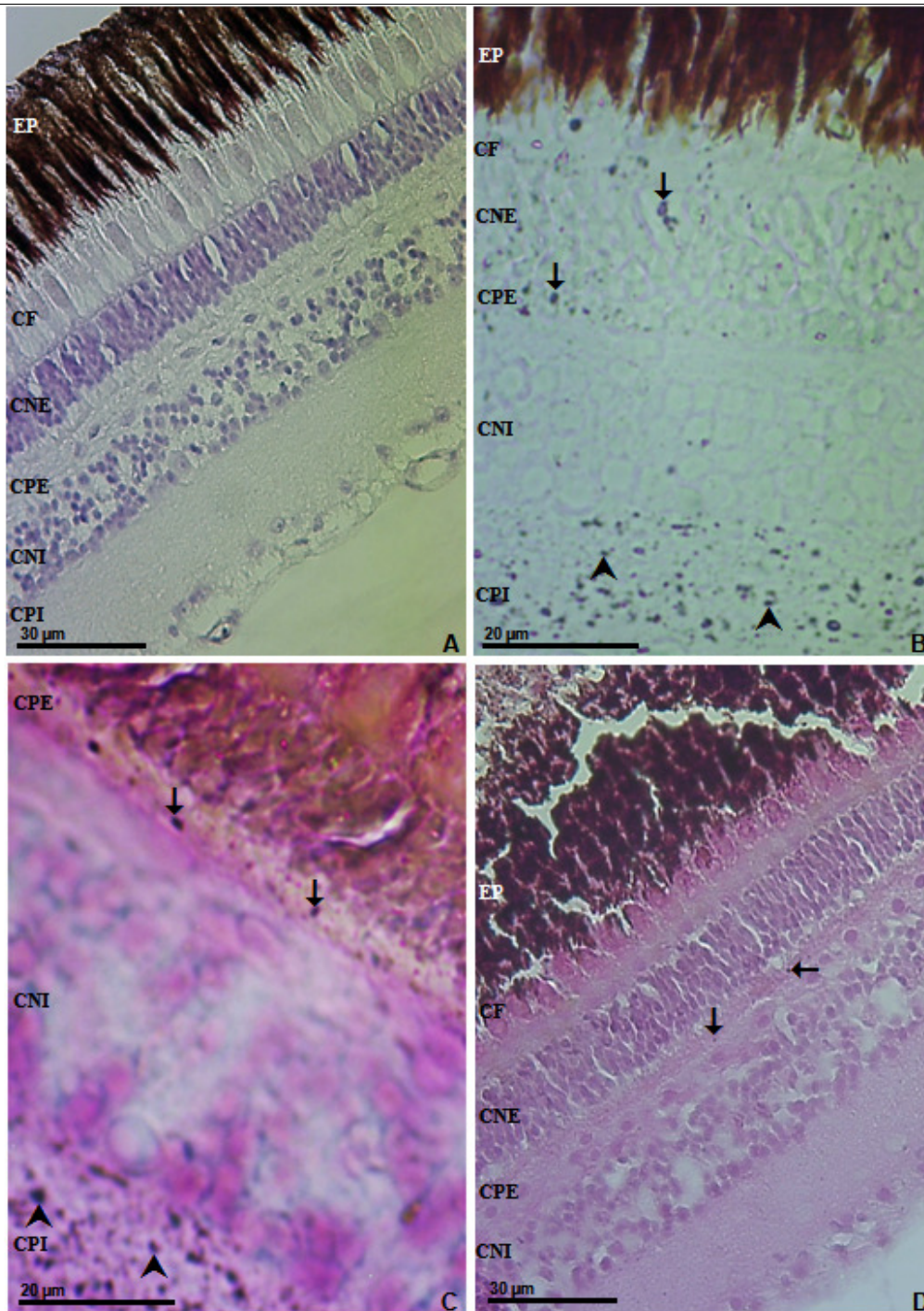


Figura 25 - Fotomicrografias da retina de *Hoplias malabaricus*. A: Grupo controle. O metal não foi visualizado. Corte corado com H.E. EP epitélio pigmentado; CP camada dos fotorreceptores; CNE camada nuclear externa; CPE camada plexiforme externa; CNI camada nuclear interna; CPI camada plexiforme interna. Aumento: 25X. B: Grupo contaminado com MeHg (0,75 µg Hg/g). Corte não corado com H.E. Depósitos de mercúrio observados na CNE camada nuclear externa (↓), CPE camada plexiforme externa (↓) e CPI camada plexiforme interna (▲). Aumento: 63X. C: Grupo contaminado com MeHg (0,75 µg Hg/g), corado com H.E. Depósitos de mercúrio observados na camada plexiforme externa (↓) e camada plexiforme interna (▲). Aumento: 63X. D: Grupo contaminado com MeHg (0,075 µg Hg/g). Corte corado com H.E. Depósitos de mercúrio observados na camada plexiforme externa (↓). Aumento: 63X.

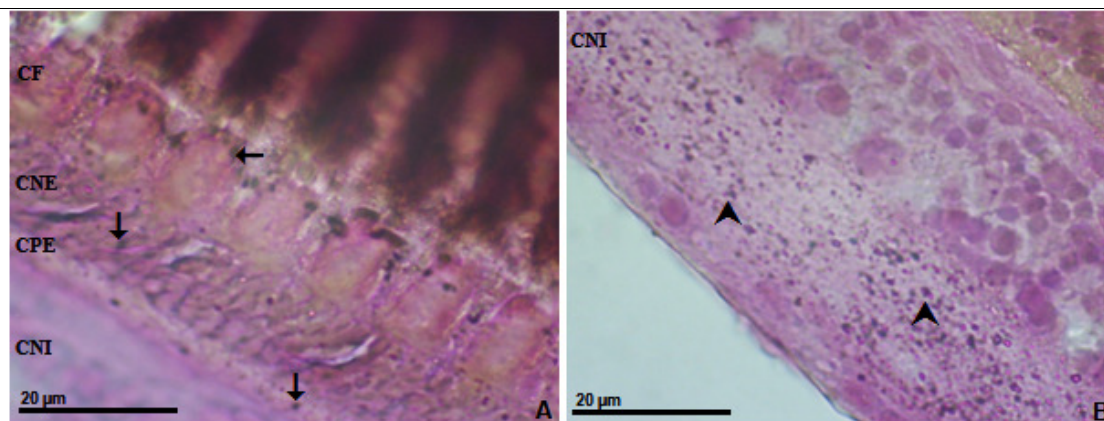


Figura 26 - Fotomicrografias da retina de *Hoplias malabaricus* - Demonstração autometalografica do MeHg. Grupo contaminado com a maior dose de MeHg (0,75 µg Hg/g). A: Grânulos de prata observados na camada dos fotorreceptores (←), camada nuclear externa e na camada plexiforme externa (↓). B: Grânulos de prata observados na camada plexiforme interna (▲). Cortes corados com H.E. Aumento: 63X.

## 6 DISCUSSÃO

Análises químicas são freqüentemente utilizadas em estudos ambientais e em particular em toxicologia para determinar a presença de metais nas amostras biológicas. A maioria dos processos envolve a destruição das amostras por digestão utilizando ácidos concentrados. Por outro lado, os métodos histológicos convencionais também são amplamente utilizados para se detectar a presença de elementos metálicos. Estes por sua vez preservam a estrutura da amostra biológica. Dentre as técnicas histológicas, a autometalografia tem sido capaz de demonstrar metais em pequenas amostras de tecido e pode ser utilizada simultaneamente com outras análises para elucidar a fisiologia celular e mecanismos patogênicos ocasionados por metais tóxicos absorvidos pelas células (Soto *et al.*, 1998). Danscher (1984) inicialmente utilizou a técnica de autometalografia para visualizar metais no sistema nervoso de ratos após perfusão, ajustando posteriormente a técnica para tecido nervoso humano. Desde então, outros usos para a técnica foram propostos (Hacker *et al.*, 1988) e com o passar dos anos ela tem sido sugerida como uma ferramenta útil no domínio da toxicologia ambiental, podendo ser utilizada em estudos de distribuição de metais em tecidos animais expostos em ambientes contaminados com baixas ou moderadas concentrações do contaminante (Wachsmuth, 1991).

A autometalografia tem sido muito utilizada para localizar mercúrio em tecidos de mamíferos (Danscher & Norgaard, 1983; Danscher & Möller-Madsen, 1985), porém muito pouco utilizada para a localização de metais em tecidos de peixes (Baatrup *et al.*, 1986; Baatrup & Danscher, 1987). Os resultados apresentados neste trabalho constituem a primeira demonstração da localização do metilmercúrio na retina de *Danio rerio* e *Hoplias malabaricus* através da técnica de autometalografia confirmando a atuação do mercúrio no sistema visual.

O metilmercúrio provoca graves distúrbios neurológicos no sistema nervoso central de humanos e animais experimentais (Clarkson *et al.*, 2003). A distribuição do mercúrio no sistema nervoso central tem sido estudada em camundongos (Warfvinge, 1995), ratos (Warfvinge *et al.*, 1992), suínos (Berlin *et al.*, 1969) e macacos (Warfvinge *et al.*, 1994). Em peixes existem poucas evidências dos efeitos do mercúrio na visão. Recentemente utilizando a retina de *H. malabaricus* como modelo de estudo, Tanan *et*



*al.* (2006) examinaram a fisiologia das células horizontais expostas ao MeHg e encontraram respostas eletrofisiológicas alteradas. Além disso, Bonci *et al.* (2006) descreveram perda da imunoreatividade de células amácrinas PV-IR e bipolares PKC-IR de *H. malabaricus* expostas à altas doses de MeHg.

A diminuição de sensibilidade escotópica é frequentemente relatada como principal sintoma após exposições a metais pesados. Fox & Sillman (1979) demonstraram reduções no potencial receptor de bastonetes, mas não em cones da retina de sapos expostos ao mercúrio. No entanto, Rice & Gilbert (1982) sugeriram que em macacos a exposição ao MeHg pode diminuir a sensibilidade ao contraste, indicando uma perda de visão foveal (fotópica).

Em seus estudos Hawryshyn *et al.* (1982) demonstraram uma redução na sensibilidade espectral, sugerindo que ambos os mecanismos, escotópico e fotópico, são afetados pela exposição ao MeHg. Além disso, dados psicofísicos de humanos revelaram que a retina central deve ser afetada por intoxicações mercuriais, uma vez que várias funções mediadas por esta região mostraram perdas (Silveira *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2004, 2005; Feitosa-Santana *et al.*, 2007; Zachi *et al.*, 2007; Barboni *et al.*, 2008).

Segundo Evans & Garman (1980), um dos primeiros sinais de intoxicação por mercúrio é o comprometimento da visão escotópica. Além disso, a exposição crônica ao mercúrio pode resultar em uma perturbação da visão periférica, seguido por uma severa perda de visão central (Finocchio *et al.*, 1980; Saldana *et al.*, 2006).

Surpreendentemente, os mecanismos pelos quais os íons de mercúrio chegam às células fotorreceptoras e causam subsequentes perdas visuais não são claros. Na retina de *Danio rerio* foi observado pela primeira vez a presença de abundantes depósitos de mercúrio nos segmentos internos e externos das células fotorreceptoras, depósitos estes que foram facilmente visualizados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, a qual forneceu imagens nítidas deste acúmulo. Nos cortes histológicos da retina de *Hoplias malabaricus* também houve a presença de depósitos de mercúrio na camada dos fotorreceptores, porém não foi possível confirmar a presença de depósitos de mercúrio no segmento interno e externo dos fotorreceptores desta espécie devido a não utilização da MET.

Para ter acesso às células fotorreceptoras, o mercúrio precisa atravessar o epitélio pigmentar da retina (Bridges *et al.*, 2007). O epitélio pigmentar é uma camada única de células estrategicamente posicionadas entre os capilares da coróide e a retina neural, sendo responsável pelo transporte de nutrientes e pela retirada de resíduos das células fotorreceptoras. Além de nutrientes essenciais e íons, o epitélio pigmentado pode também transportar compostos tóxicos e metais como o mercúrio para as células fotorreceptoras (Bridges *et al.*, 2007).

Após exposições ao mercúrio, o metal foi observado em células do epitélio pigmentar e nas células fotorreceptoras (Warfvinge & Bruun 1996). Este acúmulo pode trazer efeitos prejudiciais ao epitélio pigmentar e também aos fotorreceptores (Fox & Sillman 1979; Erie *et al.*, 2005; Warfvinge & Bruun 1996, 2000). Bridges *et al.* (2007) sugerem que o mercúrio que chega até as células fotorreceptoras é primeiramente retido pelo epitélio pigmentado através de mecanismos envolvendo transportadores de nutrientes essenciais. Por outro lado, quando o epitélio e o mercúrio aparecem conjugados com a cisteína, o metal acessa o compartimento intracelular das células-alvo através de aminoácidos e transportadores orgânicos.

Como observado neste estudo, o mercúrio acessa as células fotorreceptoras da retina de *Danio rerio* e acumula-se nestas células na região do segmento interno e externo, e também na camada nuclear externa, camada esta formada pelos núcleos dos fotorreceptores. Os fotorreceptores comunicam-se com outras células da retina localizadas na camada nuclear interna (células horizontal, células amácrine e células bipolares), que também apresentou um grande depósito de mercúrio nos núcleos celulares. Segundo Goyer & Moore (1974) existem evidências de que o núcleo acumule mais metais quando comparado com outros compartimentos celulares, devido à presença de proteínas ácidas.

A membrana limitante interna da retina *Danio rerio* é coberta por um complexo sistema de vasos sanguíneos e estes vasos estão em contato direto com as células de Müller e com a camada de células ganglionares (Alvarez *et al.*, 2007). Assim, esta pode ser considerada outra rota de entrada de mercúrio na retina. Uma vez que as células ganglionares também possuem contato com as células da camada nuclear interna, sugerimos que o acesso de mercúrio à retina desta espécie, ocorre tanto pelos vasos da coróide quanto pelos sistemas vasculares da retina, acumulando-se em todas as células da retina, com maior ou menor intensidade.

Uma vez que foram observados depósitos de mercúrio no segmento interno dos fotorreceptores, não podemos deixar de citar prováveis danos mitocondriais. As mitocôndrias são consideradas organelas-alvo para poluentes ambientais como o MeHg (Belyaeva *et al.*, 2002; Belyaeva & Korotkov, 2008). Um estudo utilizando os mesmos indivíduos deste trabalho revelou alterações estruturais destas organelas com desorganização das cristas mitocondriais (Cambier *et al.*, 2009). Resultados semelhantes também foram descritos por Oliveira Ribeiro *et al.* (2008) em *Danio rerio*. As mitocôndrias têm um papel central no suprimento energético celular e danos às membranas mitocondriais pelo mercúrio está muitas vezes associado ao desacoplamento da fosforilação oxidativa e à ocorrência de apoptose (Verity *et al.*, 1994; Garg & Chang, 2006).

Segundo Warfvinge & Bruun (2000) o mercúrio acumula-se de forma diferente na região central e periférica da retina de macacos após exposição ao vapor de mercúrio. No presente trabalho, essa diferença também foi observada na retina de *Danio rerio* exposta ao metilmercúrio. Segundo Warfvinge & Bruun (2000) esta diferença pode ser explicada pela nutrição sanguínea que não é a mesma ao longo da retina. Porém, para *Hoplias malabaricus* o acúmulo de mercúrio foi homogêneo ao longo de toda a retina.

A retina dos animais contaminados apresentou depósitos de mercúrio em células presentes na região do disco óptico, o que já foi descrito para macacos, nos quais a falta de mielinização desta região possibilitou um acúmulo de mercúrio; aparentemente o processo de mielinização da região do nervo óptico inibiu o acúmulo de metais (Warfvinge & Bruun, 1996). Segundo Warfvinge & Bruun (2000), as células responsáveis pelo acúmulo do metal são os astrócitos. Os astrócitos facilmente sequestram mercúrio e têm um papel central na mediação da neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio (Yin *et al.*, 2009). No entanto, a presença de células gliais na região do disco óptico da retina de *Danio rerio* deve ser confirmada em outros estudos utilizando, por exemplo, a técnica de imunohistoquímica GFAP.

Em *Hoplias malabaricus* a bioacumulação do mercúrio é dependente da dose. Diferentemente do observado em *Danio rerio*, o acúmulo do metal nesta espécie ocorreu de forma mais intensa na camada plexiforme interna (plexo com contato sináptico das células bipolares, células amácrinas e células ganglionares).

Apesar de serem duas espécies de teleósteos, o acúmulo de mercúrio ocorreu de maneira distinta nas células da retina de cada uma das espécies, o que deve refletir

diferenças fisiológicas esperadas para um grupo tão amplo de vertebrados. Considerando que as doses utilizadas foram distintas para *Danio rerio* (13,5 µg Hg/g e *Hoplias malabaricus* (0,75 µg Hg/g - 0,075 µg Hg/g), sugere-se que as doses administradas em *Hoplias malabaricus* não apresentaram o mesmo nível de toxicidade quando comparadas com a dose utilizada em *Danio rerio*, e por este motivo não atingiram as mesmas células da retina durante o período de exposição. Seguindo este raciocínio, consideramos que um futuro estudo utilizando estas duas espécies e uma mesma dose de metilmercúrio poderia elucidar esta questão e responder se esta diferença entre as espécies está relacionada com as diferentes doses utilizadas ou se algum outro mecanismo celular estaria envolvido no acúmulo de mercúrio na retina de cada uma das espécies.

## **7 CONCLUSÕES**

O metilmercúrio atravessa a barreira sangue-retina após exposição e acumula-se nas células da retina confirmando o envolvimento do sistema visual em intoxicações mercuriais;

A técnica de autometalografia mostrou-se uma excelente ferramenta para localizar depósitos de mercúrio na retina de ambas as espécies utilizadas neste estudo, além de ser altamente sensível e economicamente viável. Esta técnica histológica pode, portanto, prover dados úteis para o entendimento dos processos de absorção e acúmulo do mercúrio na retina de peixes após a exposição trófica e subcrônica.

## 8 REFERÊNCIAS

- Alvarez, Y.; Cederlund, M.L.; Cottell, D.C.; Bill, B.R.; Ekker, S.C.; Torres-Varquez, J.; Weinstein, B.M.; Hyde, D.R.; Vihtelic, T.C. & Kennedy, B.N. 2007. Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish. *BCM Dev. Biol.* 114: 2-17.
- Baatrup, E.; Nielsen, M.G. & Danscher, G. 1986. Histochemical demonstration of two mercury pools in trout tissues: mercury in kidney and livers after mercuric chloride exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 12: 267-282.
- Baatrup, E. & Danscher, G. 1987. Cytochemical demonstration of mercury deposits in trout liver and kidney following methylmercury intoxication. Differentiation of two mercury pools by selenium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 14: 129-141.
- Barboni, M.T.S.; Costa, M. F.; Moura, A.L.A.; Feistosa-Santana, C.; Gualtiere, M.; Lago, M.; Faria, M. A. M.; Silveira L.C.L. & Ventura, D. F. 2008. Visual field losses in workers exposed to mercury vapor. *Environ. Res.* 107: 124-131.
- Belyaeva, E.A.; Glazunov, V.V. & Korotkov, S.M. 2002. Cyclosporin A-sensitive permeability transition pore is involved in Cd<sup>2+</sup>-induced dysfunction of isolated rat liver mitochondria: doubts no more. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 252-264.
- Belyaeva, E.A. & Korotkov, S.M. 2008. Mechanism of primary Cd<sup>2+</sup>-induced rat liver mitochondria dysfunction: discrete modes of Cd<sup>2+</sup> action on calcium and thiol-dependent domains. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192: 56-68.
- Berlin, M.; Fazackerley, J. & Nordberg, G. 1969. The uptake of mercury in the brain of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. *Arch. Environ. Health.* 18: 719-729.
- Bilotta, J. & Saszik, S. 2001. The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Devel. Neuroscience.* 19: 621-629.
- Bonci, D.M.O.; de Lima, S.M.A.; Grötzner, S.R.; Oliveira Ribeiro, C.A.; Hamassaki, D.E. & Ventura, D.F. 2006. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive  $\alpha$  protein kinase C bipolar cells caused by methylmercury chloride intoxication in the retina of the tropical fish *Hoplias malabaricus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 405-410.

- Branchek, T. & Bremiler, R. 1984. The development of photoreceptors in the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 224: 107-115.
- Bridges, C.C.; Battle, J.R. & Zalups, R.K. 2007. Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221: 251-260.
- Cambier, S.; Bénard, G.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzales, P. & Rossignol, R. 2009. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of zebra fish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 791-799.
- Carranza-Rosales, P.; Daid-Fernandez, S.; Sepulveda-Saavedra, J.; Cruz-Veag, D.E. & Gandolfi, A.J. 2005. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the Kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology.* 210: 111-121.
- Cepko, C.L.; Austin, C.P.; Yang, X.; Alexiades, M. & Ezzeddine, D. 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 589-595.
- Clarkson, T.W.; Magos, L. & Myers, G.J. 2003. The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. med.* 349: 1731-1737.
- Connaughton, V.P. & Dowling, J.E. 1997. Comparative morphology of distal neurons in larval and adults zebrafish retinas. *Vision Res.* 38: 13-18.
- Connaughton, V.P. & Nelson, R. 2000. Axonal stratification patterns and glutamate-gated conductance mechanisms in zebrafish retinal bipolar cells. *J. Physiol.* 524: 153-146.
- Danscher, G. & Zimmer, J. 1978. An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochem.* 55: 27-40.
- Danscher, G. 1981. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry.* 71: 1-16.
- Danscher, G. & Norgaard, J.O.R. 1983. Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1394-1398.
- Danscher, G. 1984. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochem.* 81: 331-335.

- Danscher, G. & Möller-Madsen, B. 1985. 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.
- Danscher, G. & Montagnese, C. 1994. Autometallographic localization of synaptic vesicular zinc and lysosomal gold, silver, and mercury. *J. Hstotechnol.* 17: 15-22.
- Dimitriadis, V.K. & Papadaki, M. 2004. Fiels application of autometallography and X-ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59: 31-37.
- Dowling, J.E. 1987. The retina: an approachable part of the brain. The Belknap press of Harvard University press. Cambridge.
- Easter, S.S. & Nicola, G.N. 1997. The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Psychobiol.* 31: 267-276.
- Erie, J.C.; Butz, J.A.; Good, J.A.; Erie, E.A.; Burritt, M.F. & Cameron, J.D. 2005. Heavy metal concentrations in human eyes. *Am. J. Ophthalmol.* 139: 888-893.
- Evans, H.L. & Garman, R.H. 1980. Scotopic vision as an indicator of neurotoxicity. In: Merigan, W.H., Weiss, B. (Eds.), *Neurotoxicity of the visual systems*. Raven Press. New York, pp. 135-147.
- Feitosa-Santana, C.; Costa, M.F.; Lago, M. & Ventura, D.F., 2007. Longterm loss of color vision after exposure to mercury vapor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 409–414.
- Finocchio, D.V.; Luschei, E.S.; Mottet, N.K. & Body, R. 1980. Effects of methylmercury on the visual systems of rhesus macaque (*Macaca mulatta*). Pharmacokinetics of chronic methylmercury related to changes in vision and behavior. In: Merigan, W.H., Weiss, B. (Eds.), *Neurotoxicity of the visual system*. Raven Press, New York, pp.113-122.
- Fishman, M. C. 2001. Genomics. Zebrafish – the canonical vertebrate. *Science.* 294: 1290-1291.
- Fox, D.A. & Sillman, A.J. 1979. Heavy metals affect rod, but not cone, photoreceptors. *Science.* 206: 78-80.
- Goldsmith, P. 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 504-512.



- Goyer, R.A. & Moore, J.F. 1974. Cellular effects of lead. *Comp. Biochem. Physiol.* 48: 447-462.
- Hacker, G.W., Grimelius, L., Danscher, G., Bernatzky, G., Muss, W., Adam, H. & Turner, J. 1988. Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J. Histotechnol.* 11: 213-221.
- Hammerschmidt, C.R.; Sandheinrich, M.B.; Wiener, J.G. & Rada, R.G. 2002. Effects of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows. *Environ. Sci. Technol.* 36: 877-883.
- Hawryshyn, C.W.; Mackay, W.C. & Nilsson, T.H. 1982. Methyl mercury induces visual deficits in rainbow trout. *Canad. J. Zool.* 60: 3127-3133.
- Horky, D.; Illek, J. & Pechova, A. 2002. Histochemical and ultrahistochemical localization of heavy metals in calf organs. *Microscopy research and technique.* 56: 435-450.
- Hu, M. & Easter, S.S.Jr. 1999. Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev. Biol.* 207: 309-321.
- Kodama, H.; Abe, T.; Takama, M.; Takahashi, I.; Kodama, M. & Nishimura, M. 1993. Histochemical localization of Cooper in the intestine and kidney of macular mice: light and electron microscopy study. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 1529-1535.
- Lamason, R.L.; Mohideen, M.A.; Mest, J.R.; Wong, A.C.; Norton, H.L.; Aros, M.C.; Juryne, M.J.; Mao, X.; Humphreville, V.R.; Humbert, J.E.; Sinha, S.; Moore, J.L.; Mangini, N.J.; Gruwald, D.J.; Shriver, M.D.; Canfield, V.A. & Cheng, K.C. 2005. A putative cation exchanger affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science.* 310: 1782-1786.
- Lillie, R.D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry.* 2nd edn. New York: McGraw-Hill Inc.
- McMahon, D.G. 1994. Modulation of electrical synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. *J. Neurosci.* 19: 8603-8615.
- Möller-Madsen, B. 1991. Localization of mercury in CNS of the rat. Oral administration of methylmercuric chloride. *Fund. Appl. Toxicol.* 16: 172-187.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Mesmer-Doudons, N.; Gonzalez, P.; Dominique, Y.; Bourdineaud, J-P.; Boudou, A. & Massabuau, J-C. 2008. Effects of dietary

- methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25: 304-309.
- Pearse, A.G.E. 1980. *Histochemistry. Theoretical and applied.* Vol. 1. 4th edn. Edinburgh, London, New York: Churchill Livingstone.
- Penberthy, W.T.; Zhafizadeh, E. & Lin, S. 2002. The zebrafish as a model for human disease. *Front. Biosci.* 7: 1453-1459.
- Raymond, P.A.; Barthel, L.K. & Curran, G.A. 1995. Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 359: 537-550.
- Rice, D.C. & Gilbert, S.C. 1982. Early chronic low-level methylmercury poisoning in monkeys impairs spatial vision. *Science.* 216: 759-761
- Sajovic, P. & Levinthal, C. 1982. Visual response properties of zebrafish tectal cells. *Neuroscience.* 7: 2427-2440.
- Saldana, M.; Collins, C.E.; Gale, R. & Backhouse, O. 2006. Diet-related mercury poisoning resulting in visual loss. *Br. J. Ophthalmol.* 90: 1432-1434.
- Schawanzara, S.A. 1967. The visual pigments of freshwater fishes. *Vision Res.* 7: 121-148.
- Schmitt, E.A. & Dowling, J.E. 1994. Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Comp. Neurol.* 344: 532-542.
- Silveira, L.C.L.; Damin, E.T.B.; Pinheiro, M.C.N.; Rodrigues, A.R.; Moura, A.L.A.; Côrtes, M.I.T. & Mello, G.A. 2003. Visual dysfunction following mercury exposure by breathing mercury vapor or by eating mercury-contaminated food. In: Mollon, J.D., Pokorny, J., Knoblauch, K. (Eds.), *Normal and Defective Colour Vision.* Oxford University Press, Oxford, England, pp. 407-417.
- Soto, M.; Quincoces, I. & Marigómez, I. 1998. Autometallography procedure for the localization of metal traces in molluscan tissues by light microscopy. *J. Histotechnol.* 21: 123-127.
- Tanan, C.L.; Ventura, D.F.; De Souza, J.M.; Grötzner, S.R.; Mela, M.; Gouveia Jr. A. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2006. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of trahira fish (*Hoplias malabaricus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 987-995.
- Ventura, D.F.; Costa, M.T.V.; Costa, M.F.; Berezovsky, A.; Salomão, S.R.; Pereira, L.H.M.C.; Simoes, A.L.A.C.; Lago, M.; Faria, M.A.M. & Souza, J.M. 2004.

- Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Vis. Neurosci.* 21: 421–429.
- Ventura, D.F.; Simoes, A.L.; Tomaz, S.; Costa, M.F.; Lago, M.; Costa, M.T.V.; Canto-Pereira, L.H.M.; De Souza, J.M.; Faria, M.A.M. & Silveira, L.C.L. 2005. Colour vision and contrast sensitivity losses of mercury intoxicated industry workers in Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19: 523–529.
- Vihtelic, T.S.; Doro, C.J. & Hyde, D.R. 1999. Cloning and characterizations of six zebrafish visual mutant. *Invet. Ophthalmol. Sci.* 42: 868-874.
- Wachsmuth, E.D. 1991. Does histochemistry already contribute decisively to toxicology? *Prog. Histochem. Cytochem.* 23: 27-31.
- Warfvinge, K.; Hua, J. & Berlin, M. 1992. Mercury distribution in the rat brain after mercury vapor exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117: 46-52.
- Warfvinge, K.; Hua, J. & Lögberg B. 1994. Mercury distribution in cortical areas and fiber systems of the neonatal and maternal adult cerebrum after exposure of pregnant squirrel monkeys to mercury vapor. *Environ. Res.* 67: 196-208.
- Warfvinge, K. 1995. Mercury distribution in the mouse brain after mercury vapour exposure. *Int. J. Exp. Pathol.* 76: 29-35.
- Warfvinge, K. & Bruun, A. 1996. Mercury accumulation in the squirrel monkey eye after Mercury vapor exposure. *Toxicology.* 107:189-200.
- Warfvinge, K. & Bruun, A. 2000. Mercury distribution in the squirrel monkey retina after in uterus exposure to Mercury vapor. *Environ. Res.* 83: 102-109.
- Yin, Z.; Albrecht, J.; Syversen, T.; Jiang, H.; Summar, M.; Rocha, J.B.T.; Farina, M. & Aschner, M. 2009. Comparison of alterations in amino acids content in cultured astrocytes or neurons exposed to methylmercury separately or in co-culture. *Neurochem. Int.* 55: 136-142.
- Zachi, E.C.; Taub, A.; Medrado-Faria, M.A. & Ventura, D.F., 2007. Neuropsychological dysfunction related to earlier occupational exposure to mercury vapor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40:425–433.
- Zalewski, P.D.; Millard, S.H.; Forbes, I.J.; Kapaniris, O.; Slavotinek, A.; Betts, W.H.; Ward, A.D.; Lincoln, S.F. & Mahadevan, I. 1994. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 877-884.

## CAPÍTULO III

### **Estudo da densidade e topografia dos cones pareados da retina de *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794), traíra, submetidos a intoxicação mercurial**

#### **RESUMO**

Os mecanismos fisiológicos e morfológicos que causam alterações visuais em decorrência da intoxicação mercurial ainda não foram totalmente esclarecidos. O presente trabalho analisou o efeito do metilmercúrio na retina de um peixe tropical, traíra (*Hoplias malabaricus*) provocado por intoxicação trófica e subcrônica. Quinze exemplares foram utilizados como controles e quinze foram expostos ao organometal através de doses consecutivas de 0,75 µg Hg/g ou 0,075 µg Hg/g, onde exemplares vivos de *Astyanax* sp foram utilizados como veículo. Após 70 dias de exposição, os peixes foram anestesiados e os olhos foram enucleados e as retinas dissecadas e fixadas em paraformaldeído 4% a fim de identificar e analisar quantitativamente os cones pareados. Um olho de cada animal foi utilizado para fazer cortes radiais e testar diferentes tipos e concentrações de anticorpos. Para a preparação das retinas aplanadas foram utilizados o anticorpo JH492, produzido em coelhos, a partir das opsinas sensíveis aos comprimentos de onda médio e longos dos cones L e M, obtidas de retina de humanos, ou o anticorpo ZF Red, produzido em coelhos, a partir das opsinas sensíveis ao comprimento de onda longo dos cones L simples, obtidas da retina de *Danio rerio*. Nos dois casos a revelação foi feita com o anticorpo secundário TRITC, produzido em cabra, contra soro de coelho, acoplado a molécula fluorescente. Os cortes radiais e as retinas aplanadas foram observados em microscópio fluorescente. A partir de imagens obtidas com espaçamento de 1mm foram feitas as contagens das células e os mapas de isodensidade celular. Através dos resultados observamos um decréscimo significativo de densidade do número de cones pareados em ambos os grupos expostos ao MeHg quando comparados como grupo controle. O valor da densidade celular média do total de cones pareados nas retinas controles foi de 4.598 células/mm<sup>2</sup>. Para as retinas do grupo exposto a maior dose do metal (0,75 µg Hg/g) obtivemos uma densidade média do total de cones pareados de 4.256 células/mm<sup>2</sup>. Para as retinas do grupo exposto a menor dose do metal (0,075 µg Hg/g) obtivemos uma densidade média do total de cones pareados de 4.081 células/mm<sup>2</sup>. Através do presente trabalho, verificou-se que a dose trófica e subcrônica do metilmercúrio foi potencialmente tóxica para a espécie *Hoplias malabaricus*, acrescentando dados que auxiliam a compreensão dos mecanismos de toxicidade deste importante organometal.

**Palavras-chave:** Metilmercúrio, retina, imunocitoquímica, *Hoplias malabaricus*.

**Study of the density and topography of paired cones of *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794), Traíra, exposed to mercury poisoning**

**ABSTRACT**

The physiologic and morphologic mechanisms responsible for the visual deficits caused by mercury intoxication weren't completely explained yet. This study examined the effect of methylmercury in the retina of a tropical fish, Traíra (*Hoplias malabaricus*) caused by subchronic poisoning. Fifteen specimens were used as controls and fifteen were exposed to organic metal through consecutive doses of 0,75 g Hg/g or 0,075 g Hg/g, where live specimens of *Astyanax* sp. were used as vehicle. After 70 days of exposure, fish were anesthetized and eyes were enucleated and the retinas dissected and fixed in paraformaldehyde 4% in order to identify and analyze quantitatively the paired cones. One eye of each animal was used to make radial cuts and to test different types and concentrations of antibodies. The JH492 antibody was used for the preparation of the flat retinas. This antibody is produced by rabbits, from opsins sensitive to medium and long waves of the cones L and M, and also can be obtained from the human retina. Besides, there is the ZF Red antibody, produced by rabbits, from opsins sensitive to long waves of simple cones L, obtained from the retina of *Danio rerio*. In both cases the disclosure was made with the TRITC secondary antibody, produced by goats, against rabbit serum, attached to a fluorescent molecule. The radial cuts and the flattened wholemount retinas were observed in fluorescent microscope. The counts of cells and cellular maps of density were made from images obtained with a spacing of 1mm. Through the results found it is possible to observe a significant decrease of density in the number of paired cones in both groups exposed to MeHg when compared to the control group. The value of the average cell density out of the total of the paired cones in control retinas was 4.598 células/mm<sup>2</sup>. For the retinas of the group exposed to a higher dose of the metal (0,75 g Hg /g) it was obtained an average density of total paired cones of 4.256 cells/mm<sup>2</sup>. For the retinas of the group exposed to a lower dose of the metal (0,075 g Hg/g) it was obtained an average density of total paired cones of 4.081 cells/mm<sup>2</sup>. Through this work, it was possible to conclude that the trophic and subchronic dose of methylmercury was potentially toxic for the species *Hoplias malabaricus*, adding data to help understand the mechanisms of toxicity of this important organic metal.

**Keywords:** Methylmercury, retina, immunohistochemistry, *Hoplias malabaricus*.

## 1 INTRODUÇÃO

A grande variedade de informações do ambiente exerce forte pressão sobre os organismos, conduzindo-os a diferentes rumos adaptativos no processo evolutivo. Os órgãos sensoriais se desenvolveram de forma a possibilitar a percepção dos diversos estímulos e conseqüente interação das espécies com o meio ambiente, indispensável para sua sobrevivência e adaptação. O sistema visual, responsável pela captação e processamento das informações luminosas do ambiente (intensidade, movimento, brilho e contraste), desenvolveu-se de diferentes formas durante a história evolutiva dos animais de acordo com a demanda das espécies por este sistema (Walls, 1942). Dentro do grupo dos vertebrados é observada uma grande homologia das estruturas visuais, suas características morfológicas e fisiológicas (Walls, 1940).

A imunocitoquímica é o conjunto de técnicas que usam anticorpos para identificar estruturas tecidulares, que funcionam como antígenos, nos tecidos. Esta identificação ocorre devido a reações específicas, interação anticorpo-antígeno, que confere cor aos compostos que se pretendem estudar, permitindo a sua visualização ao microscópio óptico (Wilson *et al.* 2006).

Podemos dizer que a imunocitoquímica se apresenta como um poderoso meio de identificação de várias estruturas celulares normais e patogênicas, bem como das conseqüências, a nível funcional e morfológico, da ação desses mesmos elementos (Brooks *et al.* 2004).

Alguns estudos mostram que alterações morfológicas em decorrência de doenças adquiridas ou genéticas podem ser avaliadas por esta técnica como, por exemplo, retinoblastoma (Seigel *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006), degeneração retiniana (Wang *et al.*, 2005; Jomary *et al.*, 2006), isquemia (Brooks *et al.*, 2004) e retinopatia diabética (Feit-Laichman *et al.*, 2005; Meleth *et al.*, 2005; Tsanou *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de imunocitoquímica (marcação inespecífica) para análise da densidade e topografia dos cones pareados da retina *Hoplias malabaricus* submetidas à intoxicação mercurial.

## 1.1 Especializações da retina

A forma, o posicionamento e o tamanho relativo dos olhos dos animais são algumas das características morfológicas facilmente observadas, que apontam a grande diversidade adaptativa e a variação na demanda pelo sistema visual.

Estudos comparativos entre os vertebrados mostram que os tipos, distribuição e densidade de células nas retinas de cada espécie apresentam alto grau de variação, estando muito relacionado à ecologia visual e a filogenia das espécies (Jacobs & Rowe, 2004). Considera-se que a organização retiniana é responsável por determinar fenótipos comportamentais adaptados aos ambientes ocupados pelas espécies (Thompson, 1991). A distribuição não homogênea dos vários tipos de fotorreceptores na retina é comum e refletem as regiões de maior demanda do animal por uma boa qualidade de imagem (Walls, 1942; Lythgoe, 1979; Thompson, 1991).

Cajal (1983) em seu pioneiro estudo comparativo da retina de vertebrados verificou uma maior variação adaptativa e não tanto filogenética das vias visuais. Alguns estudos revelaram que esta distribuição celular se correlaciona melhor com comportamentos e com o hábitat do que com a filogenia, sendo que espécies próximas relacionadas podem ter diferentes distribuições e vice-versa (Hughes, 1977; Stone, 1983; Thompson, 1991). Assim, descrições de vias de bastonetes e cones transcendem diferentes ordens de vertebrados, e espécies próximas podem ter diferentes organizações dos elementos neurais.

As especializações da retina são regiões de alta densidade celular que possibilitam uma maior acuidade visual em áreas específicas e podem ser classificadas como *area*, *fóveas* ou *faixa visuais* (Walls, 1942; Brown, 1969; Coimbra *et al.*, 2006). De acordo com a teoria proposta por Hughes (1977), animais terrestres que habitam campos abertos geralmente possuem uma faixa ou estria visual horizontal, com alta densidade de fotorreceptores e células ganglionares. Esta faixa proporciona melhor visão panorâmica do ambiente e a detecção de objetos no horizonte sem a necessidade de movimentação dos olhos, apropriados para a visão de extensão de campo e percepção da aproximação de predadores a longas distâncias (Brown, 1969; Walls, 1942; Granda & Haden, 1970; Thompson, 1991; Coimbra *et al.*, 2006). Espécies arborícolas ou de mata fechada, por sua vez, apresentam geralmente uma *área centralis*, com maior densidade de cones, células ganglionares e bipolares, que aponta para uma melhor acuidade visual desta região circular. Alguns primatas, répteis e aves apresentam ainda uma

especialização desta *área centralis*, conhecida como fóveas, onde há um deslocamento lateral das células ganglionares e células das demais camadas da retina, e geralmente a presença de apenas cones, fornecendo assim a alta sensibilidade e maior acuidade nesta região (Brown, 1969; Walls, 1942; Granda & Haden, 1970).



## **2 JUSTIFICATIVA**

Para compreensão dos efeitos tóxicos de um metal no sistema nervoso, são necessários modelos experimentais. A retina mostra-se um excelente indicador biológico dos danos causados pelo MeHg, sendo que os métodos imunocitoquímicos podem revelar possíveis danos neurodegenerativos em populações de células retinianas.

A técnica de imunocitoquímica tem sido muito utilizada devido à especificidade na identificação do anticorpo ao seu antígeno e revelando tipos celulares distintos. Por esta metodologia, diferentes células podem ser identificadas e visualizadas para análise qualitativa e quantitativa.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de *Hoplías malabaricus* (Bloch, 1794), traíra, visando conhecer o potencial tóxico deste composto, através de exposição experimental trófica e subcrônica.

#### **3.2 Objetivo específico**

Analisar os efeitos da intoxicação por metilmercúrio nos cones pareados da retina de *Hoplías malabaricus* por estimativa da densidade média estabelecendo mapas da distribuição topográfica, utilizando a técnica de imunocitoquímica (marcação inespecífica).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animal experimental: *Hoplias malabaricus***

Descrição no capítulo I, subitem 4.1

### **4.2 Desenho experimental – bioensaio**

Descrição no capítulo I, subitem 4.2

### **4.3 Coleta de material biológico**

Descrição no capítulo I, subitem 4.3

### **4.4 Processamento morfológico do material biológico**

#### **4.4.1 Imunocitoquímica**

#### **Imunocitoquímica dos cones pareados**

Duas formas de processamento foram utilizadas ao se trabalhar as retinas de *Hoplias malabaricus* com imunocitoquímica: cortes radiais de retina obtidos em criostato e preparações integrais de retinas aplanadas sobre lâminas histológicas.

#### **Cortes em criostato**

Os peixes cujas retinas foram destinadas para cortes radiais em criostato, foram mantidos sob luminosidade para que os grânulos de pigmentos do epitélio pigmentado permanecessem dispersos nos prolongamentos entre os segmentos externos dos fotorreceptores, facilitando assim a identificação dos cones pareados, durante observação ao microscópio. As retinas foram dissecadas sob lupa estereoscópica (Carl Zeiss), fixadas com paraformaldeído 4% (PF) em tampão fosfato 0,1M, pH 7.2 (TF), por 3 horas e mantidas, posteriormente em TF 4°C. Antes de serem feitos os cortes, o material foi imerso em gradiente de solução de sacarose (15 e 30%), em temperatura ambiente e depois mantido na solução de 30% em temperatura de 4°C por um período de quatro horas. Aplanadas numa lâmina envolta com papel alumínio, as retinas foram emblocadas com Tissue-Tek O.T.C. (Sakura, EUA) em gelo seco. Os cortes radiais, com 14 ou 20µm de espessura, foram realizados a temperatura de -25°C em criostato

(Leica, JUNG CM 3000) pertencente ao Laboratório de Biologia da Retina do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Biociências – I da USP, sob coordenação da Prof<sup>a</sup> Dra. Dânia Emi Hamassaki. Os cortes foram transferidos para lâminas previamente gelatinizadas e secos em placa aquecedora (37°C) por 1 hora, posteriormente congelados a -20°C em caixas para lâminas até o momento do uso.

### **Montagem plana**

Para a obtenção de retinas aplanadas, os animais foram adaptados ao escuro por no mínimo 2 horas antes da dissecação para que ocorresse a retração dos grânulos de pigmentos presentes no epitélio pigmentado, para facilitar a visualização das células marcadas durante observação ao microscópio. Após a secção medular e decapitação, seguiu-se o espinalamento do cérebro. Logo em seguida a enucleação dos olhos, retirou-se a parte anterior do olho compreendendo a íris, a córnea e o cristalino formando uma cuia óptica. As retinas foram removidas sob lupa estereoscópica (Carl Zeiss), fixadas com PF 4% em TF 0,1M, pH 7.2, por 3 horas e mantidas, posteriormente em TF 4°C. Todo o procedimento foi realizado sob luz vermelha tênue, mantendo o ambiente com mínimo de luz possível para que não ocorresse a retração dos grânulos durante a dissecação. O Humor vítreo foi retirado após a fixação, sob lupa estereoscópica, com o auxílio de uma pinça, pincel e microtesouras.

### **Sequência básica do processamento imunocitoquímico**

No momento do processamento, os cortes radiais foram descongelados e secos durante uma hora, em estufa (37°C). Na sequência, o material foi hidratado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, com três lavagens de 10 minutos, depois foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com Soro Normal de Cabra (SNC) 3% e Soro de Albumina Bovina (SAB) 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 com Triton 0,3%, durante uma hora. A incubação com o Anticorpo Primário (1AC) foi feita durante oito horas (“overnight”), seguida de três lavagens de 10 minutos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 com Triton 0,3%. A incubação com o Anticorpo Secundário (2AC) ocorreu durante duas horas, seguidas de três lavagens de 10 minutos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Para cada anticorpo secundário utilizado foi feito um controle negativo da marcação, com a

omissão do anticorpo primário substituído pela solução de TF+triton 0,3%, para verificar se o anticorpo secundário produziu uma marcação inespecífica.

Para as retinas aplanadas utilizou-se o mesmo protocolo utilizado para os cortes radiais, mas o tempo de incubação do 1AC foi de sete dias e para o 2AC cinco horas. Para o controle negativo da marcação, o protocolo seguido foi o mesmo utilizado para os cortes radiais, com a omissão do 1AC.

As lâminas contendo as retinas ou os cortes foram montadas com uma substância que protege contra a perda da fluorescência, o  $\rho$ -fenilenediamino (0,1%, Sigma), diluído em TF+glicerol (1:1), preparado no mínimo, uma hora antes do uso.

### **Anticorpos utilizados**

**Rb  $\alpha$ -JH 492** – Anticorpo produzido em coelhos, a partir das opsinas sensíveis aos comprimentos de onda médio e longos dos cones L e M, obtidas de retina de humanos. Concentração utilizada (1:100). Este anticorpo foi produzido pelo laboratório do Prof. Jeremy Nathans da University of School of medicine, Baltimore, USA, em 1986 (Nathans et al., 1986). Algumas alíquotas foram cedidas ao laboratório de Psicologia Sensorial, Instituto de psicologia, USP, em 1998.

**Rb  $\alpha$ -Zebrafish Red Opsin** – Anticorpo produzido em coelhos, a partir das opsinas sensíveis ao comprimento de onda longo dos cones L simples, obtidas da retina de *Danio rerio*. Concentração utilizada (1:100). Este anticorpo foi produzido pelo Prof. Dr. Thomas S. Vihtelic, da Universidade de Notre Dame, Estados Unidos, em 1999 (Vihtelic et al., 1999). Algumas alíquotas foram cedidas ao laboratório de Psicologia Sensorial, Instituto de psicologia, USP, em 2003.

Nos dois casos a revelação foi feita com o seguinte anticorpo secundário: **gt  $\alpha$ -rb TRITC**, produzido em cabra, contra soro de coelho, acoplado a molécula fluorescente (TRITC).

### **Análise morfológica qualitativa**

A análise da imunoreatividade dos anticorpos e a obtenção das imagens foram feitas em microscópio de fluorescência (Fotomicroscópio Axiophot Carl Zeiss) na Universidade Federal do Paraná.

### **Análise morfológica quantitativa**

Cada retina aplanada foi levada ao microscópio de fluorescência (Fotomicroscópio Axiophot Carl Zeiss), e com objetiva de pequeno aumento (20X) foram tomadas as coordenadas x/y dos pontos extremos mais importantes de cada retina. Estas coordenadas (em número suficiente para se traçar o contorno da retina com segurança) foram transferidas para papel milimetrado A4 em escala adequada (normalmente 1:10) e seu contorno foi traçado a mão com grafite, obtendo-se uma imagem gráfica ampliada e fiel de cada retina (Figura 27). Para medir a área total de cada retina, a representação gráfica da retina foi digitalizada e sua área foi medida no programa Scion Image (versão Beta 4.02), o qual fornece o valor da área em milímetros quadrados ou qualquer outra unidade estipulada.

Os campos amostrais foram coletados com objetiva de médio aumento (40X) em imersão ao longo de toda a retina. Os cones pareados foram quantificados em três retinas de cada grupo e as coordenadas foram tomadas em distância de 1mm uma da outra de acordo com o método de amostragem aleatória sistemática (Weibel, 1969). As coordenadas do nervo óptico também foram anotadas.

As coordenadas das amostras digitalizadas e do nervo óptico foram transferidas para planilha do Excel, assim como os respectivos valores das contagens de cada campo amostral. Os valores brutos das contagens foram transformados para valores de células/mm<sup>2</sup>. Estas mesmas coordenadas com seus respectivos resultados de densidade celular foram levados ao Programa Delta Graph 4.0, onde foram gerados os mapas de isodensidade. Uma escala com os valores de isodensidade acompanha cada mapa.

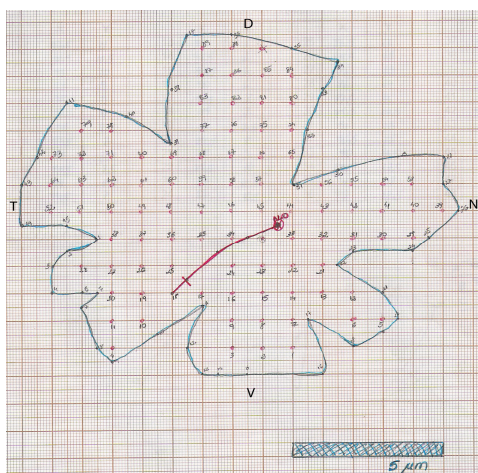


Figura 27 - Representação gráfica da retina de *Hoplias malabaricus*.

A divisão da retina por quadrantes teve como pontos de referência o nervo óptico e o início da fissura embrionária a partir do nervo óptico. A tangente traçada por esses dois pontos os quais formam o eixo 0-180°, e a sua perpendicular no eixo de 90 a -90°, possibilitaram a determinação das regiões dorsal, ventral, nasal e temporal como ilustrado na Figura 28 (Cameron & Easter, 1993). Como nem sempre o nervo óptico e o início da fissura embrionária forma um eixo de 0 a 180 e 90 a -90 graus, as coordenadas cartesianas (x,y) do contorno e dos campos de amostragem em todas as retinas foram transformados em coordenadas polares (r,  $\theta$ ) para permitir a rotação do conjunto de pontos através da fórmula:

$$X=r \cos (\theta)$$

$$Y=r \operatorname{sen} (\theta)$$

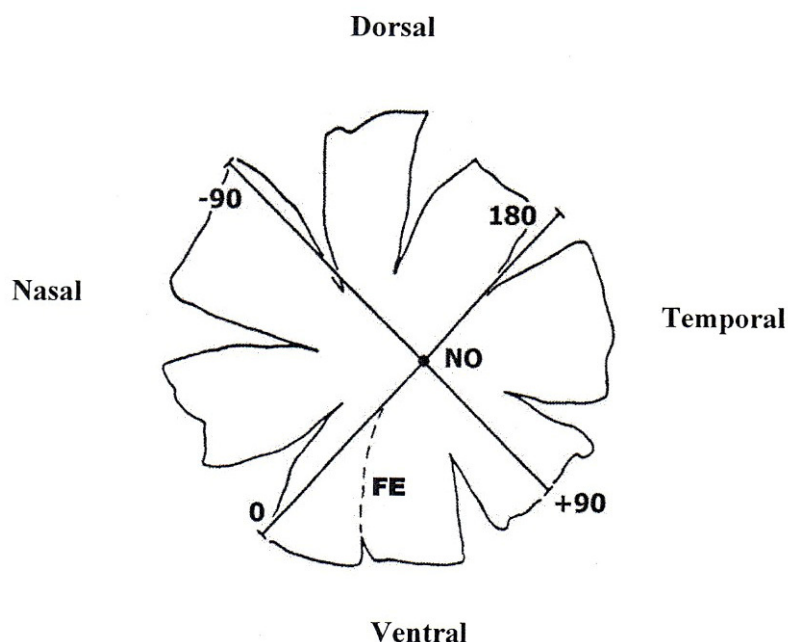


Figura 28 - Representação esquemática do sistema de coordenadas polares retinianas e da divisão por quadrantes retinianos. FE, fissura embrionária; NO, nervo óptico. Modificado de Cameron & Easter (1993).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Topografia dos cones pareados da retina de *Hoplias malabaricus*

Os anticorpos utilizados neste trabalho através da técnica de imunocitoquímica identificaram os cones pareados na camada de fotorreceptores da retina de traíra. Essa imunoreatividade pode ser observada tanto em cortes radiais (Figura 29A) quanto em montagem plana da retina (Figura 29B). Estes resultados foram obtidos por uma marcação específica do anticorpo primário, revelado com o anticorpo secundário. Em cortes radiais, a marcação observada foi muito útil para que pudéssemos identificar os cones pareados desta espécie, que provavelmente são sensíveis a comprimentos de onda longo, mas com cada membro provavelmente apresentando picos de absorbância diferentes, pois a marcação específica foi sempre mais intensa em um dos segmentos externos do que no outro. Este mesmo padrão de marcação seria utilizado nas retinas aplanadas para que pudéssemos contar o número de cones pareados em retina de traíra. Porém, observamos que durante a dissecação das retinas muitos dos segmentos externos dos fotorreceptores (cones e bastonetes) foram destruídos ou removidos pelo pincel utilizado nesta etapa do protocolo. Assim, segundo a metodologia descrita por Grötzner (2005), percebemos que a marcação inespecífica do segmento interno dos fotorreceptores poderia ser útil, uma vez que desta forma esta marcação identificou os cones pareados quando vistos em corte transversal (Figura 30).

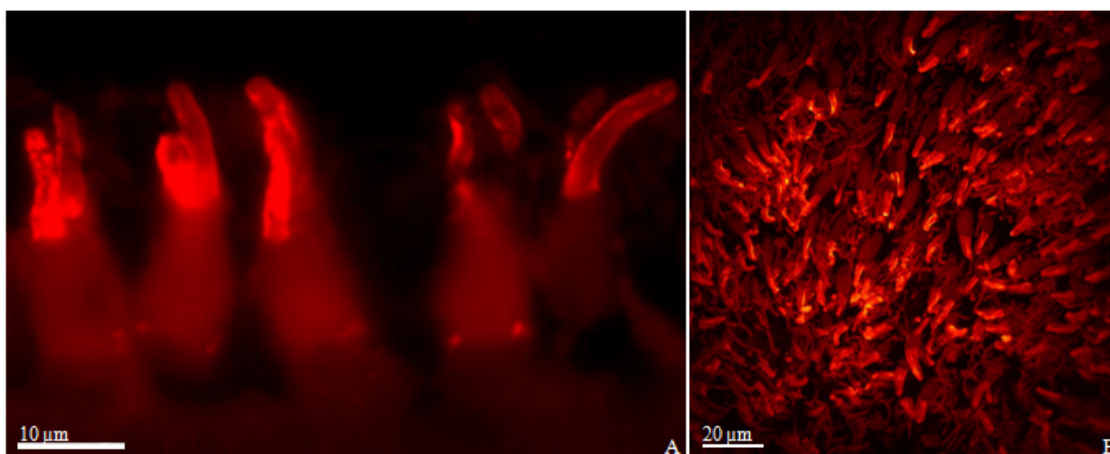


Figura 29 - Imunoreatividade observada nos segmentos externos dos cones pareados de *Hoplias malabaricus* tanto em corte radial (a), quanto em montagem plana da retina (b). Imunomarcados com rb  $\alpha$ -Zebrafish Red Opsin e revelados com gt  $\alpha$ -rb Tritc. Observamos os segmentos externos dos cortes imunomarcados e os segmentos internos apresentando a marcação inespecífica pelo Tritc.



Com imagens de alta resolução em microscópio de fluorescência, foi possível realizar a contagem dos cones pareados em cada campo digitalizado e realizar a construção dos mapas de isodensidade evitando assim um resultado duvidoso.



Figura 30 - Imagem em montagem plana da marcação inespecífica do segmento interno demonstrando a morfologia dos cones pareados da retina de *Hoplías malabaricus*, utilizada para contagem e consequentemente construção dos mapas topográficos.

Tanto com a utilização do anticorpo rb  $\alpha$ -JH492 como do anticorpo rb  $\alpha$ -Zebrafish Red Opsin, obtivemos a marcação dos segmentos externos dos cones pareados. A utilização de ambos foi realizada conforme sua disponibilidade no laboratório.

O padrão de distribuição dos cones pareados foi observado em três retinas do grupo controle (Figura 31) e em seis retinas dos grupos expostos ao contaminante (Figura 32;Figura 33). Estes mapas ilustram a distribuição da população total de cones pareados na retina de *Hoplías malabaricus*.

Nestes mapas de isodensidade, pôde-se observar a semelhança de uma maior densidade destas células principalmente na região ventral tantos no grupo controle como nos grupos contaminados.

Ao realizarmos o teste estatístico de significância (ANOVA, pós teste Dunnett's) observamos um decremento significativo de densidade do número de cones pareados em ambos os grupos expostos ao MeHg quando comparados como grupo controle (Figura 34). O valor da densidade celular média do total de cones pareados nas três retinas controles foi de 4.598 células/mm<sup>2</sup> (EPM=70). Para as três retinas do grupo exposto a maior dose do metal (0,75  $\mu$ g Hg/g) obtivemos uma densidade média do total de cones pareados de 4.256 células/mm<sup>2</sup> (EPM=120). Para as três retinas do grupo

exposto a menor dose do metal (0,075 µg Hg/g) obtivemos uma densidade média do total de cones pareados de 4.081 células/mm<sup>2</sup> (EPM=145).

A proporção de cones pareados também foi representada em porcentagem (Figura 35). Nestes gráficos observa-se que para o grupo controle a região temporal e ventral têm uma maior porcentagem de cones pareados, em relação aos demais quadrantes retinianos (dorsal e nasal). Para o grupo contaminado com a menor dose (0,075 µg Hg/g) também observamos uma maior porcentagem de cones pareados na região temporal e ventral. Para a maior dose de metilmercúrio (0,75 µg Hg/g) observamos uma maior porcentagem de cones pareados na região ventral e nasal.

Quando comparamos a densidade dos quadrantes por grupos (Figura 36), observamos que no quadrante dorsal ocorre uma diminuição significativa do número de células tanto nos indivíduos contaminados com a maior quanto nos contaminados com a menor dose, comparados com os controles. Para o quadrante nasal observamos a mesma diminuição em ambas as doses quando comparados com os controles. Para a região temporal não observamos diferenças significativas. Porém para a região ventral observamos uma diminuição no número de cones pareados na menor dose e um aumento no número de cones pareados para a maior dose.

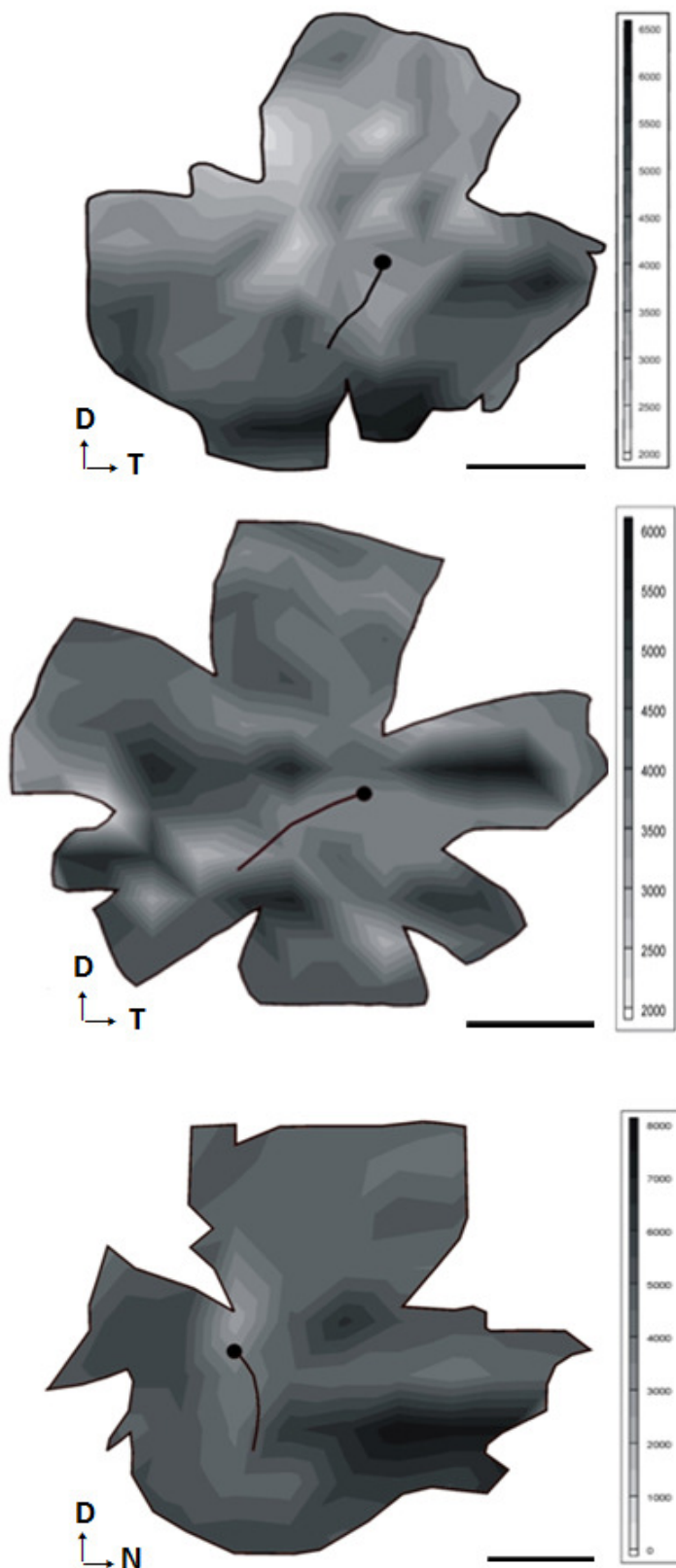


Figura 31 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo controle de *Hoplias malabaricus* representando a distribuição topográfica dos cones pareados. Escala 5 mm. A representação está em gradiente de cores do cinza ao preto. O ponto negro representa o nervo óptico.

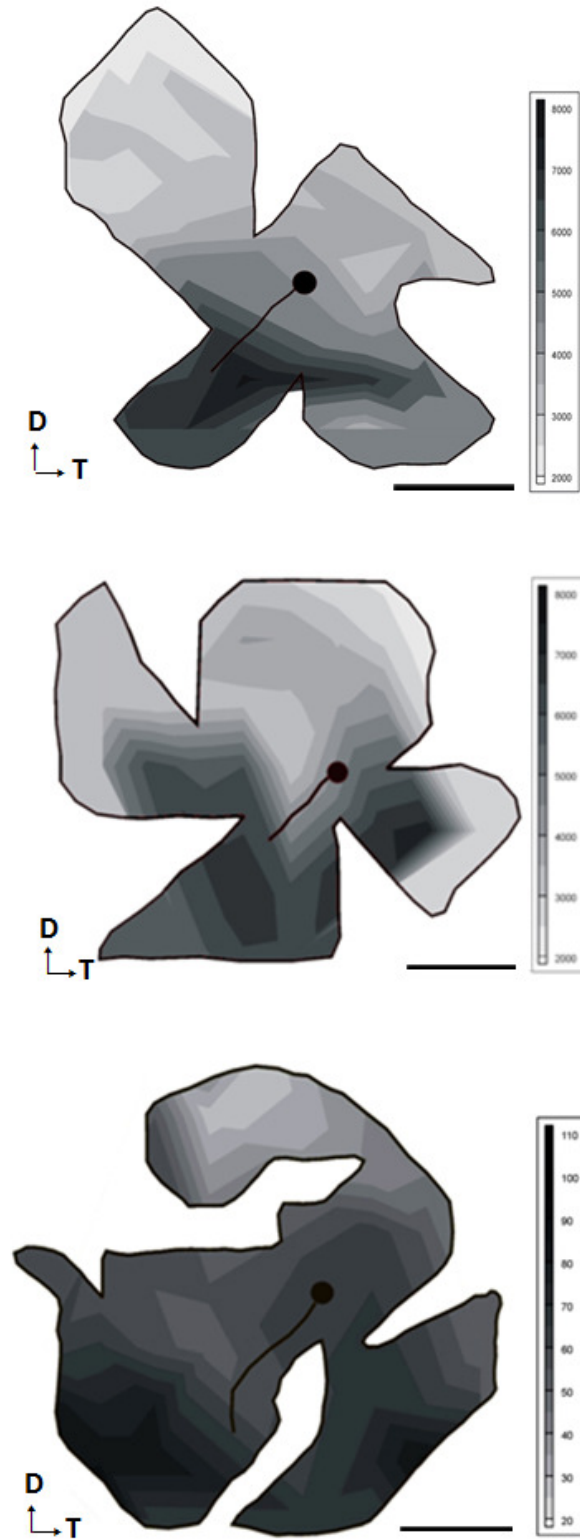


Figura 32 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo intoxicado com metilmercúrio ( $0,75 \mu\text{g Hg/g}$ ). Nos três casos, estão representadas as distribuições topográficas dos cones pareados da retina de *Hoplias malabaricus*. Escala 5 mm. A representação está em gradiente de cores do cinza ao preto. O ponto negro representa o nervo óptico.

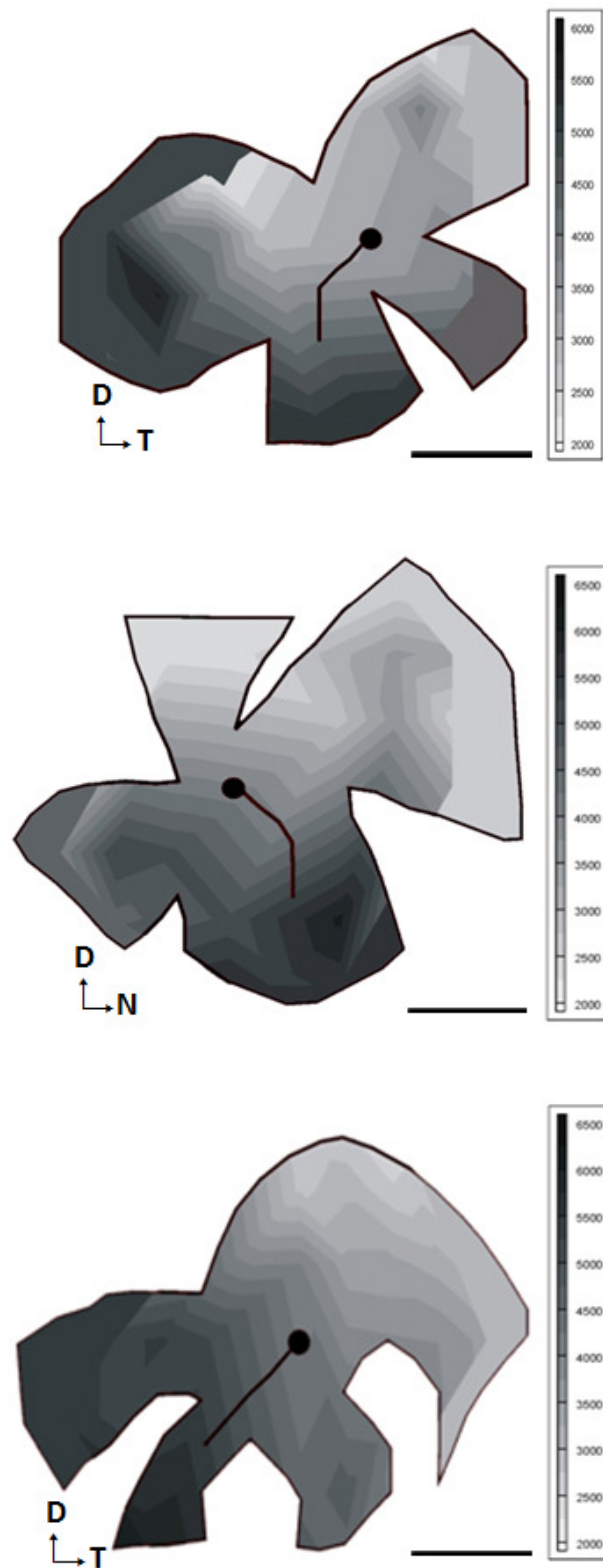


Figura 33 - Mapas de isodensidade de três retinas do grupo intoxicado com metilmercúrio ( $0,075 \mu\text{g Hg/g}$ ). Nos três casos, estão representadas as distribuições topográficas dos cones pareados da retina de *Hoplias malabaricus*. Escala 5 mm. A representação está em gradiente de cores do cinza ao preto. O ponto negro representa o nervo óptico.

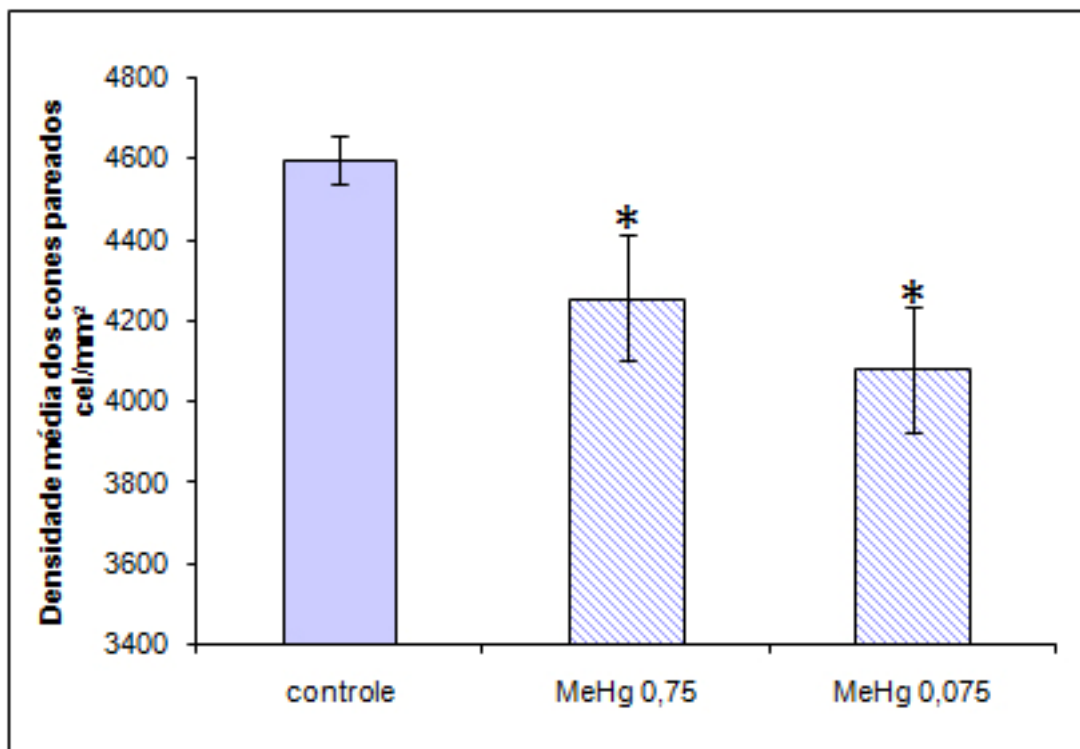
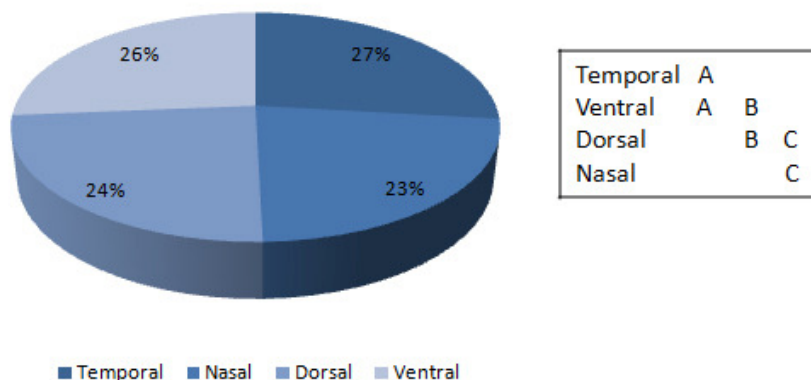
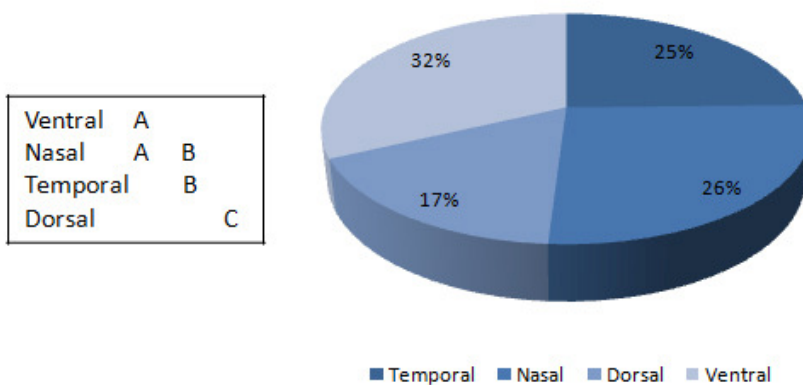


Figura 34 - Comparação da estimativa da densidade média dos cones pareados de retinas controles com retinas de traíras intoxicadas com MeHg. O asterisco representa os grupos que diferem estatisticamente do controle.

**Grupo Controle**



**Grupo - MeHg 0,75**



**Grupo - MeHg 0,075**

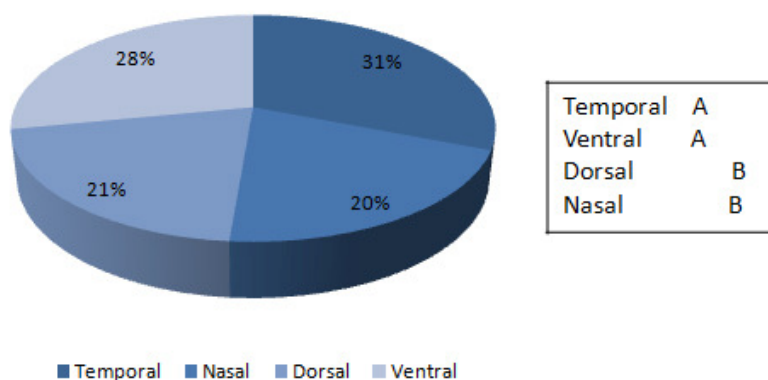


Figura 35 - Proporção de cones pareados em porcentagem, entre os quadrantes retinianos. Grupo controle e Grupos contaminados com MeHg (0,75 µg Hg/g e 0,075 µg Hg/g). Teste estatístico ANOVA com pós teste Tukey-Kramer. Quadrantes não conectados pela mesma letra são estatisticamente diferentes.

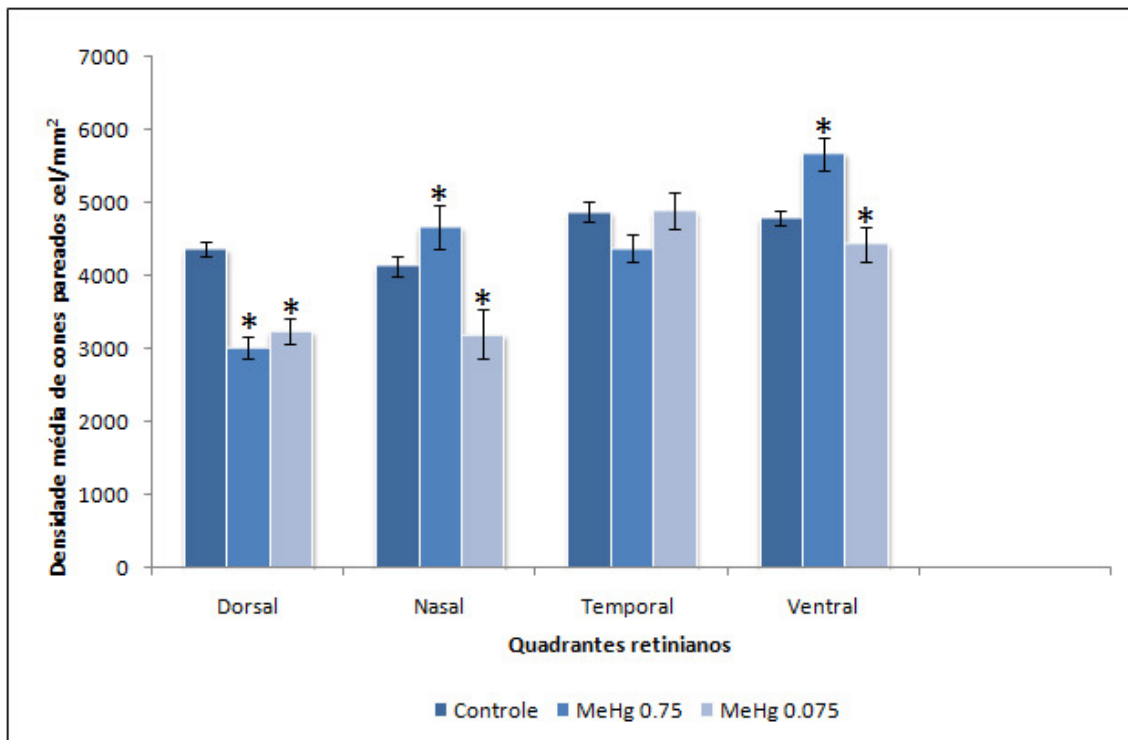


Figura 36 - Comparação da estimativa da densidade média por quadrante dos cones pareados de retinas do grupo controle com retinas de traíras intoxicadas com MeHg. O asterisco representa os grupos que diferem estatisticamente do controle.



## 6 DISCUSSÃO

O sistema visual dos teleósteos mostra uma variedade de adaptações aos hábitos alimentares e às condições luminosas do meio (Reckel & Melzer, 2003). Estas adaptações são observadas na morfologia dos olhos (Douglas & Marshall 1999), nos diferentes tipos de pigmentos visuais (Bowmaker, 1990) e na morfologia retinal (Engström, 1963; Ahlbert, 1969; Collin *et al.*, 1998). As adaptações morfológicas da retina são representadas pela organização, dimensão, densidade e uma excepcional variedade de fotorreceptores, os quais diferem entre as espécies e entre as diferentes regiões da retina.

A camada dos fotorreceptores é a última camada da retina a ser alcançada pelo estímulo luminoso e tem um importante papel nas habilidades visuais dos animais. No entanto, além desta função primordial, a distribuição topográfica destas células também é muito importante para uma boa acuidade visual.

Variações quantitativas na distribuição topográficas dos fotorreceptores, originando áreas de maior densidade, também definem uma regionalização funcional da retina (Browman *et al.*, 1990; Zaunreiter *et al.*, 1991). Os cones são frequentemente organizados em mosaico (Lyall, 1957; Engström, 1960,1963; Marc & Sperling, 1976). Em peixes, este mosaico é definido por um arranjo geométrico de cones simples e cones pareados. A morfologia deste mosaico difere entre as espécies (Lyall, 1957; Engström, 1960, 1963; Zaunreiter *et al.*, 1991) entre animais de diferentes tamanhos (Lyall, 1957; Ahlbert, 1976; Baudet *et al.*, 1993) e mesmo entre diferentes regiões da retina (Lyall, 1957; Ahlbert, 1976). Engström (1963) cita que os diferentes mosaicos observados em teleósteos são provavelmente determinados pela posição filogenética das respectivas espécies.

Na grande maioria dos teleósteos mais de uma classe de cones estão presentes. Os cones duplos são uma classe de fotorreceptores encontrados nas retinas de anfíbios, pássaros, peixes, marsupiais, monotremados e reptéis (Müller, 1857; Walls, 1942; Cohen, 1972), mas não em mamíferos placentários (Walls, 1942). Estes fotorreceptores são na verdade duas células receptoras individuais contínuas, ao longo da extensão longitudinal do segmento interno, unidas por duas membranas justapostas que

apresentam uma seção elíptica para incidência da luz (Ryder, 1895; Eigeman & Shafer, 1900; Lyall, 1957; Engström, 1963; Ahlbert, 1969; Cohen, 1972; Ali & Anctil, 1976).

Embora os cones duplos sejam conhecidos por um papel direto na análise visual, sua específica função ainda não foi elucidada. Algumas hipóteses já foram sugeridas em relação a sua função, e incluem: otimização da sensibilidade da frequência espacial (Fernald, 1983), detecção dos movimentos (Lyall, 1957), análise da informação cromática (Richter & Simon, 1974; Burkhardt *et al.*, 1980; Marchiafava, 1985) e via outros mecanismos, a detecção da luz polarizada (Waterman & Forward, 1970; Cameron & Pugh, 1991; Rowe *et al.*, 1991).

O termo cone pareado foi introduzido na literatura para designar cones formados por dois elementos sejam estes elementos iguais ou diferentes. (Walls, 1942; Novales Flamarique *et al.*, 1998). Com o avanço da micro-espectrofotometria, foi possível observar que os cones pareados podem apresentar pigmentos visuais diferentes em cada membro, ou então apresentarem pigmentos visuais idênticos (Levine & MacNichol, 1979). Cones pareados com pigmentos visuais diferentes são classificados como cones duplos, entretanto, cones pareados com o mesmo pigmento visual são classificados como cones gêmeos. Esta classificação também pode ser feita através da morfologia do segmento interno, sendo que os cones duplos apresentam segmentos internos morfologicamente dissimilares quando comparadas com os cones gêmeos (Novales Flamarique *et al.*, 1998). Porém, esta diferença morfológica não é uma regra e pode causar dúvidas no momento da classificação. Novales Flamarique (2001) sugeriu outra maneira de identificação dos cones pareados em peixes, ou seja, sem a necessidade de estudos de espectrofotometria. Esta análise é feita através da observação da coloração dos núcleos de cada um dos membros de um cone pareado no nível do segmento interno. Quando os núcleos apresentam marcação com intensidades diferentes, tanto para microscopia de luz como para microscopia eletrônica de transmissão, os cones são classificados como cones duplos. Em contraste, os cones gêmeos apresentam uma marcação similar. Segundo Novales Flamarique (2001) este método é válido, tem um baixo custo e pode ser uma alternativa em estudo de imunocitoquímica para a distribuição de cones pareados em outras espécies de vertebrados.

Engström (1963), Stell & Harosi (1976) e Bowmaker *et al.* (1991) encontraram cones duplos na retina de *Carassius auratus*. Bowmaker & Kunz (1987) também encontraram cones duplos na retina de *Salmo trutta*, enquanto que Loew & Whal (1991)

demonstraram a presença de cones gêmeos na retina de exemplares adultos e jovens de *Perca flavescens*. Em adição, Kusmic *et al.* (1993) encontraram ambos, cones gêmeos e cones duplos, na retina de *Salmo irideus*. Segundo Tamura (1957) os peixes de profundidade apresentam cones duplos bem maiores do que aqueles que vivem mais próximos a superfície.

Segundo Bromaker *et al.* (1991) espécies noturnas ou crepusculares como *Hoplias malabaricus* apresentam muitos cones pareados, bastonetes, camada nuclear externa e interna delgada e uma pequena quantidade de células ganglionares. Nesta espécie os cones duplos são uma característica proeminente. Eles representam uma grande população na retina de teleósteos, contribuindo com cerca de 50% do número total de fotorreceptores (Engstrom, 1963).

Segundo Kusmic & Gualtiere (2000) a traíra apresenta cones gêmeos e cones duplos, porém sugerem que existe apenas uma pequena população de cones gêmeos na retina desta espécie. Neste estudo foi possível classificar os cones pareados através da coloração nuclear utilizando a técnica de microscopia de luz (Hematoxilina e Eosina) e microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, os cones gêmeos foram raramente visualizados.

Em *Hoplias malabaricus*, ao analisarmos a distribuição dos cones pareados em organismos controles, observamos uma maior porcentagem destas células na região ventral e temporal da retina, ou seja, uma região de melhor acuidade visual. Esta maior densidade na região ventro-temporal coincide com dados observados em outras espécies de peixes: salmão do atlântico (Novales Flamarique, 2002) e truta arco-íris (Novales Flamarique, 2001). Ahlbert (1976) também observou uma área de maior densidade de cones pareados na região temporal da retina de *Perca fluviatilis*, *Lucioperca lucioperca*, *Acerina cernua* e *Coregonus albuna*. Uma vez que a traíra é considerada um peixe de fundo, acreditamos que esta distribuição topográfica esteja relacionada com o comportamento visual deste animal refletindo uma área com melhor poder de resolução, especializada na captura de pequenas presas localizadas na frente ou acima do animal (Ahlbert, 1976).

Reckel & Melzer (2003) também observaram na retina de *Ameca splendens* e *Dermogenys pusillus* uma maior concentração de cones pareados na região ventro-temporal. Segundo os autores esta a distribuição dos cones é um dos pré-requisitos para uma alta acuidade visual, uma vez que aumenta a resolução espacial. A alta densidade

dos cones pareados está supostamente relacionada a regiões da retina que recebem informações de importantes áreas do campo visual e que, portanto, desempenham um papel importante na visão.

Na retina, as alterações morfológicas causadas pela intoxicação mercurial foram pouco estudadas até o momento. Os poucos resultados encontrados mostram um acúmulo do mercúrio principalmente em vasos sanguíneos, epitélio pigmentado, camada plexiforme interna, células ganglionares e nervo óptico (Warfvinge & Bruun, 1996, 2000). Estudos realizados há cerca de duas décadas haviam mostrado alterações fisiológicas de respostas da retina em função da intoxicação mercurial, através de respostas eletrofisiológicas (Fox & Sillman, 1979; Gitter *et al.*, 1988).

Na retina dos grupos expostos ao metilmercúrio observamos uma diminuição estatisticamente significativa no número de cones pareados em ambas as doses utilizadas, sendo que na dose de 0,075 µg/g esta diminuição foi mais acentuada. Utilizando esta mesma dose de metilmercúrio (0,075 µg/g), Bonci (2006) observou na retina de *Hoplias malabaricus* uma redução significativa no número de células amácrinas. Segundo o autor uma das causas para a redução no número de células neurais em função da intoxicação mercurial é a indução do processo de morte celular apoptótica ou necrótica, ou ainda uma redução na expressão gênica da proteína através da qual foi feita a quantificação das células, a parvoalbumina. Kunimoto (1994) relacionou os processos apoptóticos e necróticos com a dose de metilmercúrio, demonstrando a ocorrência de apoptose em cultura de células neurais do cerebelo. A indução de apoptose é dependente da quantidade de mercúrio que afeta o tecido neural. Assim, até determinada dose (no caso 0,1mM) *in vitro* a morte neural seria induzida por um processo apoptótico e, acima disto, já estaria ocorrendo um processo de necrose no tecido.

*In vivo*, ainda não foram estabelecidos os níveis de mercúrio que diferenciam o início dos processos de morte celular. Porém, Bonci (2006) ao investigar a hipótese de morte neural através da técnica de TUNEL em retinas de traíras intoxicadas com metilmercúrio (0,075 µg/g), observou células apoptóticas na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares, sugerindo que o processo de morte celular foi induzido por uma via apoptótica.

Uma diminuição do número de células amácrinas e bipolares também foi observado por Bonci *et al.* (2006) em retinas de traíras expostas a 6 µg/g de

metilmercúrio, assim como uma redução do número de células amácrinas em retina de traíras expostas à 2 µg/g de metilmercúrio.

Fox & Sillman (1997) ao estudarem contaminação por chumbo em humanos e ratos em desenvolvimento observaram uma redução nas respostas eletrofisiológicas das funções escotópicas, medidas através do eletroretinograma (ERG). O resultado observado por esses autores foi uma diminuição na amplitude de resposta em massa da retina nas funções escotópicas. Essas alterações estariam relacionadas com apoptose de bastonetes e células bipolares acompanhadas por uma diminuição na atividade da enzima fosfodiesterase. Ao avaliarem pacientes expostos ao mercúrio, Ventura *et al.* (2004) também encontraram alterações na função escotópica. As funções fotópicas também foram avaliadas clinicamente e observou-se que elas são alteradas em função da intoxicação mercurial (Cavalleri *et al.*, 1995; Cavalleri & Gobba, 1998; Canto-Pereira *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c; Silveira *et al.*, 2004).

Tanan *et al.* (2006) em trabalhos eletrofisiológicos com *Hoplias malabaricus* expostas ao metilmercúrio (0,75 µg/g) observaram uma diminuição das respostas das células horizontais quando comparadas com o grupo controle.

Porém, utilizando a dose de 0,75 µg/g, Bonci (2006) observou um aumento no número de células amácrinas na retina de *Hoplias malabaricus* após a exposição subcrônica ao metilmercúrio. Segundo os autores este aumento no número de célula amácrinas estaria ligado a um mecanismo de proteção contra os efeitos neurotóxicos do metilmercúrio. Diferentemente do observado por Bonci (2006) este estudo demonstrou uma diminuição significativa do número de cones pareados na retina de traíra expostas a dose 0,75 µg/g de metilmercúrio. Assim, podemos inferir que as células da retina de traíra apresentam respostas diferentes ao metilmercúrio, e somente estudos futuros poderiam esclarecer se a diminuição observada no número de cones pareados estaria relacionada à morte celular ou se outro mecanismo estaria envolvido neste processo.

Além da diminuição observada no número total de cones pareados, observamos que esta diminuição foi seletiva para regiões específicas da retina, não ocorrendo de forma homogênea. Entretanto, também observamos que em alguns quadrantes retinianos houve uma manutenção no número de cones pareados ou então um aumento do número destas células. Uma vez que não observamos espaços vazios no mosaico de cones, sugerimos que ocorreu uma reorganização celular na camada dos fotorreceptores sem perda da simetria deste mosaico, provocando um consequente aumento de cones

pareados em algumas regiões. Essa reorganização pode ter ocorrido como uma resposta de defesa ao metilmercúrio, para que regiões de maior densidade celular e responsáveis pela alta acuidade visual em traíra não fossem prejudicadas. Porém, resta saber se esta aproximação dos cones pareados induzida pela reorganização celular não poderia causar prejuízos na fotorrecepção, uma vez que a distância considerada ideal entre os fotorreceptores também é considerada crucial para o processo de captação da luz. Sendo assim, futuros estudos precisam ser realizados para definirmos o impacto fisiológico destes achados nas funções visuais de *Hoplías malabaricus*.

## **7 CONCLUSÕES**

A imunocitoquímica através de uma marcação inespecífica, demonstrou que pode ser utilizada como um parâmetro a mais no estudo de toxicologia ambiental;

O metilmercúrio causa diminuição do número de cones pareados após intoxicação trófica e subcrônica.

## 8 REFERENCIAS

- Ahlbert, I. B. 1969. The organization of the cone cells in the retinae of four teleosts with different feeding habits (*Perca fluviatilis* L., *Lucioperca lucioperca* L., *Acerina cernua* L., and *Coregonus albula* L.). *Arkiv. Zool.* 22: 445-481.
- Ahlbert, I. B. 1976. The organization of the cone cells in the retina of salmon (*Salmo solar*) and trout (*Salmo trutta*) in relation to their feeding habits. *Acta Zool.* 57: 13-35.
- Ali, M. A. & Anctil, M. (1976). *Retinas of fishes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Beaudet, L.; Browman, H.I. & Hawryshyn, C.W. 1993. Spectral sensitivity and retinal structure in rainbow trout of different sizes. *Vision Res.* 33:1739-1746.
- Bonci, D. M. 2006. Análise morfológica de células amácrinas PV-IR e bipolares PKC-IR em retina de peixe tropical (*Hoplias malabaricus*) intoxicado com metilmercúrio. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, SP.
- Bonci, D.M.; Lima, S.M.; Grotzner, S.R.; Ribeiro, C.A.; Hamassaki, D.E & Ventura D.F. 2006. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive alphaprotein kinase C bipolar cells caused by methylmercury chloride intoxication in the retina of the fish *Hoplias malabaricus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:405-410.
- Bowmaker, J. K. & Kunz, Y. W. 1987. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): age dependent changes. *Vision Res.* 27: 2101-2108.
- Bowmaker, J. K.; Thorpe, A. & Douglas, R. H. 1991. Ultraviolet-sensitive cones in the goldfish. *Vision Res.* 31: 349-352.
- Brooks, D.E.; Kallberg, M.E.; Cannon, R.L.; Kamaromy, A.M.; ollivier, F.J.; Malakhova, °E.; Dawson, W.W.; Sherwood, M.B. & Lambrou, G.N. 2004. Functional and sctructural analysis of the visual syxtem in the rhesus monkey model of optic nerve head ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:1830-1840.
- Browman, H. I., W. Gordon, C.; Evans, B.I. & Brien, W.J.O. 1990. Correlation between histological and behavioral measure of visual acuity in a



- zooplanktivorous fish, the white erappie (*Pomoxis annularis*). *Brain Behav. Evol.* 35:85-97.
- Brown, K.T. 1969. A linear area centralis extending across the turtle retina and stabilized to the horizontal by non visual cues. *Vision. Res.* 4: 1053-1054.
- Burkhardt, D. A.; Hassin, G.; Levine, J. S. & MacNichol, E. F., Jr. 1980. Electrical responses and photopigments of twin cones in the retina of the walleye. *J. Physiol.* 309: 215-228.
- Cameron, D. A. & Pugh, E. N., Jr. 1991. Double cones as a basis for a new type of polarization vision in vertebrates. *Nature.* 353: 161-164.
- Cameron, D.A. & Easter, S.S. 1993. The cone photoreceptor mosaic of the green sunfish, *Lepomis cyanellus*. *Vis. Neurosci.* 10: 375-384.
- Canto-Pereira, L. H. M.; Simões, A. L.; Lago, M.; Moura, A. L. A.; Costa, M. F.; Rodrigues A.; Sato, C.; Faria, M. A. M.; Silveira, L. C. L. & Ventura, D. F. 2003. Occupational exposure to Hg impairs visual functions in dentists and factory workers in Brazil. *Proceedings of the 9th Meeting the International Neurotoxicology Association (INA)*, p 87.
- Cavalleri, A.; Gobba, F.; Luzzana, G.; Rosa, P. & Sghizzi, P. 1995. Color vision loss in workers exposed to elemental mercury vapor. *Toxicol. Lett.* 77: 351-6.
- Cavalleri, A., Gobba, F. 1998. Reversible color vision loss in occupational exposure to metallic mercury. *Environ Res.* 77:173-7.
- Cohen, A. I. 1972. Rods and cones. In *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. II/2, ed. Fuortes, M.G.F., pp. 63-110. Berlin: Springer-Verlag.
- Coimbra, J.P.; Marceliano, M.L.V.; Andrade-da-Costa, B.L.S & Yamada, E.S. 2006. The retina of tyrant flycatchers: topographic organization of neural density and size in the ganglion cell layer of the *Pitangus sulphuratus* and the rusty margined flycatcher *Myiozetetes acyanensis*. *Brain Behv. Evol.* 68: 15-25.
- Collin, S. P.; Hoskins, R. V. & Partridge, J. C. 1998. Seven retinal specializations in the tubular eye of the deep-sea pearleye, *Scopelarchus michaelisarsis*: a case study in visual optimization. *Brain Behav. Evol.* 51: 291-314.
- Douglas, R. H. & Marshall, N. J. 1999. A review of vertebrate and invertebrate ocular filters. In: Archer, S. N., Djamgoz, M. B. A., Loew E. R., Partridge, J. C., Vallerga, S. editors. *Adaptive mechanisms in the ecology of vision*. Dordrecht: Kluwer Academic. p 95-162.

- Eigemann, C. H. & Shafer, G. D. 1900. The mosaic of single and twin cones in the retina of fishes. *Am. Naturalist*. 34: 109-118.
- Engström, K. 1960. Cone types and cones arrangement in the retinae of some cyprinids. *Acta Zool. (Stockh.)* 41:277-295.
- Engström, K. 1963. Cone types and cone arrangements in teleost retinae. *Acta Zool.* 44: 179-243.
- Feit-Laichman, R.A.; Kinouchi, R.; Takeda, M.; Fan, Z.; Mohr, S.; Kern, T.S. & Chen, D.F. 2005. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neural and glial changes. *Invés. Ophthalmol. Vis. Scio.* 46: 4281-4287.
- Fernald, R. D. 1983. Neural basis of visual pattern recognition in fish. In *Advances in Vertebrate Neuroethology*, ed. Ewert, J. P.; Capranica, R. R. & Ingle, D. J., pp 569-580. New York: Plenum Press.
- Fox, D.A. & Silman, A.J. 1979. Heavy metals affect rod, but not cone, photoreceptors. *Science*. 21:78-80.
- Granda, A.M. & Haden, K. W. 1970. Retinal oil globule counts and distribution in two species of turtle: *Pseudemys scripta* and *Chelonia mydas*. *Vision. Res.* 1: 79-84.
- Grötzner, S. R. 2005. Densidade e topografia dos fotorreceptores da retina da tartaruga *Trachemys scripta elegans* com imunocitoquímica de opsinas. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, SP.
- Hughes, A. 1977. The topography of vision in mammals of contrasting life styles: comparative optics and retinal organization. In: *The visual system in Vertebrates: Handbook of Sensory Physiology*. Springer. 613-756.
- Jacobs, G.H. & Rowe, M.P. 2004. Evolution of vertebrate colour vision. *Clin. Exp. Optom.* 87: 206-216.
- Jomary, C.; Cullen, J. & Jones, S.E. 2006. Inactivation of the Akt survival pathway during photoreceptor apoptosis in the retinal degeneration mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 1620-1629.
- Kunimoto, M. 1994. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 14 :310-7.
- Kusmic, C. & Gualtieri, P. 2000. Morphology and spectral sensitivities of retinal and extraretinal photoreceptors in freshwater teleosts. *Micron* 31: 183-200.

- Kusmic, C.; Barsanti, L.; Passarelli, V. & Gualtieri, P. 1993. Photoreceptor morphology and visual pigment content in the pineal organ and in the retina of juvenile and adult trout *Salmo irideus*. *Micron* 24: 279-286.
- Levine, J. S. & MacNichol, E. F. Jr. 1979. Visual pigments in teleost fishes: effects of habitat, microhabitat, and behavior on visual pigment evolution. *Sensory Processes*. 3: 95-131.
- Loew, E. R. & Wahl, C. M. 1991. A short-wavelength sensitive cone mechanism in juvenile yellow perch. *Perca flavescens*. *Vis. Res.* 31: 353-360.
- Lyall, A. H. 1957. Cone arrangements in teleost retinae. *J. Microsc. Sci.* 98: 189-201.
- Lythgoe, J.N. 1979. *The ecology of vision*. Oxford University Press. New York.
- Marc, R. E. & Sperling, H. G. 1976. The chromatic organization of the goldfish cone mosaic. *Vis. Res.* 16: 1211-1224.
- Marchiafava, P. L. 1985. Cell coupling in double cones of the fish retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 226: 211-215.
- Meleth, A.D.; Agron, E.; Chan, C.C.; Reed, G.F.; Arora, K.; Byrnes, G.; Csaky, K.G. & Ferris, F.L. 2005. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 4295-4301.
- Müller, H. 1857. Anatomisch-physiologische Untersuchungen über die Retina bei Menschen und Wirbelthieren. *Zeitschrift fuer Wissenschaftliche Zoologie* 8: 1-122.
- Novales Flamarique, I. 2001. Gradual and partial loss of corner cone-occupied area in the retina of rainbow trout. *Vis. Res.* 21: 3073-3082.
- Novales Flamarique, I. 2002. Partial re-incorporation of corner cones in the retina of the Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Vis. Res.* 12: 2737-2745.
- Ramón Y Cajal, S. 1983. La retina des vertebres. *La cellule*. 9:17-257.
- Reckel, F. & Melzer, R. R. 2003. Regional variations in the outer retina of Atherinomorpha (Beloniformes, Atheriniformes, Cyprinodontiformes: Teleostei): photoreceptors, cone patterns, and cone densities. *J. Morphol.* 257: 270-288.
- Reckel, F.; Melzer, R. R.; Parry, J. W. L. & Bowmaker, J. K. 2002. The retina of five atherinomorph teleosts: photoreceptors, patterns and spectral sensitivities. *Brain Behav. Evol.* 260: 249-264.

- Richter, A. & Simon, E. J. 1974. Electrical responses of double cones in turtle retina. *J. Physiol.* 242: 673-683.
- Rowe, M., Engheta, N. & Pugh, E. N., Jr. 1991. Can birefringence explain the polarization analyzing capability of teleost double cones? *Society for Neuroscience. Abstracts* 17, 297.
- Ryder, J. A. 1895. An arrangement of the retinal cells in the eyes of fishes partially simulating compound eyes. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.* 161-166.
- Seigel, G.M.; Campbell, L.M.; Narayan, M. & González-Fernandez, F. 2005. Câncer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol. Vis.* 11: 729-737.
- Silveira, L.C.L.; Damin, E.T.B.; Pinheiro, M.C.N.; Rodrigues, A.R.; Moura, A.L.A.; Cortes, M.I.T. & Mello, G.A., 2003. Visual dysfunction following mercury exposure by breathing mercury vapour or by eating mercury-contaminated food. In: Mollon, J.D., Pokorny, J., Knoblauch, K. (Eds.), *Normal and Defective Colour Vision.* Oxford University Press, Oxford, England, pp. 407–417.
- Stell, W. S. & Hárosi, F. I. 1976. Cone structure and visual pigment content in the retina of goldfish. *Vis. Res.* 16: 647-657.
- Stone, J. 1983. *Parallel processing in the visual system.* London, Plenum.
- Tamura, T. 1957. A study of visual perception in fish especially on resolving Power and accomodation *Bull. Jap. Soc. Fish.* 9:536-557.
- Tanan, C.L.; Ventura, D.F.; DE Souza, J.M.; Ribeiro, C.A.O.; Mela, M. 2006. Electrophysiological study of the effects of mercury intoxication in the retina of the traíra (*Hoplias malabaricus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:987-995.
- Thompson, I. 1991. Considering the evolution of vertebrate neural retina. In: Cronly-Dillon, J. & Gregory, R.L. (eds). *Vision and visual dysfunction Vol 2: Evolution of the eye and visual system.* Macmillan Press.
- Tsanou, E.; Ioachim, E.; Stefaniotou, M.; Gorezis, S.; Charalabopoulos, K.; Bagli, H.; peschos, D.; psilas, K. & Agnantis, N.J. 2005. Immunohistochemical study of angiogenesis and proliferative activity in epiretinal membranes. *Int. J. Clin. Pract.* 10: 1157-1161.
- Ventura, D. F.; Simões, A. L.; Costa, M. F.; Costa, M. T. V.; de Souza, J. M; Canto-Pereira, L. H. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L.C. L. 2003a. Hue and saturation discrimination and electroretinograms of mercury contaminated

- industry workers in Brazil. Proceedings of the 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association (INA).
- Ventura, D. F.; Berezovsky, A.; Salomão, S. R.; Costa, M. T. V.; Simões, A. L.; Canto-Pereira, L. M.; Costa, M. F.; de Souza, J. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L. C. L. 2003b. Multifocal electroretinograms (mfERGs) correlate with color vision losses in mercury contaminated workers. Proceedings of the 17th Symposium of the International Color Vision Society (ICVS).
- Ventura, D. F.; Simões, A. L.; Costa, M. T. V.; Costa, M. F.; de Souza, J. M.; Canto-Pereira, L. H. M.; Lago, M.; Faria, M. A. M. & Silveira, L. C. L. 2003c. Occupational mercury contamination produces loss of color-and contrast-vision but no effect in full field ERG. Annual Meeting Abstract [www.arvo.org](http://www.arvo.org). Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Abstract 4112.
- Ventura, D.F.; Costa, M.T.V.; Costa, M.F.; Berezovsky, A.; Salomão, S.R. & Simoes, A.L. 2004. Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Vis. Neurosci.* 21:421–429.
- Walls, G.L. 1940. The pigment of the vertebrate lens. *Science*, 91: 172.
- Walls, G.L. 1942. The vertebrate eye and its adaptative radiation. Cranbook Inst Of Science, Bloomfield Hills.
- Wang, X. & Tay, S.S. 2005. Factor contributing to neural degeneration in retinas of experimenatl glaucomatous rats. *J. Neurosci. Res.* 5: 674-698.
- Warfvinge, K. & Bruun, A. 1996. Mercury accumutation in the squirrel monkey eye after mercury vapour exposure. *Toxicol.* 107:189-200.
- Warfvinge, K. & Bruun. A. 2000. Mercury distribution in the squirrel monkey retina after in utero exposure to mercury vapour. *Environ. Res.* 83:102-109.
- Waterman, T. H. & Forward, R. B., Jr. 1970. Field evidence for polarized light sensitivity in the fish *Zenarchopterus* *Nature.* 228: 85-87.
- Wilson, M.W.; Fraga, C.H.; Fuller, C.E.; Rodriguez-Galino, C.; Mancini, J.; Hagedorn, N.; Leggas, M.L. & Stewart, C.F. 2006. Immunohistochemical detection of multidrug-resistant protein expression in retinoblastoma trated by primary enucleation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 4: 1269-1273.
- Zaunreiter, M., Junger, H., Kotrschal, K. 1991. Retinal morphology of cyprinid fishes: a quantitative histological study of ontogenetic changes and insterspecific variation. *Vis. Res.* 31: 383-394.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os desenhos experimentais utilizados neste estudo foram satisfatórios para os objetivos propostos;

As espécies *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio* foram consideradas bons modelos biológicos para este estudo, pois adaptaram-se bem às condições laboratoriais e à manipulação durante o experimento;

Os resultados demonstraram que a histopatologia, a autometalografia e a imunocitoquímica podem ser potencialmente utilizadas como biomarcadores na avaliação dos efeitos dos metilmercúrio em retina de peixes;

Em *Hoplias malabaricus* o metilmercúrio deposita-se nas camadas e células da retina, causa alterações morfológicas na camada dos fotorreceptores e diminui o número total de cones pareados;

Em *Danio rerio* o metilmercúrio deposita-se nas camadas e células da retina;

Este trabalho forneceu dados inéditos que possibilitam uma melhor compreensão do potencial tóxico do metilmercúrio na retina de duas espécies de teleósteos;

Os danos causados pelo metilmercúrio podem comprometer a qualidade de vida dos organismos expostos;

Futuros estudos utilizando biomarcadores *in situ* em regiões afetadas pela presença do mercúrio, poderão complementar este trabalho, resultando em um diagnóstico mais completo dos efeitos do mercúrio e seus derivados nestas duas espécies.