UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio

Vanessa Cristina de Oliveira Souza

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio

Tese de Douturado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Vanessa C. de Oliveira Souza
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto
2016

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.

Souza, Vanessa Cristina de Oliveira
Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio. Ribeirão Preto, 2016.
95p.:il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior.

1. Proteômica. 2. Mercúrio. 3. Mecanismos de Ação Tóxica

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 07/07/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Cristina de Oliveira Souza

Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Não importa o quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.
(Stephen Hawking)

Ao meu filho Bruno Henrique, que realizou meu maior desejo e me faz feliz a cada instante.

Ao meu marido Nilton, pelo seu amor, amizade, carinho, paciência e apoio, essenciais no decorrer desta etapa da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado me ajudando a ter calma nos momentos difíceis e me incentivando sempre.

Amo Vocês!

Aos meus pais Cirando e Regina, por acreditarem em mim e me darem todo o amor e suporte para que mais este sonho se realizasse.

Amo Vocês!

Ao meu irmão Daniel e esposa Ane Rachel, pelo carinho e por fazerem parte desta conquista.

Aos meus cunhados e cunhadas, pela amizade e pelo convívio durante esta jornada.

Muito Obrigada!

À minha sogra Izabel,

e

Às minhas sobrinhas Cristiane, Ana Carolina e Beatriz, pelo simples fato de existirem e tornarem minha vida mais feliz.

Muito Obrigada!

À Joelma, um anjo que Deus colocou no meu caminho e que faz parte da minha família.

Muito Obrigada!

A Deus, que é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei o porquê. Sei que não posso desperdiçá-la. (Ayrton Senna).

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao meu supervisor, professor Fernando Barbosa Júnior, por me incentivar a todo momento e mostrar a importância do constante conhecimento. Não tenho palavras para expressar toda a minha admiração e orgulho em trabalhar ao seu lado. Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador, professor Fernando Barbosa Júnior, por acreditar neste sonho e confiar em mim. Gostaria de agradecer por me orientar nesta jornada e por todo conhecimento adquirido neste período. Minha eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, por tudo que representa na minha vida pessoal e profissional. Obrigada por partilhar comigo momentos e ensinamentos valiosos que me acompanharão por toda a vida!

À Dra. Kátia Cristina de Marco, por toda a ajuda e companheirismo nesta longa jornada. Principalmente pela troca de conhecimentos e sugestões valiosas e, pela grande amizade, demonstrada a cada instante. Sem você, este sonho não se realizaria!

Ao Prof. Dr. José César Rosa, por colaborar, valiosamente com este trabalho e, mais uma vez, abrir as portas do Centro de Química de Proteínas para que este sonho fosse realizado.

Aos meus amigos do Centro de Química de Proteínas, especialmente à Dra. Clarice Izumi, à Dra. Hélen Julie Laure e a Srta. Maria Helena Martins, por toda a colaboração e amizade, fundamentais não somente para a realização deste trabalho, mas também em toda a minha vida.

Ao Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer, em especial à Dra. Cristiana Bernadelli Garcia, por toda a ajuda e por colaborar de maneira ímpar com o trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, pelas amizades, sugestões, críticas e apoio demonstrados.

À Sra. Maria Aparecida Buzeto, pela amizade e por toda ajuda no laboratório. Muito obrigada!

Às secretárias da FCFRP, Rosana e Rosemary, pelo cuidado, não só comigo, mas para com cada aluno, despendido todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro.

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, dando-me incentivo, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

SOUZA, V.C.O. **Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio**. 2016. 95 f.. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O mercúrio (Hg) é um metal não essencial, encontrado em diferentes formas químicas, com propriedades bastante diferentes. Entretanto, todas são tóxicas e capazes de alterar inúmeras vias metabólicas. Dentre os efeitos tóxicos da exposição ao Hg, tem grande relevância a toxicidade sobre os tecidos renal, cerebral e hepático. Os principais efeitos nefrotóxicos decorrentes da exposição ao Hg têm sido atribuídos ao estresse oxidativo e produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), além de causar danos no metabolismo mitocondrial, alterando a funcionalidade da membrana celular e a polaridade tubular renal. As formas orgânicas do Hg apresentam efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central (SNC), com a capacidade de induzir sérios danos ao desenvolvimento neurológico, tais como deficiências na fala, hiperatividade, dificuldade de concentração e até mesmo desordens semelhantes ao autismo. No tecido hepático, os principais efeitos tóxicos ocorrem por alterações no ciclo entero-hepático, processo-chave na excreção do mercúrio. A exposição aos metais, de uma maneira geral, ativa um mecanismo que modifica a produção alterada de proteínas na tentativa de manter a homeostase e de proteger ou reparar macromoléculas que são alvos diretos ou indiretos de xenobióticos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de mapas bidimensionais, o perfil de expressão de proteínas em amostras fígado, cérebro e rim de ratos expostos a diferentes espécies de mercúrio (inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio) comparados aos seus respectivos controles, utilizando a plataforma clássica de análise proteômica (2DE e MS). Observou-se que a exposição às diferentes formas de Hg modificou a expressão de 139 proteínas, sendo 22 em células cerebrais, 19 em células do tecido renal, e 27 em células do tecido hepático. Dentre as proteínas diferencialmente expressas, destacaram-se àquelas relacionadas diretamente ao estresse oxidativo, nos tecidos hepático e renal e relacionadas à homeostase do Ca^{+2} e à regulação de glutamato na fenda sináptica, no tecido cerebral. Este estudo demonstrou que todas as formas de Hg, promoveram mudanças no perfil protéico em todos os tecidos e, muitas proteínas alteradas, corroboram com os mecanismos de ação do Hg, já previstos na literatura.

Palavras-chave: mercúrio, proteômica, mecanismos de ação.

ABSTRACT

SOUZA, V. C. O. **Proteomics analysis in rats tissue exposed to different forms of mercury.** 2016. 95 f. Thesis (Ph.D., Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Mercury (Hg) is not essential metal found in various chemical species with different properties, but all are toxic and can alter numerous metabolic pathways. Among the toxic effects of exposure to mercury, it has great relevance to toxicity on the kidneys, brain and liver tissues. The main nephrotoxic effects from exposure to mercury have been attributed to oxidative stress and production of reactive oxygen species (ROS), in addition to causing damage to mitochondrial metabolism by changing the functionality of the cell membrane and renal tubular polarity. The organic Hg forms present toxic effects on the central nervous system (CNS), with the ability to induce serious damage in the neurological deficiencies such as in speech, hyperactivity, difficulty concentrating and even disorder similar to autism. In liver tissue, the major toxic effects occur by changes in the enterohepatic cycle, key process excretion of mercury. Exposure to metals, in general, activates a mechanism which changes the production of proteins in an attempt to maintain homeostasis and to protect or repair macromolecules that are direct targets or indirect xenobiotics. In this sense, the aim of this study was to evaluate, by means of two-dimensional maps, protein expression'profiles in liver, brain and kidney samples of rats exposed to different species of mercury (inorganic, methylmercury and ethylmercury) compared to their respective controls, using the classic platform for proteomic analysis (2DE and MS). It was observed that exposure to different forms of Hg modified expression of 139 proteins, 22 in brain cells 19 in kidney tissue cells, and 27 in the hepatic tissue cells. Among the differentially expressed proteins, they stood out to those directly related to oxidative stress in the liver and kidney tissues and related to homeostasis of Ca^{2+} and glutamate regulation in the synaptic cleft, the brain tissue. This study demonstrated that all Hg forms modified the protein profile in all tissues, and many altered proteins, corroborate the Hg mechanisms of action, as provided in the literature.

Keywords: mercury, proteomics, mechanisms of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo do mercúrio (Hg) no ambiente.....2

Figura 2. Formação do complexo hidrossolúvel L-cisteína-Met-Hg e sua semelhança com o aminoácido L-metionina.....7

Figura 3. Esquema simplificado das fontes de exposição e metabolismo das diferentes espécies de Hg.....11

Figura 4. Esquema de uma focalização isoelétrica.....16

Figura 5. Representação esquemática da etapa de equilíbrio das *strips***.**.....17

Figura 6. Esquema de um SDS-PAGE.....18

Figura 7. Esquema da técnica de MALDI-TOF.....21

Figura 8. Esquema da técnica de Western Blotting evidenciando a adição de anticorpos.....23

Figura 9. Número de publicações de estudos proteômicos baseados em metais até 2015.....25

Figura 10. Estudo da reprodutibilidade das amostras.....40

Figura 11. *Normal probability plot* de amostra de extrato protéico de fígado de cada rato tratado com Met-Hg.....41

Figura 12. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de fígado de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias.....42

Figura 13. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de fígado de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas.....43

Figura 14. Gel controle demonstrando a análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de fígado controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o *software ImageMaster* versão 7.0 Platinum.....44

Figura 15. Gráfico de distribuição das proteínas identificadas em amostras de fígado, de acordo com as espécies de mercúrio.....46

Figura 16. Imunomarcação da proteína Glutationa S-Transferase, identificada por espectrometria de massas, em amostras de fígado controle e tradado com Met-Hg e Ino-Hg.....47

Figura 17. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Hg, a partir da análise do extrato protéico de fígado de animais tratados com o metal e sua relação entre as proteínas GST e ATP Sintase e o dano hepático.....48

Figura 18. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de cérebro de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias.....49

Figura 19. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de cérebro de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas.....50

Figura 20. Análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de cérebro controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o *software ImageMaster* versão 7.0 Platinum.....51

Figura 21. Gráfico demonstrando a distribuição das proteínas identificadas em amostras de cérebro, de acordo com as espécies de mercúrio.....52

Figura 22. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Met-Hg, a partir da análise do extrato protéico de cérebro de animais tratados com o metal....57

Figura 23. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de rim de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias.....58

Figura 24. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de rim de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas.....58

Figura 25. Análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de rim controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o *software ImageMaster* versão 7.0 Platinum.....59

Figura 26. Gráfico demonstrando a distribuição das proteínas identificadas em amostras de rim, de acordo com as espécies de mercúrio.....60

Figura 27. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Hg entre as proteínas SOD e PRD e o efeito nefrotóxico 62

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Exemplos de algumas matrizes disponíveis no mercado e suas aplicações.....20

Tabela II. Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir dos diferentes tecidos de ratos controle e expostos à Ino-Hg e Met-Hg durante 60 dias e à Et-Hg por 4 horas.....39

Tabela III. Número de spots detectados usando software ImageMaster versão Platinum 7.0.....40

Tabela IV. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de fígado expostas às diferentes espécies de mercúrio.....45

Tabela V. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de cérebro expostas às diferentes espécies de mercúrio.....52

Tabela VI. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de rim expostas às diferentes espécies de mercúrio.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE	eletroforese bidimensional
ACN	acetonitrila
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	atp sintase
ATSDR	*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
BSA	albumina sérica bovina
CALB	calbindina
CAT	catalase
CCB	*Coomassie Blue Coloidal*
CD95	*cluster of differentiation 95*
CHAPS	*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonate*
CID-MS/MS	dissociação induzida por colisão
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitol
EPA	*Environmental Protection Agency*
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
Et-Hg	etilmercúrio
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GS	glutamina sintase
GSH	glutationa reduzida
GST	glutationa s-transferase
IAA	iodoacetamida
IEF	focalização isoelétrica
IM	intramuscular
Ino-Hg	mercúrio inorgânico
IPG	*immobilized pH gradient - strip*
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
m/v	massa/volume
m/z	razão massa por carga
MALDI	*matrix-assisted laser desorption/ionization*
Met-Hg	metilmercúrio

MS	*mass spectrometry*
MW	massa molecular
NL	não linear
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
pI	ponto isoelétrico
PMF	*peptide mass fingerprint*
PRD	peroxiredoxina
PVDF	*polyvinylidene difluoride*
ROS	*reactive oxygen species*
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
v/v	volume/volume
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	*N,N,N´,N´-tetramethylethylenediamine*
TGI	trato gastrointestinal
TOF	*time of flight*
WHO	*World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

±	mais ou menos
™	trademark
%Vol	% volume normalizado
%	porcentagem
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
λ	comprimento de onda, em nm
°C	graus Celsius
cm	centímetros
Hg	mercúrio
mA	miliampére
mm	milímetros
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
V	volts
W	watts
ug	microgramas

SUMÁRIO

Resumo i

Abstract ii

Lista de Figuras iii

Lista de Tabelas vi

Lista de Abreviaturas e Siglas vii

Lista de Símbolos ix

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1 O Mercúrio e suas Formas de Apresentação no Ambiente..... 1

1.2 Exposição ao Mercúrio e seus Efeitos..... 3

1.2.1 Mercúrio Inorgânico..... 3

1.2.2 Metilmercúrio..... 4

1.2.3 Etilmercúrio..... 5

1.3 Toxicocinética das Espécies de Mercúrio..... 6

1.4 Mecanismos de Toxicidade das Espécies de Mercúrio..... 12

1.5 Abordagem Proteômica – Aspectos Gerais..... 14

1.5.1 Extração e Quantificação das Proteínas.....15

1.5.2 Eletroforese Bidimensional (2DE).....16

1.5.2.1 Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica (IEF).....16

1.5.2.2 Segunda Dimensão - SDS-PAGE.....17

1.5.3 Coloração, Aquisição e Análise de Imagens dos Géis..... 18

1.5.4 Digestão *in situ* com Tripsina em Géis de Poliacrilamida.....18

1.5.5 Dessalinização dos Peptídeos Tripsínicos em “Micro-Tips C18”.....19

1.5.6 Escolha da Matriz para Análise por Espectrometria de Massas.....19

1.5.7 Espectrometria de Massas..... 20

1.5.8 Western Blotting (WB)……..... 22

1.6 Proteômica: uma Nova Ferramenta para Elucidar Mecanismos de Toxicidade de metais.....24

2. HIPÓTESE..... 27

3. OBJETIVOS.....28

3.1 Objetivo Geral..... 28

3.2 Objetivos Específicos.....28

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....29
4.1 Equipamentos..... 29
4.2 Reagentes e Soluções.....29
4.3 Escolha da Dose e Tratamento dos Animais.....30
4.4 Extração e Quantificação das Proteínas.....31
4.5 Eletroforese Bidimensional (2DE)..... 32
4.5.1 Focalização Isoelétrica (IEF)..... 32
4.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....33
4.6 Obtenção e Análise de Imagens dos Géis.....33
4.7 Proteólise Limitada: Digestão Enzimática por Tripsina.....34
4.8 Dessalinização dos Peptídeos Tripsínicos em “Micro-Tips C18”..... 34
4.9 Espectrometria de Massas..... 35
4.10 Identificação de Proteínas em Banco de Dados.....35
4.11 SDS-PAGE e Western Blotting..... 36
4.12 Análise Estatística.....37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....38
5.1 Extração e Quantificação das Proteínas.....38
5.2 Estudo da Reprodutibilidade dos Géis Obtidos por 2DE..... 39
5.3 Análise Proteômica do Fígado de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg.....42
5.4 Análise Proteômica do Cérebro de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg.....49
5.5 Análise Proteômica do Rim de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg.....58

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....63

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....64

8. ANEXOS..... 94
8.1 Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais..... 94
8.3 Artigo Aceito para Publicação.....95

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Mercúrio e suas Formas de Apresentação no Ambiente

O mercúrio (Hg) é um elemento químico encontrado naturalmente no solo e liberado da crosta terrestre em pequenas quantidades por processos naturais e em maiores quantidades pela queima de combustível fóssil, petróleo, pelo processo de mineração e desmatamento (PASSOS; MERGLER, 2008). O Hg é um metal não essencial e um dos contaminantes ambientais mais conhecidos. A exposição a este elemento químico pode induzir severas alterações no organismo animal (STACEY; KAPPAS, 1982). O Hg existe basicamente em três formas quimicas: mercúrio elementar (Hg^0) ou Hg metálico, mercúrio inorgânico (Ino-Hg) e mercúrio orgânico (Hg-O), sendo as formas orgânicas mais tóxicas (GOCHFELD, 2003, ATSDR, 1999). Além disso, as propriedades tóxicas estão diretamente relacionadas as forma químicas do Hg (BERNHOFT, 2012, CARNEIRO et al, 2014a,b, DOREA et al, 2014).

O Hg na forma elementar é um metal de cor prateada que existe como um líquido espesso à temperatura ambiente e encontrado, por exemplo, em termômetros, lâmpadas fluorescentes, restaurações de amálgama dentário, entre outras fontes (EPA, 2007a). Por outro lado, Ino-Hg descreve uma categoria de compostos do metal que ocorre na forma de sais a partir de seus cátions mono e divalentes, que inclui cloreto, acetato, sulfeto, e outros (EPA, 2007a, WHO, 2003). Compostos a base de Ino-Hg têm sido muito utilizados em uma gama de produtos médicos e cosméticos, antissépticos e cremes para clareamento da pele, devido à capacidade do cátion de Hg bloquear a produção de melanina na pele.

A exposição mais comum às formas inorgânicas pode ocorrer pela inalação do vapor de Hg originário de amálgamas dentários ou de atividades mineradoras de ouro (ATSDR, 1999). O Hg elementar (Hg^0) é altamente lipofílico e facilmente absorvido pela mucosa oral e pelos pulmões. Após alcançar a corrente sanguínea, o Hg^0 transpõe membranas, incluindo a barreira hematoencefálica e a placentária e, dentro das células, é oxidado pela catalase a Hg^{2+} (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001). Além disso, no ambiente, o Hg^0 pode reagir com oxidantes atmosféricos, formando o Hg^{2+}. A forma inorgânica Hg^{2+} é mais solúvel e pode se aderir a partículas na atmosfera e, com a umidade e as chuvas, depositar-se no ambiente, principalmente o aquático (FITZGERALD, 1995).

Uma vez no ecossistema aquático, o Hg^{2+} é exposto a condições físico-químicas que favorecem sua metilação a metilmercúrio (Met-Hg), completando o Ciclo do Mercúrio (CLARKSON; MAGOS, 2006) mostrado na Figura 1.

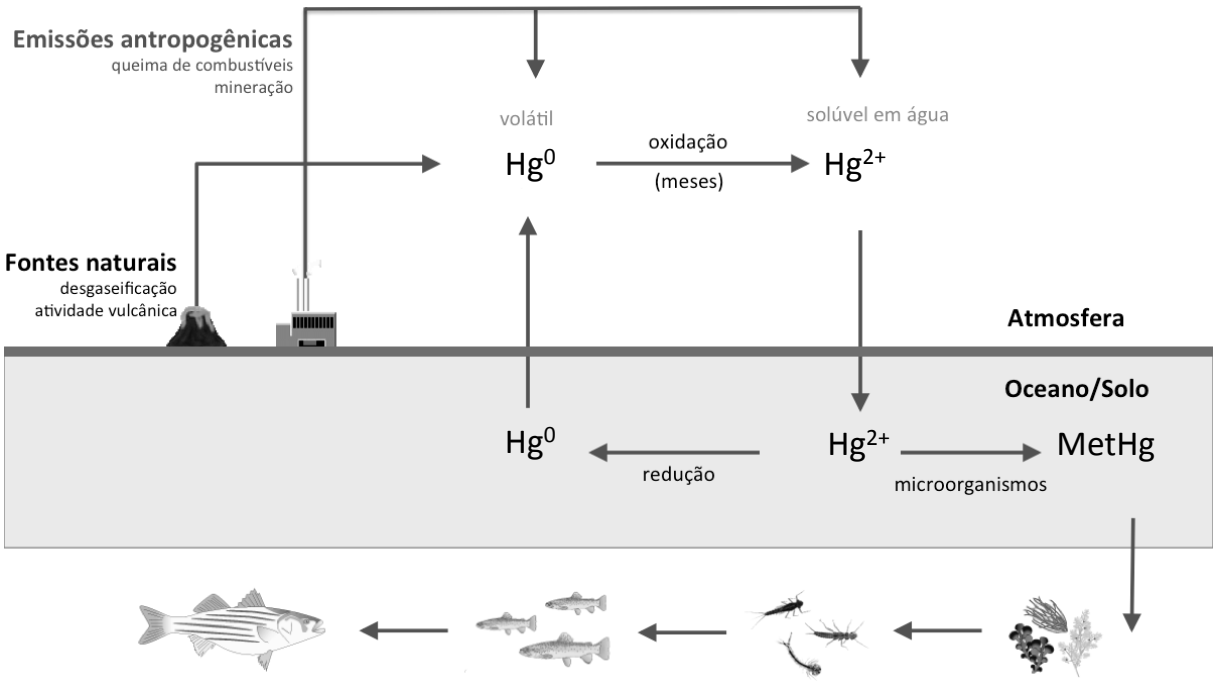

Figura 1. Representação esquemática do ciclo do Hg no ambiente. Sob a forma metálica (Hg^0), o mercúrio pode sofrer processo de oxidação, tornando um elemento hidrossolúvel, o cátion mercúrico (Hg^{2+}). Através da chuva, retorna ao solo e/ou à água e, no ambiente aquático, pode ser metilado por microrganismos presentes no sedimento a metilmercúrio (Met-Hg), o qual entra na cadeia alimentar, iniciando-se pelos plânctons, peixes herbívoros e carnívoros, e finalmente, chega ao homem por meio da pesca.

Após a metilação, o Met-Hg torna-se rapidamente biodisponível e acumula-se ao longo da cadeia trófica (MALM, 1998). Dessa forma, as algas e as plantas aquáticas apresentam concentrações de Met-Hg poucas vezes maiores do que as concentrações em águas. Já os peixes que consomem estas plantas têm concentrações maiores, e assim ocorre sua bioacumulação (aumento da concentração nos tecidos ao longo do tempo), até que os peixes do topo da cadeia alimentar sejam atingidos, apresentando concentrações de Met-Hg até um milhão de vezes maiores às das águas onde vivem (GUIMARÃES & FORTI, 1999).

Hg-O é encontrado principalmente nas formas de Met-Hg e etilmercúrio (Et-Hg), os quais possuem propriedades químicas similares e são ditos como alquil-mercuriais de cadeia curta.

A principal fonte de exposição ao Met-Hg ocorre por meio do consumo de peixes ou de alimentos marinhos contaminados (ATSDR, 1999), sendo que aproximadamente 95% do Met-Hg ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, alcançando a corrente sanguínea e se distribuindo por todo o organismo (EPA, 2001).

O Et-Hg é usado na forma de timerosal (tiossalicilato sódico de etilmercúrio) com a finalidade de antisséptico tópico e como conservante em produtos como plasma humano, imunoglobulinas e principalmente, no Brasil, em vacinas rotineiramente administradas em crianças, como é o caso da vacina tetravalente indicada contra difteria, tétano, coqueluche, meningite e na tríplice viral, vacina contra caxumba, rubéola e sarampo (COUNTER & BUCHANAN, 2004).

Neste sentido, até 2001 alguns trabalhos sugeriram uma predisposição de algumas crianças ao autismo após exposição ao timerosal em vacinas (HALSEY, 1999; PLESS & RISHER, 2000; BRAYDEN et al., 2001; ORAM et al., 2001; SEAL & DAUM, 2001, BERNARD et al., 2001). Entretanto, trabalhos posteriores não suportam tal hipótese (HVIID ET AL., 2003; PARKER et al., 2004; HAYNEY, 2004). A elucidação da toxicocinética do timerosal poderia ajudar a entender sobre a incorporação do Hg após a administração de vacinas, podendo confirmar a necessidade da substituição do mesmo como conservante. O timerosal em concentrações micromolares diminui a viabilidade celular e provoca apoptose celular indicado pela ativação de caspases 3 (BASKIN et al., 2003; MAKANI et al., 2002). Outros efeitos tóxicos do timerosal podem ser citados, como por exemplo, alteração da sinalização de neurotropina, incluindo ligação a mensageiros secundários (VANLINGEN et al., 2001), síntese de microtúbulos (ALEXANDRE et al., 2003) e inibição do conteúdo de glutationa (UEHA-ISHIBASHI et al., 2004).

1.2 Exposição ao Mercúrio e seus Efeitos

1.2.1 Mercúrio Inorgânico

Usos medicinais de compostos contendo íons mercuroso e mercúrico praticamente desapareceram, mas o Ino-Hg ainda é o princípio ativo de cremes para clareamento da pele amplamente utilizado em muitos países em desenvolvimento (WELDON et al., 2000).

O íon mercúrico, sob a forma dos seus sais solúveis em água, é altamente tóxico, uma vez que a ingestão de cerca de 1g pode ser fatal, com um colapso

completo da função renal. Além disso, doses menores causam dano aos rins, sendo o túbulo proximal o principal alvo. A ação seletiva sobre o rim é, sem dúvida, oriundo do ávido acúmulo renal desta forma de mercúrio, porém os mecanismos bioquímicos de toxicidade renal ainda são desconhecidos (CLARKSON & MAGOS, 2006).

Alguns estudos têm indicado que Hg, especialmente na forma inorgânica divalente, está associada a doenças autoimunes em animais e, possivelmente, aos seres humanos (POLLARD & HULTMAN, 1997). Uma quantidade considerável de trabalhos experimentais tem sido dedicada à ação do metal no sistema imune (GARDNER & NYLAND, 2016; SOLLOME & FRY, 2015; RICE et al., 2014; LEWIS et al., 2013). Modelos animais geneticamente susceptíveis têm sido utilizados para caracterizar os efeitos do Hg^{2+} no sistema imune, ou seja, a linfoproliferação, hipergamaglobu-linemia, e desenvolvimento de autoimunidade sistêmica (POLLARD & HULTMAN, 1997).

Embora a ação do Hg em níveis celulares e sistêmicos esteja bem caracterizada, os seus mecanismos bioquímicos de ação ainda não estao completamente elucidados (POLLARD, 2002). A apoptose de células imunocompetentes desempenha um papel fundamental na regulação da atividade imune. Neste contexto, a via de sinalização CD95-caspase-3 que medeia a apoptose pode desempenhar um papel bioquímico chave na resposta autoimune (WHITEKUS et al, 1999;. MCCABE et al, 2003). Em 2005, McCabe e cols. demonstraram que a atenuação desta via não é devido a uma ação direta de Hg^{2+} na caspase-3, mas em vez disso, tem como alvo um evento de sinalização na membrana plasmática. Portanto, a ação inicial do mercúrio pode estar sobre a superfície da célula. Este trabalho foi um dos poucos casos em que houve o cuidado de medir as concentrações de mercúrio nas células-alvo *in vitro* (McCabe et al., 2005).

1.2.2 Metilmercúrio

As principais vias de exposição do homem ao Met-Hg ocorrem pela ingestão de peixes com altas concentrações deste metal (CLARKSON & MAGOS, 2006).

O Met-Hg produzido pelo processo de biometilação em sedimentos aquáticos é incorporado na cadeia alimentar aquática e é submetido a um processo de biomagnificação para alcançar concentrações mais elevadas nos tecidos musculares de peixes predadores. Mamíferos marinhos carnívoros também têm concentrações

elevadas de mercúrio. O grau de biomagnificação depende da localização das espécies de peixes na cadeia alimentar (SEGADE & TYSON, 2003).

A ingestão de Met-Hg depende da quantidade e da espécie de peixe consumida. As populações que dependem de peixes como a principal fonte de alimento têm os maiores consumos, tais como as populações ribeirinhas na Amazônia (GROTTO et. al, 2011; GROTTO et. al, 2010).

Os efeitos tóxicos do Met-Hg são particularmente notáveis no cérebro, sendo os principais sintomas distúrbios visuais, parestesia, perda da audição, tremor muscular, distúrbio da motilidade, paralisia e até morte (LEBEL et al., 1996; GRANDJEAN et al., 1999; ETO, 2000). Além disso, o Met-Hg é teratogênico (STEUERWALD et al, 2000). Em Minamata (Japão), mulheres intoxicadas por Met-Hg geraram crianças com severos danos cerebrais, tais como paralisia cerebral, microcefalia e retardo mental (KONDO, 2000).

Syversen & Kaur (2012) observaram que a síntese de proteína foi alterada em todas as áreas do cérebro em ratos tratados com Met-Hg. No entanto, em certas populações de células, a síntese protéica foi recuperada, ultrapassando os níveis de pré-tratamento, porém permaneceu inibida em outras populações celulares. De especial interesse foi a descoberta de que as células granulares do cerebelo, conhecidas por serem afetadas por Met-Hg, não mostraram recuperação da síntese de proteínas, enquanto que as células de Purkinje do cerebelo, conhecidas por serem resistentes ao metilmercúrio, tiveram uma superexpressão de proteínas (HIMI et al., 1996; TAKEUCHI & ETO, 1999).

1.2.3 Etilmercúrio

A principal forma de exposição ao Et-Hg ocorre em decorrência do uso do timerosal (tiomersal, mertiolate, mercurocromo ou tiosalicilato de sódio de etil mercúrio) (CLARKSON, 2002). O composto contém 49,6% de Hg em sua composição e é frequentemente utilizado em frascos multidose de vacinas na ordem de 0,003% a 0,01% de Hg (BALL, BALL & PRATT, 2001; DÓREA, 2013). No organismo, este composto é dissociado em tiosalicilato de sódio e etilmercúrio (TAN & PARKIN, 2000).

A exposição ao timerosal surgiu como um possível fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurocomportamentais. De acordo com Clements e cols. (2000), crianças que receberam a série completa de vacinas podem ter sido

potencialmente expostas a aproximadamente 187µg de Hg durante os 6 primeiros meses de vida. Esta exposição cumulativa excede o limite definido pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana, estimado em 0,1 µgHg/kg de peso corpóreo/dia (EPA, 1997). Tal fato gerou interesse para o desenvolvimento de mais estudos, alguns deles apontando que o desenvolvimento de autismo e outras complicações neurológicas em crianças estaria potencialmente ligado à exposição das mesmas ao EtHg por meio da vacinação (BERNARD et al., 2001; DELONG, 2011). Contudo, outros estudos não suportam tal hipótese (HVIID et al., 2003; PARKER et al., 2004; MONTANA et al., 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proibiu o uso do timerosal no Merthiolate® e similares em 2001, alegando se tratar de uma substância organomercurial, com risco de toxicidade e sem controle de utilização.

A manutenção da utilização do timerosal em vacinas tanto no Brasil quanto em outros países em desenvolvimento está muito relacionada ao risco de contaminação bacteriana advinda de múltiplas administrações de vacina de um mesmo frasco (frascos multidose). Nos EUA e países da Europa as vacinas não mais são armazenadas em frascos multidose e, sim, em frascos de dose única, o que aumenta o custo da produção e armazenamento.

Além das crianças, outras populações suscetíveis como gestantes e idosos estão expostos ao timerosal, pois quase todas as vacinas contra a gripe no mundo - as quais vêm sendo bastante incentivadas a estas populações específicas - contém o composto (DÓREA, 2013).

Os mecanismos de toxicidade do Et-Hg ainda são desconhecidos. Provavelmente, o radical etil intacto age sobre o sistema nervoso e a glutationa reduzida (GSH) é o mais abundante e essencial tiol intracelular também parece ter um efeito protetor para a toxicidade em células neuronais para o Et-Hg (JAMES et al., 2005).

1.3. Toxicocinética das Espécies de Mercúrio

Compreender a cinética das diferentes formas do Hg é fundamental para avaliar os seus efeitos biológicos (DÓREA et al., 2013). Cerca de 80% do vapor de Hg inalado é transportado para os tecidos, enquanto que esta percentagem aumenta para 95% para o Met-Hg ingerido (CLARKSON, 2002). Quanto ao Et-Hg, no entanto, pouco se sabe sobre as concentrações de Hg em tecidos humanos após exposição.

Acredita-se que esta espécie química de Hg seja consideravelmente absorvida, visto suas características químicas e da via rotineiramente utilizada, a intramuscular (IM) (ZUIDEMA et al, 1994, CLEMENTS, 2000; CLARKSON, 2002).

Uma vez na corrente sanguínea, os mecanismos celulares intrínsecos de transporte e metabolismo de diferentes formas de Hg são provavelmente os responsáveis pela disparidade na distribuição sistêmica, padrões de efeito biológico e de potência tóxica (ZALUPS & BRIDGES, 2012).

O Ino-Hg se acumula principalmente nos rins, seguido pela sua acumulação no fígado. Em humanos, estudos demonstram que de 1-16% da dose inicial dada é absorvida em um tempo de meia-vida de cerca de 41 dias, e que não há deposição significativa de mercúrio na região cerebral durante os primeiros 58 dias. Por outro lado, estudos em animais têm demonstrado que 8% do cloreto de mercúrio aplicado à pele podem ser absorvidos em 5 horas (SYVERSEN & KAUR, 2012).

Com relação à toxicocinética dos compostos orgânicos, o Met-Hg acumula-se mais no cérebro, devido principalmente ao seu perfil lipofílico e à sua mobilidade obtida através da formação de um complexo hidrossolúvel com o aminoácido cisteína. A estrutura deste complexo se assemelha ao aminoácido neutro metionina, conseguindo entrar nas células por meio de um transportador de aminoácido neutro localizado na membrana celular cerebral (figura 2), resultando no acúmulo de Met-Hg no cérebro (KERPER et al., 1992, SIMMONS-WILLIS et al., 2002). A absorção intestinal provavelmente ocorre pelo mesmo mecanismo (MAGRO & MASON, 2002).

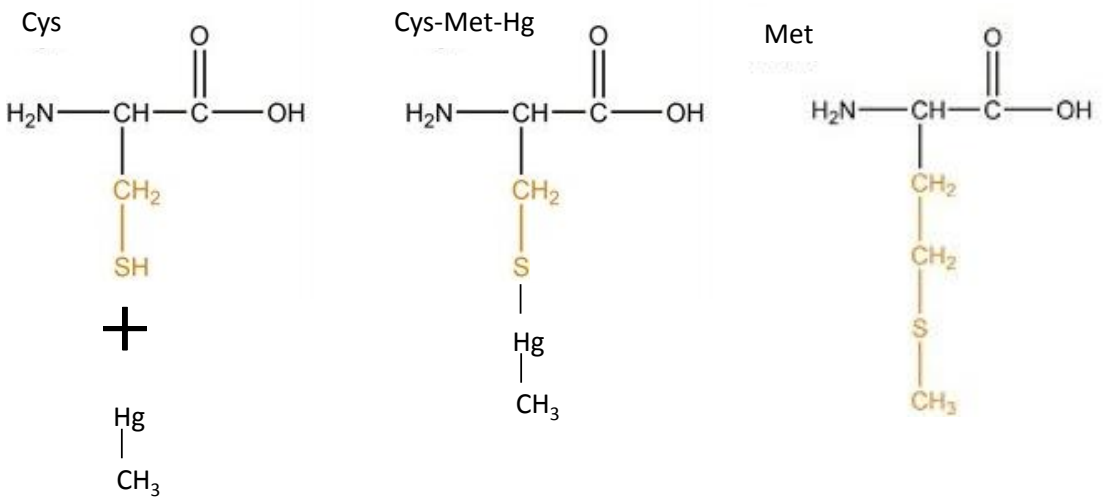

Figura 2. Formação do complexo hidrossolúvel L-cisteína-Met-Hg e sua semelhança com o aminoácido L-metionina.

No fígado, Met-Hg é transportado para fora como um complexo com a glutationa reduzida - L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina -, utilizando um transportador na membrana deste peptídeo (BALLATORI & CLARKSON, 1985; BALLATORI et al., 1995). Estas vias de transporte também desempenham um papel fundamental na eliminação do Met-Hg do corpo. A principal via é pelas fezes, representando até 90% da excreção total. O complexo Met-Hg-glutationa, depois de secreção juntamente com a bile, é degradado por enzimas extracelulares, liberando, assim, Met-Hg com cisteína. Este complexo, por sua vez, muito lipossolúvel, é reabsorvido de volta para a corrente sanguínea na vesícula biliar e áreas mais distantes do trato gastrointestinal (TGI) (DUTCZAK & BALLATORI, 1994), completando o ciclo entero-hepático (figura 3).

Apesar da toxicologia do Met-Hg ser relativamente bem conhecida, a do Et-Hg é menos compreendida. Até pouco tempo atrás, pensava-se que o Et-Hg teria propriedades toxicológicas semelhantes às do Met-Hg, devido à grande similaridade entre as estruturas químicas (BURBACHER et al., 2005). Contudo, atualmente, sabe-se que algumas propriedades - como a cinética - diferem entre estas formas orgânicas de Hg. Um dos estudos clássicos foi realizado em macacos e demonstrou que grande parte do Hg estava presente na forma inorgânica e apresentava maior afinidade no tecido renal, hepático e menor no cérebro e músculos (BLAIR et al, 1975). Dez anos depois, Magos (1986) estudou diferenças entre Et-Hg e Met-Hg em ratos e constatou que os animais expostos a Et-Hg tiveram menor concentração de Hg tecidual, mas maior conteúdo de Ino-Hg no tecido renal e menor de Hg orgânico no cérebro em comparação aos animais que foram expostos a Met-Hg. Estes dados foram confirmados posteriormente por Zareba e cols. (2007) cujo estudo demonstrou que, após administração intramuscular de timerosal, camundongos neonatos, passadas 24 a 72 horas da exposição, acumularam significativamente menos Hg orgânico no cérebro e mais Ino-Hg nos rins em comparação com os animais que receberam Met-Hg. A hipótese a partir de tais resultados é a de que, após a administração de timerosal, o Et-Hg é metabolizado a Ino-Hg que, em seguida, acumula-se nos rins (DÓREA et al., 2013).

Outro estudo realizado por BURBACHER e cols. (2005), demonstrou que as concentrações de Hg total foram significativamente menores no cérebro de macacos bebês que receberam timerosal pela via IM em comparação aos outros recebendo Met-Hg por via oral, mas a proporção de Ino-Hg no tecido nervoso foi maior no grupo

timerosal, o que corrobora os estudos de ZAREBA et al. (2007), BLAIR (1975) e MAGOS (1986). Além disso, a meia-vida biológica do Hg no sangue foi estatisticamente menor nos macacos tratados com o timerosal (2,1 e 8,6 dias, inicial e final, respectivamente) quando comparada à obtida para o Met-Hg (21,5 dias) evidenciando a diferença na eliminação de tais formas de Hg.

Sabe-se que o Hg tem diferentes tempos de meia-vida biológica de acordo com a espécie química e a via de exposição. Para o Met-Hg - após ingestão, a absorção é grande, cerca de 95% do Hg é encontrado no sangue (WHO, 1990). A meia-vida, neste mesmo compartimento é relativamente longa, de aproximadamente 50 dias, entretanto há descrição de variações de 35 a 100 dias (SMITH et al.,1994; YAGINUMA-SAKURAI et al., 2012; OGA, 2008). O Hg elementar ingerido tem uma absorção quase nula (menos de 0,01%) ao passo que quando o mesmo é aspirado na forma de vapor, como ocorre, por exemplo, em exposição ocupacional ou ainda, por presença de amálgamas dentários, sua absorção torna-se importante (~ 74 %) (CLARKSON & MAGOS, 2006). As concentrações sanguíneas de Ino-Hg diminuem inicialmente com uma meia-vida rápida de aproximadamente 1 a 3 dias, seguido por uma meia-vida mais lenta de cerca de 1 a 3 semanas (BARREGARD et al. 1992; SANDBORGH-ENGLUND et al. 1998).

Para o Et-Hg ou timerosal, em humanos, os dados são mais raros, por haver menos estudos em comparação com o Met-Hg e Ino-Hg. No sangue, os valores de meia-vida sanguínea para o Et-Hg são estimados em cerca de 7 dias (MILLER & CLARKSON, 1973; MAGOS, 2003; PICHICHIERO et al., 2009) mas também há relato de períodos ainda menores, como 5,6 e 3,7 dias, respectivamente (PICHICHERO et al., 2008; BARREGARD et al., 2011). Assim, nota-se diferença na eliminação desta forma orgânica de Hg em comparação ao Ino-Hg e Met-Hg.

Presumivelmente, o ânion do ácido tiosalicílico ligado ao Et-Hg na molécula de timerosal não exerce nenhum efeito especial sobre a absorção do Et-Hg. Isto já foi sugerido em 1973, quando MILLER & CLARKSON (1973) observaram as mesmas disposições de Hg nos tecidos após doses equivalentes de Et-Hg e timerosal. Conforme relatado anteriormente, há trabalhos na literatura sugerindo que o Et-Hg forma Ino-Hg mais rapidamente do que o Met-Hg, já que concentrações mais elevadas de Ino-Hg foram encontradas nos tecidos após exposição a Et-Hg em comparação a Met-Hg. Da mesma forma, MATHESON e cols. (1980) relataram que,

após exposição ao timerosal, a proporção de Ino-Hg no sangue representou cerca de 50% do Hg total, enquanto que para o Met-Hg, aproximadamente 10%.

Em termos de excreção, o Ino-Hg é eliminado através da urina e fezes, enquanto que a forma orgânica é primeiramente convertida a Ino-Hg, conjugado a ácidos biliares (podendo ser reabsorvido) e excretado majoritariamente por meio das fezes, apesar de haver também excreção direta do Hg orgânico nas fezes. Passado o tempo da exposição, a maioria da carga corporal restante de Hg estará nos rins, na forma inorgânica e, neste ponto, é a excreção urinária que prevalece (CLARKSON & MAGOS, 2006) (figura 3).

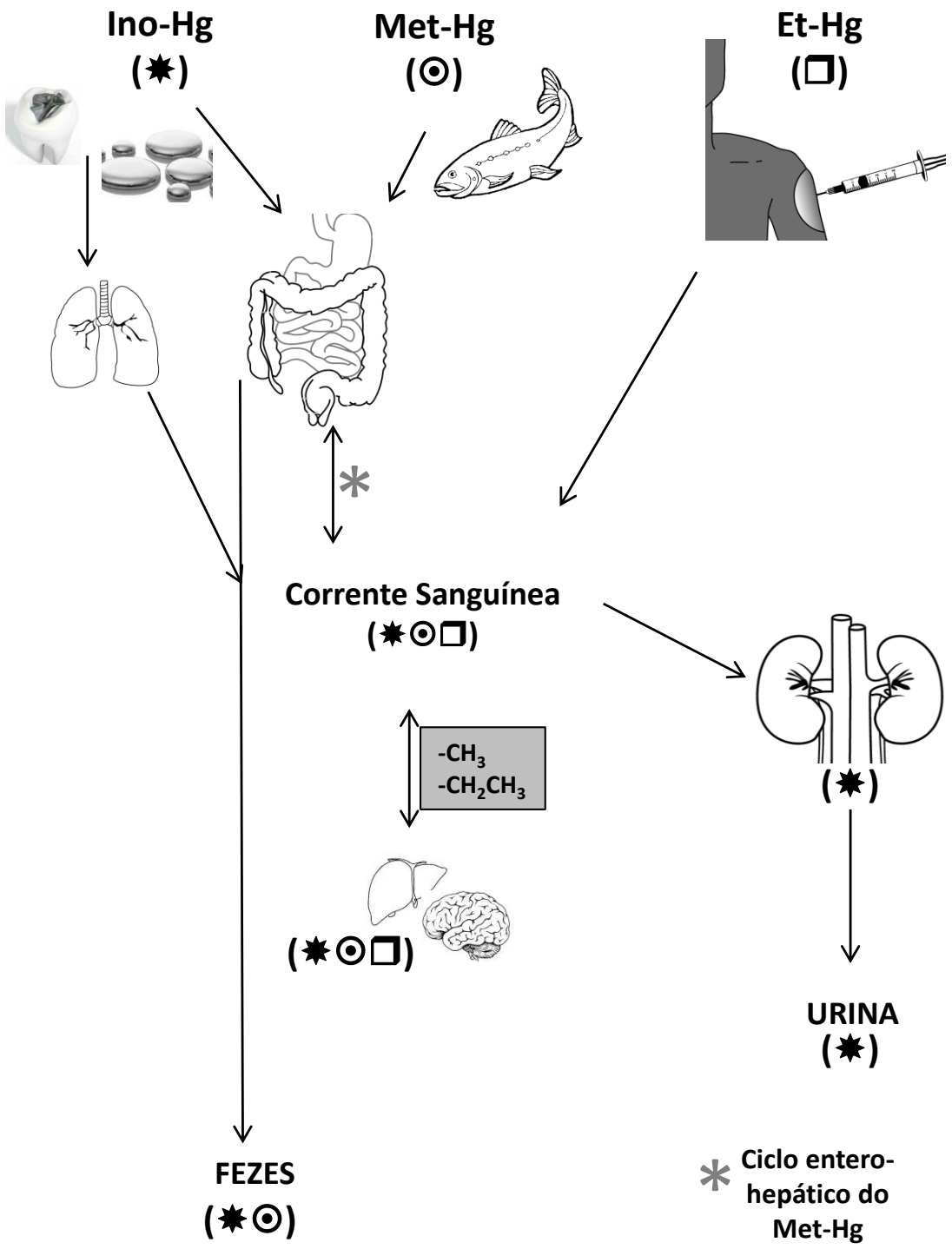

Figura 3. Esquema simplificado das fontes de exposição e metabolismo das diferentes espécies de Hg. Ino-Hg é absorvido nos pulmões após inalação, e também pelo trato gastrointestinal, após a ingestão oral, juntamente com o Met-Hg. Já o Et-Hg é absorvido por meio da via intramuscular, após injeção de vacinas. Após absorção, as formas orgânicas podem sofrer demetilação e deetilação na corrente sanguínea e nos tecidos, completando o ciclo entero-hepático.

1.4 Mecanismos de Toxicidade das Espécies de Mercúrio

Diversos mecanismos são sugeridos para explicar os efeitos tóxicos das espécies orgânicas e inorgânicas de Hg, porém acredita-se que nenhum deles atue de maneira isolada no organismo.

Um dos principais mecanismos de toxicidade do Hg é a morte celular, principalmente de neurônios. A degeneração neuronal induzida pela exposição ao Hg, dependendo da concentração, pode ocorrer tanto por necrose (CASTOLDI et al., 2000) quanto por apoptose (KUNIMOTO, 1994; CASTOLDI et al., 2000).

Estudos *in vitro* sugerem que a concentração de Met-Hg a qual as células foram expostas seria um fator crítico, determinando o mecanismo de morte neuronal. Assim, altas concentrações de Met-Hg (1,25 -2,5 mg/L) causariam intenso dano mitocondrial, lise da membrana plasmática, liberação do conteúdo intracelular e reação inflamatória local, resultando em necrose celular (SCHWARTZ et al., 1993). Por outro lado, exposições a baixas concentrações de Met-Hg (<251 ug/L) causariam, principalmente, morte de células neuronais por apoptose, sem causar processo inflamatório e danos no tecido circundante (CASTOLDI et al., 2000).

Outro mecanismo de toxicidade do Hg que explica o dano oxidativo induzido pelo Hg é a sua alta reatividade com os grupos sulfidrílicos (– SH) (SCHURZ; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000). A glutationa reduzida (GSH) é o mais abundante e essencial tiol celular livre, e também o principal antioxidante endógeno do organismo, responsável pela manutenção do estado redox normal (DRINGEN, 2000). A GSH serve como uma primeira linha de defesa celular contra os compostos de Hg. Tanto o Hg^{2+} quanto o Met-Hg conjugam-se aos grupamentos –SH da GSH e também a resíduos de cisteína de forma covalente, minimizando os efeitos deletérios deste metal (OU et al., 1999).

Esta ação protetora mediada pela GSH pode induzir a depleção deste antioxidante e, assim, o organismo fica mais susceptível ao dano oxidativo diante do desequilíbrio entre o aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) e diminuição da GSH (SHANKER et al., 2005).

Além de depletar a principal defesa antioxidante do organismo, a GSH, tanto o Hg inorgânico quanto o Met-Hg podem induzir a produção de ROS, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2•^-$) e radical hidroxila (OH•) (SARAFIAN, 1999; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007), causando um desequilíbrio entre as espécies antioxidantes e as oxidantes no organismo. Este desequilíbrio gera um

estado pró-oxidante, também conhecido como estresse oxidativo. As ROS, então, podem atacar e provocar modificações em estruturas como lipídeos (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990), DNA (MARNETT, 1999) e proteínas (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

O ataque das espécies reativas ao DNA frequentemente causa dano oxidativo ao mesmo, e isto foi demonstrado em ratos expostos ao Met-Hg (JIN et al., 2008). Sugere-se que a geração de ROS induzida por metais tóxicos estaria relacionada com mecanismos genotóxicos em células de mamíferos (HARTWIG, 1995). Além disso, outro efeito deletério do Hg foi a inibição do sistema de reparo do DNA em pessoas expostas ao vapor de Hg, contribuindo para os efeitos mutagênicos (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005).

Muitos dos mecanismos de toxicidade decorrem da ativação de sistemas que, ao serem expostos a condições de estresse, induzem a síntese de proteínas que atuam para proteger ou reparar macromoléculas que são os alvos diretos ou indiretos de xenobióticos, especialmente metais tais como Hg (ZALUPS, 2000; CHANG, 1995).

A exposição aos metais, de uma maneira geral, ativa no organismo um mecanismo de defesa denominado de “resposta ao estresse”, o qual inclui a produção alterada de proteínas na tentativa de manter a homeostase, proteger tecidos e órgãos contra os danos causados pelo metal e simultaneamente se defender das condições adversas (GINSBERG et. al., 2014, GROTTO et. al., 2009, MARTINEZ et. al., 2014, MORIMOTO & SANTORO, 1998).

Durante a exposição a um metal tóxico como o Hg, algumas proteínas exercem o papel de antioxidantes endógenos, atuando em processos de oxirredução em nosso organismo, eliminando, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS). Participam deste processo as enzimas catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (CHANG, 1995). Alternativamente, algumas enzimas, tais como metalotioneinas, podem se ligar diretamente aos metais, transportando-os até a sua eliminação, parcial ou completa, pela urina.

Entretanto, algumas enzimas que também participam de processos fisiológicos importantes em nosso organismo podem não atuar como agentes antioxidantes, mas podem ser alvos diretos de determinados metais tóxicos. Neste caso, os metais ao se ligarem aos sítios ativos, podem inativar estas enzimas via ligação a grupos cisteína da proteína. Mercúrio é um exemplo dentre os metais que

inativa uma série de enzimas por este mecanismo (SCHURZ; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000).

A atividade de íons metálicos a nível intracelular é largamente controlada por várias famílias de proteínas, tanto detoxificantes, protetoras ou simplesmente proteínas envolvidas no ciclo celular, proliferação e apoptose (HALL, 2002). Entretanto, muitos dos mecanismos de toxicidade de metais, ainda não são totalmente conhecidos (HALL, 2002). A compreensão destes mecanismos requer a identificação das proteínas envolvidas, sejam elas metaloproteínas ou não, e a caracterização de complexos protéicos com metais. Neste sentido, o estudo direcionado à expressão de proteínas é de extrema importância na elucidação destes e de novos mecanismos de toxicidade, especialmente das diferentes formas de Hg.

1.5 Abordagem Proteômica – Aspectos Gerais

A expressão de proteínas em uma célula ou tecido, conhecido como proteoma, não é uma característica fixa de um organismo, como no caso do genoma. O proteoma apresenta características muito dinâmicas que mudam a cada momento, de acordo com estímulos externos e internos, ou mesmo sob as condições na qual o indivíduo se encontra. A análise do proteoma é uma representação direta do número total de proteínas num sistema, em termos de presença e abundância num determinado tempo específico, sob um conjunto definido de condições. O sistema pode ser composto por tecidos, células, plasma / soro ou uma organela especial, cujo perfil de expressão protéica precisa ser estudado. No caso de estudos clínicos, a análise proteômica pode determinar o padrão de expressão de proteínas em presença ou ausência de determinados parâmetros ou estímulos. As proteínas que desempenham um papel importante no crescimento e/ou sobrevivência de uma célula pode ser identificada e a sua função pode ser determinada. Além disso, proteínas específicas, que são expressas pela célula somente em algumas condições, como estresse, também podem ser identificadas.

Um dos métodos mais utilizados para conduzir uma análise proteômica é a combinação de duas ferramentas analíticas: a eletroforese bidimensional (2DE) e a espectrometria de massas (MS).

A eletroforese bidimensional consiste basicamente de duas corridas eletroforéticas sequenciais, sendo a primeira uma focalização isoelétrica, a qual separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e a segunda é uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a qual separa as proteínas de acordo com seu peso molecular (MILLER, et al., 2006). Em seguida os "spots" separados contendo as proteínas são recortados do gel e digeridos enzimaticamente, geralmente com tripsina. Os peptídeos obtidos por meio da digestão são identificados utilizando técnicas de espectrometria de massas, tais como MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight*) e ESI-TQ (*ElectroSpray Ionization – Triple Quadrupole*) (WILKINS et al., 1996), com o uso de softwares apropriados e de bioinformática (KANITZ, et al., 1999; HERALD, et al., 2003; KLENØ, et al., 2004).

1.5.1 Extração e Quantificação das Proteínas

A obtenção dos extratos protéicos é um dos passos críticos devido à reprodutibilidade exigida em estudos proteômicos e envolve etapas como solubilização, desnaturação, redução das proteínas, e procedimentos para remover componentes não protéicos, como ácidos nucléicos. Amostras contendo proteínas insolúveis, tais como as proteínas de membrana, necessitam ainda da adição de reagentes alternativos para auxiliar na solubilização (SANTONI et al., 2000; MOLLOY et al., 1999).

A quantificação das proteínas é uma etapa importante, uma vez que quando se aplica quantidades similares das amostras, uma comparação entre os géis pode ser feita. O método utilizado para a estimativa da concentração protéica deve ser tal que os seus reagentes sejam compatíveis com as substâncias presentes na solução de amostra. Neste sentido, o método mais utilizado é o de Bradford, o qual baseia-se no princípio do deslocamento máximo de absorvância do corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, na presença de proteínas. Quando o reagente de Bradford não está ligado a proteínas, este apresenta uma coloração castanho-avermelhada e tem um máximo de absorção em 470nm. Quando ele está ligado a proteínas, por meio de interações não covalentes tais como as forças eletrostáticas e de Van der Waals, este forma um complexo de cor azul, que tem absorbância máxima em 595nm. A interação corante-proteína se dá principalmente através dos resíduos de Arg,

embora esta ligação também possa ocorrer em outros resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos, tais como His, Lys, Trp, Tyr e Phe (BRADFORD, 1976).

1.5.2 Eletroforese Bidimensional (2DE)

1.5.2.1 Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica (IEF)

Para a primeira dimensão, são utilizadas tiras contendo um gel com gradiente de pH imobilizado (IPG), as quais separam as proteínas com base no seu ponto isoelétrico (pI). As proteínas apresentam propriedades anfotéricas, ou seja, elas possuem uma carga líquida, dependendo do pH da solução. O pH específico no qual a carga líquida da proteína é zero é conhecido como ponto isoelétrico. Proteínas possuem carga líquida negativa em valores de pH acima do seu pI e positiva em valores de pH abaixo do seu pI. Na presença de um gradiente de pH e sob a influência de um campo elétrico, as proteínas tendem a mover-se no gel em direção ao seu pI. O processo é realizado sob condições de tensão constante de uma forma em degraus, aplicando inicialmente uma tensão baixa, para evitar a agregação da proteína e precipitação, seguido de tensão máxima em que as proteínas se separam adequadamente uma das outras (Figura 4).

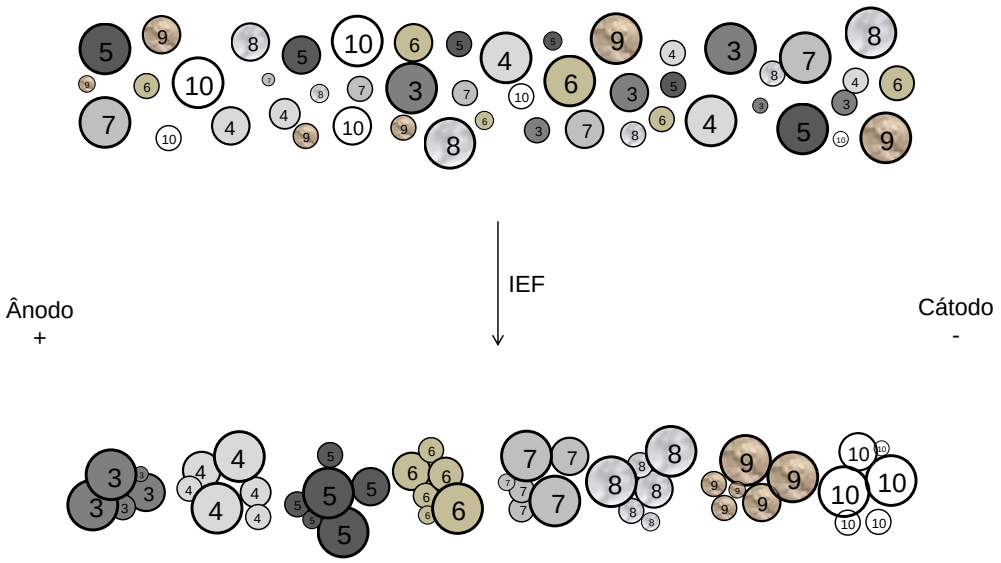

Figura 4. Esquema de uma focalização isoelétrica. Durante a IEF, as proteínas carregadas positivamente tendem a migrar em direção ao cátodo, e aquelas carregadas negativamente tendem a migrar em direção ao ânodo para atingir seu pI. Mesmo que uma proteína se mova de seu pI, esta ganha uma carga imediatamente e migra de volta ao seu pI.

1.5.2.2 Segunda Dimensão - SDS-PAGE

A segunda dimensão da 2DE é um SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando dodecil sulfato de sódio). Nesta etapa, as proteínas são separadas de acordo com o peso molecular, quando um campo elétrico é aplicado.

As tiras contendo as amostras que foram previamente focalizadas precisam passar por uma etapa de equilíbrio antes de serem submetidas à um SDS-PAGE, a qual é dividida em dois passos. Em um primeiro momento, as tiras de IPG são equilibradas com uma solução contendo ditiotreitol (DTT), a qual mantém as proteínas num estado desnaturado e, posteriormente, em uma solução contendo 2-iodoacetamida (IAA), a qual impede a reoxidação por alquilação dos grupos tiol nas proteínas (figura 5). Uma quantidade adequada de solução de equilíbrio também tem a finalidade de saturar as tiras IPG com SDS que é necessário para realizar a separação na segunda dimensão da eletroforese bidimensional (GRANVOGL, et al., 2007).

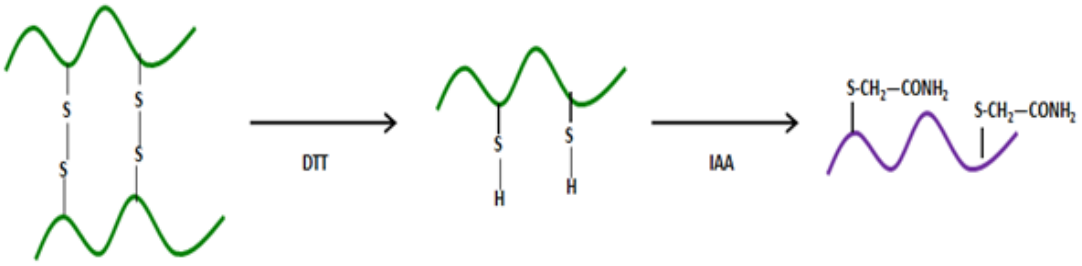

Figura 5. Representação esquemática da etapa de equilíbrio das *strips*. O DTT, adicionado ao tampão de equilíbrio, rompe as ligações dissulfureto presentes nas proteínas, desnaturando as mesmas e, posteriormente, IAA é adicionado ao tampão de equilíbrio para evitar a reoxidação por alquilação dos grupos tiol da proteína.

As proteínas desnaturadas após o tratamento de equilíbrio formam complexos com SDS, o qual fornece uma carga líquida negativa constante por unidade de massa nas amostras, assegurando que a eletroforese realizada na segunda dimensão seja baseada apenas no peso molecular da proteína. O complexo proteína-SDS tende a mover-se em direção ao ânodo, na presença de um sistema tampão, cujo sistema de Tris-glicina descrito por Laemmli em 1970 é o mais rotineiramente utilizado (figura 6).

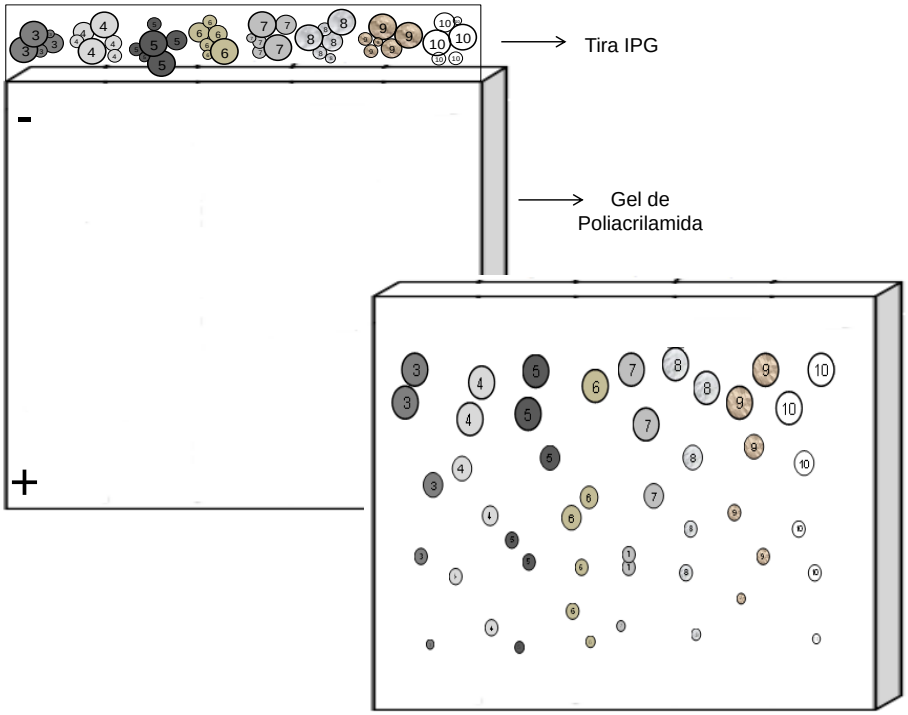

Figura 6. Esquema de um SDS-PAGE: As proteínas separadas nas tiras de IPG, com base no ponto isoelétrico são revestidas com SDS para dar uma carga negativa uniforme. Na presença de um campo elétrico, estas proteínas, então se separam de acordo com o peso molecular.

1.5.3. Coloração, Aquisição e Análise de Imagens dos Géis

Após o SDS-PAGE, os perfis de separação das amostras de proteína são visualizados por coloração dos géis, os quais são obtidos por meio de corantes específicos que se ligam às proteínas. *Coomassie Blue*, um corante geralmente usado, interage com as proteínas incorporadas no gel por forças não covalentes como eletrostáticas e interações de Van der Walls. As proteínas, em seguida, aparecem como pontos azuis sobre um fundo claro *(spots*). Os géis são, em seguida, submetidos a um passo de descoloração antes de serem digitalizados utilizando um instrumento de documentação de gel. Essas imagens dos géis corados pode, então, ser utilizadas para efeitos de comparação do perfil de expressão de proteínas em diferentes amostras com a ajuda de software disponível comercialmente.

1.5.4 Digestão *in situ* com Tripsina em Géis de Poliacrilamida

Digestão enzimática é realizada com o objetivo de clivar as proteínas de interesse presentes na matriz de poliacrilamida, antes da análise por espectrometria de massas. Inicialmente, a identificação das proteínas era realizada por

transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose ou PVDF para a digestão tripsínica ou para sequenciamento N-terminal. Subsequentemente, o avanço tecnológico introduziu a digestão tripsínica *in situ* em géis de acrilamida para a identificação de proteínas de interesse. Identificação por espectrometria de massas da proteína alvo depende da eficácia do processo de digestão em gel que gera uma mistura de peptídeos por meio de digestão proteolítica.

A enzima mais utilizada para esta finalidade é a tripsina, a qual hidrolisa a proteína no lado C-terminal de lisina e arginina, exceto quando estes são seguidos por prolina. Esta enzima possui uma faixa de pH ótima, entre 7 e 9 (BALDWIN, 2004).

1.5.5 Dessalinização dos Peptídeos Tripsínicos em "Micro-Tips C18"

Os peptídeos extraídos por meio de digestão enzimática são dessalinificados em *micro-tips* contendo uma resina de fase reversa C18 antes da análise por MS. Esses *micro-tips* são utilizados a fim de se concentrar e purificar os peptídeos, bem como remover sais e outros interferentes da análise. A amostra é carregada em micro-tip individual, cuja resina foi previamente ativada com metanol, e dessalinificada com 3 lavagens consecutivas com uma solução contendo ácido fórmico 0,2%, sendo eluída da resina com 30µL de uma solução de metanol a 60% e ácido fórmico a 5%.

1.5.6. Escolha da Matriz para Análise por Espectrometria de Massas

A identificação de proteínas através da espectrometria de massas é uma etapa fundamental em análise proteômica e depende dentre vários fatores, da escolha da matriz a qual a amostra será acoplada, bem como a preparação da mistura amostra/matriz adicionada na placa, a qual influencia diretamente na qualidade dos espectros dos peptídeos (SUIZDAK, 1996).

Matrizes são compostos orgânicos de baixo peso molecular com baixa pressão de vapor e volátil. A maioria das matrizes é de natureza ácida, de modo que possam facilmente ionizar o alvo para análise. Além disso, a presença da matriz protege o analito de degradação, transferindo parte da energia vinda do laser às macromoléculas, resultando em uma leve ionização, na qual juntamente com o analito, convertem-se para a fase gasosa, permitindo, assim, a identificação da proteína, por meio de seus peptídeos (SUIZDAK, 1996). A tabela I mostra alguns

exemplos de matrizes usadas na espectrometria de massas, bem como suas aplicações.

Tabela I. **Exemplos de algumas matrizes disponíveis no mercado e suas aplicações**.

Matriz	Aplicações
Ácido sinapínico	Peptídeos e proteínas > 10kDa
Ácido α-ciano-4-hidróxicinâmico	Peptídeos e proteínas < 10kDa
Ácido 3-hidróxi-picolínico	Oligonucleotídeos maiores
Ácido 2 5-di-hidróxibenzóico	Peptídeos, carboidratos básicos, glicolipídeos, pequenas moléculas
Ácido 2,4,6 tri-hidróxi acetofenona	Oligonucleotídeos menores, carboidratos ácidos e glicopeptídeos
Ácido1-(4-hidróxi-fenil-azo)-benzóico	Proteínas e polímeros
Ácido 2-aminobenzóico	Oligonucleotídeos

1.5.7. Espectrometria de Massas

Espectrometria de massas é uma técnica analítica extremamente valiosa, na qual moléculas em uma amostra são ionizadas em fase gasosa, e são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa-carga, m/z (TANAKA et al., 1998; WILSON & WALKER, 2010). Os espectrômetros de massa são constituídos basicamente por 5 itens: a) um sistema de alto vácuo, utilizando-se uma série de bombas (ex. bombas turbomoleculares, etc.); b) um sistema de introdução de amostras (amostras líquidas podem entrar por capilares ou amostras sólidas podem ser colocadas em placas específicas); c) uma fonte de ionização, na qual as amostras são convertidas em íons e transferidas para a fase gasosa; d) um analisador de massas, que pode ser de vários tipos, tais como TOF (time of light), quadrupolo, quadrupolo-ion trap, etc.; e e) um detector, cuja função é fazer com que as informações do analisador de massa sejam convertidas em sinais elétricos, que são, então, multiplicados pelos tubos foto-multiplicadores e lidos pelo sistema de dados WILSON & WALKER, 2010).

Dentre os modelos de espectrômetros mais utilizados para o estudo de proteínas e peptídeos, destacam-se: MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight) e ESI-TQ (ElectroSpray Ionization – Triple Quadrupole) (WILKINS et al., 1996).

A técnica de MALDI-TOF consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H^+) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Dessorção é um fenômeno pelo qual uma substância é liberada através de uma superfície. O processo é o oposto de sorção (isto é, adsorção e absorção ocorrendo simultaneamente). A absorção é a incorporação de uma substância em um estado, para outro estado diferente (por exemplo, líquidos a serem absorvidos por um sólido, ou gases a serem absorvidos por um líquido). Adsorção é a adesão física ou ligação de íons e moléculas na superfície de outra molécula.

Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o analisador do tipo TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo, até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas *m/z*, chegando ao detector em diferentes tempos, formando os espectros de massa (figura 7).

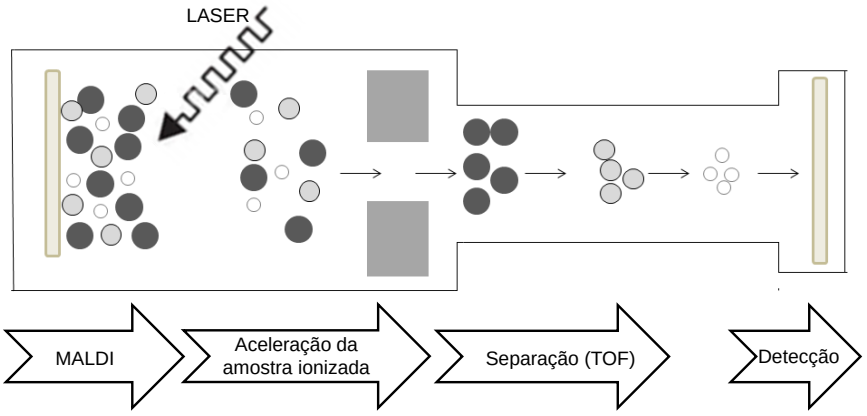

Figura 7. Esquema da técnica de MALDI-TOF. A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da matriz junto com a amostra, a placa metálica é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas dessorvidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo elétrico e entram em um tubo metálico submetido a vácuo (tubo de vôo, por onde as moléculas passam) até atingirem o detector. Os íons com tamanho menor (*m/z*) viajam mais rapidamente pelo tubo de vôo do que os de tamanho maior, formando os espectros de massa de acordo com sua razão *m/z* e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito). Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo todas as impressões digitais das moléculas.

1.5.8. Western Blotting (WB)

Western blotting é uma técnica largamente utilizada para imunodetecção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente (KURIEN & SCOFIELD, 2006). Esta técnica permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra (KURIEN & SCOLFIELD, 2003).

O processo de transferência pode ocorrer por difusão simples; transferência a vácuo; eletroblotting, sendo esta última a mais utilizada. O eletroblotting pode ser realizado por imersão completa de um sanduíche gel-membrana em uma solução tampão (transferência úmida) ou colocando o sanduíche gel-membrana entre papel filtro absorvente em um tampão de transferência (transferência semi-seca) (PAGANO, 1999; KURIEN & SCOFIELD, 2006).

O processo de transferência mais comumente utilizado consiste no contato direto entre o gel proveniente da eletroforese e uma membrana, geralmente de nitrocelulose ou PVDF, sob aplicação de um campo elétrico, num ambiente imerso em tampão básico. A capilaridade do gel permite que o tampão entre nos poros e remova as proteínas para a membrana, mantendo-as separadas. As proteínas se ligam quase irreversivelmente com a membrana através de interações hidrofóbicas.

Após a transferência, a membrana é incubada com uma “solução bloqueadora”, cuja finalidade é de cobrir as regiões da membrana que não possuem as proteínas submetidas à eletroforese. O bloqueio inibe a ligação inespecífica entre os anticorpos a serem aplicados e a membrana. Esta solução pode ser composta por leite, albumina bovina (BSA), Triton X-100, Nonidet P-40 e Tween 20, os quais são eficazes na remoção de ligações protéicas. Leite seco desnatado e BSA são rotineiramente utilizados em procedimentos de imunodetecção de proteínas para evitar ligações inespecíficas (KURIEN & SCOFIELD, 2003; KURIEN & SCOFIELD, 2006).

Após o bloqueio, a membrana é tratada com anticorpo reativo para a proteína que se deseja analisar (anticorpo primário), podendo ser monoclonal ou policlonal, dissolvido em uma solução de PBS (PAGANO, 1999). Na etapa seguinte, a membrana é submetida a lavagens consecutivas para remoção dos anticorpos que não se ligaram aos seus antígenos (proteínas) correspondentes. Posteriormente, a membrana é incubada com o anticorpo secundário, o qual é específico para a espécie animal na qual foi desenvolvido o anticorpo primário. O anticorpo

secundário, comumente, está complexado a uma enzima reveladora, a qual, na medida em que for incubada com seu substrato específico, emitirá um sinal, por exemplo, fotossensível (KURIEN & SCOFIELD, 2003). A quantificação deste sinal é a medida indireta de quanto de proteína-alvo (antígeno) está presente na amostra (figura 8)

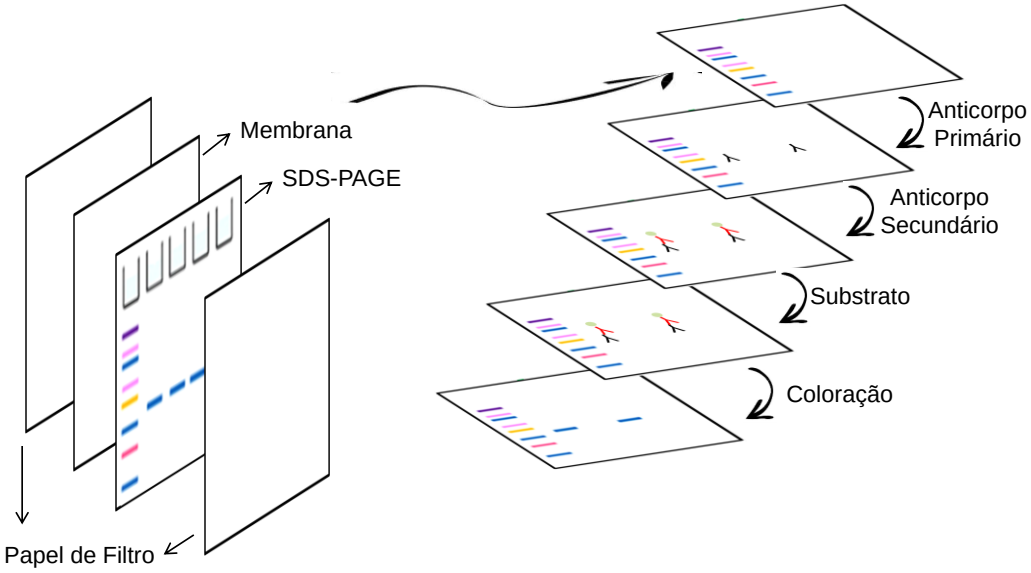

Figura 8. Esquema da técnica de Western Blotting evidenciando a adição de anticorpos.

Existem quatro tipos principais de detecção do sinal no Western Blotting :

a) Colorimétrica – Neste método a detecção depende da incubação da membrana com um substrato que reaja com a enzima reveladora, como a peroxidase, que está conjugada ao anticorpo secundário. Esta reação converte o corante solúvel em insolúvel, colorindo a membrana e gerando as bandas.

b) Quimioluminescente – Os métodos de detecção quimioluminescentes são caracterizados pela incubação da membrana com substrato que emita luz após a reação com a enzima reveladora. A luz emitida é capturada por um filme fotográfico ou por câmeras digitais e a análise é feita por densitometria. A quimioluminescência é um dos métodos mais sensíveis de detecção no WB;

c) Radioativa – Diferentemente das técnicas de detecção anteriores, este método não necessita de substratos enzimáticos uma vez que o anticorpo secundário está acoplado a uma sonda radioativa, o que permite a associação de filmes médicos de raios-X para revelação diretamente com o WB.

d) Fluorescente – Assim como a detecção radioativa, esta técnica não necessita de substratos enzimáticos, pois o anticorpo secundário está acoplado a uma sonda fluorescente. Quando excitada no comprimento de onda apropriado, esta sonda emite a fluorescência que é captada por um fotosensor, como uma câmera CCD, permitindo a análise das bandas por densitometria. A detecção fluorescente também é considerada um dos métodos mais sensíveis de detecção no WB.

1.6 Proteômica: uma Nova Ferramenta para Elucidar Mecanismos de Toxicidade de Metais

A contaminação de ecossistemas e exposição a metais tóxicos é de grande preocupação em todo mundo. Alguns destes metais são encontrados naturalmente no ambiente, devido a sua liberação em quantidades substanciais como consequência de atividades geológicas e/ou antropogênicos. Embora alguns desses metais sejam micronutrientes essenciais em baixas concentrações, eles podem causar vários efeitos deletérios quando em excesso (LUQUE-GARCIA et al., 2011; TITZ et al., 2014).

A maioria dos estudos realizados até agora para avaliar a toxicidade de metais se concentraram no desenvolvimento de técnicas analíticas para a determinação de metais em diferentes amostras, principalmente usando técnicas de análise elementar (espectroscopia de absorção e emissão atômica e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)), sendo este último a técnica analítica mais amplamente utilizada para análise multielementar e especiação química. No entanto, pouco tem sido feito para entender os mecanismos moleculares relacionados à toxicidade dos metais e as maneiras na quais estes interagem com os organismos (TITZ et al., 2014).

Nos últimos anos, o aprimoramento de técnicas para separação e identificação de proteínas e a expansão do conhecimento na área genômica têm levado a um aumento na aplicação da análise proteômica para responder às questões biológicas.

Proteômica, ou a análise sistemática de proteínas expressas por um genoma, é uma ferramenta poderosa não somente para descrever proteomas completos em uma organela, célula, órgão ou tecido, mas também comparar proteomas afetados por diferentes condições fisiológicas (aqueles resultantes da exposição a metais tóxicos, por exemplo). Estudos visando à identificação de alterações na expressão

de proteínas individuais ou grupo de proteínas associados com a exposição a metais tóxicos poderiam ajudar na compreensão sobre os mecanismos de toxicidade destes metais (TITZ et al., 2014, LUQUE-GARCIA et al., 2011).

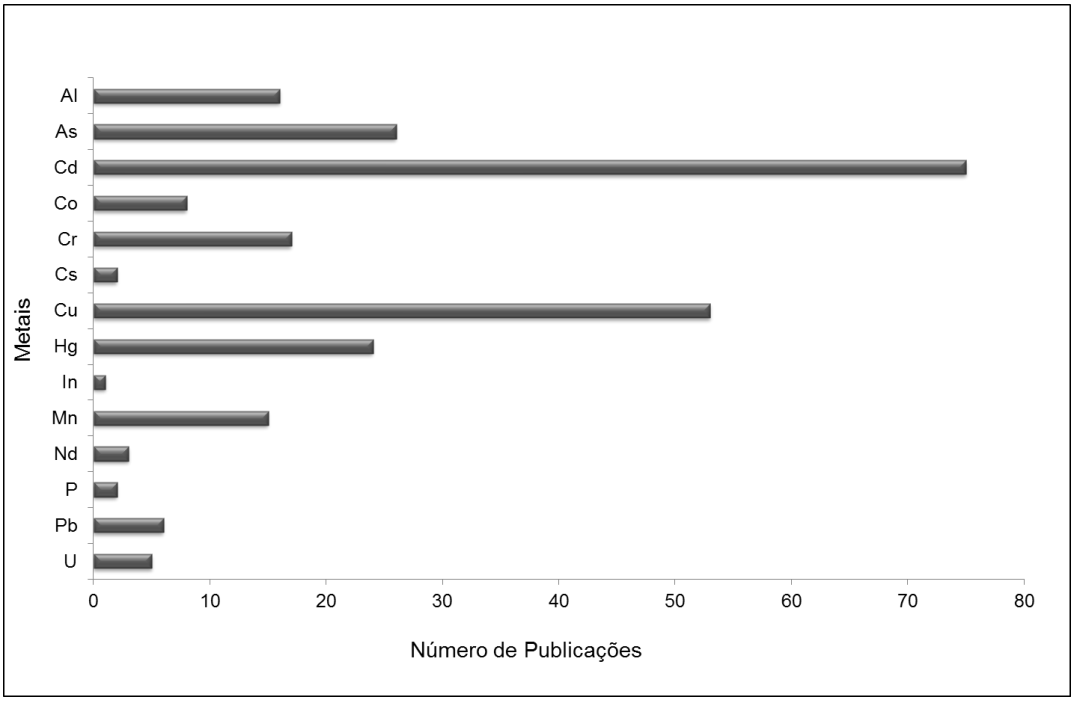

Figura 9. Número de publicações de estudos proteômicos baseados em metais até 2015.

Dentre os metais tóxicos, uma grande atenção tem sido dada ao cádmio, devido à sua alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. A figura 9 mostra que o número de publicações na área proteômica, até 2015, relacionadas ao cádmio é muito maior do que com os outros metais, incluindo mercúrio, destacando a necessidade de ampliação nos estudos sobre mercúrio. Esta estimativa foi extendida até 2015 a partir do trabalho de Luque-Garcia e cols. (2011) mostrando dados até 2011. Para isso, foi utilizando o Web of Science como base de dados e como palavras chave específicas ("*proteomics" and "the name of each metal"*).

A maioria das análises proteômicas tem estudado o efeito dos metais tóxicos em diferentes organismos e demonstraram que proteínas relacionadas com mecanismos de defesa antioxidante são diferencialmente expressas em resposta a toxicidade do metal. Embora alguns trabalhos tentaramresponder a estas questões, ainda são necessários mais estudos envolvendo estratégias proteômicas, para

esclarecer, não apenas o modo de ação dos metais, mas também identificar biomarcadores específicos (LUQUE-GARCIA, 2011; WANG et al., 2015).

2. HIPÓTESE

A exposição às diferentes formas de Hg promove alterações na expressão do proteoma em diversos tecidos. Sendo assim, a identificação destas proteínas diferencialmente expressas corroborará de forma fundamental na elucidação de novos mecanismos de toxicidade, além de ratificar os mecanismos já propostos. Ademais, a identificação de proteínas anteriormente não relacionadas ao metal apontará caminhos na elucidação destes mecanismos de toxicidade, bem como delineará outros novos. Essas proteínas também poderão ser de grande relevância na identificação de novos candidatos a biomarcadores de exposição ao Hg.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil de expressão de proteínas em várias amostras de tecidos de ratos (fígado, cérebro e rim), quando estes foram tratados com diferentes espécies de mercúrio (inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio) e em ratos controle, utilizando a plataforma clássica de análise proteômica (2DE e MS).

3.2 Objetivos Específicos

Obter mapas bidimensionais (2DE) de extratos protéicos de diferentes amostras de tecido de ratos (fígado, cérebro e rim), tratados com diferentes espécies de mercúrio (Ino-Hg, Met-Hg e Et-Hg);

Comparar os níveis de expressão destas amostras ao perfil de expressão de amostras do grupo controle e selecioná-las para identificação;

Identificar as proteínas diferencialmente expressas obtidas, utilizando espectrometria de massas;

Correlacionar algumas proteínas identificadas aos mecanismos de ação do Hg.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Para a extração e quantificação das proteínas foram utilizados centrífuga refrigerada Solab modelo SL-703, homogeneizador mecânico Fisatom modelo 713D, e leitor de Elisa Molecular Devices.

Para a eletroforese bidimensional foram utilizados focalizador isoelétrico IPGPhor III e sistema de eletroforese vertical modelo MiniVE (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Para a aquisição das imagens foi utilizado Scanner modelo ImageScanner III (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Para a identificação das proteínas foi utilizado espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (Axima Performance - Kratos-Shimadzu, Manchester, UK).

Para ensaios por western blotting foram utilizados o sistema Semi Dry, modelo Trans Blot SD Cell (BioRad Laboratories), E filme radiográfico AGFA.

4.2 Reagentes e Soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩcm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho.

Strips IPG de 7cm, 3-11 NL, IPG *buffer* 3-11NL, membranas de PVDF e *cover fluid* foram obtidos da GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Cloreto de sódio ≥ 99,8%, glicina ≥ 99%, trizma-base ≥99,9%, CHAPS (*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*) ≥ 98%, coquetel de inibidores de proteases, acrilamida ≥ 99%; N,N-metileno bis-acrilamida albumina sérica bovina ≥ 98%, acetona, ácido tricloroacético 99%, ditiotreitol ≥ 99%, iodoacetamida, uréia, tiouréia ≥ 99%, dodecil sulfato de sódio ≥ 99%, sulfato de amônio ≥ 99%; persulfato de amônio ≥ 98%; TEMED ≥ 99%; hidróxido de sódio 99,99%, Triton® X-100, azida sódica ≥ 99,5%, agarose, azul de bromofenol, glicerol≥ 99%, metanol grau HPLC, etanol 95%, butanol ≥ 99%; ácido acético ≥99,8%, corante coomassie blue G-250, ácido o-fosfórico 85%; bicarbonato de amônio, acetonitrila grau HPLC, ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico e ácido fórmico ≥ 98% foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reativo de Bradford (Quick Start™ Dye Reagent 1x) foi obtido pela BioRad e tripsina foi obtida da Promega (Madison – EUA).

Anticorpos primários anti-GST (26H1) mouse mAb código 2624 e anti-GAPDH (14C10) rabbit mAb código 2110 foram obtidos pela Cell Signaling Technology.

Anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-mouse IgG código 0741806 e anti-rabbit IgG código 0741516 foram obtidos pela KPL.

Cloretos de metil, etilmercúrio (CH_3HgCl, CH_3CH_2HgCl) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Solução de cloreto de mercúrio II, 10 mg/L em HNO3 0,5% v/v foi obtido pela PerkinElmer.

Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Frascos de plástico e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 10 % v/v HNO3 por 24 h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

4.3 Escolha da Dose e Tratamento dos Animais

Normalmente, os estudos experimentais com animais utilizam doses de Hg muito elevadas, muitíssimas vezes superiores às concentrações em que o homem está exposto, criando situações de estudo irreais. Dessa forma, neste estudo utilizou-se dose de Met-Hg baseada no estudo de GROTTO et al., 2011, que mostram efeitos toxicos a baixas doses de exposição. Assim, a dose escolhida foi de 140 µg/kg/dia de CH_3HgCl.

Com relação à adminstração de Et-Hg, foi levada em consideração a exposição humana decorrentes da presença do timerosal em vacinas. Crianças que receberam a série completa de vacinas, contendo timerosal, potencialmente podem ter acumulado acima de 187,50 ug de etilmercúrio durante os primeiros seis meses de vida (CLEMENTS et al., 2000 & AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1999) e, portanto, a dose escolhida foi de 800 µg/kg/dia de CH_3CH_2HgCl.

E, finalmente, como relação à adminstração de Ino-Hg, foi levada em consideração a exposição por amálgamas dentários e por ingestão oral e a dose escolhida foi de 100 µg/kg/dia de $HgCl_2$ (ATSDR, 2006).

Sendo assim, foram utilizados ratos machos *Wistar* (190 a 210 gramas), mantidos em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas com temperatura controlada (22-25°C) e alimentados com ração habitual (Purina-Labina) e água filtrada. Soluções de Met-Hg e Ino-Hg foram administradas por gavagem, diariamente, e os animais foram sacrificados após 60 dias, enquanto que o Et-Hg foi administrado via

intramuscular, em dose única, e sacrificados após 4 horas. Quanto aos grupos controles, nestes foram administrados soro fisiológico, tanto por gavagem, quanto via intramuscular.

Os animais foram divididos em 5 grupos, contendo 3 animais por grupo:

Grupo 1 – Controle 1: Administração de soro fisiológico e ração por 60 dias;

Grupo 2 - Administração sub-crônica de 100 µg/kg/dia Ino-Hg por 60 dias;

Grupo 3 – Administração sub-crônica de 140 µg/kg/dia de Met-Hg por 60 dias;

Grupo 4 – Controle 2: Administração de soro fisiológico e ração e eutanásia após 4 horas;

Grupo 5 – Administração aguda de 800 µg/kg de Et-Hg e eutanásia após 4 horas;

Ao final do tratamento, os ratos foram eutanaziados com sobredose dos anestésicos ketamina e xilazina intraperitonial, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, (Número de aprovação do processo: 2012.1.1268.53.1, Anexo I). Retirou-se fígado, cérebro e rins. Todas as amostras foram armazenadas a –80 ^{o}C para posterior extração de proteínas.

4.4 Extração e Quantificação das Proteínas

Todas as amostras de tecidos foram mecanicamente homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador, em tampão de homogeneização contendo Tris-HCl 30 mM (pH 7,0), NaCl 50 mM, CHAPS 4 % e coquetel de inibidores de proteases. Os lisados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos para eliminação de fragmentos celulares. Para obtenção das proteínas solúveis, o sobrenadante foi precipitado com TCA 20 % em banho de gelo por 30 minutos e lavados 3 vezes com acetona gelada, intercalados por centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos. Após a última lavagem, foi retirado o excesso de acetona e os tubos foram secos a temperatura ambiente para que as proteínas fiquem aderidas às suas paredes. Foram adicionados 400 µL de tampão de eletroforese 2D contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M e CHAPS 4 %, seguidos de cinco ciclos de 5 minutos em banho de ultrassom contendo gelo para eficiente solubilização das proteínas.

A quantificação de proteínas foi realizada em microplacas pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). Para que seja possível quantificar

uma amostra desconhecida, é necessário estabelecer uma relação linear de absorbância *versus* massa da proteína, o que normalmente é feito através da confecção de uma curva padrão, cotendo quantidades conhecidas de uma determinada proteína, como a albumina sérica bovina (BSA) (BRADFORD, 1976).

Alíquotas dos extratos protéicos foram diluídas 1:200 em H_2O e um volume de 20 µL foi aplicado em microplacas. Para obtenção da curva padrão, utilizou-se a proteína BSA, nas quantidades de 0,5 a 2,0 µg em um volume final de 20 µL, diluída em H_2O. Foi adicionado, a cada poço, 200 µL da solução de reação de Bradford (Kit Quick Start^{TM} Bradford Dye Reagent, 1X, Bio-Rad). Após incubação durante 15 minutos a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi determinada em um espectrofotômetro com leitor de ELISA (Molecular Devices), com leitura em 595 nm. Todos os ensaios de quantificação foram realizados em triplicata, sendo feita uma nova curva padrão a cada ensaio.

4.5 Eletroforese Bidimensional (2DE)

4.5.1 Focalização Isoelétrica

Foram utilizadas fitas IPG de 7 cm com faixa de pH 3-11 não linear (GE Healthcare), sendo a focalização isoelétrica realizada em um sistema de eletroforese horizontal IPGPhor III (GE Healthcare). A aplicação das amostras foi feita durante a etapa de rehidratação dos géis IPG utilizados na focalização isoelétrica (RABILLOUD et al., 1994). Durante esse processo, as fitas IPG foram incubadas durante 12 horas a 20 ºC com a solução de rehidratação (7,7 M uréia, 2,2 M de tiouréia e 4,4 % CHAPS e 65 mM de DTT, IPG *buffer* 0,5% e traços de bromofenol), contendo a amostra a ser focalizada, sendo utilizados 125 µL para cada fita de 7 cm. O processo de separação eletroforética foi realizado a 20 ºC, utilizando 50 µA/fita IPG, compreendendo uma série de etapas sequenciais: 500 V por 1h (*step and hold*), 1000 V por 1 hora (*gradient*) e 8000 V por 2 horas e 30 minutos (*gradient*) e 8000 V até atingir 40000 Vh (*step and hold*).

4.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a focalização isoelétrica, as proteínas foram submetidas à redução e alquilação. As fitas IPG foram incubadas durante 15 minutos na solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, uréia 6 M, SDS 2 % (m/v), glicerol 30 % (v/v), traços de azul de bromofenol, contendo o agente redutor (DTT 65 mM). Em seguida, o excesso de solução foi retirado e as fitas IPG foram incubadas durante 15 minutos com a solução de equilíbrio contendo o agente alquilante (iodoacetamida 0,1 M).

O SDS-PAGE foi realizado em sistema de eletroforese vertical (Mini Hoefer™ GE Healthcare), utilizando géis 10 cm × 10 cm × 1,0 mm, homogêneos contendo 12,5 % de acrilamida (LAEMMLI, 1970). Uma vez equilibradas, as fitas IPG foram posicionadas sobre os géis da segunda dimensão, nos quais, padrão contendo marcadores de peso molecular (1 µg), previamente diluído em tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 20 % e traços de azul de bromofenol) e fervido por 5 minutos foi aplicado em pedaço de papel de filtro e posicionado na superfície do gel, próximo à parte ácida da fita IPG. O sistema foi fixado com uma solução de agarose 0,5 % (m/v) e as proteínas submetidas à separação eletroforética com as seguintes condições de corrida: 10 mA/gel, 300 V e 10 W, até a entrada de todo marcador (azul de bromofenol) e depois aumentada para 15 mA/gel até o final da corrida. Os géis foram fixados em etanol, ácido acético e água (40:10:50) e corados com coomassie blue.

4.6 Obtenção e Análise de Imagens dos Géis

Após a coloração dos géis, as imagens foram digitalizadas utilizando o sistema de aquisição de imagem LabScan (GE Healthcare), que capta a imagem por transmitância, fornecendo maior resolução e precisão e evitando distorção da imagem. O processamento e a análise comparativa dos mapas bidimensionais foram realizados com a utilização do software ImageMaster versão Platinum 7.0 (GE Healthcare).

Uma vez digitalizados, os mapas-2D foram processados, o que envolve a detecção dos “spots”, subtração do “background”, calibração pelo padrão de peso molecular e calibração pela faixa de ponto isoelétrico, além de uma avaliação da reprodutibilidade dos géis bidimensionais. O processamento destes géis permite obter, para cada “spot” ou proteína, um valor de massa molecular aparente, de ponto

isoelétrico, de volume e de volume normalizado (calculado com base na soma dos volumes de todos os “spots” presentes no gel). Após o processamento, foi realizado o pareamento entre diferentes géis, para identificação dos “*spots*” coincidentes entre eles e, consequentemente, daqueles exclusivos de uma ou outra amostra. Essa análise comparativa foi realizada entre os géis contendo amostras controles e tratadas simultaneamente.

A diferença de expressão foi obtida através da razão de volume normalizado para cada grupo de *spots* (grupo de *spots* são aqueles presentes em todos os géis, na mesma localização). Esse valor é calculado pelo software com base no gel conhecido como referência (controle) e considera uma faixa de valores que engloba uma tendência central de valores (o valor médio da % Vol dos grupos de *spots* dentro de uma classe) e a dispersão destes valores. Foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que tiveram alteração média de %Vol ≥ 2 vezes.

4.7 Proteólise Limitada: Digestão Enzimática por Tripsina

Os *spots* considerados diferencialmente expressos foram selecionados e recortados para identificação. Para isso, a digestão *in situ* das proteínas será realizada conforme descrito por Neuhoff e cols. (1988). Os *spots* recortados foram lavados 4x com solução de NH_4HCO_3 100 mM em acetonitrila (ACN) 50 % para a remoção de SDS e corante, sendo em seguida, desidratados com ACN 100 %. Os *spots* completamente secos em SpeedVac (Savant) foram rehidratados com 10 µL de uma solução contendo 0,5 µg de tripsina (Promega, Madison – EUA), em solução NH_4HCO_3 50 mM, pH 8,0. Após rehidratação dos *spots* por cerca de 30 minutos, foram adicionados 50 µL de NH_4HCO_3 50 mM, volume suficiente para cobrir o gel. A reação foi mantida a 37 ºC por 24 horas e, após esse período, interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico 98 % e mantida a temperatura ambiente para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20 ºC) até a etapa de dessalinização dos peptídeos para análise por espectrometria de massas.

4.8 Dessalinização dos Peptídeos Tripsínicos em “Micro-Tips C18”

Para a dessalinização dos peptídeos foram utilizadas “Micro-Tips C18”, ponteiras de micropipeta contendo resina hidrofóbica C_{18} (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA). Esse processo possibilita a retirada do sal e outros componentes da amostra que possam interferir na análise por espectrometria de massas. A resina

foi ativada com 100 μL de metanol 100% e equilibrada 3 vezes com 100 μL de ácido fórmico 0,2 % (v/v). A solução contendo os peptídeos resultantes da digestão *in situ* foi então carregada, sendo realizadas, em seguida, 3 lavagens com 100 μL de ácido fórmico 0,2% (v/v). Após a lavagem, os peptídeos foram eluídos da resina com 30 μL de solução ácido fórmico 5% (v/v) em metanol 60% (v/v) e completamente secos em SpeedVac (Savant).

4.9 Espectrometria de Massas

Os peptídeos tripsínicos foram diluídos 1:1 com uma solução de matriz orgânica (ácido α-cianohidróxicinâmico 1%, ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 50%), aplicados, em duplicata, e a placa foi deixada a temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. Depois, foi analisada em um espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (Axima Performance - Kratos-Shimadzu, Manchester, UK), localizado no laboratório do Prof. Dr. José César Rosa, do Centro de Química de Proteínas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os espectros dos peptídeos (*Peptide Mass Fingerprinting*) foram obtidos e as sequências de peptídeos tripsínicos foram deduzidas a partir de íons fragmentos dos tipos b e y, produzidos por dissociação por colisão induzida de alta energia. O servidor MASCOT Matrix Science foi usado para pesquisar no banco de dados de proteínas Swiss-Prot (http://www.expasy.ch/sprot/). Probabilidades de correspondência de proteína foram determinadas usando MASCOT protein scores, com a confiança de identificação indicado pelo número de matching e da cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos correspondentes. A presença de pelo menos um peptídeo com íons significativos foi necessária para a identificação positiva da proteína. Somente os resultados estatisticamente significativos obtidos pelo MASCOT ($p < 0,05$) foram incluídos na análise. Os espectros obtidos mediram a massa por carga do(s) íon(s) precursores e de seus íons obtidos por fragmentação por colisão induzida (CID-MS/MS) por gás inerte (hélio) e uma energia de colisão fixa de 20 keVolt.

4.10 Identificação de Proteínas em Banco de Dados

Os espectros de massa obtidos foram submetidos automaticamente ao programa MASCOT versão 2.2.04 e pesquisados contra o banco de dados de

proteínas SwissProt 57.2.fasta (contendo 466.739 sequências). Os seguintes parâmetros foram considerados: digestão por tripsina, 1 falha de clivagem permitida, tolerância de massa molecular do íon precursor de 0,5 Da e 0,8 para os íons fragmentos, modificação fixa por carboxiamidometilação de cisteínas e modificação variável por oxidação de metionina. Somente foram considerados os dados estatisticamente significantes obtidos pelo programa MASCOT (p:S0,05) com escore mínimo de 30 para cada peptídeo (http://www.matrixscience.com).

4.11 SDS-PAGE e Western Blotting

Amostras de proteínas (10 ug) foram separadas por SDS-PAGE em gel 10% segundo Laemmli (1970). Foi utilizado o sistema vertical Mini-PROTEAN (BioRad Laboratories) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado padrão de peso molecular para proteínas *Spectra Multicolor Broad Range Ladder* (26634, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras foram submetidas à separação eletroforética com as seguintes condições de corrida: 12 mA/gel, 110 V durante 90 a 120 min. A corrida foi feita em tampão Tris-glicina (Tris 25 mM, pH 8,3, SDS 0,1 %, glicina 250 mM.

Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), utilizando tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10 mM, carbonato de sódio 3 mM, pH 9,9) por 1,5 h a 350 mA/gel. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução salina tamponada de Tris (TBS/T) – Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, com leite desnatado 5%) por 1 h a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi lavada 3x com TBS/T por 5 min e incubada 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo primário diluído 5000 vezes em TBS/T. A seguir, a membrana foi novamente lavada com TBS/T durante 5 min, 3x e incubada por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído 3000 vezes em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T.

A visualização dos imunocomplexos por quimioluminescência foi realizada a partir da adição de solução de ECL – *enhanced chemiluminescense* (Tris 0,1 M pH 8,5, ácido p-coumárico 400 uM, luminol 2,5 mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio. A membrana de PVDF foi exposta a filme de autoradiografia *(AGFA)* para detecção da imunomarcação. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o *software ImageLab*^{TM} *(BioRad Laboratories)*, localizado no

laboratório da Profa. Dra. Andreia Machado Leopoldino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.12 Análise Estatística

As diferenças significativas na expressão de proteínas entre os grupos experimentais (com base nas alterações médias de ±2 vezes do volume normalizado dos *spots* pareados), foi realizada por meio de análise de variância de 1 via (ANOVA) utilizando $p<0,05$, obtidos com auxílio do *software* ImageMaster Platinum® v. 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e Quantificação das Proteínas

A obtenção dos extratos protéicos é um dos passos críticos devido à reprodutibilidade exigida em estudos proteômicos e envolve etapas como solubilização, desnaturação, redução das proteínas, e procedimentos para remover componentes não protéicos, como ácidos nucléicos. A adição de inibidores de proteases é feita logo no início da extração, para garantir que as proteínas não sejam degradadas. Durante a extração, foi avaliada a eficiência de dois tampões de homogeneização, sendo o primeiro contendo CHAPS e outro contendo Triton X-100, como detergente para lise das células. Após a extração e quantificação dos extratos utilizando os diferentes tampões, aquele contendo CHAPS mostrou-se mais eficiente e foi escolhido para ser usado em todo o trabalho.

Os extratos protéicos foram quantificados pelo método de Bradford, pois é compatível com a solução de lise, a qual contém agentes altamente desnaturantes (uréia e tiouréia) e detergente (CHAPS). A tabela II mostra as concentrações de proteínas encontradas nas amostras de cérebro, rim e fígado durante os 60 dias de tratamento com Ino-Hg e Met-Hg, bem como as amostras contendo Et-Hg tratadas por 4 horas.

Tabela II. **Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir dos diferentes tecidos de ratos controle e expostos à Ino-Hg e Met-Hg durante 60 dias e à Et-Hg por 4 horas.** A tabela mostra os valores médios ± SD, em mg mL^{-1} de cada amostra, obtidos pela leitura em triplicata das mesmas. A diferença estatistica entre elas foi inferior a 10%.

Extratos Protéicos	
Amostra	**Concentração (mg mL^{-1})**
Cérebro	
Controle	5,18 ± 0,48
Ino-Hg	5,25 ± 0.51
Met-Hg	5,86 ± 0,60
Et-Hg	6,56 ± 0,66
Rim	
Controle	4,99 ± 0,51
Ino-Hg	5,09 ± 0,44
Met-Hg	5,80 ± 0,58
Et-Hg	4,71 ±0,49
Fígado	
Controle	10,2 ± 0,98
Ino-Hg	8,73 ± 0,91
Met-Hg	14,1 ± 1,32
Et-Hg	21,7 ± 2.23

5.2 Estudo da Reprodutibilidade dos Géis Obtidos por 2DE

Uma vez obtidos os extratos celulares, as proteínas foram submetidas à eletroforese bidimensional, cuja técnica permite separar, simultaneamente, centenas de proteínas diferentes, possibilitando a análise de amostras complexas.

Para uma primeira avaliação, com o propósito de padronizar o desenvolvimento do gel bidimensional e fixar alguns parâmetros para a análise de imagens, foi utilizado extrato de proteína de fígado de ratos tratados com Met-Hg (Figura 10). De acordo com a figura 10, os géis apresentaram reprodutibilidades adequadas entre si, as quais ficaram entre 95,7 e 99,8% para o ponto isoelétrico e entre 90,1 e 99,0% para a massa molecular.

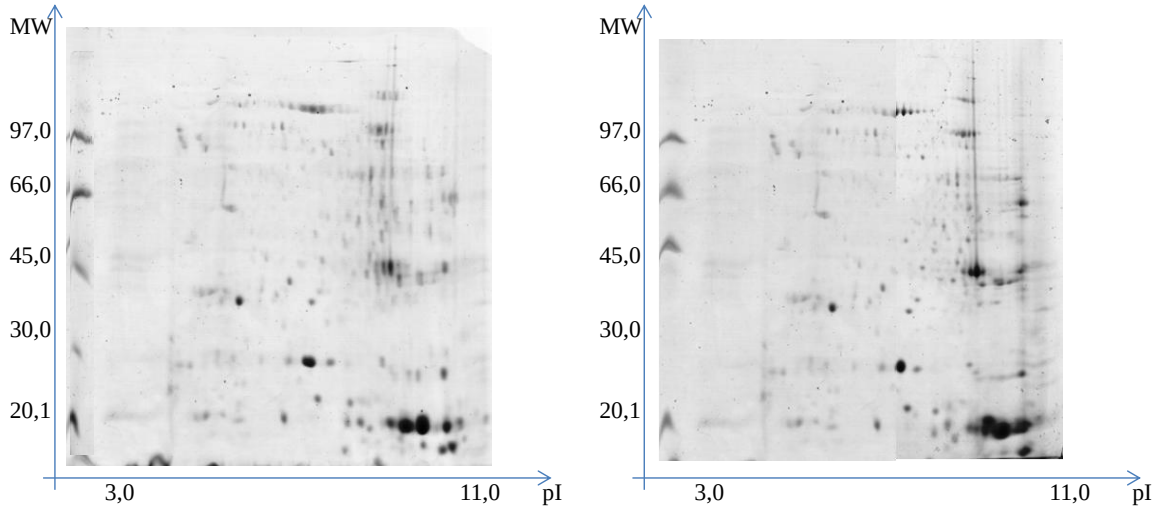

Figura 10. Estudo da reprodutibilidade das amostras. Foram utilizados géis bidimensionais obtidos por IEF com IPG-3-11NL de fígado de ratos tratados com Met-Hg por 60 dias. O gel é 12,5% com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel.

Uma vez padronizada a corrida eletroforética, a próxima etapa a ser estudada foi a homogeneidade das amostras individuais, devido ao tamanho amostral. Para isso, foi utilizado extrato protéico de fígado de cada rato tratado com Met-Hg. Os géis foram feitos em duplicata para cada amostra, nos quais foi detectado o número de spots em cada um deles, demostrados na tabela III.

Tabela III. Número de spots detectados usando software ImageMaster versão Platinum 7.0 (GE Healthcare). Foram analisados géis, em duplicata, de amostras de fígado de cada animal contido no grupo tratado com Met-Hg.

	n° de spots detectados
Gel 1 (rato 1)	366
Gel 2 (rato 1)	356
Gel 1 (rato 2)	354
Gel 2 (rato 2)	359
Gel 1 (rato 3)	363
Gel 2 (rato 3)	370
Média	361,33
Desvio Padrão	6,12
Intervalo de Confiança 95%	(354,91;367,75)

Com o objetivo de saber se as amostras estão normalmente distribuídas, a partir dos dados obtidos da tabela III, foi possível construir um gráfico conhecido

como *Normal Probability Plot*, no qual os dados são representados graficamente contra uma distribuição normal teórica de tal maneira que os pontos devem formar uma linha reta aproximada. Pontos fora desta linha reta indicam desvios da normalidade . (GHASEMI & ZAHEDIASL, 2012). A figura 11 apresenta o número de spots obtidos em cada amostra *versus* seus valores esperados em relação à normalidade (z-escore teórico).

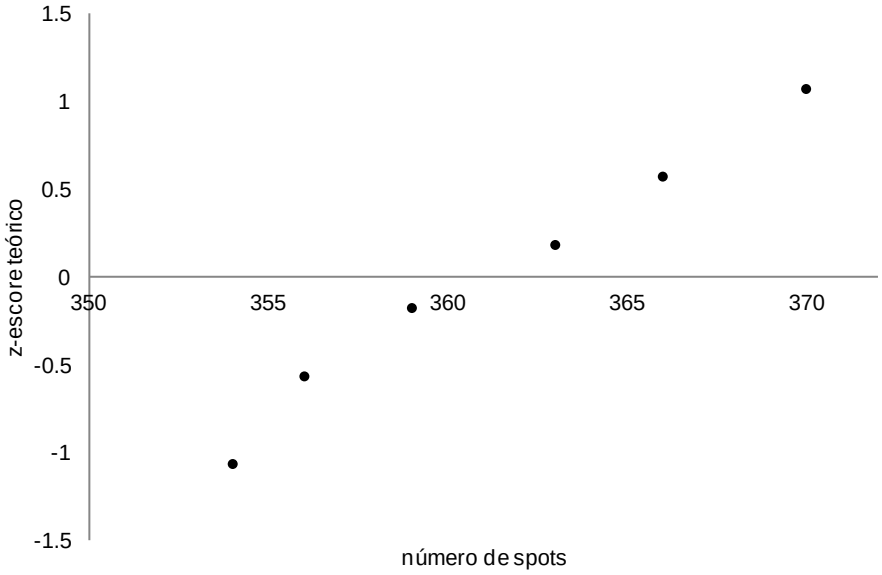

Figura 11. *Normal probability plot* de amostra de extrato protéico de fígado de cada rato tratado com Met-Hg. O gráfico apresenta uma distribuição simétrica, aproximadamente normal.

Como os animais possuíam as mesmas características (todos machos, linhagem, peso, etc.), foram tratados e mantidos nas mesmas gaiolas, e como o conjunto de géis individuais apresentou uma distribuição simétrica, aproximadamente normal (figura 11), foi feito um *pool* do extrato protéico de cada tecido, uma vez que não foi observada variabilidade entre os géis individuais das amostras, uma vez que todos os géis apresentaram número de spots semelhantes, com valores pertencentes ao intervalo de confiança de 95% (tabela III).

A eletroforese bidimensional apresenta, entretanto, certas limitações quando consideramos a análise de proteínas dotadas de algumas características específicas ou expressas em pequenas quantidades.

Proteínas hidrofóbicas, tais como proteínas de membrana, são geralmente insolúveis, o que dificulta sua migração durante a IEF. Além disso, as proteínas com

alto peso molecular apresentam migração limitada na segunda dimensão em SDS-PAGE, necessitando de géis com malha de poliacrilamida de 3 a 5% de concentração para uma separação eficiente. Porém, géis preparados com esta malha são extremamente frágeis e de difícil manipulação, o que os tornam inviáveis.

Além disso, proteínas que apresentam pI<3 e pI>10 geralmente são de difícil focalização isoelétrica, uma vez que as fitas IPG disponíveis comercialmente, utilizadas durante a IEF, excluem essa faixa de pH.

Para todas as amostras deste estudo foi realizada uma focalização isoelétrica utilizando *strips* de 7 cm não lineares com faixa de pH de 3 a 11 e a segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida a 12,5%.

5.3 Análise Proteômica do Fígado de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg

As figuras 12 e 13 mostram as imagens de géis bidimensionais contendo 600µg de proteínas do grupo controle e amostras de fígado tratadas por 60 dias com Ino-Hg e Met-Hg (figura 12) e por 4horas com Et-Hg (figura 13).

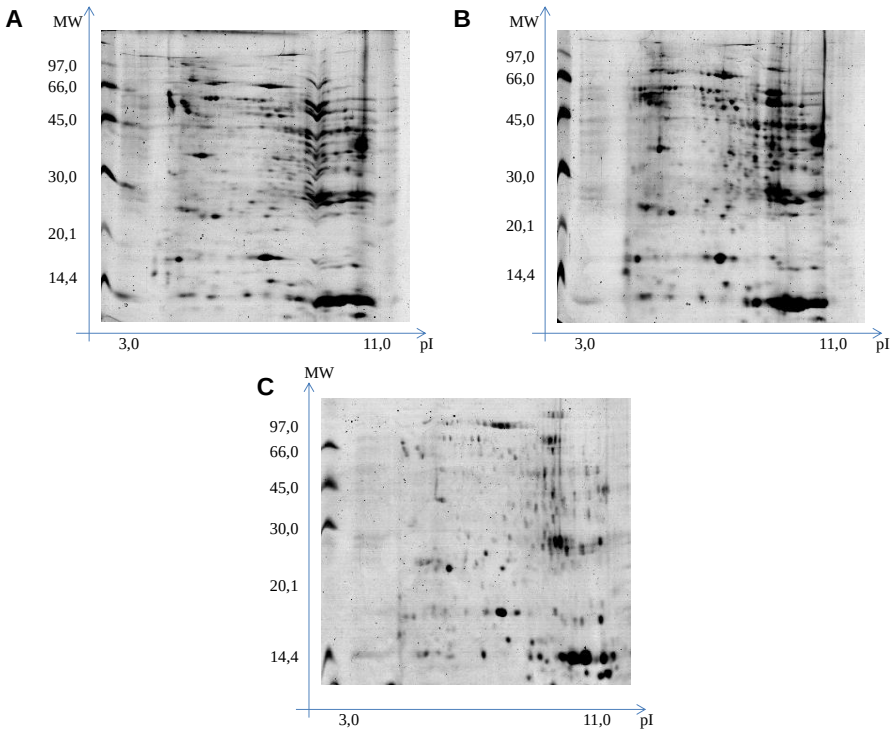

Figura 12. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de fígado de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias. Os géis são 12,5% com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle, B) Ino-Hg e C) Met-Hg.

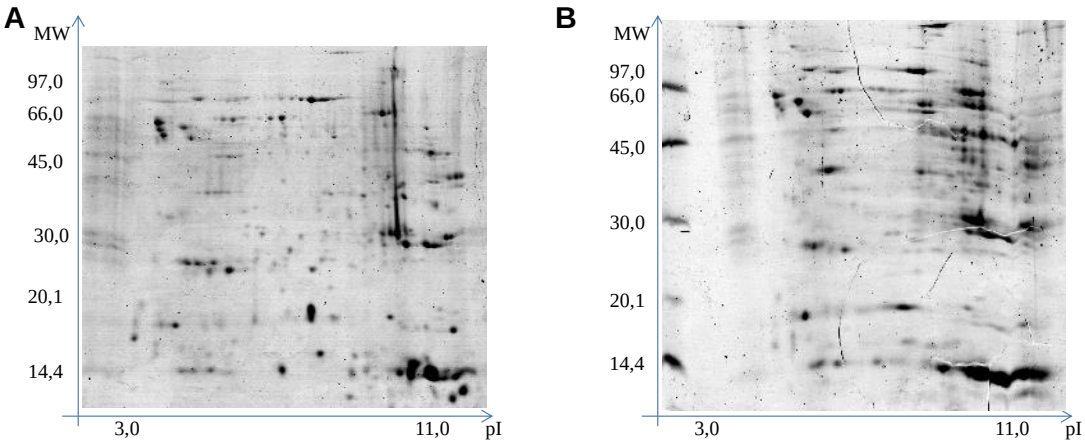

Figura 13. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de fígado de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas. Os géis são 12,5% com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle e B) Et-Hg.

A figura 14 mostra a imagem do gel 2DE do extrato protéico da amostra de fígado controle, contendo 600 µg de proteínas após a análise diferencial, o qual 366 *matches* foram identificados, sendo 46 deles diferencialmente expressos, quando comparados ao gel contendo extrato protéico da amostra de fígado de ratos tratados por 60 dias com Met-Hg. O mesmo procedimento foi feito para a comparação entre extrato protéico da amostra de fígado controle, comparado à de ratos tratados por 60 dias com Ino-Hg, no qual 352 *matches* foram identificados, sendo 51 deles diferencialmente expressos e por 4 horas com Et-Hg, no qual 356 *matches* foram identificados, sendo 39 deles diferencialmente expressos (géis não demonstrados).

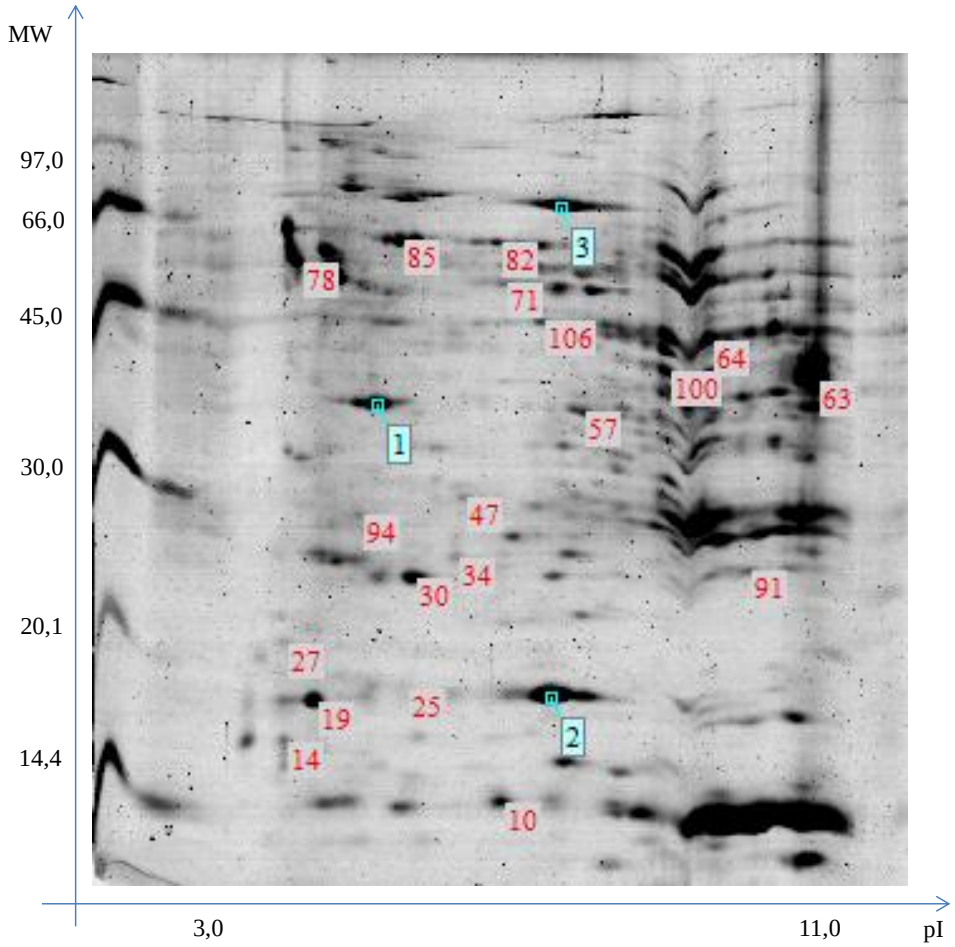

Figura 14. Gel controle demonstrando a análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de fígado controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o software ImageMaster versão 7.0 Platinum. Os *spots* selecionados foram submetidos à digestão enzimática com tripsina e os peptídeos extraídos do gel foram analisados por espectrometria de massas.

Na Tabela IV estão demonstrados os *spots* selecionados como diferencialmente expressos, entre amostras de fígado controle e tratados com as diferentes formas de Hg, identificados por espectrometria de massas.

Tabela IV. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de fígado expostas às diferentes espécies de mercúrio. Análise dos *spots* de proteínas separadas por gel 2D IPG-pH 3 a 11 gradiente não linear (IPG-3-11NL), hidrolisadas por tripsina e submetidas à espectrometria de massas.

ID	*ID proteína*	*Massa (kDa)*	*Expressão*
130	Serum albumin	70,70	↓ Met-Hg ↓ Ino-Hg
134	Nucleoside diphosphate kinase A	17,30	↑ Met-Hg ↑ Ino-Hg
135	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 4	64,30	↓ Met-Hg ↑ Ino-Hg
136	Glutathione S-transferase Mu 1	26,07	↑ Met-Hg
137	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	38,60	↓Met-Hg
138	Receptor expression-enhancing protein 4	29,81	↑ Ino-Hg
139	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	34,54	↓Met-Hg
140	Sphingosine kinase 1	42,96	↓Met-Hg
141	NAD kinase 2, mitochondrial	48,43	↓Met-Hg
142	Fructose-bisphosphate aldolase B	40,00	↓Met-Hg
143	Phenylalanine-4-hydroxylase	52,30	↑ Ino-Hg
144	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,32	↓ Met-Hg ↓ Ino-Hg
145	Calreticulin	48,14	↓ Met-Hg
146	Protein disulfide-isomerase	57,31	↓ Met-Hg ↑ Et-Hg
149	Phosphoglucomutase-1	61,65	↓ Et-Hg
150	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	44,54	↓ Et-Hg
151	Cytochrome b5"	15,35	↑ Et-Hg
153	Endoplasmin	93,00	↓ Et-Hg
157	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	10,90	↓ Et-Hg
159	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18,09	↓ Et-Hg
160	Nucleoside diphosphate kinase B	17,39	↓ Et-Hg
164	Argininosuccinate synthase	46,75	↑ Et-Hg
165	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial	96,27	↓ Et-Hg
169	Catechol O-methyltransferase	29,81	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
175	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36,63	↓ Met-Hg
176	Protein disulfide-isomerase A3	57,04	↓ Met-Hg
177	Sulfotransferase 1A1	34,17	↓ Met-Hg

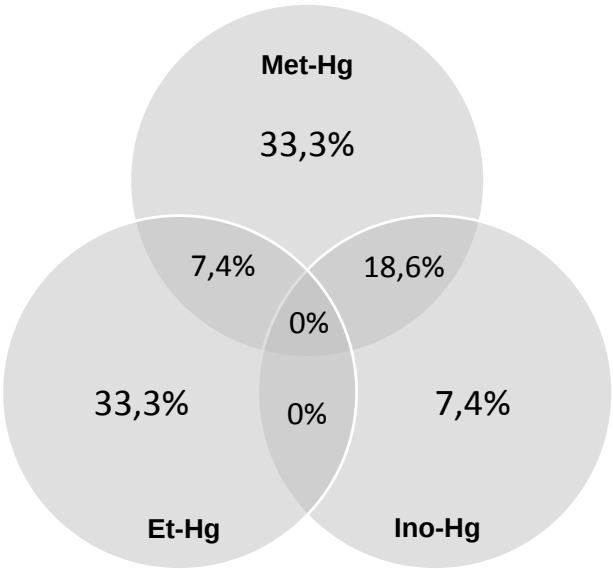

Figura 15. Gráfico de a distribuição das proteínas identificadas em amostras de fígado, de acordo com as espécies de Hg.

De acordo com a figura 15, o tratamento com as formas orgânicas foi responsável pela maioria das proteínas diferencialmente expressas no tecido hepático, demonstrando que o fígado possui um papel central no metabolismo, uma vez que está envolvido em várias reações de desintoxicação e, portanto, é considerado o principal órgão alvo da toxicidade de xenobióticos, tais como o mercúrio (VERGILIO et al, 2015).

A análise por WB revelou que a administração de Met-Hg proporcionou um aumento na expressão da proteína Glutationa S-Transferase (GST) (tabela IV), quando comparada à amostra controle. Este experimento foi realizado utilizando triplicatas biológicas de extratos protéicos de fígado e a análise da intensidade das bandas foi obtida com o auxílio do *software ImageLab*, a qual demonstrou um aumento médio de 28% no nível da proteína (figura 16).

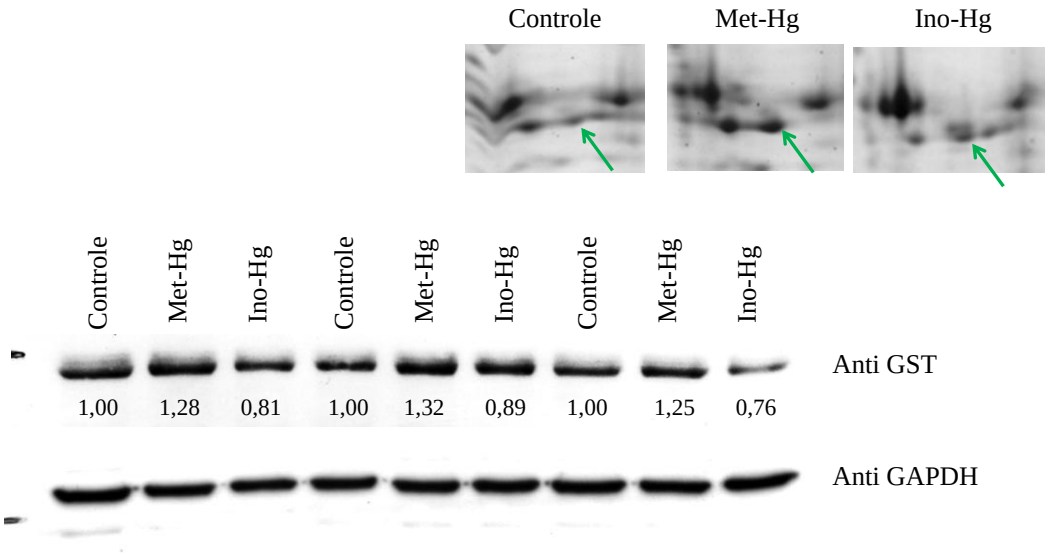

Figura 16. Imunomarcação da proteína Glutationa S-Transferase, identificada por espectrometria de massas, em amostras de fígado controle e tradado com Met-Hg e Ino-Hg. O aumento da expressão de GST foi confirmado por Western Blotting utilizando o anticorpo para GST. A proteína GAPDH foi utilizada para o cálculo da porcentagem relativa da GST nas diferentes formas de exposição. No canto superior a direita, variação de expressão da proteína GST, destacadas em géis 2D IPG-3-11NL.

Um dos principais mecanismos de toxicidade que explica o dano oxidativo induzido pelo Hg é a sua alta reatividade com os grupamentos sulfidrílicos (-SH) (SCHURZ; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000). A GSH é o mais abundante e essencial tiol celular livre, e também o principal antioxidante endógeno do organismo, responsável pela manutenção do estado redox normal (DRINGEN, 2000). A GSH serve como uma primeira linha de defesa celular contra os compostos de Hg (OU et al., 1999). Tanto o mercúrio orgânico, quanto o inorgânico conjugam-se aos grupamentos tiólicos da GSH, com a finalidade de eliminação deste metal do organismo minimizando seus efeitos.

Glutationa S-transferases compreendem uma família de enzimas, as quais catalisam o ataque nucleofílico da GSH na forma reduzida a compostos eletrofílicos, como por exemplo, ROS (HUBER et al., 2008), tornando este conjugado mais hidrossolúvel, o qual é melhor eliminado (KLAASSEN, 2013). No tecido hepático, 5% das proteínas citosólicas são compostas por GSTs (WILCE & PARKER, 1994).

Quando o organismo está exposto a altas concentrações de Hg, há uma elevação da concentração de GSH, com a finalidade de diminuir o dano oxidativo e,

consequentemente há uma superexpressão da GST (tabela IV), o qual foi observado neste estudo. Porém, a produção de ROS ($O_2\bullet^-$, H_2O_2 e $OH\bullet$) é um processo fisiológico, uma consequência natural da respiração, que ocorre durante a síntese de ATP. De acordo com alguns estudos, a ligação do mercúrio à enzima ATP Sintase, provoca uma inibição significativa da mesma. Além disso, a ligação do Hg à glutationa reduzida (GSH) é estimulada pela enzima GST (BHATTACHARYA, et. al., 1997; KADE, 2012). Todos esses achados corroboram com o atual estudo, o qual demonstrou por meio do perfil proteômico de extratos hepáticos, que a exposição ao Hg causa uma superexpressão da GST, com o objetivo de evitar a formação de ROS, que por sua vez é responsável pela disfunção mitocondrial, o que desencadeia a inibição da enzima ATP Sintase, que pode levar à morte celular e, consequentemente, dano hepático durante a exposição ao metal (figura 17).

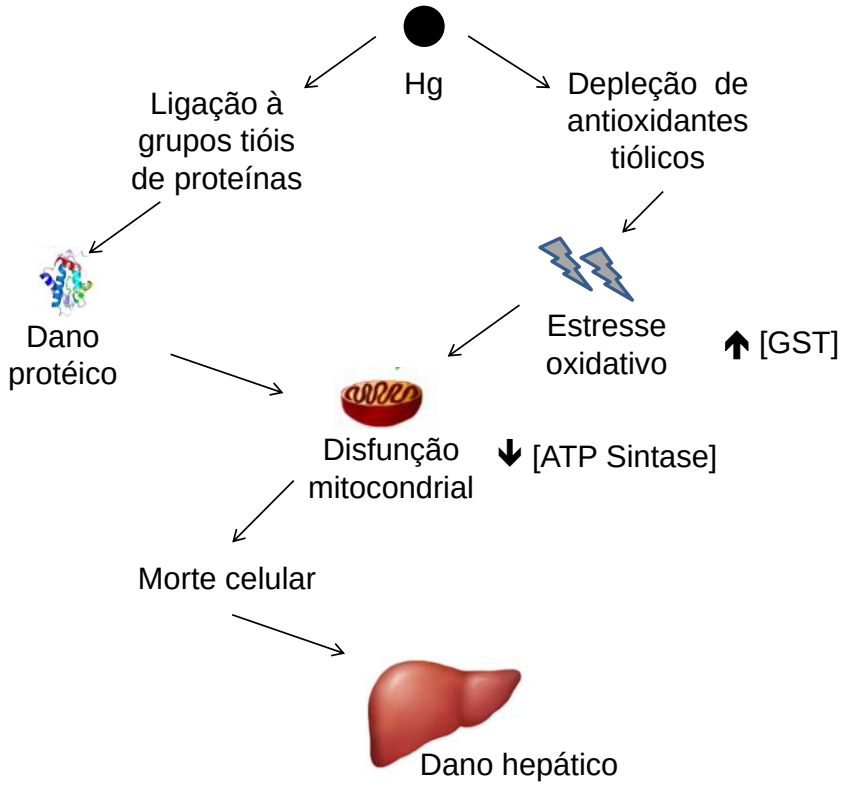

Figura 17. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Hg, a partir da análise do extrato protéico de fígado de animais tratados com o metal e sua relação entre as proteínas GST e ATP Sintase e o dano hepático. A superexpressão da proteína GST causa injúria hepática devido a um aumento do estresse oxidativo, levando à disfunção da mitocôndria. A queda na produção de ATP, observada na diminuição da expressão da enzima ATP Sintase Mitocondrial, é devido à sua ligação ao Hg, bem como ao aumento da atividade da GST.

5.4 Análise Proteômica do Cérebro de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg

As figuras 18 e 19 mostram as imagens de géis bidimensionais contendo 600 µg de proteínas de controle e amostras de cérebro tratadas por 60 dias com Ino-Hg e Met-Hg (figura 18) e por 4horas com Et-Hg (figura 19).

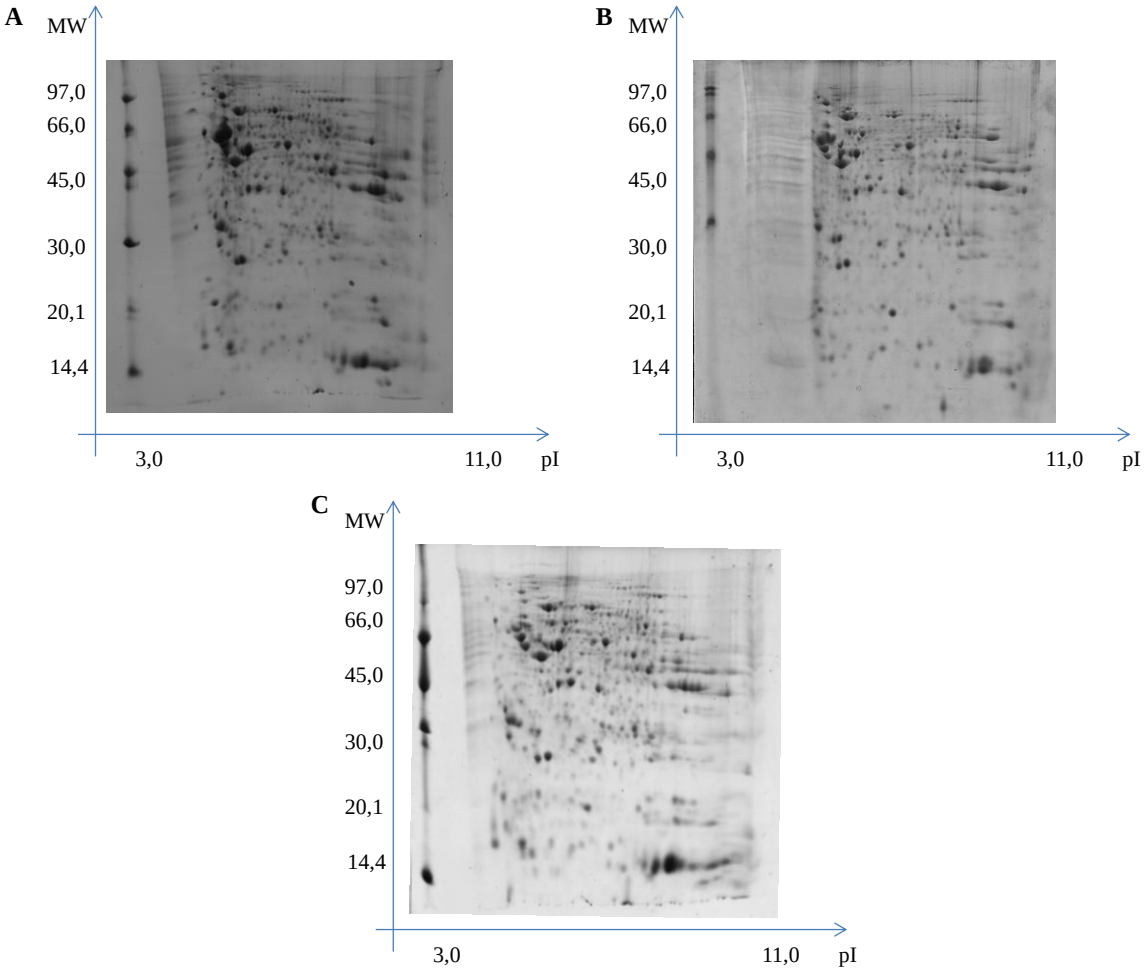

Figura 18. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de cérebro de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias. Os géis são 12,5 % com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle, B) Ino-Hg e C) Met-Hg.

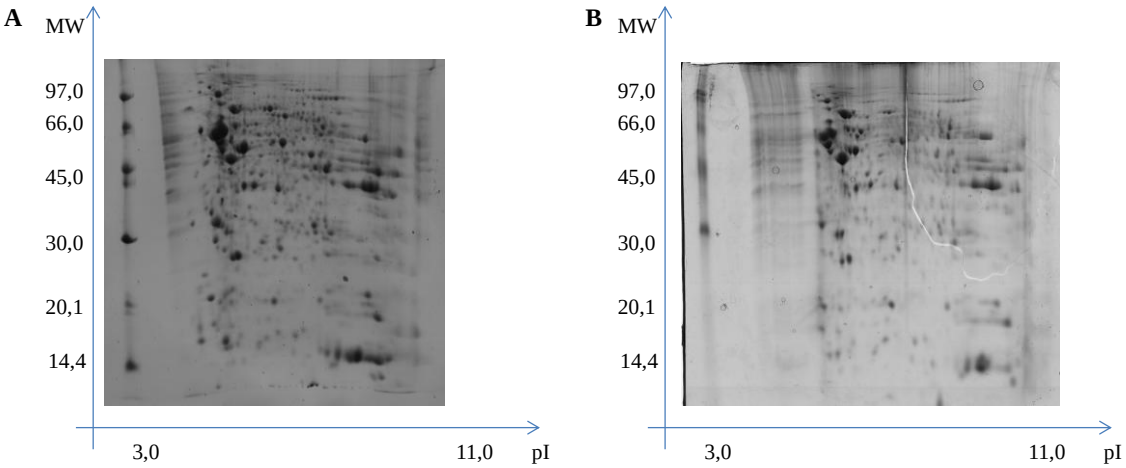

Figura 19. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de cérebro de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas. Os géis são 12,5 % com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle e B) Et-Hg.

A figura 20 mostra a imagem do gel 2DE de cérebro controle, contendo 600 µg de proteínas, após a análise diferencial, no qual foram identificados 312 matches, sendo 42 deles diferencialmente expressos, quando comparados ao gel contendo amostra de cérebro de ratos tratados por 60 dias com Met-Hg. O mesmo procedimento foi feito para a comparação entre extrato protéico da amostra de cérebro controle, comparado à de ratos tratados por 60 dias com Ino-Hg, no qual 361 *matches* foram identificados, sendo 57 deles diferencialmente expressos e por 4 horas com Et-Hg, no qual 354 *matches* foram identificados, sendo 44 deles diferencialmente expressos (géis não demonstrados).

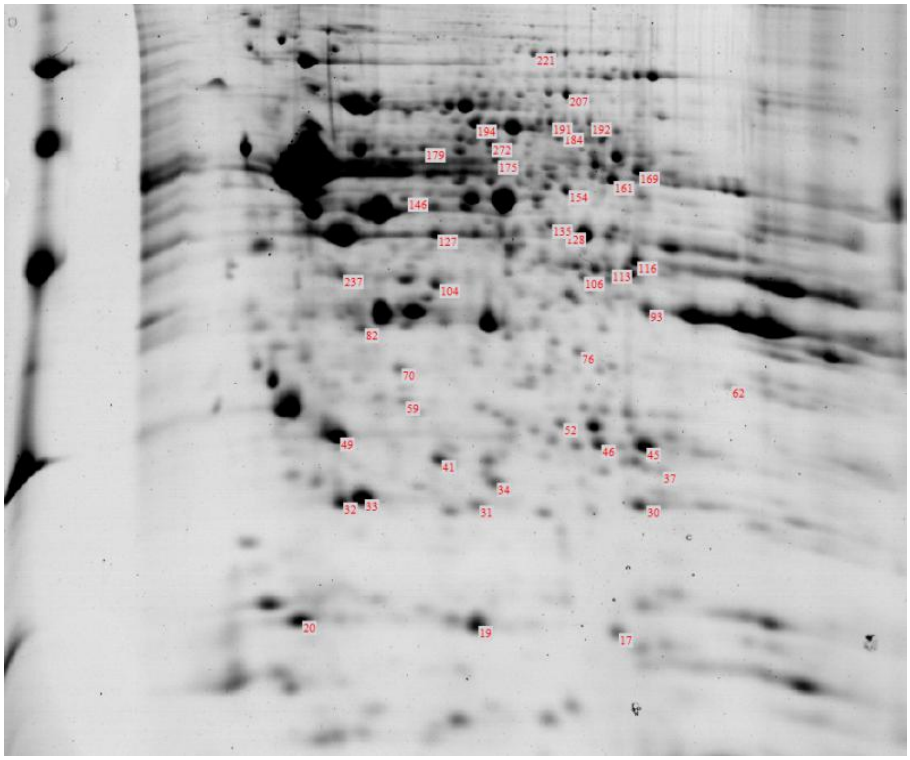

Figura 20. Análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de cérebro controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o software ImageMaster versão 7.0 Platinum. Os *spots* selecionados foram submetidos à digestão enzimática com tripsina e os peptídeos extraídos do gel foram analisados por espectrometria de massas.

Na Tabela V estão demonstrados os *spots* selecionados como diferencialmente expressos, entre amostras de cérebro controle e tratados com as diferentes formas de Hg, identificados por espectrometria de massas.

Tabela V. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de cérebro expostas às diferentes espécies de mercúrio. Análise dos *spots* de proteínas separadas por gel 2D IPG-pH 3 a 11 gradiente não linear (IPG-3-11NL), hidrolisadas por tripsina e submetidas à espectrometria de massas.

ID spot	*ID proteína*	*Massa (kDa)*	*pI*	*Expressão*
2	Calbidin	30,20	4,71	↑ Met-Hg ↑ Et-Hg
5	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	20,90	5,48	↑ Ino-Hg ↑ Et-Hg
6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	25,17	5,14	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg
9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18,09	8,34	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
10	Calretinin	31,50	4,94	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg ↑ Et-Hg
12	Gamma-enolase	47,51	5,03	↑ Ino-Hg
14	Phosphoglycerate kinase	44,91	8,02	↑ Ino-Hg
17	60 kDa heat shock protein	61,09	5,91	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
22	Triosephosphate isomerase	27,35	6,89	↑ Ino-Hg
28	Alpha-synuclein	14,48	4,74	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg
38	Protein DJ-1	20,19	6,32	↓ Met-Hg
42	Calmodulin	16,83	4,09	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
62	Cofilin	18,75	8,22	↑ Ino-Hg ↑ Met-Hg
63	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,78	8,31	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
64	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,83	9,22	↓ Met-Hg
73	Cytochrome c oxidase	16,35	6,09	↓ Ino-Hg
75	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16,07	5,88	↑Ino-Hg ↑Met-Hg
76	Nucleoside diphosphate kinase B	17,39	6,92	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
78	Triosephosphate isomerase	27,35	6,89	↑Ino-Hg ↓Met-Hg
81	Glutamine synthetase	42,98	6,64	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
83	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58,29	6,63	↑Met-Hg
90	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,72	8,05	↓ Met-Hg

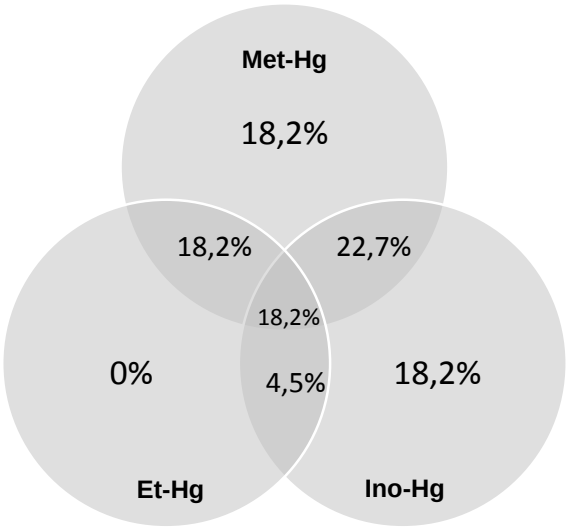

Figura 21. Gráfico demonstrando a distribuição das proteínas identificadas em amostras de cérebro, de acordo com as espécies de mercúrio.

Foram observadas diferenças na expressão protéica frente à exposição a todas as formas de Hg (figura 21), porém com maior ênfase para Met-Hg e Ino-Hg. A proteômica tem se tornado cada vez mais uma ferramenta valiosa para a compreensão de mecanismos de toxicidade e descoberta de biomarcadores de exposição, contribuindo para maior controle dos casos de exposição e prevenção de efeitos tóxicos (MILLER et al, 2014). Portanto, o amplo entendimento da fisiologia neuronal e das vias de sinalização, bem como o conhecimento das funções neuronais implica no conhecimento da função de proteínas envolvidas em tais processos. Vários investigadores abordaram a análise de expressão de proteína em regiões do cérebro ou do cérebro inteiro (LUBEC et al, 2003; YANG et al, 2004; 2005; YIN et al, 2007; YU et al, 2004). No entanto, a utilização de proteínas totais em toxicologia é ainda muito limitada.

Estudos anteriores avaliaram o perfil de proteínas de células cerebrais expostas a Met-Hg de saguis (*Callithrix jacchus*), beluga juvenil (*Huso huso*) e medaka (*Oryzias melastigma*) cérebro (KEYVANSHOKOOH et al, 2009; SHAO et al, 2015; WANG et al., 2011) e no tecido hepático de bacalhau do Atlântico (KARLSENA et al., 2014). No entanto, o presente estudo é, para o nosso conhecimento, o primeiro que reporta o efeito do Met-Hg sobre o perfil de expressão de proteínas em células cerebrais de ratos, contribuindo para elucidação dos mecanismos de neurotoxicidade desse metal.

A tabela V mostra as proteínas identificadas no presente estudo, das quais podem-se destacar àquelas relacionadas ao metabolismo e atividade catalítica. Nossos resultados estão de acordo com Wang e cols. (2011) e Keyvanshokooh e cols., (2009), os quais apresentaram uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo (por exemplo, glutamina sintetase e piruvato quinase) em cérebro de medaka (Oryzias melastigma) exposto ao mercúrio e uma diminuição na expressão de calmodulina no cérebro de beluga exposta ao metilmercúrio (KEYVANSHOKOOH et al., 2009), respectivamente.

A exposição a organomercuriais é conhecida por estar associada a efeitos prejudiciais no sistema nervoso central (COUNTER et al., 2002; NI et al. 2012). No entanto, a compreensão abrangente do mecanismo associado com os efeitos neurotóxicos continua por ser elucidado. Três eventos-chave relacionados com a neurotoxicidade induzida por Hg estão bem estabelecidas: (i) geração de ROS, (ii)

perturbação da homeostase do Ca^{2+} e (iii) liberação de glutamato, além do processo de morte celular. Estes mecanismos estão descritos abaixo.

O processo de apoptose tem sido relatado em vários estudos como um dos eventos tóxicos decorrentes da exposição Hg e os com destaque para o papel central do Ca^{2+} neste efeito neurotóxico, uma vez que a homeostase do Ca^{2+} desempenha um papel crucial nos processos de lesão celular e o aumento da sua concentração intracelular é um dos mecanismos pelo qual Hg induz a morte de células neuronais. Corroborando com estes mecanismos, foi demonstrado que o uso de bloqueadores dos canais de Ca^{2+} apresenta proteção contra os efeitos tóxicos do Hg (XU et al., 2012). Por sua vez, o mecanismo de toxicidade do Met-Hg envolve a liberação do íon a partir dos estoques intracelulares, influxo do meio extracelular e inibição do efluxo de Ca^{2+}. Além disso, o efeito inibitório do Met-Hg sobre a Na^{+} K^{+}-ATPase e Ca^{2+}-ATPase contribui para um significativo aumento de Ca^{2+} intracelular em células neuronais, o que pode levar a um aumento da liberação de neurotransmissores e de produção de ROS, ativação de proteases celulares e, finalmente, pode promover a morte celular e degeneração neuronal (LIMKE et al., 2004; LIMKE et al., 2003).

O presente estudo indicou um aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), uma proteína envolvida nos processos de antioxidantes em células, como uma consequência da exposição Met-Hg. A produção excessiva de ROS pode desencadear na célula um aumento das defesas antioxidantes, para prevenir o dano celular. Muitos estudos demonstraram que os neurônios respondem a exposição Met-Hg com produção de ROS aumentada, que representa um mecanismo chave de danos celulares (ASCHNER et al, 2007; CHOI et al., 1996, FARINA et al, 2011a; 2011b, ZIMMERMANN et al, 2014), uma vez que o cérebro representa um órgão altamente vulnerável ao estresse oxidativo devido a sua alta taxa de metabolismo (ASCHNER et al., 2007). Em células do cérebro, a exposição ao Hg modifica a função fisiológica das mitocôndrias, contribuindo para o aumento da produção de ROS, resultando em estresse oxidativo, redução do potencial de membrana mitocondrial (MMP), e perturbações do transporte de elétrons, o que sugere que as mitocôndrias possam ser uma das organelas alvo para a ação neurotóxica mediada por Hg (DREIEM et al, 2005; GAO et al, 2007; YIN et al., 2007). Além disso, o estresse oxidativo também desempenha um papel importante em doenças degenerativas. É bem conhecido que ROS pode mediar a neurotoxicidade

induzida por Met-Hg em vários modelos experimentais e alterações mitocondriais pode iniciar uma cascata de eventos, culminando na morte celular (apoptose ou necrose) (ASCHNER et al, 2007; BERNARDI et al, 1998; KROEMER & REED, 2000; YIN et al, 2011).

No momento, vários estudos relataram que a apoptose ocorre como resultado de toxicidade orgânica Hg (SANTOS et al, 2016; SOKOLOWSKI et al, 2011; CECCATELLI et al., 2010), mas os mecanismos moleculares não estão completamente elucidados. No entanto, as evidências indicam que o íon Ca^{2+} está ligado a este efeito neurotóxico. Homeostase do Ca^{2+} desempenha um papel crucial nos processos de lesão celular. A liberação de íons intracelulares, um influxo de Ca^{2+} a partir de meio extracelular, e inibição do efluxo de Ca^{2+} é uma parte necessária do mecanismo que leva ao Ca^{2+} excedente, no interior da célula. Por conseguinte, o efeito inibidor de Met-Hg em Na^{+} -K^{+} -ATPase e de Ca^{2+} -ATPases contribui para um significativo aumento de Ca^{2+} intracelular em células neuronais, o que pode levar a um aumento da liberação de neurotransmissores e excesso de produção de ROS, ativação de proteases celulares e, finalmente, a promoção da morte celular e degeneração neuronal (LIMKE et al. 2003, 2004)

Verificou-se uma superexpressão de calbindina em células cerebrais após a exposição ao Met-Hg e Et-Hg, sugerindo que a expressão aumentada simula um mecanismo de defesa, uma vez que que Hg promove a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+}, induzindo danos ou mesmo levando a apoptose da célula. Calbindina é uma proteína que se liga ao Ca^{2+}, e exibe várias funções relacionadas com o movimento destes íons através de células do sistema nervoso. Esta proteína está localizada na membrana plasmática e participa na modulação da bomba de cálcio (CHOI & JEUNG, 2008). Calbindina é muito abundante no tecido cerebral, que é entre 0,1 e 1,5% das proteínas solúveis totais e tem um papel importante na manutenção da função neuronal, alterando interações sinápticas do hipocampo que modulam a atividade de canais de Ca^{2+} e a apoptose (HONTANILLA et al., 1998). Alguns estudos sugerem que esta proteína atua como um agente neuroprotetor, ajustando a concentração de Ca^{2+} no interior das células com potencial para uso no tratamento de doenças neurodegenerativas (BELLIDO et al., 2000; CHRISTAKOS & LIU, 2004; KOJETÍN et al., 2006). Assim, aumentos na concentração de calbindina podem fornecer um controle eficaz da homeostase do Ca^{2+} prevenindo a injúria celular.

Neste estudo, observou-se também a redução da proteína glutamina sintetase (GS) no tecido cerebral. Esta enzima está presente em astrócitos e promove a conversão do glutamato em glutamina, que regula a concentração de glutamato na fenda sináptica e mantém as suas concentrações extracelulares abaixo dos níveis tóxicos. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório nas células neuronais de mamífero, onde ele desempenha um papel chave na resposta à lesão (FEATHERSTONE, 2010). No entanto, altas concentrações de glutamato na fenda sináptica fazem com que ele passe a atuar como uma neurotoxina potente, induzindo a lesão neuronal e à morte (MELDRUM, 2000; OZAWA et al, 1998). A neurotoxicidade mediada por glutamato ocorre devido à elevada ativação do N-metil-D-aspartato (NMDA), um tipo de receptor de glutamato, o que leva ao aumento do influxo de Ca^{2+} para dentro dos neurônios (OZAWA et al., 1998; PIVOVAROVA & ANDREWS, 2010).

Níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentados estão associados com a geração de estresse oxidativo, por conseguinte, levando à ativação de vias importantes envolvidas com a neurotoxicidade e morte celular (CECCATELLI et al. 2010). Alternativamente, Ca^{2+} pode interferir no funcionamento das mitocôndrias, onde pode estimular a geração de ROS (REYNOLDS & HASTINGS, 1995), induzindo disfunção mitocondrial e consequente geração de H_2O_2 que, por si próprio, já é um potente inibidor da captação de glutamato (MORI et al., 2007).

Yee & Choi, (1996) relataram que exposição a Met-Hg resulta na geração de ROS, as quais podem inativar ou degradar a proteína GS, e, além disso, Met-Hg pode inativar GS por meio da interação com grupos tióis da enzima. Avanços na compreensão do papel do glutamato na neurotoxicidade induzida por Met-Hg foi derivado a partir de estudos *in vitro* com células neuronais, mostrando que Met-Hg inibe prontamente a captação de glutamato na fenda sináptica (ASCHNER et al., 2000). Met-Hg também bloqueia a captação de glutamato em vesículas sinápticas de rato (PORCIÚNCULA et al., 2003), sugerindo que os níveis aumentados de glutamato no meio extracelular podem representar uma consequência bioquímica da exposição do metal (JUÁREZ et al., 2002). Os mecanismos moleculares que medeiam aumento da liberação e diminuição da captação de glutamato na toxicidade do Met-Hg ainda não estão completamente compreendidos. No entanto, este estudo propõe um modelo para o mecanismo bioquímico possível em que, há uma redução na expressão de GS e a superexpressão de calbindina, e pode

explicar uma grande parte do mecanismo de toxicidade induzida pela ação do Hg (Figura 22).

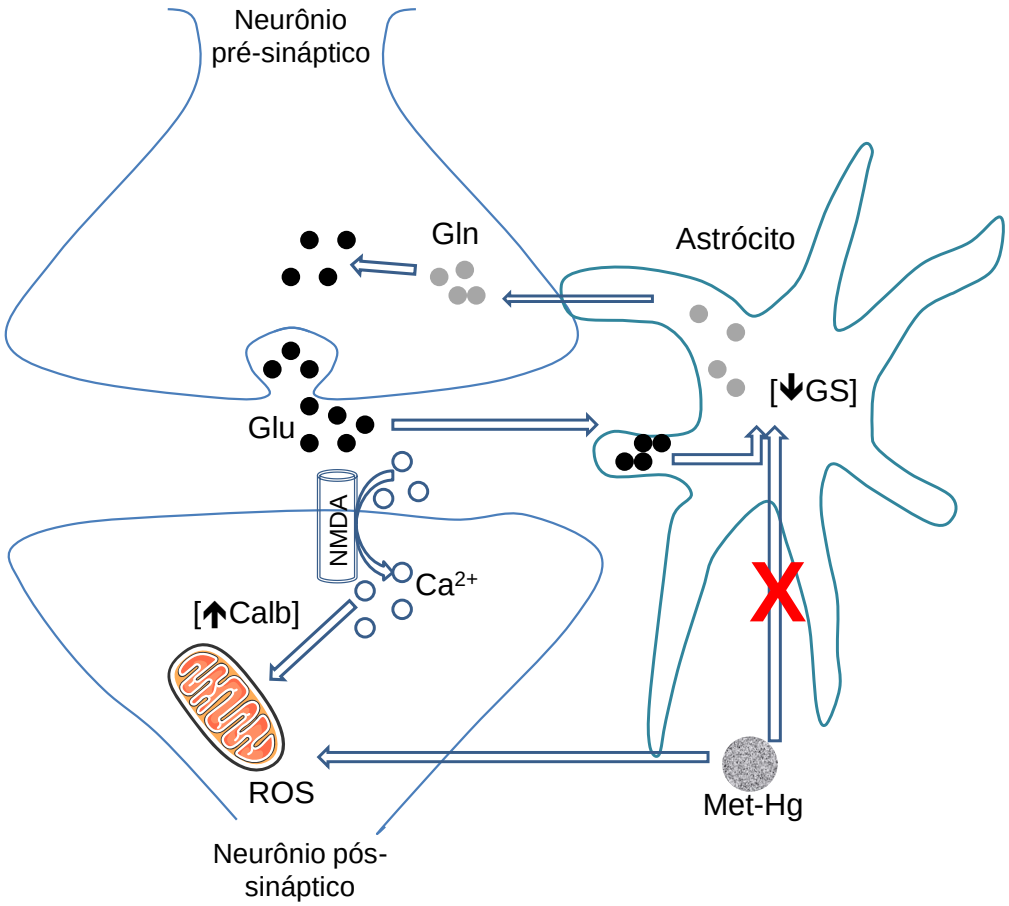

Figura 22. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Met-Hg, a partir da análise do extrato protéico de cérebro de animais tratados com o metal. Esquema sugerindo a contribuição de Met-Hg para a expressão de Glutamina Sintase (GS) e da Calbindina (CALB) proteínas no tecido cerebral. A exposição ao metal causou o decréscimo na expressão da proteína GS, causando o acúmulo de glutamato no neurônio pré-sináptico e na fenda sináptica. Este acúmulo leva a ativação do receptor NMDA de glutamato que, por sua vez ativa um canal de íons, favorecendo o acúmulo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, causando estresse oxidativo que, por sua vez contribuiu para o aumento na expressão de CALB, com o objetivo de retirar Ca^{2+} intracelular e manter a homeostase do sistema. (Adaptado de Souza et al, 2016)

5.5 Análise Proteômica do Rim de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Hg

As figuras 23 e 24 mostram as imagens de géis bidimensionais contendo 600 µg de proteínas de controle e amostras de rim tratadas por 60 dias com Ino-Hg e Met-Hg (figura 23) e por 4horas com Et-Hg (figura 24).

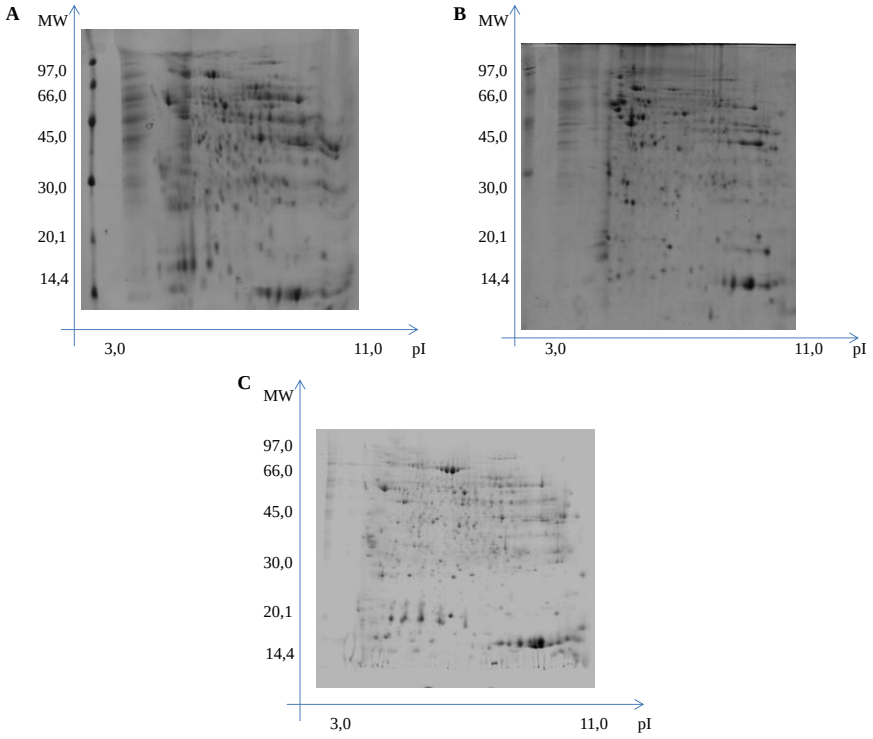

Figura 23. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de rim de ratos tratados com as diferentes formas de mercúrio, por 60 dias. Os géis são 12,5 % com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle, B) Ino-Hg e C) Met-Hg.

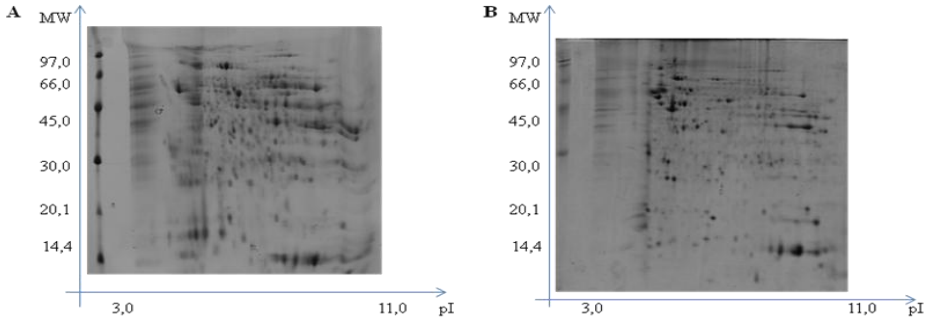

Figura 24. Eletroforese bidimensional obtida por IEF com IPG-3-11NL de extratos de rim de ratos tratados com Et-Hg, por 4 horas. Os géis são 12,5% com dimensões de 10 cm × 10,5 cm × 1 mm. Uma quantidade de 600 µg de proteínas foi aplicada ao gel. A) Controle e B) Et-Hg.

A figura 25 mostra a imagem do gel 2DE de rim controle, contendo 600 µg de proteínas, após a análise diferencial, na qual foram identificados 328 *matches*, sendo 51 deles diferencialmente expressos, quando comparados ao gel contendo amostra de rim de ratos tratados por 60 dias com Met-Hg. O mesmo procedimento foi feito para a comparação entre extrato protéico da amostra de rim controle, comparado à de ratos tratados por 60 dias com Ino-Hg, no qual 366 *matches* foram identificados, sendo 48 deles diferencialmente expressos e por 4 horas com Et-Hg, no qual 342 *matches* foram identificados, sendo 46 deles diferencialmente expressos (géis não demonstrados).

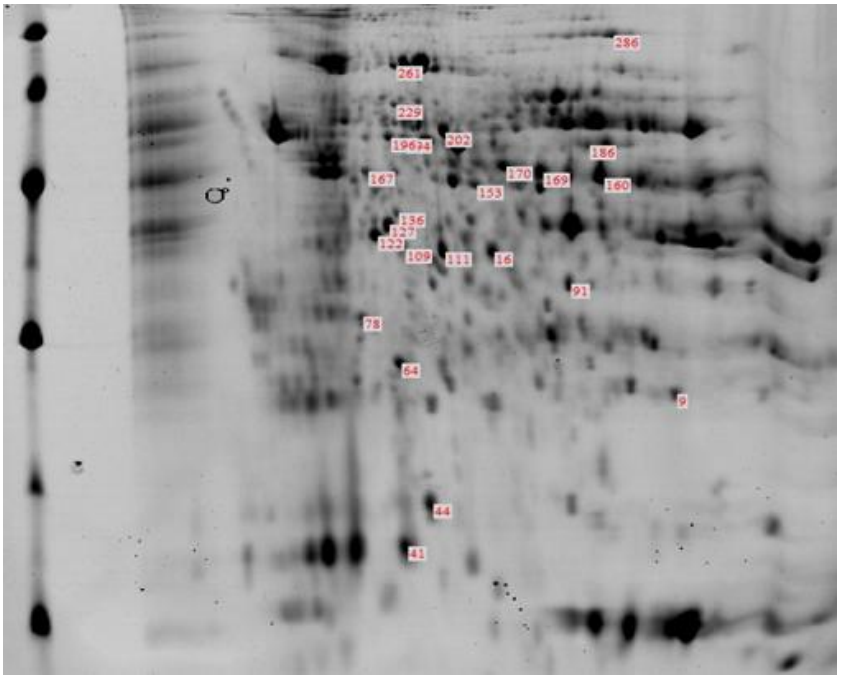

Figura 25. Análise comparativa dos géis IPG-3-11NL, de amostras de rim controle e tratado com Met-Hg por 60 dias utilizando o software ImageMaster versão 7.0 Platinum. Os *spots* selecionados foram submetidos à digestão enzimática com tripsina e os peptídeos extraídos do gel foram analisados por espectrometria de massas.

Na Tabela VI estão demonstrados os *spots* selecionados como diferencialmente expressos, entre amostras de rim controle e tratados com as diferentes formas de Hg, identificados por espectrometria de massas.

Tabela VI. Identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas de amostras de rim expostas às diferentes espécies de mercúrio. Análise dos *spots* de proteínas separadas por gel 2D IPG-pH 3 a 11 gradiente não linear (IPG-3-11NL), hidrolisadas por tripsina e submetidas à espectrometria de massas.

ID spot	*ID proteína*	*Massa (kDa)*	*pI*	*Expressão*
3	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	56,45	6,63	↓ Met-Hg
7	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	47,05	6,53	↓ Met-Hg
8	Argininosuccinate synthase	46,75	7,63	↓ Met-Hg
10	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	24,89	8,96	↑ Met-Hg
11	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16,07	5,88	↑ Met-Hg ↑Ino-Hg
12	Major urinary protein	21,01	5,85	↑ Met-Hg
13	Peroxiredoxin-6	24,86	5,64	↑ Met-Hg
15	L-lactate dehydrogenase B chain	36,87	5,70	↓ Met-Hg
16	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	31,80	5,75	↑ Met-Hg
19	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit α-mitochondrial	40,04	6,47	↓ Met-Hg
44	Calmodulin	16,83	4,09	↓ Met-Hg
45	Aminoacylase-1A	46,06	6,03	↑ Et-Hg
46	Dna J homolog subfamily C member 16	89,21	6,83	↓ Met-Hg
47	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59,83	9,22	↓ Met-Hg
48	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	144,78	5,60	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
50	Ribonuclease UK114	14,35	7,79	↓ Met-Hg ↓ Et-Hg
51	Major urinary protein	21,01	5,85	↓ Met-Hg
56	Urokinase-type plasminogen activator	49,35	8,07	↓ Ino-Hg ↓Met-Hg ↓Et-Hg
57	ATP synthase subunit d, mitochondrial	18,81	6,17	↓ Ino-Hg ↓ Met-Hg

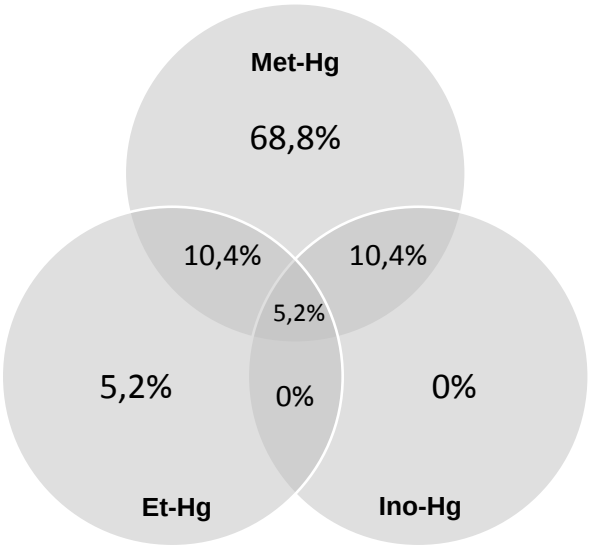

Figura 26. Gráfico demonstrando a distribuição das proteínas identificadas em amostras de rim, de acordo com as espécies de mercúrio.

De acordo com a figura 26, a exposição ao Met-Hg foi responsável pela maioria das proteínas diferencialmente expressas no tecido renal. De acordo com alguns estudos, Ino-Hg é a principal forma acumulada nos rins (SYVERSEN & KAUR, 2012), sugerindo que a forma inorgânica eliminada neste órgão é devido à conversão do Met-Hg à forma inorgânica.

Os principais efeitos nefrotóxicos decorrentes da exposição ao Hg têm sido atribuídos ao estresse oxidativo e produção de ROS, além de causar danos no metabolismo mitocondrial e microssomal, alterando a funcionalidade da membrana celular e a polaridade tubular renal (ZALUPS & LASH, 1994).

A produção de ROS constitui uma característica intrínseca ao metabolismo aeróbico e pode ser deletéria aos organismos os devido à oxidação de biomoléculas tais como ácidos nucléicos (DNA), proteínas e lipídeos, dando origem, por exemplo, a mutações genéticas, agregação de proteínas e comprometimento de membranas biológicas, respectivamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

No tecido renal dos animais expostos ao Ino-Hg e Met-Hg foi observada uma superexpressão da enzima SOD, a qual apresenta papel fundamental na manutenção do equilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante dos tecidos, uma vez que sua principal função é metabolizar o radical superóxido, altamente reativo, gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio, reduzindo potencialmente o risco de danos oxidativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; OKADO-MATSUMOTO & FRIDOVICH, 2001). A SOD se distribui predominantemente no citoplasma, mas também se encontra no núcleo, peroxissomo e no espaço intermembrana da mitocôndria (MILLER, 2012; VALENTINE, DOUCETTE & ZITTIN-POTTER, 2005). Um dos mecanismos de toxicidade do mercúrio está relacionado à indução do estresse oxidativo, demonstrado pelo aumento na geração de produtos de peroxidação lipídica, perda de grupamentos sulfidrila, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição das enzimas antioxidantes (AZIRA, BIJUR & WILLIAMS; 1998, SHIMOJO, KUMAGAI & NAGAFUNE, 2002).

Quando as células renais são expostas ao Hg, ocorre uma modificação na função fisiológica da mitocôndria, o que contribui para o aumento da produção de ROS levando a condição de estresse oxidativo, redução do potencial de membrana mitocondrial e alteração na cadeia de transporte de elétrons; o que sugere que as mitocôndrias podem ser uma das organelas alvo para a ação nefrotóxica de Hg

(DREIEM et al., 2005; GAO et al., 2007). Outra enzima, cujo aumento na expressão foi observado no tecido renal dos animais expostos a Hg foi a Peroxiredoxina (PRD), uma proteína com atividade de peroxidase, importante na linha de defesa antioxidante. Assim como a catalase, a PRD catalisa a redução de peróxidos.

O aumento na expressão dessas proteínas sugere que, durante a exposição, houve um aumento da produção de espécies reativas, principalmente do radical superóxido, deslocando o equilíbrio da reação da SOD, no sentido de formação de peróxido de hidrogênio, e este, por sua vez, sendo reduzido por meio do recrutamento de PDR (figura 27). Os resultados do presente trabalho corroboram com outros estudos que reportam que o rim é um órgão que acumula grandes concentrações de Ino-Hg e como consequência ocorre um aumento na atividade de enzimas antioxidantes resultante do acúmulo do metal; aumentando, dessa forma, a capacidade antioxidante das enzimas presentes neste órgão para reduzir os danos provenientes do estresse oxidativo (HUSSAIN et al., 1999).

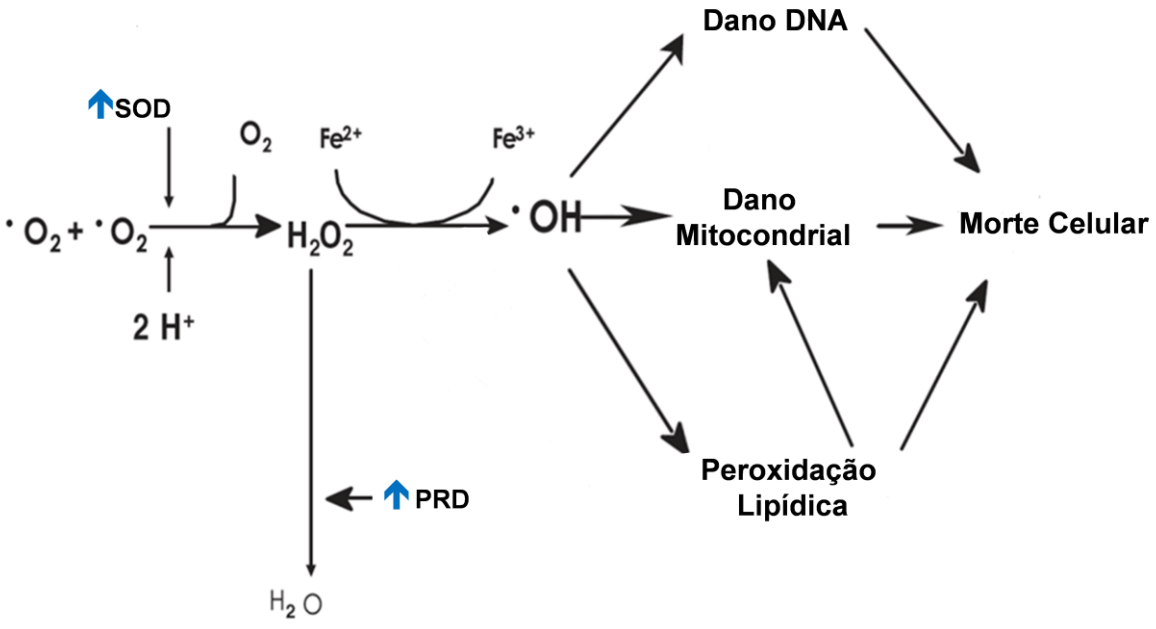

Figura 27. Modelo sugerido para o mecanismo bioquímico de ação do Hg entre as proteínas SOD e PRD e o efeito nefrotóxico. A exposição ao Hg no tecido renal causa um aumento de ROS, o que leva ao aumento na expressão das proteínas SOD e PRD, as quais contribuem para a detoxificação, devido a formação de H_2O_2, produzido pela SOD e, posterior redução com formação de água, pela PRD.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que demonstrou alterações no perfil de expressão de proteínas em diferentes tecidos de ratos (fígado, cérebro e rim), após o tratamento com distintas espécies de Hg (Met-Hg, Et-Hg e Ino-Hg).

No tecido hepático, observou-se que as formas orgânicas de mercúrio (Met-Hg, Et-Hg) contribuíram com 66,6% das alterações no perfil protéico. Dentre as proteínas alteradas, destacaram-se a diminuição na expressão da enzima ATP Sintase e o aumento na expressão da Glutationa S-Trasferase com o objetivo de evitar a formação de ROS, espécies responsáveis pela disfunção mitocondrial e, consequentemente, inibição da produção de ATP.

Com relação ao tecido cerebral, foram observadas diferenças na expressão protéica frente à exposição a todas as formas de Hg, porém com maior ênfase para Met-Hg e Ino-Hg. A exposição ao Met-Hg causou o decréscimo na expressão da proteína Glutamina Sintase, causando o acúmulo de glutamato no neurônio pré-sináptico e na fenda sináptica, causando ativação do receptor NMDA, levando a abertura de um canal de íons, favorecendo o acúmulo de cálcio no neurônio pós-sináptico, causando estresse oxidativo que, por sua vez contribuiu para o aumento na expressão de CALB, com o objetivo de retirar cálcio intracelular e manter a homeostase do sistema.

Apesar de vários estudos apontarem os rins como principal órgão relacionado à forma inorgânica do Hg, no presente estudo foi observado que, o Met-Hg contribuiu com 70% das alterações no perfil protéico renal, com destaque para o aumento na expressão das proteínas Superóxido Dismutase e Peroxiredoxina. O aumento da SOD contribui no processo de detoxificação, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formação de peróxido de hidrogênio, o que, por sua vez provoca o aumento da PRD, a fim de reduzir a ROS formada, produzindo água.

Finalmente, este estudo demonstrou que todas as formas de Hg, promoveram mudanças no perfil protéico em todos os tecidos e, em acordo com a literatura, destacou a capacidade do Met-Hg em alterar um maior número de proteínas quando comparada às outras formas (Et-Hg e Ino-Hg) administradas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, H. DELSINNE, V., GOVAL, J.J. CAUWENBERGEET, A.V. Effect of taxol and okadaic acid on microtubule dynamics in thimerosal-arrested primary mouse oocytes: a confocal study. **Biology of the Cell**, 95, 407-413, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Joint statement of the American Academy of Pediatrics (AAP) and the United States Public Health Service (USPHS). **Pediatrics**, Elk Grove Village, 104, (3), 568-569, 1999.

ARIZA, M.E.; BIJUR, G.N.; WILLIAMS, M.V. Lead and mercury mutagenesis: role of H2O2, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, 31, 352-61, 1998.

ASCHNER M., YAO C.P., ALLEN J.W., TAN K.H. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, 37(2-3):199-206, 2000.

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

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Mercury. **Center for Disease Control**, Atlanta, 676, 2006.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury. **Center for Disease Control**, Atlanta, 676, 1999.

BALDWIN, M.A. Protein identification by mass spectrometry. **Molecular and Cellular Proteomics**, 3, 1–9, 2004.

BALL, L.K.; BALL, R.; PRATT, R.D. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. **Pediatrics**, 107, (5), 1147-1154, 2001.

BALLATORI, N., & CLARKSON, T.W. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. **Toxicological Sciences**, 5(5), 816-831., 1985.

BALLATORI, N., GATMAITAN, Z., & TRUONG, A.T. Impaired biliary excretion and whole body elimination of methylmercury in rats with a congenital defect in biliary glutathione excretion. **Hepatology**, 22(5), 1469-1473, 1995.

BARREGARD, L., REKIĆ, D., HORVAT, M., ELMBERG, L., LUNDH, T., & ZACHRISSON, O. Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. **Toxicological Sciences**, 120, 499-506, 2011.

BASKIN, D.S.; NGO, HOP; DIDENKO, V.V. Thimerosal induces DNA breaks, caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. **Toxicological Sciences**, 74, (2), 361-368, 2003.

BELLIDO T, HUENING M, RAVAL-PANDYA M, MANOLAGAS SC, CHRISTAKOS S. Calbindin D28K is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. **The Journal of Biological Chemistry**. 275, (34), 26328- 26332, 2000.

BERNARD, S., ENAYATI, A., REDWOOD, L., ROGER, H., & BINSTOCK, T. Autism: a novel form of mercury poisoning. **Medical Hypotheses**, 56(4), 462-471, 2001.

BERNARDI, P., COLONNA, R., COSTANTINI, P., ERIKSSON, O., FONTAINE, E., ICHAS, F., MASSARI, S., NICOLLI, A., PETRONILLI, V., SCORRANO, L. The mitochondrial permeability transition. **Biofactors**, 8: 273-281, 1998.

BERNHOFT, R.A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. **Journal of Environmental and Public Health**, 2012, 2011.

BHATTACHARYA, S., BOSE, S., MUKHOPADHYAY, B., SARKAR, D., DAS, D., BANDYOPADHYAY, J., BOSE, R., MAJUMDAR, C., MONDAL, S.& SEN, S. Specific binding of inorganic mercury to Na-K-ATPase in rat liver plasma membrane and signal transduction. **BioMetals**, 10(3), 157-162, 1997.

BLAIR, A., CLARK, B., CLARKE, A.J., WOOD, P. Tissue concentrations of mercury after chronic dosing of squirrel monkeys with thiomersal. **Toxicology**, 3, 171-176, 1975.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, 72, 248-254, 1976.

BRAYDEN, R. M., PEARSON, K. A., JONES, J. S., RENFREW, B. L., & BERMAN, S. Effect of thimerosal recommendations on hospitals' neonatal hepatitis B vaccination policies. **The Journal of Pediatrics**, 138(5), 752-755, 2001.

BURBACHER, T. M., SHEN, D. D., LIBERATO, N., GRANT, K. S., CERNICHIARI, E., & CLARKSON, T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. **Environmental Health Perspectives**, 113, 1015-1021, 2005.

CARNEIRO, M.F.H., GROTTO, D. BARBOSA F. Inorganic and methylmercury levels in plasma are differentially associated with age, gender, and oxidative stress markers in a population exposed to mercury through fish consumption. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 77, (1-3), 69-79, 2014a.

CARNEIRO, M.F.H., SOUZA, J.M.O., GROTTO, D., BATISTA, B.L., SOUZA, V.C.O., BARBOSA, F. A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). **Environmental Research**, 134, 218-227, 2014b.

CASTOLDI, A. F., BARNI, S., TURIN, I., GANDINI, C., & MANZO, L. Early acute necrosys, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscince Research**, New York, 60, 775-787, 2000.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A., PANEK, A., ŻABIŃSKI, Z., MOSZCZYŃSKI, P., & AU, W. W. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutatation Research**, Amsterdam, 586, 102-114, 2005.

CECCATELLI S, DARÉ E, MOORS M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**,188, (2), 301-308, 2010

CHANG LW. *in*. Handbook of Metal Toxicology. 1st edition ed: CRC Press 1995.

CHOI KC, JEUNG EB. Molecular mechanism of regulation of the calcium-binding protein calbindin-D9k,and its physiological role(s) in mammals: A review of current research: Molecular Medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 12, (2), 409-420, 2008.

CHOI, B.H., YEE, S., ROBLES, M. The effects of glutathione glycoside in methyl mercury poisoning. **Toxicology and Applied. Pharmacology**, 141: 357-364, 1996.

CHRISTAKOS, S. & LIU, Y. Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. **Jounal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 89–90, 401-404, 2004.

CLARKSON TW. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, 1:11-23, 110 Suppl, 2002.

CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, London, 36, (8), 609-662, 2006.

CLEMENTS, C.J., BALL, L.K., BALL, R., & PRATT, D., Thiomersal in vaccines. **Lancet**, 355:1279-1280, 2000.

COUNTER, S.A., & BUCHANAN, L.H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 198, (2), 209-230, 2004.

COUNTER, S.A., BUCHANAN, L.H., ORTEGA, F., & LAURELL, G. Elevated blood mercury and neuro-otological observations in children of the Ecuadorian gold mines. **Journal of Environmental and Public Health A**. 65, 149-163, 2002.

CRESPO-LÓPEZ, M.E., DE SA, A.L., HERCULANO, A.M., BURBANO, R.R., & DO NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cells lines of the central nervous systems. **Environmental International**, 33, 141-146, 2007.

DELONG, G. A positive association found between autism prevalence and childhood vaccination uptake across the U.S. population. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 74, n. 14, p. 903-916, 2011.

DÓREA, J.G., FARINA, M., ROCHA, J.B. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, 33, 700-711, 2013.

DÓREA, J.G., MARQUES, R.C., ABREU, L. Milestone Achievement and Neurodevelopment of Rural Amazonian Toddlers (12 to 24 Months) with Different Methylmercury and Ethylmercury Exposure **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 77 (1-3), 1-13, 2014.

DREIEM A, GERTZ C.C., SEEGAL R.F. The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. **Toxicological Sciences**, 87(1):156-162, 2005.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, New York, 62, 649-671, 2000.

DUTCZAK, W.J.; BALLATORI, N. Transport of the glutathione–methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 269, 9746-9751, 1994.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), Inorganic mercury, 2007a.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), Organic mercury, 2007b.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Mercury Study Report to Congress, Volume V.:Health Effects of Mercury and Mercury Compounds, 1997

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury, 2001

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, 1, 529-539, 2001.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, New York, 186, 407-421, 1990.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**, Sendai, 20, 14-19, 2000.

FARINA M., ASCHNER M., ROCHA J.B.T. Oxidative stress in Met-Hg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 256, (3), 405-417, 2011a.

FARINA M., ROCHA J.B.T., ASCHNER M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, 89, (15-16), 555-563, 2011b.

FEATHERSTONE D.E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, 1, (1), 4-12, 2010.

FITZGERALD, W. Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, 80, 245-254, 1995.

GAO, Y., YAN, C.H., TIAN, Y., WANG, Y., XIE, H.F., ZHOU, X. & SHEN, X.M. Prenatal exposure to mercury and neurobehavioral development of neonates in Zhoushan City, China. **Environmental Research**, 105, (3), 390-399, 2007.

GARDNER, R. M., & NYLAND, J. F. Immunotoxic Effects of Mercury. In **Environmental Influences on the Immune System** (pp. 273-302). Springer Vienna, 2016.

GHASEMI, A., & ZAHEDIASL, S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, 10, (2), 486-489, 2012.

GINSBERG, G., SONAWANE, B., NATH, R., LEWANDOWSKI, P. Methylmercury-Induced Inhibition of Paraoxonase-1 (PON1)—Implications for Cardiovascular Risk. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 77, (17), 1004-1023, 2014.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, 56, 174-179, 2003.

GRANDJEAN, P., WHITE, R.F., NIELSEN, A., CLEARY, D., & DE OLIVEIRA SANTOS, E.C. Methylmercury neurotoxicity in Amazon children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, 107, 587-591, 1999.

GRANVOGL, B., PLÖSCHER, M., EICHACKER, L.A. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 389, 991-1002, 2007.

GRAVES P.R., HAYSTEAD T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66, (1), 39-63, 2002.

GROTTO D., BARCELOS G.R.M., GARCIA, S.C., BARBOSA, F. Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. **Archives of Toxicology**, 83, 249-254, 2009.

GROTTO, D. VALENTINI, J., FILLION, M., PASSOS, C.J.S., GARCIA, S.C., MERGLER, D., & BARBOSA, F et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 4, p. 806-811, 2010.

GROTTO, D., VICENTINI, J., ANGELI, J.P.F., LATORRACA, E.F., MONTEIRO, P.A.P., BARCELOS, G.R.M., SOMACAL, S., EMANUELLI, T., BARBOSA, F. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74(3), 487-493, 2011.

GUIMARÃES, J.R.D.& FORTI, M.C. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon. **Ambio**, Oslo, 28, 296-301, 1999.

HALL J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 53, (366), 1-11, 2002.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, 57, 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. **Free Radicals Biology and Medicine**, Oxford: Science Publications, 3, 1999.

HALSEY, N.A. Limiting infant exposure to thimerosal in vaccines and other sources of mercury. **Journal of the American Medical Association**, 282, 1763, 1999.

HARTWIG, A. Current aspects in metal genotoxicity. **Biometals**, Amsterdam, 8, 1-3, 1995.

HAYNEY, M.S. Vaccine safety: no link between thimerosal and autism. **Journal of the American Pharmacists Association**, 44, 725-726, 2004.

HERALD, V.L., HEAZLEWOOD, J.L., DAY, D.A., & MILLAR, A.H., Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria. **FEBS Letters**, 537, (1-3), 96-100, 2003.

HIMI, T., IKEDA, M., SATO, I., YUASA, T., MUROTA, S. Purkinje cells express neuronal nitric oxide synthase after methylmercury administration. **Brain Research**. 718, 189–192, 1996.

HONTANILLA B, PARENT A, DE LAS HERAS S, GIMÉNEZ-AMAYA J.M. Distribution of calbindin D-28k and parvalbumin neurons and fibers in the rat basal ganglia. **Brain Research Bulletin**, 47, (2), 107-116, 1998.

HORNIG, M., CHIAN, D., AND LIPKIN, W.I. Neurotoxic effects of postnatal thimerosal are mouse strain dependent. **Molecular Psychiatry**, 9:833–845, 2004.

HUSSAIN, S., ATKINSON, A., THOMPSON, S. J., & KHAN, A. T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, London, 34, 645-660, 1999.

HVIID, A., STELLFELD, M., WOHLFAHRT, J., & MELBYE, M. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. **Journal of the American Medical Association**, 290, 1763-1766, 2003.

JAMES, S.J., SLIKKER, W., MELNYK, S., NEW, E., POGRIBNA, M., JERNIGAN, S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: Protection with glutathione precursors. **NeuroToxicology**, 26:1–8, 2005.

JIN, X., Chan, H.M., Lok, E., Kapal, K., Taylor, M., Kubow, S. & Mehta, R. Dietary fats modulate methylmercury-mediated systemic oxidative stress and oxidative DNA damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 46, p. 1706-1720, 2008.

JUÁREZ B.I., MARTÍNEZ M.L., MONTANTE M., DUFOUR L., GARCÍA E. & JIMÉNEZ-CAPDEVILLE, M.E. Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 24, (6), 767-771, 2002.

KANITZ, M.H., WITZMANN, F.A., ZHU, H., FULTZ, C.D., SKAGGS, S., MOORMAN, W.J. & SAVAGE, R.E. Alterations in rabbit kidney protein expression following lead exposure as analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, 20, (14), 2977-2985, 1999.

KARLSENA, O.A., SHEEHANB, D., GOKSØYRA, A. Alterations in the Atlantic COD (Gadus morhua) Hepatic Thiol-Proteome After Methylmercury Exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 77: 650-662, 2014.

KERPER, L.E., BALLATORI, N., CLARKSON, T.W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 262, (5 Pt 2), R761-765, 1992.

KEYVANSHOKOOH, S., VAZIRI, B., GHARAEI, A., MAHBOUDI, F., ESMAILI-SARI, A., SHAHRIARI-MOGHADAM, M. Proteome modifications of juvenile beluga (Huso

huso) brain as an effect of dietary methylmercury. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics**. 4, 243-248, 2009.

KLAASSEN, C.D. (8th ed.). *In* Casarett and Doull's Toxicology: **The Basic Science of Poisons**. New York, McGraw-Hill, 2013.

KLENØ, T.G., ANDREASEN, C.M., KJELDAL, H.Ø., LEONARDSEN, L.R., KROGH, T.N., NIELSEN, P.F. & JENSEN, O.N. MALDI MS peptide mapping performance by in-gel digestion on a probe with prestructured sample supports. **Analytical Chemistry**, 76, (13), 3576-3583, 2004.

KOJETIN, D. J., VENTERS, R. A., KORDYS, D. R., THOMPSON, R. J., KUMAR, R., & CAVANAGH, J. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca^{2+} loaded calbindin-D28K. **Nature Structural and Molecular Biology**, 13, (7), 641-647, 2006.

KONDO, K.J. Congenital Minamata disease: warnings from Japan's experience. **Journal of Child Neurology**, Littleton, 15, 458-464, 2000.

KOZMA, L., LENKEY, A., VARGA, E. & GOMBA, S. Induction of renin release from isolated glomeruli by inorganic mercury (II). **Toxicology Letters**, Amsterdam, 85, (1), 49-54, 1996.

KROEMER, G., REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, 6: 513-519, 2000.

KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, 204, 310-317, 1994.

KURIEN, B. T., & SCOFIELD, R. H. Protein blotting: a review. **Journal of Immunological Methods**, 274(1), 1-15, 2003.

KURIEN, B. T., & SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, 38(4), 283-293, 2006.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, (5259), 680-685, 1970.

LEBEL, J., MERGLER, D., LUCOTTE, M., AMORIM, M., DOLBEC, J., MIRANDA, D., & PICHET, P. Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. **Neurotoxicology**, Amsterdam, 7, 157-167, 1996.

LEWIS, C. A., CRISTOL, D. A., SWADDLE, J. P., VARIAN-RAMOS, C. W., & ZWOLLO, P. Decreased immune response in zebra finches exposed to sublethal doses of mercury**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 64(2), 327-336, 2013.

LIMKE, T.L., HEIDEMANN, S.R., ATCHISON, W.D. Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: Are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? **Neurotoxicology**, 25, (5), 741-760, 2004.

LIMKE, T.L., OTERO-MONTAÑEZ, J.K.L., ATCHISON, W.D. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 304, (3), 949-958, 2003.

LUBEC G., KRAPFENBAUER K., FOUNTOULAKIS, M. Proteomics in brain research: Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, 69, (3), 193-211, 2003.

LUQUE-GARCIA, J.L., CABEZAS-SANCHEZ, P., & CAMARA, C. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. **Trends in Analytical Chemistry**, 30, (5), 703-716, 2011.

MAGOS, L. Neurotoxic character of thimerosal and the allometric extrapolation of adult clearance half-time to infants. **Journal of Applied Toxicology**, 23, (4), 263-269, 2003.

MAGOS, L., The absorption, distribution and excretion of methyl mercury. *In*: Eccles, C.U.A., Z. (Ed.) **The Toxicity of Methyl Mercury** The Johns Hopkins University Press, USA, pp. 24-44, 1986.

MAKANI, S., GOLLAPUDI, S., YEL, L., CHIPLUNKAR, S., & GUPTA, S. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. **Genes and Immunity**, 3, (5), 270-278, 2002.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, New York, 77, 73-78, 1998.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, Amsterdam, 424, 83-95, 1999.

MARTINEZ, C.S., ESCOBAR, A.G., TORRES, J.G.D., BRUM, D.S., SANTOS, F.W., ALONSO, M.J., SALAICES, M., VASSALLO, D.V., PEÇANHA, F.M., LEIVAS, F.G., WIGGERS, G.A. Chronic Exposure to Low Doses of Mercury Impairs Sperm Quality and Induces Oxidative Stress in Rats **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 77 (1-3), 143-154, 2014.

MATHESON D.S., CLARKSON T.W., GELFAND E.W. Mercury toxicity (acrodynia) induced by longterm injection of gammaglobulin. **The Journal of Pediatrics**, 97, (1), 153-155, 1980.

MCCABE, M.J., ECKLES, K.G., LANGDON, M., CLARKSON, T.W.,WHITEKUS, M.J., ROSENSPIRE, A.J. Attenuation of Cd95-induced apoptosis by inorganic mercury: Caspase-3 is not a direct target at low levels of Hg^{2+}. **Toxicology Letters**, 155:161–170, 2005.

MCCABE, M.J., WHITEKUS, M.J., HYNN, J., ECKLES, K.G., MCCOLLUM, G., Rosenspire, A.J. Inorganic mercury attenuates CD95-mediated apoptosis by interfering with formation of the death inducing signaling complex. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 190:146–156, 2003.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition**, 130, (4 SUPPL.), 1007S-1015S, 2000.

MILLER I, CRAWFORD J, GIANAZZA E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? **Proteomics**, 6, (20), 5385-5408, 2006.

MILLER, A.F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, 586, (5), 585-595, 2012.

MILLER, I., SERCHI, T., MURK, A.J. & GUTLEB, A.C. The added value of proteomics for toxicological studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, 17: 225-246, 2014.

MILLER, M.W. CLARKSON., T.W. Mercury, Mercurials and Mercaptans. (ed), Charles C. Thomas, USA, 208–240, 1973.

MOLLOY, M.P., HERBERT, B.R., WILLIAMS, K.L., GOOLEY, A.A. Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 20(4-5), 701-704, 1999.

MONTANA, M. VERHAEGHE, P., DUCROS, C., TERME, T., VANELLE, P., & RATHELOT, P. Safety review: squalene and thimerosal in vaccines. **Therapie**, 65, 6, 533-541, 2010.

MORI N, YASUTAKE A, HIRAYAMA K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Archives of Toxicology**, 81, (11), 769-776, 2007.

MORIMOTO RI, SANTORO MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature Biotechnology**, 16, (9), 833-838, 1998.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., & EHRHARDT, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, 9, (6), 255-262, 1988.

NI, M., LI, X., ROCHA, J.B., FARINA, M., ASCHNER, M. Glia and methylmercury neurotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 75, 1091-1101, 2012.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, Atheneu, 2008.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biology and Chemistry**, 276, (4), 388-393, 2001.

ORAM, R.J., DAUM, R.S., SEAL, J.B., LAUDERDALE, D.S. Impact of recommendations to suspend the birth dose of hepatitis B virus vaccine. **Journal of the American Medical Association**, 285, (14), 1874-1879, 2001.

OU, Y.C., WHITE, C.C., KREJSA, C.M., PONCE, R.A., KAVANAGH, T.J., FAUSTMAN, E.M. The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. **Neurotoxicology**, Amsterdam, 20, 793-804, 1999.

OZAWA S, KAMIYA H, TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, 54, (5), 581-618, 1998.

PAGANO, M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. **Analytica Chimica Acta**, 383(1), 119-125, 1999.

PARKER, S.K., SCHWARTZ, B., TODD, J., & PICKERING, L.K. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. **Pediatrics**, 114, (3), 793-804, 2004.

PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24, 503-520, 2008.

PICHICHERO, M.E., GENTILE, A., GIGLIO, N., ALONSO, M.M., MENTABERRI, M.V.F., ZAREBA, G., CLARKSON, T., GOTELLI, C., GOTELLI, M., YAN, L. TREANOR, J. Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. **The Journal of Pediatrics**, 155, (4), 495-499, 2009.

PICHICHERO, M.E., GENTILE, A., GIGLIO, N., UMIDO, V., CLARKSON, T., CERNICHIARI, E., ZAREBA, G., GOTELLI, C., GOTELLI, M., YAN, L., TREANOR, J., Mercury levels in newborns and infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. **Pediatrics**, 121, (2), 208-214, 2008.

PIVOVAROVA, N.B., ANDREWS, S.B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons: Minireview. **FEBS Journal**, 277, (18), 3622-3636, 2010.

PLESS, R., RISHER, J.F. Mercury, infant neurodevelopment, and vaccination. **The Journal of Pediatrics**, 136, (5), 571-573., 2000.

POLLARD, K.M. Cell death, auto-antigen cleavage, and autoimmunity. **Arthritis and Rheumatism**, 46:1699–1720, 2002.

POLLARD, K.M., AND HULTMAN, P. Effects of mercury on the immune system. **Metal Ions in Biological Systems**, 34:421–440, 1997.

PORCIÚNCULA, L.O., ROCHA, J.B.T., TAVARES, R.G., GHISLENI, G., REIS, M., SOUZA, D.O. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport**, 14, (4), 577-580, 2003.

RABILLOUD, T., VALETTE, C., & LAWRENCE, J.J. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. **Electrophoresis**, 15, (12), 1552-1558, 1994.

REYNOLDS, I.J., HASTINGS, T.G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. **Journal of Neuroscience**, 15, (5 I), 3318-3327, 1995.

RICE, K. M., WALKER, E. M., WU, M., GILLETTE, C., & BLOUGH, E. R. Environmental mercury and its toxic effects. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, 47(2), 74-83, 2014.

SANDBORGH-ENGLUND, G, ELINDER, C-G., JOHANSON, G., LIND, B., SKARE, I., EKSTRAND, J. The absorption, blood levels, and excretion of mercury after a single dose of mercury vapor in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, 150, 1, 146-153, 1998.

SANTONI, V., MOLLOY, M., RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?. **Electrophoresis**, 21(6), 1054-1070, 2000.

SANTOS, A.A., HORT, M.A., CULBRETH, M., LÓPEZ-GRANERO, C., FARINA, M., ROCHA, J.B., ASCHNER, M. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2016 doi:10.1016/j. jtemb.2016.03.001,

SARAFIAN, T.A. Methylmercuty-induced generation of free radical: biological implications. **Metal Ions in Biological Systems**, New York, 36, 415-444, 1999.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, Amsterdam, 15, 525-530, 2000.

SCHWARTZ, L.M., SMITH, S.W., JONES, M.E., & OSBORNE, B.A. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90, (3), 980-984., 1993.

SEAL, J. B., DAUM, R. S. What happened to primum non nocere? **Pediatrics**, 107(5), 1177-1178, 2001.

SEGADE, S.R.; TYSON, J.F., Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic

absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent, **Spectrochimica Acta Part B**, 28, 797-807, 2003.

SHANKER, G., SYVERSEN, T., ASCHNER, J.L., & ASCHNER, M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Molecular Brain Research**, 137, (1), 11-22., 2005.

SHAO, Y., YAMAMOTO, M., FIGEYS, D., NING, Z., & CHAN, H. M. Proteomic analysis of cerebellum in common marmoset exposed to methylmercury. **Toxicology Science**, 146: 43-51, 2015.

SHIMOJO, N.; KUMAGAI, Y.; NAGAFUNE, J. Difference between kidney and liver in decreased manganese superoxide dismutase activity caused by exposure of mice to mercuric chloride. **Archives of Toxicology**, 76, 383-387, 2002.

SIUZDAK, G. *In* Mass Spectrometry for Biotechnology, Academic Press, 1996.

SMITH, J.C., ALLEN, P.V., TURNER, M.D., MOST, B., FISHER, H.L., & HALL, L.L. The kinetics of intravenously administered methyl mercury in man. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 128(2), 251-256, 1994.

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

SOLLOME, J., & FRY, R. C. Environmental Contaminants and the Immune System. *In* **Elsevier Inc**., 2015.

SOUZA, V.C.O., DE MARCO, K.C., LAURE, H.J., ROSA, J.C., BARBOSA, F. A brain proteome profile in rats exposed to methylmercury or thimerosal (ethylmercury). **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 2016, doi http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1182003.

STACEY, N.H.; KAPPAS, H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, 63, 29-35, 1982.

STEUERWALD, U., WEIHE, P., JØRGENSEN, P.J., BJERVE, K., BROCK, J., HEINZOW, B., GRANDJEAN, P. Maternal seafood diet, methylmercury exposure and neonatal neurologic function. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 136, p. 599-605, 2000.

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

TAKEUCHI, T., & ETO, K. The Pathology of Minamata Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 58(9), 1027, 1999.

TAN, M; PARKIN, JE. Route of decomposition of thiomersal (thimerosal). **International Journal of Pharmaceutics**, 208, .23-34, 2000.

TANAKA, K., WAKI, H., IDO, Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y., YOSHIDA, T., & MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time? of? flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2(8), 151-153, 1988.

TITZ, B., ELAMIN, A., MARTIN, F., SCHNEIDER, T., DIJON, S., IVANOV, N.V., & PEITSCH, M.C. Proteomics for systems toxicology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 11, (18), 73-90, 2014.

UEHA-ISHIBASHI, T., OYAMA, Y., NAKAO, H., UMEBAYASHI, C., NISHIZAKI, Y., TATSUISHI, T. SEO, H. Effect of thimerosal, a preservative in vaccines, on intracellular Ca^{2+} concentration of rat cerebellar neurons. **Toxicology**, 195, (1), 77-84, 2004.

VALENTINE, S.J.; DOUCETTE, P.A.; ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase sans amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review of Biochemitry**, 74, 563-93, 2005.

VANLINGEN, S., SIPMA, H., DE SMET, P., CALLEWAERT, G., MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., & PARYS, J.B. Modulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate binding to the various inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor isoforms by thimerosal and cyclic ADP-ribose. **Biochemical Pharmacology**, 61, (7), 803-809, 2001.

VERGILIO, C.S., CARVALHO, C.E.V,. MELO, E.J.T. Mercury-induced dysfunctions in multiple organelles leading to cell death. **Toxicology in Vitro**, 29, (1), 63–71, 2015.

WANG, M., WANG, Y., WANG, J., LIN, L., HONG, H., & WANG, D. Proteome profiles in medaka (Oryzias melastigma) liver and brain experimentally exposed to acute inorganic mercury. **Aquatic Toxicology**, 103: 129-139, 2011.

WANG, Y., WANG, H., LI, H., SUN, H. Metallomic and metalloproteomic strategies in elucidating the molecular mechanisms of metallodrugs. **Dalton Transactions**, 44, (2), 437-447, 2015.

WELDON, M.M., SMOLINSKI, M.S., MAROUFI, A., HASTY, B.W., GILLISS, D.L.,BOULANGER, L.L.,BALLUZ, L.S., AND DUTTON, R.J. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. **Western Journal of Medicine**, 173:15–18, 2000.

WHITEKUS, M.J., SANTINE, R.P., ROSENSPIRE, A.J., AND MCCABE, M.J.. Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells. **The Journal of Immunology**, 162:7162–7170, 1999.

WHO (World Health Organization), Elemental mercury and inorganic mercury compounds: **Human Health Aspects**, Genebra, 2003.

WHO (World Health Organization). Methylmercury. **Environmental Health Criteria 101**, Genebra, 1990.

WILCE, M. C., PARKER, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1205(1), 1-18, 1994.

WILKINS, M.R., SANCHEZ, J.C., GOOLEY, A.A., APPEL, R.D., HUMPHERY-SMITH, I., HOCHSTRASSER, D.F., & WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13, (1), 19-50, 1996.

WILSON, K. & WALKER, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge university press, 2010.

XU, F., FARKAS, S., KORTBEEK, S., ZHANG, F. X., CHEN, L., ZAMPONI, G. W., & SYED, N. I. Mercury-induced toxicity of rat cortical neurons is mediated through N-methyl-D-Aspartate receptors. **Molecular Brain**, 5(1), 1, 2012.

YAGINUMA-SAKURAI, K., MURATA, K., IWAI-SHIMADA, M., NAKAI, K., KUROKAWA, N., TATSUTA, N., & SATOH, H. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. **The Journal of Toxicological Sciences**, 37, (1), 123-130, 2012.

YANG, J.W., CZECH, T., LUBEC, G. Proteomic profiling of human hippocampus. **Electrophoresis**, 25, (7-8), 1169-1174, 2004.

YANG, J.W., RODRIGO, R., FELIPO, V., LUBEC, G. Proteome analysis of primary neurons and astrocytes from rat cerebellum. **Journal of Proteome Research**, 4, (3), 768-788, 2005.

YEE, S., CHOI, B.H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **Neurotoxicology**, 17, (1), 17-26, 1996.

YIN, Z., MILATOVIC, D., ASCHNER, J.L., SYVERSEN, T., ROCHA, J.B., SOUZA, D. O., ASCHNER, M. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. **Brain Research**, 1131, (1), 1-10, 2007.

YU, L.R., CONRADS, T.P., UO, T., KINOSHITA, Y., MORRISON, R.S., LUCAS, D. A., VEENSTRA, T.D. Global analysis of the cortical neuron proteome. **Molecular and Cellular Proteomics**, 3, (9), 896-907, 2004.

ZALUPS, R.K. & LASH L.H. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 42 (1), 1-44, 1994.

ZALUPS, R.K. *In*: Molecular Biology and Toxicology of Metals. 1st edition ed: CRC Press, 2000.

ZALUPS, R.K., & BRIDGES, C.C. Relationships between the renal handling of DMPS and DMSA and the renal handling of mercury. **Chemical Research in Toxicology**, 25, (9), 1825-1838, 2012.

ZAREBA, G., CERNICHIARI, E., HOJO, R., NITT, S.M., WEISS, B., MUMTAZ, M. M., CLARKSON, T.W. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury. **Journal of Applied Toxicology**, 27, (5), 511-518, 2007.

ZIMMERMANN, L.T, SANTOS, D.B., COLLE,D., SANTOS, A.A., HORT, M.A., GARCIA, S.C., BRESSAN, L.P., BOHRER, D., FARINA, M. Methionine Stimulates Motor Impairment And Cerebellar Mercury Deposition in Methylmercury-Exposed Mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 77, (1-3), 46-56, 2014.

ZIMMERMANN, L.T., SANTOS, D.B., NAIME, A.A., LEAL, R.B., DÓREA, J.G., BARBOSA, F., & FARINA, M., Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. **Neurotoxicology**, 38C, 1-8, 2013.

ZUIDEMA, J., KADIR, F., TITULAER, H.A.C., & OUSSOREN, C. Release and absorption rates of intramuscularly and subcutaneously injected pharmaceuticals (II). **International Journal of Pharmaceutics**, 105, 189-207, 1994.

8. ANEXOS

8.1 Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1268.53.1), intitulado "Análise Proteômica em Tecidos de Ratos Expostos às Diferentes Formas de Mercúrio", de autoria de **Vanessa Cristina de Oliveira Souza** e de **Fernando Barbosa Junior,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.12.2012.

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1268.53.1), entitled: "Proteomic Analysis in Tissues of Rats Exposed to Different Forms of Mercury", by **Vanessa Cristina de Oliveira Souza** and **Fernando Barbosa Junior,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December, 10 2012.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964

8.2 Artigo Aceito para Publicação

SOUZA, V.C.O., DE MARCO, K.C., LAURE, H.J., ROSA, J.C., BARBOSA, F. A brain proteome profile in rats exposed to methylmercury or thimerosal (ethylmercury). **Journal of Toxicology and Environmental Health A** DOI: http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1182003, 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES