

Heloisa Ghizoni

**EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS  $\omega$ -3 NA NEUROTOXICIDADE  
INDUZIDA POR METILMERCÚRIO EM CAMUNDONGOS**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica, da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo  
Farina  
Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Patricia de  
Souza Brocardo

Florianópolis  
2017

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

Ghizoni, Heloisa

Efeitos dos ácidos graxos w-3 na neurotoxicidade induzida por metilmercúrio em camundongos / Heloisa Ghizoni ; orientador, Marcelo Farina ; coorientadora, Patrícia de Souza Brocardo. - Florianópolis, SC, 2017. 128 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Bioquímica . 3. Ácidos graxos poli insaturados w-3. 4. Metilmercúrio. I. Farina, Marcelo. II. Brocardo, Patrícia de Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.





*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ângela e Marcelo, que nunca mediram esforços para permitir que eu lutasse pelos meus objetivos e sonhos, com muito carinho e compreensão me mostraram o valor das conquistas ao longo desta jornada. Aos meus queridos irmãos, Henrique e Carolina e ao querido Fábio (in memoriam) que sempre me encorajaram e incentivaram a seguir em frente. Palavras jamais serão suficientes para expressar minha gratidão!  
Amo vocês incondicionalmente.*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, sempre tão generoso, me permitiu essa importante conquista, que representou muito mais que um amadurecimento profissional, um crescimento pessoal inestimável.

Aos meus avós, Nereu, Luci e Solange, minha tia Helenice e minha querida amiga-equipe Prof. Eliane, pelo carinho, apoio e torcida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Farina, que me recebeu em seu laboratório e me confiou a realização deste trabalho. Sua dedicação, competência e profissionalismo são exemplos para todos. Você terá sempre minha gratidão pelo meu crescimento em muitos aspectos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Patricia de Souza Brocardo pela amizade, competência, paciência, dedicação e valiosas contribuições para este trabalho! Minha gratidão e carinho serão eternos!

Aos amigos-colegas maravilhosos que a pós-graduação me presenteou: Cinara, Juliana, Viviane, Débora, Aline, Dirleise, Danúbia, Diones, Mark, Sthéfani, Ariana, Vivian, Felipe, Ana Cristina, Priscila, Marcos, Mariana e tantos outros que foram fundamentais para que a jornada fosse agradável e divertida! Sentirei muitas saudades de vocês!

Ao meu braço-direito, amiga e companheira de tanto momentos, Marina. Tua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada por pegar firme com tanta competência e comprometimento!

A minha amiga-irmã Waleska, pela amizade, carinho, força e suporte irrestritos ao longo destes 12 anos de minhas risadas e lágrimas! Obrigada por tudo amiga!!!

A minha querida amiga Larissa, que mesmo de (muito) longe sempre demonstrou muito carinho e suporte ao longo do caminho!

Ao meu amado namorado Nilton, por todo carinho, apoio e paciência nesta reta final da pós-graduação. Teu amor e suporte foram muito importantes para esta conquista, muito obrigada!

Aos técnicos do LAMEB I e II, Emily, Chirle, Vanessa, Bibiana, Denis e Demétrio pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Aos professores do PPG em Bioquímica da UFSC, responsáveis pela minha formação acadêmica e científica.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.





## RESUMO

O Metilmercúrio (MeHg) é um poluente ambiental produzido por bactérias redutoras no ambiente aquático e bioacumulado na cadeia alimentar aquática. Logo, a principal fonte de exposição do homem ao MeHg ocorre pela ingestão de peixes e frutos do mar contaminados. Uma vez ingerido, o MeHg é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e causar efeitos deletérios ao sistema nervoso central (SNC). O SNC em desenvolvimento é mais susceptível às ações deletérias do MeHg em relação ao do adulto; enquanto que no adulto a exposição causa danos a áreas restritas do SNC, a exposição durante o desenvolvimento causa danos neurológicos mais difusos e generalizados e as consequências destes danos podem persistir até a vida adulta. Por outro lado, os pescados representam uma importante fonte de nutrientes, dentre os quais destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) do tipo  $\omega$ -3, principalmente os ácidos docosahexaenóico (DHA) e o eicosapentaenóico (EPA), importantes constituintes do SNC. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos dos AGPI do tipo  $\omega$ -3 (DHA e EPA), presentes no óleo de peixe, na modulação da neurotoxicidade induzida pela exposição gestacional e lactacional ao MeHg em filhotes com 22 dias de vida e em adultos com 3 meses de idade. Além disto, investigou-se o efeito de uma segunda exposição ao MeHg em animais adultos expostos ao MeHg e/ou aos AGPIs  $\omega$ -3 durante o desenvolvimento. Fêmeas prenhas de camundongos *Swiss* foram divididas em 4 grupos experimentais; o grupo i recebeu água potável e ração controle, o grupo ii recebeu solução de MeHg via água de beber e ração controle, o grupo iii recebeu água potável e ração enriquecida com óleo de peixe e o grupo iv recebeu ração enriquecida com óleo de peixe e a solução de MeHg via água de beber. Os tratamentos foram veiculados durante os períodos gestacional e de lactação (totalizando 6 semanas). No 21º dia pós-natal (PN 21), os animais foram desmamados e 4 filhotes de cada ninhada foram separados para as análises comportamentais, bioquímicas e morfológicas. A coordenação motora dos animais foi prejudicada e a atividade hipocampal da enzima glutatona peroxidase (GPx) foi diminuída pela exposição ao MeHg e a dieta enriquecida com AGPIs  $\omega$ -3 não foi capaz de reverter estes danos. O perfil lipídico plasmático e parâmetros de estresse oxidativo não foram afetados pelos tratamentos. A exposição perinatal (período de gestação e lactação) isolada à ração enriquecida com óleo de peixe aumentou a atividade do complexo mitocondrial I, sem alterar a atividade do complexo II. Já o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na homeostase sináptica,

histogênese e a imunomarcção para proteína fibrilar ácida glial (GFAP-gliose) não mostraram alterações significativas nos filhotes expostos perinatalmente ao MeHg e/ou ração enriquecida com óleo de peixe. O efeito a longo prazo do MeHg e/ou ração enriquecida com óleo de peixe foram avaliados em camundongos machos na vida adulta. Os animais foram alimentados com dieta padrão desde o desmame e, a partir da 10ª semana de vida, foram submetidos a uma segunda exposição ao MeHg via gavagem durante 14 dias. Após 24h do término do tratamento na vida adulta, os camundongos foram avaliados por testes comportamentais e, no dia seguinte, conduzida a eutanásia para coleta de sangue e a dissecação do cerebelo e hipocampo. A exposição perinatal ao MeHg *per se* causou prejuízo na locomoção e exploração e a dieta enriquecida com óleo de peixe combinada ao MeHg no período perinatal protegeu do dano locomotor em adultos. A exposição ao MeHg na fase adulta prejudicou a coordenação, locomoção e exploração, exceto nos animais que já haviam sido expostos perinatalmente ao MeHg, sugerindo uma possível adaptação a este toxicante. A exposição ao MeHg na vida adulta causou hipercolesterolemia nos animais, exceto nos camundongos expostos perinatalmente aos AGPIs  $\omega$ -3 via dieta materna, sugerindo um efeito benéfico na vida adulta. Ainda, o tratamento com MeHg na fase adulta diminuiu a atividade da GPx cerebelar nos animais, exceto nos que já haviam sido tratados perinatalmente com MeHg. Por fim, a exposição concomitante ao MeHg e à ração enriquecida com óleo de peixe levou a um maior acúmulo de Hg no cerebelo a longo prazo e a reexposição ao MeHg na fase adulta, exacerbou esta resposta. Em conjunto, estes resultados indicam que a exposição perinatal ao MeHg e aos ácidos graxos  $\omega$ -3 podem modular respostas a longo prazo e a susceptibilidade frente a uma nova exposição ao MeHg em animais adultos.

**Palavras-chave:** Metilmercúrio, Ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3, Neurotoxicidade.

## ABSTRACT

Methylmercury (MeHg), an organic mercurial, is a well-known toxic compound present in the environment and originated through the methylation of inorganic mercury by sulfate-reducing bacteria in the aquatic environment. MeHg bioaccumulates and biomagnifies in the aquatic food chain; being the fish intake the main source of MeHg exposure. The central nervous system (CNS) is the primary target of MeHg toxicity and the developing brain is highly sensitive to MeHg exposure. Otherwise, fish and shellfish are important sources of several nutrients, such as n-3 fatty acids (PUFAs), particularly the eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, which play important role in the CNS during pre and postnatal development. We investigated the potential neuroprotective effects of an enriched diet with n-3 fatty acids against the neurotoxic effects of prenatal exposure to MeHg. Animals were exposed *in utero* until postnatal day (PND) 21 to both MeHg and n-3 fatty acids. Moreover, an additional group received a second MeHg-exposure during adulthood (PND 84). Pregnant mice (GD 1) were randomly settled in 4 experimental groups: (i) Control (tap water and standard chow); (ii) MeHg (diluted in the water); (iii) n-3 enriched diet (tap water and a fish oil enriched-chow) and (iv) n-3+MeHg (a fish oil enriched-chow + MeHg diluted in the water). Treatments were performed throughout gestational and lactation periods (GD 1 to PND 21) and offspring were weaned at PND 21. Twenty-four hours after weaning (PN 22), pups were evaluated through behavioral tests, biochemical, histological and immunohistochemical analyzes. Motor coordination and hippocampal glutathione peroxidase (GPx) activity were impaired by MeHg exposure during development and n-3 enriched-diet was not able to protect these alterations. Perinatal exposure to n-3 enriched-diet per se increased the activity of the mitochondrial complex I, but did not change the activity of complex II. To analyze the long-lasting neurotoxic effects of exposure to MeHg during development and to evaluate the second exposure in the adulthood to MeHg an additional group were made. The animals from each litter were fed with standard diet until PND 70, whereas half of the animals were submitted to a second exposure to MeHg via gavage for 14 days (until PN 84). Twenty-four hours after the last gavage, the adult mice were evaluated by behavioral tests and, on the next day, euthanasia was performed for blood collection and the cerebellum and hippocampal structures were removed for biochemical analyses. Exposure to MeHg during development caused a long-lasting impairment in locomotion and exploration and exposure to n-3 enriched-diet

prevented these alterations in adult mice. Exposure to MeHg during adulthood impaired coordination, locomotion and exploration, except in animals that had been exposed previously to MeHg during development, suggesting a possible adaptation to this effect. Interestingly, acute exposure to MeHg in adult mice caused hypercholesterolemia, except in mice exposed during the development to n-3 acids via maternal diet, suggesting a long-lasting beneficial effect. Moreover, MeHg treatment to mice during adulthood reduced the activity of cerebellar GPx, except in those animals that had already been exposed perinatally to MeHg. Finally, prenatal exposure to MeHg combined with the n-3-enriched diet increased cerebellar Hg accumulation in adult mice and a second exposure to MeHg exacerbated this effect. Taken together, these results indicate that perinatal exposure to MeHg and n-3 fatty acids may promote a long-lasting behavioral and biochemical modulation on responses and susceptibility to an adult exposure to MeHg in adult animals.

**Keywords:** Methylmercury, n-3 fatty acids, Neurotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biogeoquímico do mercúrio (Hg) no meio ambiente.....	21
<b>Figura 2:</b> Esquema da citoarquitetura dos neurônios presentes no córtex do cerebelo.....	26
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática das células da glia de Bergmann e do cerebelo.....	27
<b>Figura 4:</b> Metabolismo dos AGPIs da série $\omega$ -3.....	31
<b>Figura 5:</b> Linha do tempo descritiva do protocolo experimental I.....	39
<b>Figura 6:</b> Linha do tempo descritiva do protocolo experimental II.....	40
<b>Figura 7:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 no peso corporal das mães e filhotes.....	50
<b>Figura 8:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 no comportamento locomotor e exploratório em filhotes.....	51
<b>Figura 9:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 na coordenação motora e força neuromuscular em filhotes.....	52
<b>Figura 10:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 na atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) em filhotes.....	54
<b>Figura 11:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 na atividade dos complexos mitocondriais em filhotes.....	56
<b>Figura 12:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 na fosforilação da proteína sinapsina e imunocnteúdo das proteínas sinapsina, sinaptofisina, PSD-95 e 4-HNE em filhotes.....	58
<b>Figura 13:</b> Efeitos da exposição materna ao MeHg e/ou AGIP do tipo $\omega$ -3 na coloração da técnica histológica de Azul de Toluidina no cerebelo de filhotes.....	60
<b>Figura 14:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou AGIP do tipo $\omega$ -3 sobre a imunomarcção para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no cerebelo dos filhotes.....	62
<b>Figura 15:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) na atividade locomotora e exploratória em machos adultos (3 meses de vida).....	64
<b>Figura 16:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs no desempenho motor no teste da barra giratória ( <i>rotarod</i> ) e sobre a força neuromuscular no teste da grade invertida em machos adultos (3 meses).....	66
<b>Figura 17:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs no perfil lipídico em machos adultos (3 meses de vida).....	68
<b>Figura 18:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs na atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) em machos adultos (3 meses de vida).....	70

**Figura 19.** Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs na atividade dos complexos mitocondriais em machos adultos (3 meses de vida).....74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição centesimal da ração padrão AIN-93G e da ração enriquecida com óleo de peixe produzidas pela empresa Rhooster® (Araçoiaba da Serra/ SP).....	37
<b>Tabela 2:</b> Ingestão materna diária de ração (gramas) ao longo dos períodos de gestação e lactação nos grupos experimentais.....	48
<b>Tabela 3:</b> Ingestão materna diária de líquidos (mililitros) ao longo dos períodos de gestação e lactação nos grupos experimentais.....	49
<b>Tabela 4:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 no perfil lipídico em filhotes.....	53
<b>Tabela 5:</b> Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos $\omega$ -3 sobre parâmetros de estresse oxidativo em filhotes.....	55
<b>Tabela 6:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs sobre parâmetros de estresse oxidativo em machos adultos (3 meses de vida).....	72
<b>Tabela 7:</b> Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs nos níveis de Hg no cerebelo em machos adultos (3 meses de vida).....	77





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPIs	Ácidos graxos poli-insaturados
AIN-93G	Ração purificada para crescimento, gestação e lactação
AIN-93M	Ração purificada para manutenção para adultos
ALA	3- $\alpha$ -linolênico
ANOVA	Análise de variância
AREs	Elementos de resposta antioxidante
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina de soro bovino
C I	Complexo mitocondrial I
C II	Complexo mitocondrial II
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CG	Camada granular
CGB	Células da glia de Bergmann
CM	Camada molecular
CP	Camada das células de Purkinje
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DAB	3,3-diaminobenzidina
DG	Dia gestacional
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DTNB	Ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
ERK	Proteínas cinases regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GLUT-1	Transportador de glicose-1
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona s-transferase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hg	Mercúrio
4-HNE	4-hidroxi-nonenal

LAT-1	Transportador de aminoácidos neutros-1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBP	Proteína básica de mielina
MDA	Malondialdeído
MDR-1	Gene de resistência multidroga-1
MeHg	Metilmercúrio
MRP-1	Proteína de resistência multidroga-1
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NPSH	Tióis não-proteicos
Nrf2	Fator de transcrição Nrf2
NSE	Enolase neurônio-específica
PBS	Tampão fosfato salino
PFA	Paraformaldeído
PN	Dia pós-natal
PSD-95	Proteína pós-sináptica de densidade 95
RNA	Ácido ribonucleotídeo
SeH	Grupo selenol
SH	Grupo tiol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
$\omega$ -3	$\omega$ 3

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Metilmercúrio e Neurotoxicidade .....	21
1.2 Cerebelo .....	25
1.3 Ácidos graxos poli-insaturados $\omega$ -3 e SNC.....	28
1.3 MeHg versus AGPIs $\omega$ -3 .....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS .....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1 Animais .....	39
4.2 Protocolo experimental 1 - exposição perinatal ao MeHg e/ou óleo de peixe.....	39
4.3 Protocolo experimental 2 – exposição adulta ao MeHg em animais expostos ou não ao MeHg e/ou óleo de peixe no período perinatal .....	41
4.4 Análises Comportamentais.....	43
4.4.1 Teste do campo aberto .....	43
4.4.2 Teste da barra giratória ( <i>Rotarod</i> ).....	43
4.4.3 Teste da inversão da grade ( <i>hang test</i> ) .....	43
4.5 Análises Bioquímicas.....	44
4.5.1 Análise de perfil lipídico plasmático.....	44
4.5.2 Preparação de extrato dos tecidos cerebrais .....	44
4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes .....	45
4.5.4 Atividade dos complexos mitocondriais .....	45
4.5.5 Determinação dos níveis de tióis-não proteicos .....	45
4.5.6 Determinação da concentração de MDA.....	45
4.5.7 <i>Western blot</i> .....	46
4.5.8 Dosagem de proteínas .....	47

4.5.9 Determinação dos níveis de mercúrio.....	47
4.6 Análise histológica .....	48
4.6.1 Análise morfológica e morfométrica.....	48
4.6.2 Análise imunohistoquímica .....	48
4.7 Análise estatística .....	49
5. Resultados .....	51
5.1 Protocolo experimental 1: exposição perinatal ao MeHg e/ou óleo de peixe .....	51
5.2 Protocolo experimental 2 – exposição adulta ao MeHg em animais expostos ou não ao MeHg e/ou óleo de peixe no período perinatal .....	66
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES.....	101
8. REFERÊNCIAS .....	105

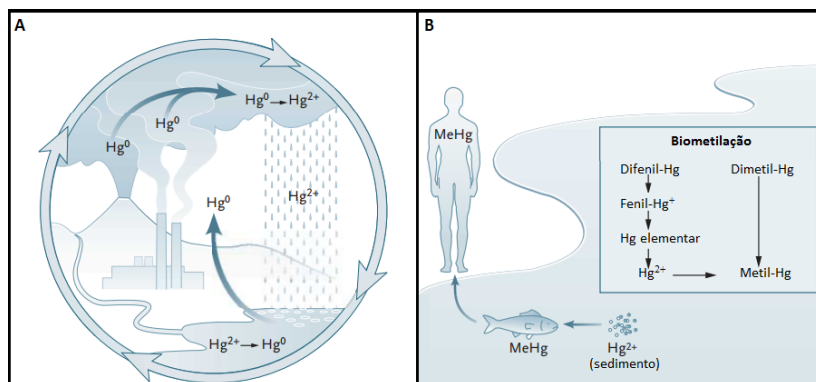
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Metilmercúrio e Neurotoxicidade

O mercúrio (Hg) é um elemento químico pertencente à família dos metais de transição e considerado um poluente ambiental, presente no meio ambiente em decorrência de eventos naturais, como erupção vulcânica e evaporação da superfície terrestre, queima de combustíveis fósseis, além das fontes antropogênicas, como emissão industrial e exploração de minério (Clarkson *et al*, 2003; Tchounwou *et al*, 2003). Este elemento é encontrado na natureza sob três formas químicas: o mercúrio elementar, compostos inorgânicos de mercúrio e os compostos orgânicos de mercúrio, como o metilmercúrio, uma forma altamente tóxica (Rooney, 2007; Guzzi & La Porta, 2008).

Uma vez depositado nos sedimentos marinhos, o mercúrio é biometilado na forma de metilmercúrio (MeHg) pela ação de bactérias redutoras no ambiente aquático, sendo este ingerido pelos organismos vivos e bioacumulado na escala trófica aquática. Sendo assim, a principal fonte de exposição do homem ao MeHg ocorre pela ingestão de peixes e outros frutos do mar contaminados, particularmente espécies predadoras que estão acima na cadeia trófica (**Figura 1**) (Clarkson *et al*, 2003; Bradberry, 2012; Gil & Gil, 2015).

**Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio (Hg) no meio ambiente**



(A) Ciclo do Hg proveniente dos eventos naturais e atividades antropogênicas. (B) Exposição e via de conversão do Hg inorgânico ( $Hg^{2+}$ ) em MeHg. Adaptado de Clarkson *et al*, 2003.

Uma vez ingerido, cerca de 90-95% do MeHg é absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído para os tecidos pela corrente sanguínea em até 4 dias após sua ingestão, sendo que a meia-vida do MeHg no organismo varia de 20 a 70 dias (WHO, 1990). A eliminação do MeHg do organismo ocorre via bile e fezes, na forma demetilada, pela ação de bactérias da flora intestinal (Tchounwoun *et al*, 2003). Embora seja distribuído por todos os tecidos, o sistema nervoso central (SNC) é o alvo primário da ação deste metal no organismo, pois o MeHg prontamente atravessa a barreira hematoencefálica (via transportadores de aminoácidos neutros, o LAT-1), alcança as células neuronais e gliais e promove seus efeitos neurotóxicos (Counter & Buchanan, 2004; Farina *et al*, 2011a, Zimmermann *et al*, 2013). No compartimento intracelular, o MeHg interage com os grupos tiol (-SH) e selenol (-SeH), de característica nucleofílica, presentes nas moléculas biológicas. Como principal consequência desta interação, ocorre a diminuição de algumas defesas antioxidantes das células, já que muitas destas são agentes redutores (por exemplo, glutatona), de forma a aumentar a geração e diminuir a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), consequentemente levando ao estresse oxidativo (Halliwell, 2009; Jimenez-Del-Rio & Velez-Pardo, 2012).

A glutatona é um tripeptídeo com importante ação antioxidante e se encontra nos organismos nas formas oxidada (GSSG) e reduzida (GSH). Este peptídeo atua conjuntamente a enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona S-transferase (GST). A enzima glutatona redutase (GR) tem um papel importante neste cenário, pois é responsável por reduzir a GSSG a GSH às custas de elétrons do NADPH (Dringen *et al*, 2005). A enzima GPx-1 (isoenzima da grande família das glutatona peroxidases) é uma selenoenzima citoplasmática que apresenta em sua estrutura um grupo selenol, cuja função é auxiliar na detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando GSH como substrato da reação (Hiragi *et al*, 2011). Juntamente com as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxiredoxinas, o sistema antioxidante da glutatona constitui um importante mecanismo de defesa celular (Halliwell & Gutteridge, 1999; Farina *et al*, 2011b).

Acredita-se que a geração das EROs represente um dos principais mecanismos de toxicidade celular promovido pelo MeHg no SNC, o qual relaciona-se à sua afinidade aos grupos tióis e selenóis, culminando com a depleção de GSH e demais defesas antioxidantes nucleofílicas das células neurais (Farina *et al*, 2011b). Neste contexto, já foi demonstrado que a exposição ao MeHg é capaz de reduzir a atividade da GPx-1 em modelos animais e cultura de células neuronais, além de

promover um aumento na geração de EROs e peroxidação lipídica, diminuir a viabilidade celular, aumentar no índice de apoptose e alterar no metabolismo de neurotransmissores (Carvalho *et al*, 2007; Mori *et al*, 2007; Farina *et al*, 2009; Franco *et al*, 2009; Bellum *et al*, 2013; Zemolin *et al* 2012; Xu *et al*, 2012; Agrawal *et al*, 2015).

Em células da glia, como astrócitos e microgliócitos, o MeHg também promove toxicidade, através do aumento na produção de EROs, levando a diminuição na razão GSH/GSSG (Aschner *et al*, 2000, 2007; Garg & Chang, 2006; Kaur *et al*, 2008a; Ni *et al*, 2010, 2012) e inibição na captação de glutamato pelos astrócitos, gerando citotoxicidade neuronal (Aschner *et al*, 1993, 2000). Foi demonstrado também alteração da homeostase intracelular de  $Ca^{2+}$  (Farina *et al*, 2011a) e aumento na produção microglial de citocinas pró-inflamatórias após a exposição ao MeHg (Garg & Chang, 2006; Chang, 2007; Bassett *et al*, 2012; Shinozaket *al*, 2014). Ainda, em cultura celular de gliócitos e neuroblastomas, o estresse oxidativo provocado pelo MeHg aumenta a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2 (Wang *et al*, 2009; Ni *et al*, 2010, 2011; Toyama *et al*, 2007, 2011; Farina *et al*, 2011; Hwang, 2012). A ligação do Nrf2 a regiões específicas do DNA (Elementos de Resposta Antioxidante – AREs) inicia a transcrição de genes citoprotetores, como aqueles que codificam enzimas antioxidantes e de detoxificação de xenobióticos, além de proteínas envolvidas em vias anti-inflamatórias (Kensler & Wakabayashi, 2010; Wakabayashi *et al*, 2010).

Como anteriormente mencionado, o SNC é o principal alvo da ação do MeHg. O SNC fetal e neonatal, ainda em intenso desenvolvimento, é mais susceptível às ações deletérias deste poluente em relação ao adulto (Costa *et al.*, 2004; Grandjean *et al*, 2014). Ao passo que no adulto a exposição a este contaminante causa danos em áreas restritas do SNC, como em neurônios do córtex visual e da camada granular no cerebelo (Castoldi *et al*, 2001; Carvalho *et al*, 2007), a exposição durante o período fetal causa danos neurológicos mais difusos e generalizados (Oken & Bellinger, 2008). Isto porque, durante esta fase crucial de desenvolvimento, o MeHg é capaz de inibir a proliferação e migração das células neuronais e gliais, além de prejudicar a arquitetura celular do cérebro e o cerebelo em formação (Castoldi *et al*, 2001; Sass *et al*, 2001).

Em modelos experimentais, a exposição gestacional ao MeHg prejudica a ontogênese pós-natal do sistema antioxidante da glutationa no encéfalo, causando diminuição da atividade de GPx e GR e, conseqüentemente, aumento da peroxidação lipídica (Stringari *et al*, 2008). A exposição ao MeHg durante este período também inibe a

atividade da CAT e GPx no córtex cerebral e cerebelo em animais adultos (Lucena *et al*, 2010). Durante o período pós-natal inicial (animal lactente), no qual a gliogênese é acentuada, o MeHg pode aumentar a liberação e captação de glutamato pelos astrócitos (Farina *et al*, 2003). Ainda neste período, a exposição ao MeHg através do leite diminui os níveis de GSH no cerebelo dos filhotes enquanto que, nas mães, há um aumento dos níveis de GSH e da atividade cerebelar de GR, além de aumentar o nível tecidual de Hg em ambos filhotes e mães (Franco *et al*, 2006).

A exposição perinatal ao MeHg, durante as fases de gestação e lactação, por sua vez, promove acúmulo de Hg preferencialmente no cerebelo, seguidos do hipocampo e córtex cerebral (Cheng *et al*, 2015). Além disto, causa alterações histológicas no cerebelo, como aparecimento de gliose, aumento na densidade de astrócitos e glia de Bergmann (Roda *et al*, 2008) e localização heterotópica de células granulares e de Purkinje em ratos jovens (Sakamoto *et al*, 2002). Ainda, leva à diminuição na expressão de sinaptofisina nas células granulares cerebelares (Fujimura *et al*, 2012) e induz inflamação nesta estrutura (Zhang *et al*, 2011), sugerindo um efeito citotóxico sobre o cerebelo. Além disto, a coordenação motora e aprendizado, nos quais as estruturas de cerebelo e hipocampo estão envolvidas, também podem ser afetados pela exposição perinatal ao MeHg em roedores jovens e adultos (Sakamoto *et al*, 2002; Goulet *et al*, 2003; Weiss *et al*, 2005; Carratú *et al*, 2008; Yoshida *et al*, 2008; Sitarek & Gralewicz, 2009; Fujimura *et al*, 2012; Bisen-Hersh *et al*, 2014). Por fim, a administração pré-natal de MeHg promove estresse oxidativo no hipocampo pela diminuição da atividade das enzimas SOD, GPx e CAT e aumento de EROs em animais neonatos e adultos (Vicente *et al*, 2004; Falluel-Morel *et al*, 2007), bem como aumento da apoptose e redução da neurogênese pós-natal nesta estrutura plástica (Burke *et al*, 2006; Falluel-Morel *et al*, 2007).

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos têm sugerido uma forte associação entre a exposição perinatal ao MeHg e prejuízos em crianças onde a alimentação materna foi rica em pescados. Isto porque o MeHg pode ser transferido para os fetos e neonatos via placenta e leite materno, respectivamente (Grandjean *et al*, 1994; Sakamoto *et al*, 2002; Björnberg *et al*, 2005; Manfroi *et al*, 2004; Franco *et al*, 2006). Os principais achados destes estudos populacionais apontam desde danos sutis no neurodesenvolvimento a prejuízos na atenção, cognição e no desenvolvimento intelectual, bem como alterações comportamentais, locomotoras e visuais (Grandjean *et al*, 1997, 2014; Crump *et al*, 1998; Counter & Buchanan, 2004; Axelrad *et al*, 2007; Boucher *et al*, 2010;



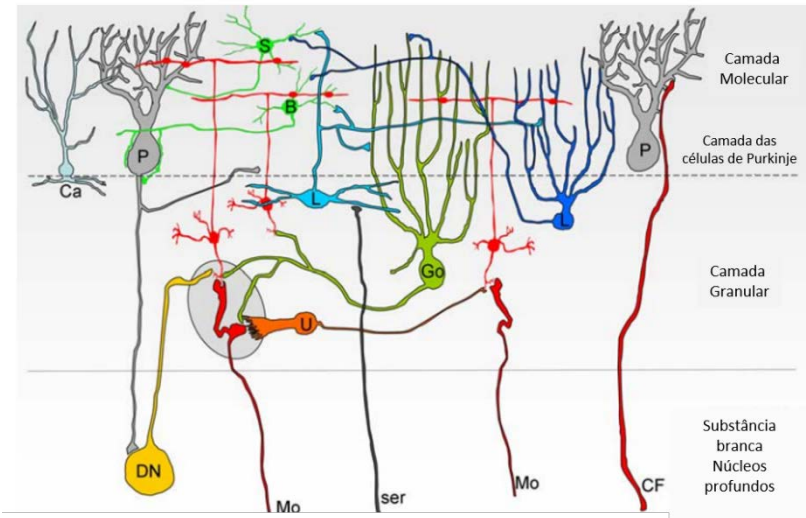
Zeilmaker *et al*, 2013; Marques *et al*, 2016). É importante destacar que estes danos podem perdurar por anos após a exposição ao MeHg. Neste contexto, ressalta-se a permanência de déficits neurológicos em crianças (7 anos) e adolescentes (14 anos) que se expuseram ao MeHg durante períodos críticos do neurodesenvolvimento (Debes *et al.*, 2006). Ainda, a ingestão materna de frutos do mar contaminados com MeHg foi associada à persistência de prejuízos em testes relacionados à inteligência em adultos (22 anos), indicando efeitos permanentes da neurotoxicidade induzida pela exposição perinatal a este composto (Debes *et al*, 2016).

## 1.2 Cerebelo

O cerebelo é uma estrutura do SNC conectada ao cérebro através de pares de pedúnculos e anatomicamente subdividido em dois hemisférios ligados pelo *vermis* central, os hemisférios cerebelares são lobulados e possuem duas regiões, o córtex e a substância branca (Balsters *et al*, 2010). Esta estrutura está diretamente relacionada ao controle motor, particularmente na coordenação motora e precisão dos movimentos (Manto *et al*, 2012). Além disto, recentemente tem sido demonstrado o envolvimento do cerebelo nos processos de aprendizagem e linguagem (Butts *et al*, 2014; Koziol *et al*, 2014), bem como em doenças neurológicas como o autismo (Hampson & Blatt, 2015; Chrobak & Soltys, 2016).

Na substância branca estão presentes os núcleos cerebelares profundos, onde estão localizados os neurônios glutamatérgicos (excitatórios), GABAérgicos (inibitórios) e glicinérgicos (principalmente inibitórios), cujos prolongamentos se projetam para o tálamo e para a medula espinhal (Sillitoe *et al*, 2012). Já a citoarquitetura do córtex cerebelar adulto compreende três camadas distintas: (a) a camada granular; (b) camada das células de Purkinje (CP) e (c) camada molecular. A camada granular (CG) é composta por diferentes tipos de neurônios, como as células granulares e unipolares em “escova” (ambas glutamatérgicas), além de células de Golgi e de Lugaro, ambos neurônios GABAérgicos. A CP consiste em uma monocamada formada por neurônios de Purkinje e por células em candelabro, ambas GABAérgicas. A camada molecular (CM) consiste nos dendritos das células de Purkinje e das células em candelabro, bem como nos interneurônios “em cesto” e células estreladas (ambos também GABAérgicos) (**Figura 2**) (Schilling *et al*, 2008; Martinez *et al*, 2013; Marzban *et al*, 2015).

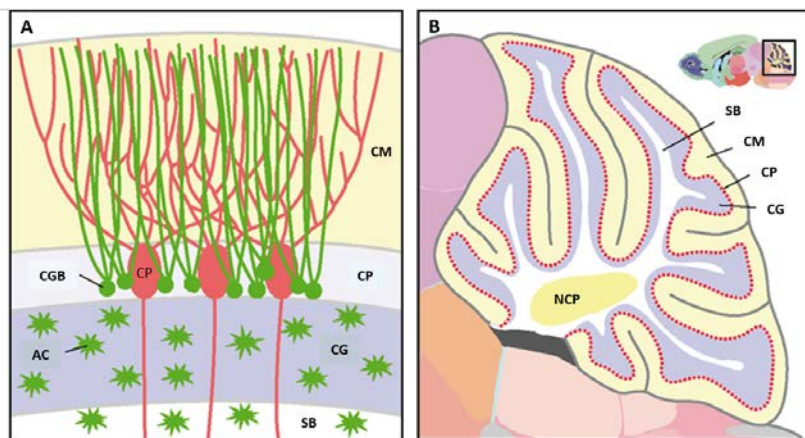
**Figura 2: Esquema da citoarquitetura dos neurônios presentes no córtex do cerebello.**



Visão sagital do córtex do cerebello adulto. Na camada molecular são encontrados os prolongamentos das células de Purkinje (P, em cinza) e das células em candelabro (Ca), células “em cesto” (B) e estreladas (S). A camada das células de Purkinje consiste nos corpos celulares destes neurônios e das células em candelabro e a camada granular é formada pelas células de Lugaro (L), de Golgi (Go) e células unipolares em escova (U, em vermelho). Na substância branca estão presentes os núcleos cerebelares profundos (DN) e fibras nervosas excitatórias musgosas (Mo) e “trepadeiras” (CF) e fibras serotoninérgicas aferentes (ser). Adaptado de Schilling *et al*, 2008.

No cerebello são encontradas também as células da glia de Bergmann (CGB); estas células são astrócitos unipolares encontrados apenas no cerebello. Seus prolongamentos estão em contato com os dendritos das células de Purkinje na CM, sendo que o corpo celular está presente na CP (**Figura 3A**) (Tanaka *et al*, 2008).

**Figura 3: Representação esquemática das células da glia de Bergmann e do cerebello.**



(A) Visão sagital das camadas celulares presentes no córtex do cerebello. O corpo celular das células da glia de Bergmann (CGB, em verde) está localizado na camada das células de Purkinje (CM, em negrito) e seus prolongamentos estão em contato com os axônios das células de Purkinje (CP, em vermelho) na camada molecular (CM). AC: astrócitos cerebelares na camada granular (CG). SB: substância branca. (B) Visão sagital do cerebello mostrando o processo de “foliação” que ocorre no período pós-natal e as camadas celulares. NCP: núcleos cerebelares profundos. Adaptado de Tanaka *et al*, 2008.

Durante o desenvolvimento do SNC, o neuroepitélio da porção anterior do tubo neural se diferencia em 3 vesículas encefálicas; prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, sendo que esta última, na parte rostral, dá origem ao cerebello (Martinez *et al*, 2013). A glia de Bergmann (CGB) tem um papel crucial durante o desenvolvimento do cerebello; na embriogênese, as células de Purkinje recém-formadas migram através da glia radial, células que mais tarde darão origem às CGB. Já no período pós-natal, as células granulares utilizam as fibras ou prolongamentos das CGB para migrarem até a camada interna do cerebello, que dará origem a CG. Sendo assim, as células da glia de Bergmann atuam como “guias” para a migração dos dois tipos celulares mais abundantes do cerebello (Sillitoe *et al*, 2012; Xu *et al*, 2013).

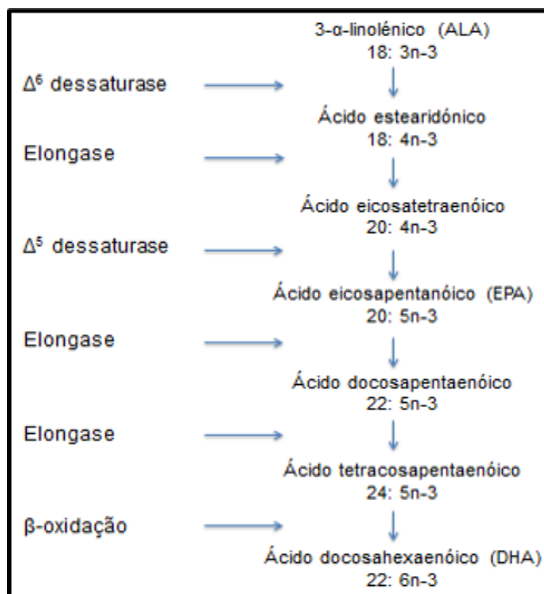
Como citado anteriormente, o cerebello é dividido em substância branca e córtex, e a região cortical apresenta lobulações e “foliações”,

consequências da migração e interação entre as células de Purkinje, granulares e da glia de Bergmann (**Figura 3B**) (Xu *et al*, 2013). Em mamíferos, os eventos celulares que culminam na histogênese do cerebelo ocorrem majoritariamente durante o período pós-natal (Lee *et al*, 2005) e em camundongos pode ser observado a partir do 15º dia de vida pós-natal, onde o processo de “foliação” está completo; os lóbulos cerebelares estão formados e as 3 camadas celulares bem organizadas (Martinez *et al*, 2013; Leto *et al*, 2016).

### 1.3 Ácidos graxos poli-insaturados $\omega$ -3 e SNC

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da série  $\omega$ -3 são importantes nutrientes para os seres humanos, dentre os quais têm destaque os ácidos 3- $\alpha$ -linolênico [ALA - C18:3 (n-3)], o docosahexaenóico [DHA - 22:6 (n-3)] e o eicosapentaenóico [EPA - 20:5 (n-3)]. O ALA é considerado um ácido graxo essencial e tem como fonte alimentar as nozes, sementes de linho e óleo de soja. Endogenamente, o ALA é convertido em ácido estearidônico [C18:4(n-3)] pela ação da  $\Delta$ 6 dessaturase; após, este ácido é alongado em ácido eicosatetraenóico [C20:4(n-3)] e, posteriormente, convertido em EPA pela ação da  $\Delta$ 5 dessaturase. A conversão de EPA em DHA envolve a adição de dois carbonos pela ação da enzima elongase, formando então o docosapentaenóico [C22:5(n-3)]. Posteriormente, pela ação desta mesma enzima, são adicionados mais dois carbonos produzindo o ácido tetracosapentaenóico [C24:5(n-3)]. Em seguida, ocorre uma dessaturação utilizando a  $\Delta$ 6 dessaturase para formar o ácido tetracosahexaenóico [C24:6(n-3)] e por fim ocorre a redução em dois carbonos por  $\beta$ -oxidação, formando o DHA (**Figura 4**) (Wall *et al*, 2010). No entanto, a conversão de ALA nos AGPIs de cadeia mais longa é limitada, sendo então necessário o consumo de fontes alimentares para garantir o aporte adequado dos ácidos graxos EPA e DHA (Mahaffey *et al*, 2011; Baker *et al*, 2016).

**Figura 4. Metabolismo dos AGPIs da série  $\omega$ -3.**



Conversão do ácido 3- $\alpha$ -linolênico (ALA) nos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Adaptado de Wall *et al*, 2010.

Como citado anteriormente, os peixes e frutos do mar representam a principal via de exposição do homem ao MeHg. Entretanto, os pescados constituem uma importante fonte de nutrientes, como vitaminas, minerais e os AGPIs da série  $\omega$ -3 DHA e EPA (Hardman, 2004). As concentrações de MeHg e  $\omega$ -3 contidas nos peixes e outros frutos do mar variam de acordo com a espécie, o que influencia a relação custo/benefício do consumo destes alimentos. Logo, para se obter os benefícios nutricionais da ingestão de pescados, recomenda-se a escolha daqueles que apresentam menor concentração de MeHg e maiores concentrações de  $\omega$ -3 (Mahaffey, 2004; Mahaffey *et al*, 2011; Zeilmaker *et al*, 2013). Dentre os pescados que possuem esta característica, destacam-se o salmão, a truta, a sardinha e o camarão (Visentainer *et al*, 2000; Smith & Guentzel, 2010; Silva *et al*, 2011). Por outro lado, há espécies de peixes conhecidas pelo alto teor de  $\omega$ -3 e que, no entanto, também apresentam alta concentração de MeHg e outros poluentes ambientais, tais como o atum, robalo e linguado (Visentainer *et al*, 2000;

Cabañero *et al*, 2005; Mahaffey *et al*, 2008; Smith & Guentzel, 2010, Gil & Gil, 2015).

A presença dos AGPIs é abundante no SNC e estes ácidos graxos são capazes de regular a estrutura e função de neurônios, células gliais e endoteliais, bem como modular a sobrevivência celular, neurogênese e neuroinflamação, além do metabolismo de glicose (via receptor GLUT-1) e de neurotransmissores (Pifferi *et al*, 2007; Bazinet & Layé, 2014). O EPA e o DHA são importantes constituintes das membranas das células neurais, influenciando suas funções através das propriedades de membrana (fluidez e integridade, por exemplo), além de seus metabólitos atuarem como precursores de mensageiros e mediadores anti-inflamatórios (Youdim *et al*, 2000; Dyall & Michael-Titus, 2008). O DHA é o principal AGPI encontrado no SNC e representa cerca de 15% do total de ácidos graxos presentes na substância cinzenta e nos retinoblastomas (Calon & Cole, 2007), sendo que vesículas sinápticas e mitocôndrias representam os principais sítios de localização subcelular (Youdim *et al*, 2000).

Apesar de estruturalmente semelhantes, estes dois ácidos graxos (DHA e EPA) têm funções distintas no metabolismo do SNC e as concentrações de EPA esterificados aos fosfolipídeos de membrana nos neurônios e células gliais são baixas quando comparadas às de DHA. O EPA é utilizado para geração de energia metabólica por  $\beta$ -oxidação e para a conversão em DHA pela ação de enzimas do tipo elongases e desaturases (Chen & Bazinet, 2015). Já o DHA encontra-se majoritariamente esterificado a fosfatidiletanolamina e em menor proporção a fosfatidilserina, porém pode ser liberado no citoplasma e convertido em seus metabólitos ativos pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (Bazinet & Layé, 2014).

Os ácidos graxos EPA e DHA, bem como seus mediadores conhecidos como resolvinas e neuroprotectinas, têm demonstrado um papel anti-inflamatório potente no SNC (Cardoso *et al*, 2016). A alta e frequente ingestão destes AGPIs pode ser estar relacionada a uma diminuição no risco de desenvolvimento de doenças neurológicas que têm como base processos inflamatórios, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Kidd, 2007; Bousquet *et al*, 2008; Layé, 2010; Russell & Bürgin-Maunders, 2012; Eckert *et al*, 2013; Janssen *et al*, 2014; Heras-Sandoval *et al*, 2016). Embora os ácidos graxos  $\omega$ -3 não sejam conhecidos classicamente como antioxidantes ou *scavengers* de radicais livres, evidências têm sugerido que estes podem proteger contra o estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*. A exposição ao EPA e DHA pode ativar a via de sinalização antioxidante do Nrf2 em hepatócitos (Saw *et al*, 2013) e

em enterócitos (Pettersen *et al*, 2016), além de proteger da peroxidação lipídica e diminuir o dano oxidativo em modelos de diabetes (Arnal *et al*, 2010) e de isquemia cerebral (Cao *et al*, 2004; Bas *et al*, 2007; Kidd, 2007).

Os AGPIs são fundamentais durante o desenvolvimento pré- e pós-natal inicial do SNC, onde a taxa de crescimento e maturação do encéfalo é bastante elevada (Wainwright, 2002). Como mencionado anteriormente, o DHA é o principal ácido graxo encontrado nas membranas de células neurais na substância cinzenta e de células da retina. Em humanos, o acúmulo de DHA nas membranas celulares ocorre principalmente no terceiro trimestre de gestação até por volta dos 2 anos de idade, via transferência placentária e leite materno, influenciado diretamente pela ingestão dietética materna (Innis, 2008, 2014). Esta janela do neurodesenvolvimento é marcada por intensa neurogênese e gliogênese, arborização dendrítica e axonal, bem como por formação sináptica, neurotransmissão, mielinização e formação e expansão das redes neurais (Knickmeyer *et al*, 2008; Tau & Peterson, 2010; Guesnet & Alessandri, 2011). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação positiva entre desenvolvimento neurológico e visual e ingestão materna de AGPIs, onde neonatos, crianças e adolescentes apresentaram melhores resultados em testes relacionados a habilidades visuais, cognitivas e de memória (Jesen *et al*, 2005; Jensen & Lapillonne, 2009; Campoy *et al*, 2012; Kuratko *et al*, 2013; Makrides, 2013; Julvez *et al*, 2016). Logo, o DHA é considerado um nutriente importante para os processos envolvidos no desenvolvimento neurológico (Innis, 2007, 2011, 2014; Brenna & Carlson, 2014; Mita *et al*, 2016).

### 1.3 MeHg versus AGPIs $\omega$ -3

Apesar de alguns estudos epidemiológicos, como os acima citados, apontarem às consequências deletérias da exposição perinatal ao MeHg, paradoxalmente, outros evidenciam a importância do consumo dos pescados neste período. Por serem fontes de ácidos graxos  $\omega$ -3, a ingestão materna de peixes e outros frutos do mar pode conferir benefícios à ontogênese do SNC e ao seu desenvolvimento pós-natal (Myers & Davidson, 1998; Sakamoto *et al*, 2004; McCann & Ames, 2005; Myers *et al*, 2007; Oken & Bellinger, 2008; Davidson *et al*, 2000; 2011; Strain *et al*, 2008; Stokes-Riner *et al*, 2011; Strain *et al*, 2015; Julvez *et al*, 2016).

Poucos trabalhos exploraram os possíveis benefícios da ação DHA e/ou EPA frente aos efeitos deletérios decorrentes da ação de MeHg

co-administrados no período perinatal. Jayashankar e cols. (2012) demonstraram que o tratamento combinado de DHA e MeHg perinatalmente reduz o acúmulo de MeHg no cérebro e diminui o dano comportamental provocados pelo MeHg em filhotes de camundongos com 15 dias de vida. Interessantemente, este estudo também mostrou que a exposição isolada de DHA e combinada com MeHg ativou a expressão de genes relacionados ao funcionamento e desenvolvimento adequados do cérebro, sendo que a ativação destes não foi observada no tratamento isolado com MeHg (Jayashankar *et al*, 2012). Entretanto, animais adultos e idosos que foram expostos *in utero* a uma dieta combinada de óleo de peixe e MeHg não apresentaram melhora em testes comportamentais espaciais e visuais a longo prazo (Paletz *et al*, 2006; 2007).

*In vitro*, o tratamento prévio com DHA em células de linhagens neuronal (B35) e astrocitária (C6) expostas ao MeHg diminuiu o conteúdo celular de Hg. No entanto, o DHA não foi capaz de aumentar o conteúdo de GSH e diminuir a produção de EROs mediados por MeHg (Kaur *et al*, 2007; 2011). Já em outro estudo com cultura primária de astrócitos e neurônios cerebelares, o tratamento com DHA também diminuiu o acúmulo celular de Hg e foi capaz de reduzir o aumento da produção de EROs induzidos pelo MeHg em ambos os tipos celulares (Kaur *et al*, 2008b). Células C6 tratadas com ácidos graxos  $\omega$ -3 mostraram que a exposição ao DHA e EPA aumentou o conteúdo intracelular dos AGPIs e a atividade das enzimas CAT e glicose-6-fosfato desidrogenase (Leonardi *et al*, 2005). No entanto, apenas a exposição ao DHA causou um aumento na geração de EROs e na peroxidação lipídica concomitante ao aumento na atividade da GPx de maneira dose- e tempo-dependente (Leonardi *et al*, 2005; 2007).

Como acima descrito, durante as fases de desenvolvimento pré-natal e pós-natal inicial do SNC, os eventos celulares de proliferação e diferenciação são intensos. Neste período, o SNC, em particular, é altamente susceptível a ação de fatores nutricionais e ambientais, tais como o MeHg. Durante este período, os organismos em formação podem sofrer a ação de agentes externos, sendo capazes de responder a tais agentes com modificações moleculares, incluindo alterações no DNA (Grandjean *et al*, 1997; Wainwright, 2002; Bernal & Jirtle, 2010). Tais modificações epigenéticas podem ser transmitidas entre as células e algumas consequências adversas podem surgir na vida adulta. É durante este período *plástico* de desenvolvimento que alguns tecidos, tais como o SNC, estão mais sensíveis aos eventos epigenéticos decorrentes do ambiente (Barouki *et al*, 2012). A literatura atual explora pouco o possível envolvimento de eventos epigenéticos conferidos pelos EPA e DHA



frente à neurotoxicidade do MeHg durante o desenvolvimento e maturação do SNC, tampouco se estes podem modular ou potencializar respostas que podem surgir na vida adulta.



## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que a exposição a determinados fatores ambientais - como metais tóxicos - e nutricionais durante o desenvolvimento pode influenciar no surgimento de respostas biológicas a curto e longo prazo em animais e seres humanos. Os períodos de desenvolvimento *in utero* e pós-natal inicial representam janelas cruciais para a ação de agentes deletérios, como o MeHg, um poluente encontrado principalmente em frutos do mar. Por outro lado, um crescente número de estudos com populações consumidoras de pescados durante o neurodesenvolvimento vem sugerindo o possível papel protetor dos ácidos graxos poliinsaturados do tipo  $\omega$ -3 como uma importante estratégia contra a toxicidade promovida por MeHg. No entanto, a maior parte destes estudos tem como foco a análise de comportamentos relacionados ao desenvolvimento motor e intelectual e pouco se sabe das consequências celulares e bioquímicas da exposição a estes agentes durante o desenvolvimento. Tampouco é conhecido se os efeitos da exposição durante este período podem estar envolvidos na modulação e surgimento de respostas na vida adulta (longo prazo). Logo, o presente estudo investigou possíveis efeitos benéficos da ingestão dos ácidos graxos  $\omega$ -3 no início da vida no dano promovido pelo MeHg ao SNC a curto e longo prazo.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi investigar os possíveis mecanismos celulares, bioquímicos e comportamentais pelos quais os ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ -3 (DHA e EPA) afetam a neurotoxicidade induzida pela exposição perinatal e adulta de camundongos ao MeHg.

#### 3.2. Objetivos específicos

a. Investigar o efeito da exposição materna (períodos gestacional e lactacional) ao MeHg e/ou ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 (via dieta enriquecida com óleo de peixe) em camundongos após o desmame (PN 21) sobre os seguintes aspectos:

- (i) parâmetros comportamentais relacionados ao sistema locomotor;
- (ii) perfil lipídico plasmático (colesterol e triglicerídeos);
- (iii) atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase), marcadores de estresse oxidativo (conteúdo de tióis não-proteicos e MDA) e metabolismo mitocondrial (atividade dos complexos I e II) no cerebelo e hipocampo;
- (iv) proteínas-alvo envolvidas na homeostase sináptica no cerebelo;
- (v) morfologia geral, organização e morfometria das camadas celulares e quantificação das células de Purkinje no cerebelo;
- (vi) imunohistoquímica para ativação de astrócitos (gliose) (GFAP) no cerebelo de camundongos filhotes.

b. Investigar, em camundongos adultos, efeito de uma exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 (via dieta enriquecida com óleo de peixe) a longo prazo (PN 84) e os efeitos da exposição ao MeHg durante a vida adulta (14 dias de exposição) nestes animais sobre os seguintes aspectos:

- (i) parâmetros comportamentais relacionados ao sistema locomotor;
- (ii) perfil lipídico plasmático;
- (iii) atividade de enzimas antioxidantes, marcadores de estresse oxidativo e metabolismo mitocondrial no cerebelo e hipocampo;
- (iv) níveis de mercúrio no cerebelo de camundongos adultos.

c. Buscar relacionar eventos observados após o desmame e vida adulta no intuito de compreender fatores nutricionais/ambientais precoces que podem modular eventos neurotóxicos futuros.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para os estudos realizados, foram utilizadas fêmeas prenhas de camundongos (*Mus musculus*, linhagem *Swiss*) oriundas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) após confirmação do acasalamento por *plug* vaginal no dia gestacional 1 (DG 1). Estes animais foram mantidos sob condições ambientais adequadas no Biotério do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC em gaiolas plásticas individuais com ração e água *ad libitum*, em estantes ventiladas e temperatura de  $22 \pm 2$  °C controladas e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo de número PP00765.

### 4.2 Protocolo experimental 1 - exposição perinatal ao MeHg e/ou óleo de peixe

Fêmeas adultas prenhas foram divididas em 4 grupos experimentais de acordo com o tratamento recebido. Cada grupo foi composto por 21-23 fêmeas, sendo estes: (i) grupo controle, cujos animais receberam água e ração padrão AIN-93G (Rhoster®), (ii) grupo MeHg, cujos animais receberam uma solução de MeHg (5 mg/L, *ad libitum* – Cloreto de Metilmercúrio (II), Sigma Aldrich) (Stringari *et al*, 2008) via água de beber, (iii) grupo  $\omega$ -3, cujos animais receberam ração enriquecida com 4,5% de óleo de peixe (Rhoster®, 11,96 g/kg de DHA e 13,3 g/kg de EPA w/w, *ad libitum*) (Sable *et al*, 2012; Rathod *et al*, 2014) (**Tabela 1**) e (iv) grupo  $\omega$ -3 + MeHg, cujos animais receberam a ração enriquecida com óleo de peixe *ad libitum* e MeHg *ad libitum* via água de beber.

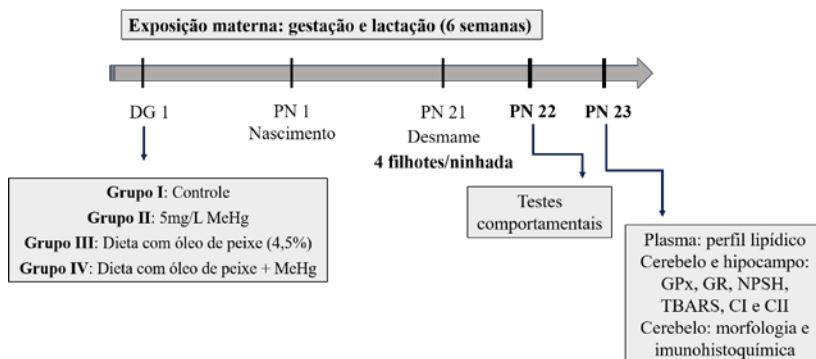
**Tabela 1: Composição centesimal da ração padrão AIN-93G e da ração enriquecida com óleo de peixe produzidas pela empresa Rhooster® (Araçoiaba da Serra/SP).**

Ingredientes	Dietas (g/kg)	
	AIN-93G	Ração enriquecida com óleo de peixe
Caseína	200	200
Amido de milho	397,486	352,486
Sacarose	100	100
Óleo de soja	70	70
Amido dextrinizado	132	132
Óleo de peixe	-	45
Fibras	50	50
Mistura de vitaminas	10	10
Mistura de minerais	35	35
Bitartarato de colina	2,5	2,5
L-cistina	3	3
Antioxidante	0,014	0,014
Total (g)	1000	1000
Energia (kJ/g)	3,9	4,1
Carboidratos (%)	61,74	55,16
Proteínas (%)	20,56	21,13
Lipídeos (%)	17,70	23,71

Os diferentes tratamentos foram conduzidos durante o período gestacional e de lactação, totalizando 6 semanas de exposição (**Figura 5**). Ao longo deste período, o controle da ingesta sólida (consumo e troca) foi realizado 3 vezes por semana, ao passo que a ingestão hídrica (consumo e troca) foi registrado 2 vezes na semana. Ainda, o peso corporal das mães durante a gestação e lactação e o peso das ninhadas do nascimento ao desmame foram monitorados semanalmente.



**Figura 5: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental I.**



Os tratamentos iniciaram no dia gestacional (DG) 1 e foram até o dia pós-natal (PN) 21, quando ocorreu o desmame, seguidas das análises comportamentais, bioquímicas e histológicas. GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; NPSH: tióis não-protéicos; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; C I: atividade com complexo mitocondrial I; C II: atividade com complexo mitocondrial II.

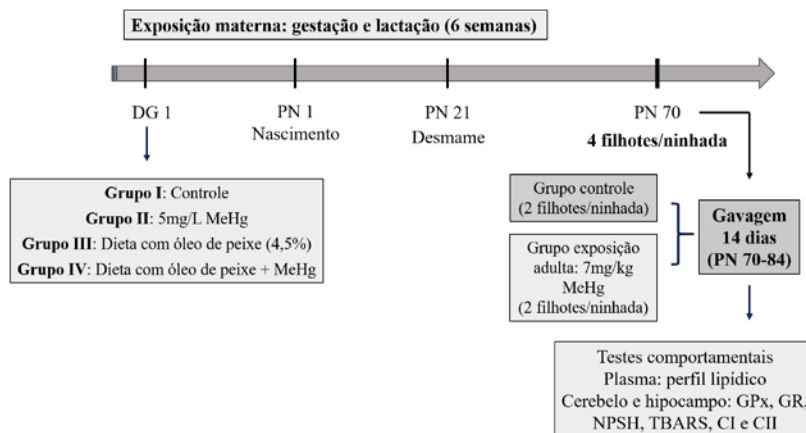
O dia do nascimento foi considerado PN1 e, no 3º dia de vida pós-natal (PN 3), as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes/ninhada (mantendo vivos preferencialmente machos), que permaneceram com suas mães até o PN 21, onde ocorreu o desmame. Neste momento, foram separados 4 filhotes de cada ninhada e, após 24 horas, conduzida análise de testes comportamentais. No dia seguinte a estes testes, os filhotes foram anestesiados com isoflurano para coleta de sangue por punção cardíaca e obtenção do plasma. Além disso, o cérebro foi retirado e o cerebelo e hipocampo coletados. Os filhotes remanescentes, ou seja, 4 filhotes/ninhada, foram utilizados no segundo conjunto de experimentos, sendo que, para este, somente filhotes do sexo masculino foram utilizados.

#### **4.3 Protocolo experimental 2 – exposição adulta ao MeHg em animais expostos ou não ao MeHg e/ou óleo de peixe no período perinatal**

Para este segundo conjunto de experimentos, foram utilizados machos provenientes das proles dos 4 grupos pertencentes ao experimento 1. Como descrito acima, estes animais foram desmamados aos 21 dias e os 4 machos remanescentes de cada ninhada foram

alimentados com dieta padrão (AIN-93M) e não receberam tratamento até a 10<sup>a</sup> semana de vida. A partir da 10<sup>a</sup> semana de vida, dois animais de cada ninhada dos 4 grupos experimentais foram submetidos a exposição ao MeHg (7 mg/kg/dia) (Stringari *et al*, 2006) via gavagem durante 14 dias (**Figura 6**). Os dois animais remanescentes de cada grupo receberam água (veículo do MeHg) via gavagem, sendo estes considerados controles. Após estes 14 dias de exposição ou não ao MeHg, assim como no experimento 1, os animais foram analisados por testes comportamentais para a avaliação locomotora e força neuromuscular. Após 24 h da realização destes testes, os animais foram anestesiados com isoflurano e procedeu-se a punção cardíaca para coleta de sangue e obtenção do plasma e as estruturas encefálicas de interesse (cerebelo e hipocampo) foram dissecadas para as análises bioquímicas.

**Figura 6: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental II.**



Grupos experimentais I – IV de acordo com o tratamento materno (gestação e lactação). Os tratamentos nas mães iniciaram no dia gestacional (DG) 1 até o dia pós-natal (PN) 21, quando ocorreu o desmame. A exposição adulta ao MeHg (via gavagem) ocorreu na 10<sup>a</sup> semana de vida pós-natal dos animais, por 14 dias e após foram conduzidas as análises comportamentais e bioquímicas. DG: dia gestacional; PN: dia pós-natal; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; NPSH: tióis não-protéicos; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; C I: atividade com complexo mitocondrial I; C II: atividade com complexo mitocondrial II.

## 4.4 Análises Comportamentais

### 4.4.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado com o objetivo de analisar a atividade locomotora e exploratória dos animais. Para o tal, os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena circular (44 cm de diâmetro e 22 cm de altura) com 12 setores desenhados no chão. O número de cruzamentos (setores cruzados pelo animal com as quatro patas) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e o número de levantadas (número de vezes que o animal se equilibra sobre as patas traseiras) foi utilizado para avaliar o comportamento exploratório, sendo estes parâmetros registrados em um período de 6 minutos (Santos *et al.*, 2012).

### 4.4.2 Teste da barra giratória (*rotarod*)

O teste do *rotarod* tem por objetivo avaliar a integridade do sistema motor dos animais. O aparato é composto por uma barra giratória de 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, a qual possui 4 compartimentos individualizados (*Insight*®). O protocolo adotado foi o de aceleração contínua, onde os animais eram colocados sobre a barra numa velocidade inicial de 5 rotações por minuto (rpm), ao longo do período de 6 minutos de avaliação, sendo que a velocidade aumenta progressivamente até no máximo 21 rpm e 25 rpm, para os filhotes e para os adultos, respectivamente (Malagutti *et al.*, 2009; Stringari *et al.*, 2006). Para esta análise, o número de quedas de cada animal ao longo do tempo foi então registrado.

### 4.4.3 Teste da inversão da grade (*hang test*)

Para avaliar a força neuromuscular dos animais, os camundongos (filhotes e adultos) foram individualmente colocados em uma grade horizontal de malha de aço de 0,5 cm<sup>2</sup>, a grade foi então invertida, de modo que para o camundongo não cair, ele precisa se agarrar nela com as patas dianteiras e traseiras, permanecendo pendurado de cabeça para baixo (Tillerson & Miller, 2003). A inversão da grade ocorreu a uma distância de 20 cm acima de uma caixa contendo maravalha, para desencorajar a queda e evitar ferimentos em caso de queda. Esta grade foi ainda equipada com uma proteção de papelão com 10 cm de altura para impedir que os animais escalassem até a sua parte superior. Os

camundongos foram mantidos invertidos individualmente por até 30 segundos e foram dadas 10 tentativas (com intervalo de 1 minuto entre elas) para se determinar o maior tempo de permanência. O maior tempo atingido pelo animal foi utilizado para o cálculo da porcentagem de tempo sem cair, registrado como o maior tempo/30 s  $\times$  100 (Mohanasundari *et al.*, 2006).

## **4.5 Análises Bioquímicas**

### **4.5.1 Análise de perfil lipídico plasmático**

Os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos foram determinados por métodos enzimáticos utilizando kit comercial de reagentes (Labtest Diagnóstica ®, Lagoa Santa MG, Brasil).

### **4.5.2 Preparação de extrato dos tecidos encefálicas**

Após 24h do término dos testes comportamentais, os animais foram mantidos anestesiados em isoflurano, conduzida a punção cardíaca para obtenção do plasma (com seringas e tubos heparinizados) e, após decapitação, os animais tiveram seus encéfalos removidos. Os hipocampo e cerebelo do hemisfério direito foram isolados e homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,0. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 16.000 g por 20 minutos em centrífuga refrigerada (4° C). Parte do sobrenadante imediatamente separado para mensuração dos níveis de TBARS e de tióis não-protéicos (NPSH) e o remanescente conservado a -80° C para posterior dosagem das atividades enzimáticas (GPx e GR). Para as dosagens do conteúdo dos níveis de tióis-não proteicos, os sobrenadantes foram acrescidos de uma solução de ácido tricloroacético a 10% a centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos sob refrigeração. O sobrenadante ácido foi neutralizado até pH 7,0 com uma solução de TFK 1 M. Para determinação da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, os hemisférios esquerdos do cerebelo e hipocampo foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4), contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina. Os homogenatos foram centrifugados a 1000 x g sob refrigeração durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado foi utilizado para a determinação da atividade das NADH desidrogenases (complexo I) (Cassina & Radi, 1996) modificado por Latini *et al* (2005) e do complexo II (Fischer *et al.*, 1985).

### **4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes**

A enzima GPx catalisa a redução de  $H_2O_2$  e outros peróxidos orgânicos, e para tal utiliza GSH como co-substrato, produzindo GSSG, a qual é reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm (Wendel, 1981). A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. Já para a atividade da enzima GR, a redução da glutatona oxidada (GSSG) foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1985) e sua atividade foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

### **4.5.4 Atividade dos complexos mitocondriais**

A atividade do complexo I foi medida através da taxa de redução do ferricianeto a 420 nm, dependente de NADH. Já a atividade do complexo II foi mensurada através da taxa de absorção do succinato-2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) a 600 nm. As atividades de ambos os complexos da cadeia respiratória foram calculados como  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ .

### **4.5.5 Determinação dos níveis de tióis-não proteicos**

Com o objetivo de avaliar o conteúdo intracelular de glutatona reduzida (GSH), os níveis de NPSH foram determinados pelo método de Ellman (1959), uma vez que cerca de 95% dos NPSH é glutatona. O conteúdo de tióis não-proteico foi determinado pela redução do ácido 55'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) a 405 nm em espectrofotômetro utilizando uma curva de GSH como padrão em nmol/mg de proteína.

### **4.5.6 Determinação da concentração de MDA**

Para avaliar o efeito dos tratamentos na peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas, as substâncias capazes de reagir ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas em homogenatos de cerebelo e hipocampo de filhotes e adultos utilizando o método descrito por Ohkawa e col (1979). O método consiste em avaliar a formação de malondialdeído (MDA), um produto final de peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo corado. O

produto da reação foi mensurado espectrofotometricamente a 532 nm utilizando MDA como padrão em nmol/mg de proteína.

#### 4.5.7 *Western blot*

##### 4.5.7.1 Extração de proteínas totais

Para obtenção do extrato proteico total das amostras, o cerebelo foi dissecado (8 animais/grupo) e homogeneizado mecanicamente (4°C) em tampão de extração 1:4 p/v, contendo (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 1% e glicerol 10%, coquetel comercial de inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, Amresco, OH, USA), PMSF 0,1 mM e inibidores de fosfatases NaF 100 mM e Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM). Em seguida, os extratos foram centrifugados (10.000 × g a 4 °C por 10 min) e os sobrenadantes diluídos (1:1 v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8; EDTA 4 mM e SDS 8%) e posteriormente aquecidos a 100°C por 5 min. Por fim, foi adicionado as amostras o tampão de diluição (glicerol 40%, Tris 100 mM, azul de bromofenol blue, pH 6,8) na proporção 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final de 8%).

##### 4.5.7.2 Eletroforese e transferência das proteínas

Após a extração e dosagem de proteínas das amostras de cerebelo, 60 µg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10% em corrente elétrica fixa de 40 mA e tensão máxima de 150 mV por aproximadamente 2 h. A seguir, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) usando um sistema *semi-dry* (1.2 mA/cm<sup>2</sup>; 1.5 h). Para atestar a eficácia do processo de transferência das proteínas, os géis foram corados com solução de azul de Coomassie e as membranas com solução de Ponceau S 0,5% por 3 minutos. Feito isto, as membranas foram submetidas ao processo de imunodeteção com anticorpos específicos, descritos a seguir.

##### 4.5.7.3 Imunodeteção de Proteínas

As membranas foram incubadas com tampão de bloqueio com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) por 1 hora sob agitação. Após lavagens em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 Mm, Tween 20 0,1%, pH 7,5), as membranas foram incubadas

*overnight* a 4° C com anticorpos específicos diluídos em TBS-T com BSA 2% nas seguintes concentrações: 1:1000 de anti-fosfo e total sinapsina, (Santa Cruz, CA, USA; Cell Signaling Technology, Beverly, USA, respectivamente), anti-sinaptofisina (Abcam, Cambridge, MA, USA) e anti-PSD-95 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 1:3000 de anti-4-hidroxi-nonenal (Abcam, Cambridge, USA) e 1:2500 de  $\beta$ -actina (Santa Cruz, CA, USA). A fim de se detectar os complexos imunes, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram expostas ao kit de emissão de quimioluminescência (ECL, GE Healthcare) e o sinal emitido registrado pelo Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA). Após três lavagens, todas as membranas foram incubadas com anticorpo anti- $\beta$ -actina (1:2500) para o controle interno da quantidade de proteínas de cada amostra.

O sinal emitido nas bandas fosforiladas foi determinado pela razão da densidade óptica (DO) da banda fosforilada e da DO da banda total. Já para proteínas totais, o imunoc conteúdo foi determinado pela razão da DO da banda da proteína alvo e da DO da  $\beta$ -actina, sendo que as densidades foram quantificadas usando o software ImageJ® (Frederick, MD, USA).

#### **4.5.8 Dosagem de proteínas**

O conteúdo de proteínas foi determinado através do método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.5.9 Determinação dos níveis de mercúrio**

Os níveis de mercúrio nas amostras de cerebelo foram determinadas pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais coordenado pelo professor Dr. Fernando Barbosa Júnior da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. A análise foi realizada por Espectrometria de absorção atômica, como descrito por Zimmermann e col (2014). Em resumo, as amostras foram pesadas (5 animais/grupo) e adicionados 5 ml a 3:1 (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente, por 2 horas. A seguir, as amostras foram aquecidas a 80°C (40 min) adicionados 15 ml de HCl 6 mol/L, 3 ml de BrCl 0,1 mol/L e 4 ml de água deionizada. As amostras foram novamente aquecidas a 60°C por 1 hora e diluídas em 1:10 with 2% (v/v) com HCl e 0,1 ml de cloridrato de hidroxilamina para a análise. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$ .

## 4.6 Análise histológica

Para a obtenção das amostras histológicas, os camundongos no PN 23 (9 animais/grupo) foram anestesiados com isofurano e em seguida perfundidos no ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl a 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PFA) em 0,1 M de solução tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Após a perfusão, os cerebelos foram dissecados e pré-fixados *overnight* em solução de PFA e divididos em 2 grupos experimentais. Quatro animais/grupo foram utilizados para a análise morfológica e cinco animais/grupo foram destinados para a análise imunohistoquímica.

### 4.6.1 Análise morfológica e morfométrica

Para as análises morfológicas e morfométricas, os cerebelos (4 animais/grupo) foram desidratados em soluções de concentração crescente de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II) por 1 hora cada e diafanizados em xilol I (1:1 de álcool etílico 100% e xilol) e xilol II por 40 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram incluídas na parafina (3 banhos por 3 horas em cada etapa). Após, foram armazenadas até a realização dos cortes sagitais em micrótomo rotativo (Leica® RM2255, IL, USA) na espessura de 5  $\mu$ m. Os cortes sagitais obtidos do cerebelo foram dispostos em lâminas revestidas com gelatina a 2% e posteriormente estes foram corados com Azul de Toluidina 1% por 30 segundos.

Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas em meio de montagem Entellan (Merck, DA, Germany) para a análise da morfologia geral e obtenção da morfometria das camadas celulares do cerebelo em fotomicrografias obtidas no Microscópio invertido Olympus IX83 com o sistema de captura de imagens CellSens Dimension 1.12 (Olympus, Canadá). O comprimento das camadas molecular e granular do cerebelo ( $\mu$ m) foram mensuradas no ápice das folhas cerebelares em 9 cortes por animal (x10). O número de células de Purkinje foi avaliada através da contagem por campo visual nas folhas cerebelares em 3 cortes por animal (x40).

### 4.6.2 Análise imunohistoquímica

Para as análises por imunohistoquímica, o cerebelos dos camundongos (5 animais/grupo) foram armazenados em uma solução de sacarose 30% a 4°C para posterior realização das fatias sagitais obtidas



em vibrátomo rotativo (Vibratome®, *Series 1000*, St. Louis, MO, USA) a fresco com espessura de 20  $\mu\text{m}$ . As fatias foram incubadas com 0,3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em PBS contendo 0,15 % de triton X-100 (PBS-T) por 30 minutos para inibição das peroxidases endógenas. Posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de soro de cabra em PBS-T por 1 hora à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as fatias foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário anti –GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (1:500; Dako Laboratories, CA, USA). Após incubação as fatias foram lavadas em PBS-T, e foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (1:250, Sigma, MO, USA), seguida de incubação por 1 hora com o complexo avidina-biotina (1:125, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA) e da reação de revelação com 0,035 % de cloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, MO, USA). As fatias foram montadas em lâminas tratadas com gelatina a 2%, desidratadas em uma série crescente de etanol, xilol e cobertas com lamínulas utilizando o meio de montagem Entellan (Merck, DA, Germany) para posterior análise. As fotomicrografias para a análise da imunomarcção para GFAP foram obtidas pelo sistema de captura descrito acima (x10). As imagens foram obtidas em brilho uniforme e convertidas em escala de cinza para obtenção da Densidade Óptica (DO) das camadas molecular e granular do cerebelo de 5 regiões/fatia em 4 fatias aleatórias usando o software ImageJ® (Frederick, MD, USA).

#### **4.7 Análise estatística**

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias para os protocolos experimentais 1 e 2, seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Fisher. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle a fim de evitar possíveis vieses para cada conjunto de animais. Os dados foram representados com média  $\pm$  Erro Padrão da Média (E.P.M) e diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software Statistica 8.0. (StatSoft, Inc., 2008, OK, USA) e o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), respectivamente.



## 5. Resultados

### 5.1 Protocolo experimental 1: exposição perinatal ao MeHg e/ou óleo de peixe

Com o objetivo de investigar os efeitos da exposição perinatal ao MeHg isolada e/ou combinada à ingestão de ácidos graxos poliinsaturados do tipo  $\omega$ -3 na prole, fêmeas de camundongo receberam MeHg (5 mg/L) via água e/ou uma dieta enriquecida com óleo de peixe (4,5%) durante a gestação e lactação. Ao longo deste período, o consumo de líquidos e de ração foram monitorados individualmente, pela diferença do que era ofertado e a quantidade da sobra do consumo. As tabelas 2 e 3 mostram que as ingestões materna de ração e de líquidos, respectivamente, não diferiram significativamente entres os grupos experimentais. As ingestões materna de ração e de líquidos foram crescentes, conforme se aproximava o nascimento (DG 21) e o desmame dos filhotes (PN 21). Além disto, não foram evidenciadas alterações no comprometimento motor nas progenitoras, assim como alterações no número de ninhadas e distribuição de filhotes e sexo nas proles durante os diferentes tratamentos.

**Tabela 2: Ingestão materna diária de ração (gramas) ao longo do período de gestação e lactação nos grupos experimentais.**

Ingestão (gramas)	Gestação			Lactação		
	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana
<b>Controle</b>	4,1 (±0,3)	5,3 (±0,2)	5,9 (±0,2)	10 (±0,4)	15,6 (±0,4)	14,1 (±0,8)
<b>MeHg</b>	4,3 (±0,3)	5,6 (±0,2)	5,5 (±0,2)	9,5 (±0,4)	14,2 (±0,4)	14,0 (±0,5)
<b><math>\omega</math>-3</b>	4,2 (±0,3)	5,2 (±0,2)	5,3 (±0,2)	9,4 (±0,4)	15,3 (±0,6)	14,3 (±0,4)
<b><math>\omega</math>-3+ MeHg</b>	4,2 (±0,3)	5,3 (±0,2)	5,4 (±0,2)	9,4 (±0,3)	15,6 (±0,4)	14,4 (±0,5)

A ingestão diária de ração, em gramas, foi obtida a partir de 3 dias de coleta por semana. As fêmeas dos grupos controle e MeHg receberam ração padrão AIN-

93G e os grupos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -3+MeHg receberam uma ração AIN-93G enriquecida com óleo de peixe (4,5%). Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n= 21-23. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD.

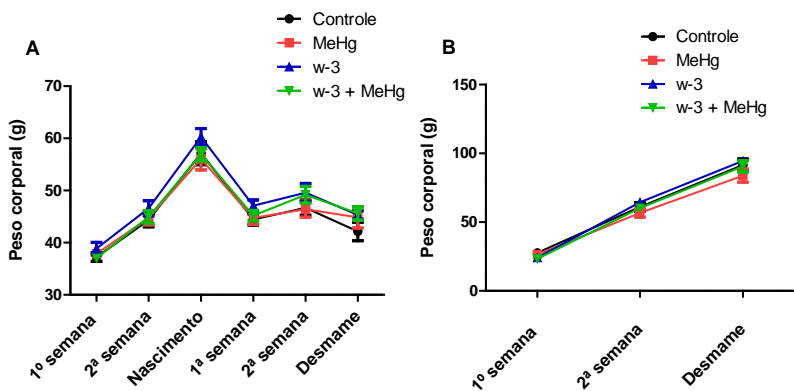
**Tabela 3: Ingestão materna diária de líquidos (mililitros) ao longo do período de gestação e lactação nos grupos experimentais.**

Ingestão (Mililitros)	Gestação			Lactação		
	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana
<b>Controle</b>	5,9 ( $\pm$ 0,4)	7,4 ( $\pm$ 0,6)	8,3 ( $\pm$ 0,4)	12,6 ( $\pm$ 1)	15,5 ( $\pm$ 0,9)	18 ( $\pm$ 1,2)
<b>MeHg</b>	6,2 ( $\pm$ 0,3)	7 ( $\pm$ 0,6)	8,1 ( $\pm$ 0,4)	12,2 ( $\pm$ 0,8)	15,6 ( $\pm$ 0,7)	17 ( $\pm$ 1)
<b><math>\omega</math>-3</b>	6,2 ( $\pm$ 0,6)	7 ( $\pm$ 0,5)	8,7 $\pm$ 0,5	12,7 ( $\pm$ 1,1)	15,1 ( $\pm$ 0,9)	17,6 ( $\pm$ 1)
<b><math>\omega</math>-3+ MeHg</b>	5,8 ( $\pm$ 0,4)	6,9 ( $\pm$ 0,6)	8,7 $\pm$ 0,4	12 ( $\pm$ 1)	17,1 ( $\pm$ 0,9)	17 ( $\pm$ 1,1)

A ingestão diária de líquidos, em mililitros, foi obtida a partir de 2 dias de coleta por semana. As fêmeas dos grupos controle e  $\omega$ -3 receberam água, ao passo que os grupos MeHg e  $\omega$ -3+MeHg receberam água contendo 5mg/L de MeHg. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M.n= 21-23. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD.

Além do controle do consumo de líquidos e de ração, os pesos corporais das mães e das ninhadas também foram monitorados ao longo dos períodos de desenvolvimento. A exposição ao MeHg e/ou a ração enriquecida com óleo de peixe não alteraram o ganho de peso das fêmeas e das ninhadas nas 3 semanas de gestação e de lactação avaliadas (Figura 7).

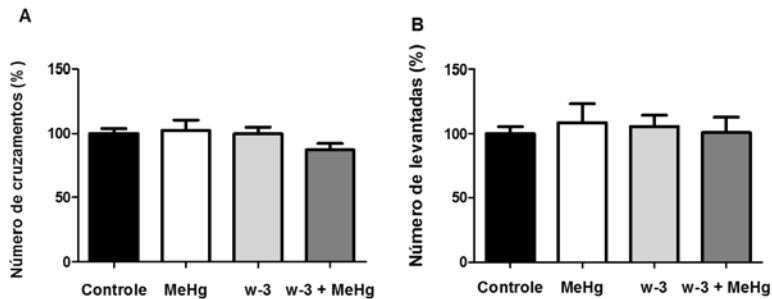
**Figura 7. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 no peso corporal das mães e filhotes.**



As fêmeas receberam durante a gestação e lactação MeHg via água (5 mg/L) e/ou a uma dieta enriquecida com ácidos graxos  $\omega$ -3 (4,5%) e o grupo controle recebeu água e dieta padrão (AIN-93G). (A) Peso corporal (gramas) das mães foi monitorado semanalmente ao longo do período gestacional e de lactação, totalizando 6 semanas. (B) Peso corporal (gramas) das ninhadas ao longo do período de lactação. Após o nascimento (1ª semana), o registro do peso foi realizado com a ninhada completa (sem manipulação), ao passo que nas semanas subsequentes, o peso foi registrado com as ninhadas já padronizadas com 8 filhotes por mãe. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M.  $n = 21-23$ . A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD.

Para investigar o efeito da exposição perinatal ao MeHg e/ou aos ácidos graxos oriundos do óleo de peixe em parâmetros comportamentais, após o desmame dos filhotes, quatro animais de cada ninhada foram submetidos a testes específicos para averiguar possíveis alterações na atividade locomotora, coordenação motora e força neuromuscular. A atividade locomotora espontânea e o comportamento exploratório, avaliados através do número de cruzamentos e levantadas no teste do campo aberto, respectivamente, não mostraram alterações nos filhotes com 22 dias (PN 22) nos diferentes tratamentos (Figura 8).

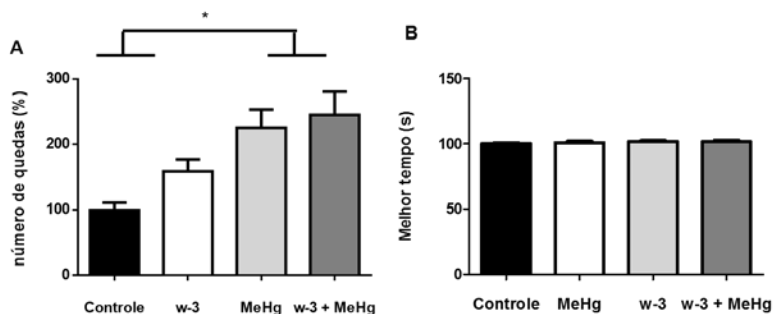
**Figura 8. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 no comportamento locomotor e exploratório em filhotes.**



Os filhotes foram expostos durante a gestação e lactação ao MeHg (5 mg/L) e/ou a uma dieta enriquecida com ácidos graxos  $\omega$ -3 (4,5%) e o controle recebeu água e dieta padrão (AIN-93G). O teste do campo aberto foi realizado nos filhotes 24h após o desmame, que ocorreu no dia PN 21. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como (A) número de cruzamentos (100% corresponde à média de  $131,2 \pm 9,3$  cruzamentos) e (B) número de levantadas (100% corresponde à média de  $52,3 \pm 5,8$  levantadas) no teste do campo aberto. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M.  $n = 12-17$ . A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD.

No entanto, a exposição perinatal ao MeHg foi capaz de alterar a coordenação motora dos filhotes, avaliada através do teste da barra giratória (*Rotarod*). Houve um aumento significativo no número de quedas nos animais cujas mães receberam MeHg [ $F_{(1,72)} = 15,15$ ;  $p=0,0002$ ] e a ração enriquecida com óleo de peixe não foi capaz de alterar este comportamento (Figura 9A). Por fim, a força neuromuscular, avaliada pelo teste da grade invertida, não se mostrou alterada em decorrência dos tratamentos maternos (Figura 9B).

**Figura 9. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 na coordenação motora e força neuromuscular em filhotes.**



Os testes do *rotarod* e da grade invertida foram realizados 24h após o desmame, que ocorreu no dia PN 21. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como (A) número de quedas no *rotarod* (100% corresponde à média de  $0,7 \pm 0,2$  quedas) e (B) melhor tempo (segundos) no teste da grade invertida (100% corresponde à média de  $97,3 \pm 1$  melhor tempo) nos camundongos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A)  $n=15-21$  (B)  $n=13-17$ . A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. (A) \* indica  $p < 0,05$  nos grupos controle e  $\omega$ -3 *versus* MeHg e  $\omega$ -3 + MeHg.

Após 24h da realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para a obtenção de amostras de plasma e de tecidos encefálicos (hipocampo e cerebelo). A análise do perfil lipídico no plasma dos filhotes mostrou que os tratamentos não alteraram os níveis de colesterol e triglicerídeos nos animais (Tabela 4).

**Tabela 4: Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 no perfil lipídico em filhotes.**

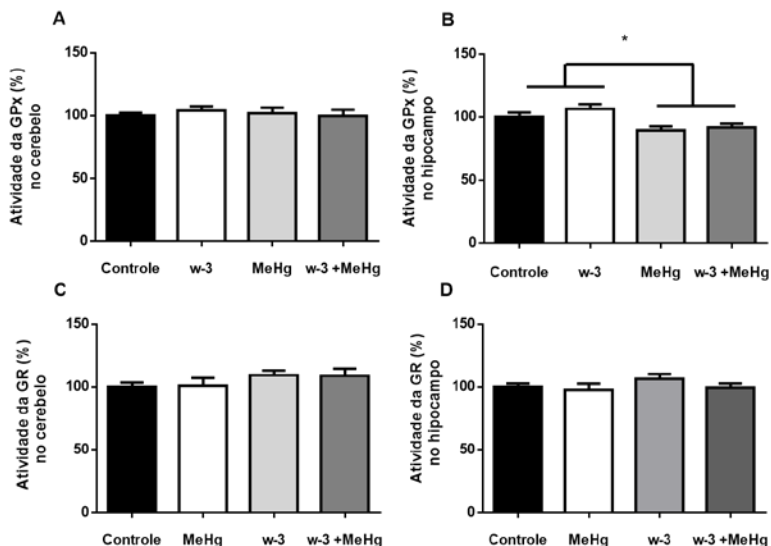
	Grupos			
	Controle	MeHg	$\omega$ -3	$\omega$ -3+ MeHg
<b>Colesterol (%)</b>	100 ( $\pm 4,99$ )	91,33 ( $\pm 5,59$ )	92,8 ( $\pm 3,07$ )	101 ( $\pm 4,04$ )
<b>Triglicerídeos (%)</b>	100 ( $\pm 4,57$ )	90,01 ( $\pm 6,43$ )	97,55 ( $\pm 5,16$ )	105,8 ( $\pm 6,23$ )

Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como nível de colesterol (100% corresponde ao nível médio de  $61,9 \pm 6$  mg/dL) e nível de triglicerídeos (100% corresponde ao nível médio de  $62,2 \pm 4,2$  mg/dL) em mg/dL. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A) n=9-13 (B) n=9-11. A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD.

Parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados no hipocampo e cerebelo dos filhotes de camundongo. A exposição perinatal ao MeHg foi capaz de diminuir a atividade da GPx no hipocampo [ $F_{(1,43)} = 13,68$ ;  $p=0,0006$ ], no entanto, esta resposta não foi vista no cerebelo. A atividade da GR (Figura 10), e os níveis de NPSH e TBARS não foram alterados no cerebelo ou no hipocampo dos filhotes em função dos tratamentos (Tabela 5).



**Figura 10. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 na atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) em filhotes.**



A atividade das enzimas foi mensurada nos filhotes no dia PN 23 e são expressas como nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como atividade das enzimas GPx no (A) cerebelo (100% corresponde à média de  $3,5 \pm 0,3$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e (B) hipocampo (100% corresponde à média de  $2 \pm 0,1$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e da GR em (C) cerebelo (100% corresponde à média de  $22,1 \pm 2,9$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e (D) hipocampo (100% corresponde à média de  $10,4 \pm 0,5$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) nos camundongos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A) (C) n= 8-14 (B) n= 8-12 (D) n= 9-14. \* indica  $p < 0,05$  nos grupos controle e  $\omega$ -3 versus MeHg e  $\omega$ -3 + MeHg.

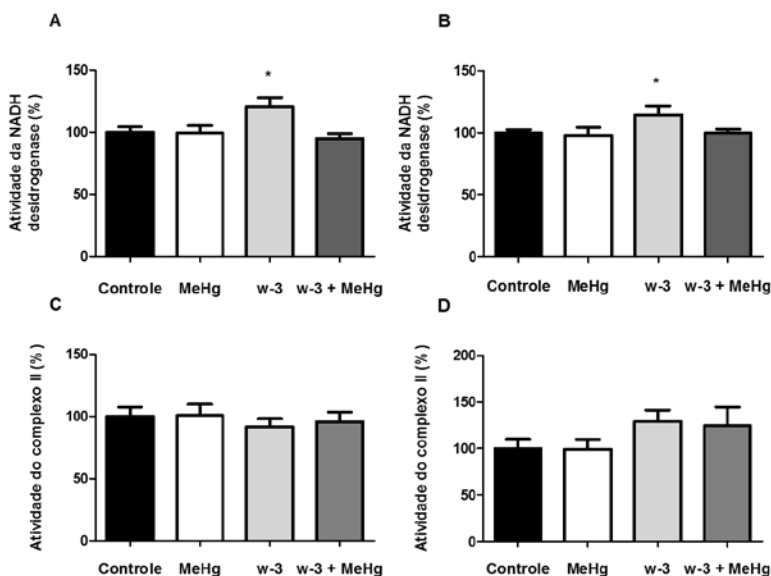
**Tabela 5. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 sobre parâmetros de estresse oxidativo em filhotes.**

	Grupos			
	Controle	MeHg	$\omega$ -3	$\omega$ -3+ MeHg
<b>Conteúdo de NPSH no cerebelo (%)</b>	100 ( $\pm 4,96$ )	95,51 ( $\pm 3,09$ )	92,52 ( $\pm 8,51$ )	103,2 ( $\pm 8,73$ )
<b>Conteúdo de NPSH no hipocampo (%)</b>	100 ( $\pm 6,71$ )	86,10 ( $\pm 6,49$ )	105,4 ( $\pm 9,44$ )	103,7 ( $\pm 7,13$ )
<b>Níveis de TBARS no cerebelo (%)</b>	100,0 ( $\pm 15,71$ )	83,39 ( $\pm 24,91$ )	98,30 ( $\pm 25,82$ )	87,88 ( $\pm 30,40$ )
<b>Níveis de TBARS no hipocampo (%)</b>	100 ( $\pm 32,86$ )	89,99 ( $\pm 25,2$ )	94,28 ( $\pm 19,11$ )	109,5 ( $\pm 51,44$ )

O conteúdo de NPSH e os níveis de TBARS foram mensurados nos filhotes no dia PN 23 e são expressos como nmol NPSH/mg proteína e nmol de MDA/mg de proteína, respectivamente. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como conteúdo de NPSH no cerebelo (100% corresponde à média de  $16,9 \pm 2,5$  nmol NPSH/mg proteína)  $n=4-7$  e hipocampo (100% corresponde à média de  $15,1 \pm 2$  nmol NPSH/mg proteína)  $n=4-8$ , níveis de TBARS no cerebelo (100% corresponde à média de  $4,4 \pm 1,9$  nmol de MDA/mg de proteína)  $n=4-8$  e no hipocampo (100% corresponde à média de  $1,6 \pm 1,1$  nmol de MDA/mg de proteína)  $n=4-7$ . Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M.

Além das atividades das enzimas antioxidantes, avaliou-se o efeito dos tratamentos maternos na atividade dos complexos mitocondriais I e II no cerebelo e hipocampo dos filhotes. A Figura 11 mostra um aumento significativo na atividade NADH desidrogenase no cerebelo [ $F_{(1,34)} = 4,76$ ;  $p=0,03$ ] e no hipocampo [ $F_{(1,39)} = 1489,426$ ;  $p<0,000001$ ] dos filhotes expostos perinatalmente a uma dieta enriquecida com óleo de peixe (Figura 11A e B), embora isto não tenha sido evidenciado nos animais expostos perinatalmente a uma dieta enriquecida com óleo de peixe + MeHg. A atividade do complexo II não foi significativamente alterada pelos tratamentos no cerebelo e hipocampo (Figura 11C e D).

**Figura 11. Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 na atividade dos complexos mitocondriais em filhotes.**

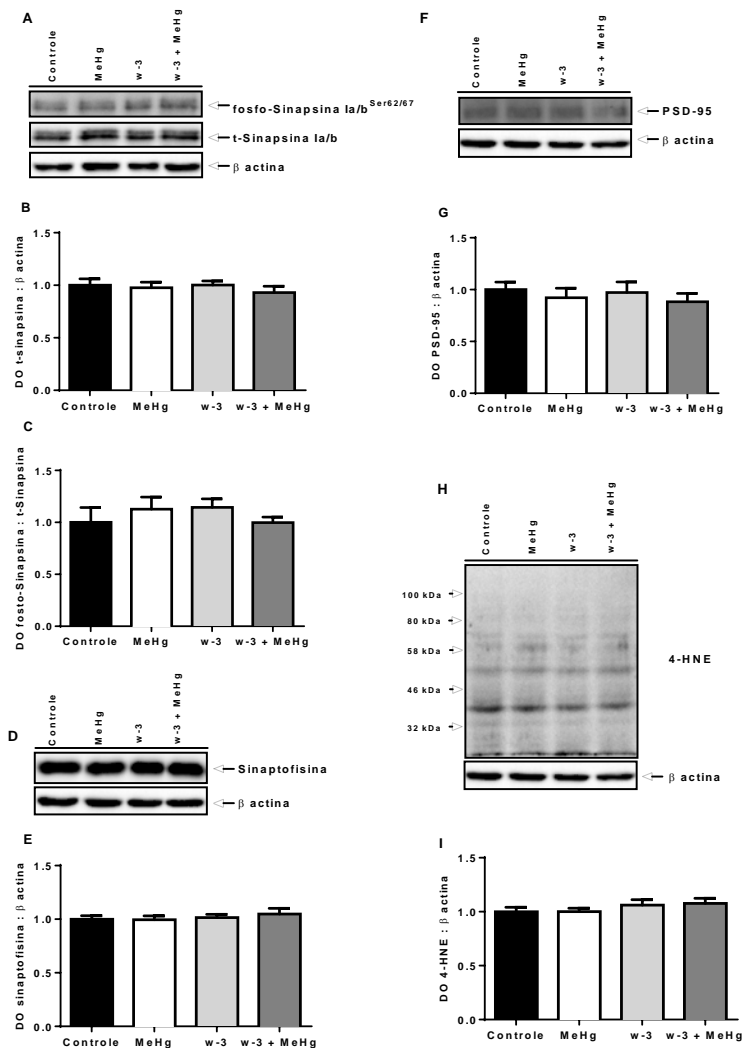


A atividade da NADH desidrogenase e do complexo II nos filhotes no dia PN 23 e são expressos em nmol/min/mg de proteína. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como atividade da NADH desidrogenase no (A) cerebelo (100% corresponde à média de  $36,9 \pm 4,1$  nmol/min/mg de proteína) e (B) hipocampo (100% corresponde à média de  $38,1 \pm 1,9$  nmol/min/mg de proteína), atividade do complexo II no (C) cerebelo (100% corresponde à média de  $1,7 \pm 0,2$  nmol/min/mg de proteína) e (D) hipocampo (100% corresponde à média de  $0,8 \pm 0,06$  nmol/min/mg de proteína) nos camundongos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A)  $n=8-11$  (B)  $n=8-13$  (C)  $n=7-10$  (D)  $n=4-7$ . \* indica  $p < 0,05$  no grupo  $\omega$ -3 versus os demais grupos experimentais.

Uma vez evidenciado que os tratamentos com o MeHg (isoladamente e em combinação a ração enriquecida) foram capazes de alterar a coordenação motora nos filhotes em PN 22, investigou-se seus efeitos em alvos envolvidos na homeostase sináptica e na neurotransmissão. Para tal, avaliou-se o imunoc conteúdo de sinapsina, sinaptofisina e PSD-95 no cerebelo, uma vez que esta estrutura está relacionada ao equilíbrio motor. A sinapsina é uma proteína envolvida na

regulação da neurotransmissão, particularmente na liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (Cesca *et al*, 2010), ao passo que a sinaptofisina e PSD-95 são proteínas pré e pós-sinápticas, respectivamente (Glantz *et al*, 2007). Além disto, o imunoconteúdo do 4-HNE, um marcador utilizado para avaliar a lipoperoxidação, também foi determinado no cerebelo dos filhotes. A figura 12 mostra que a exposição perinatal ao MeHg isoladamente e/ou em combinação a uma dieta rica em  $\omega$ -3 não foi capaz de alterar os níveis das proteínas envolvidas na transmissão sináptica, bem como não modificou os níveis de 4-HNE no cerebelo dos camundongos.

**Figura 12.** Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 na fosforilação da proteína sinapsina e imunocntéudo das proteínas sinapsina, sinaptofisina, PSD-95 e 4-HNE em filhotes.

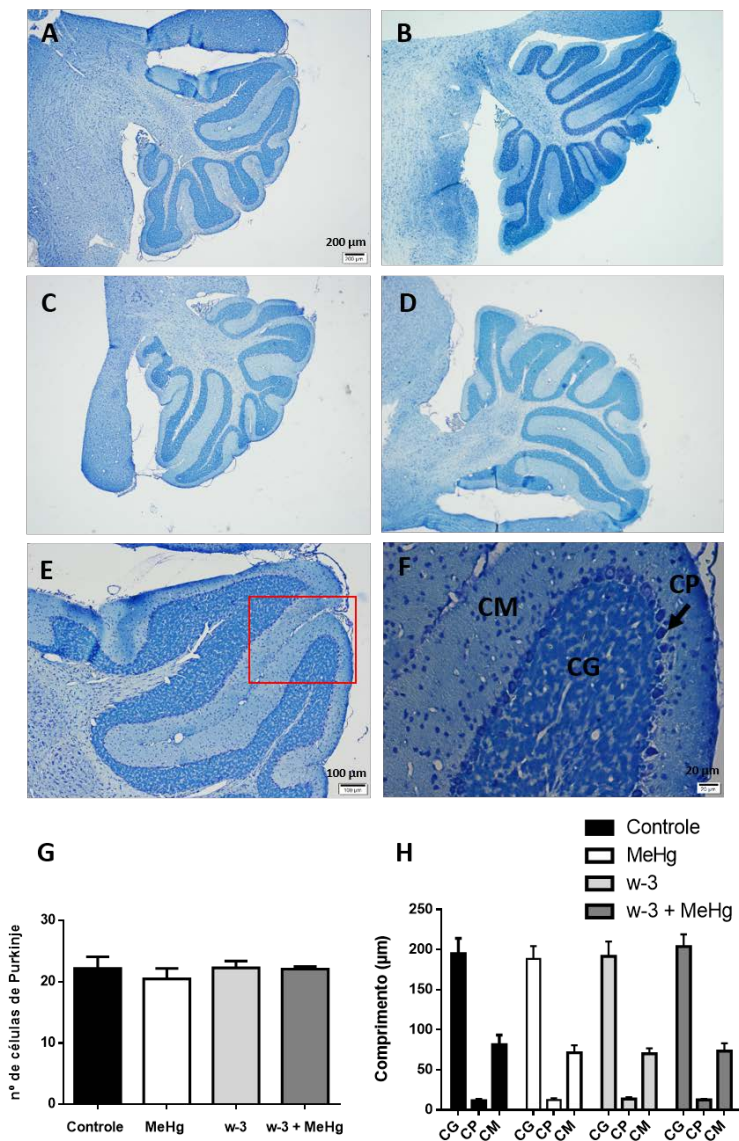


(Legenda na próxima página)

A taxa de fosforilação e o imunoc conteúdo das proteínas foi determinado no cerebelo dos filhotes no dia PN 23 e são expressos como os blots representativos da imunorreatividade das proteínas-alvo e a densidade óptica (DO) das bandas. Os resultados foram mostrados como (A) bandas representativas da proteína sinapsina na sua forma total e fosforilada no cerebelo de cada condição experimental. (B) A densidade óptica (DO) da proteína sinapsina total foi normalizada pela DO da  $\beta$ -actina e (C) a DO obtida pela razão entre a forma fosforilada e total da sinapsina. Bandas representativas dos níveis de sinaptofisina (D), PSD-95 (F) e 4-HNE (H) nas condições experimentais. A densidade óptica (DO) das proteínas sinaptofisina (E), PSD-95 (G) e 4-HNE (I) foi normalizada pela DO da  $\beta$ -actina de cada condição. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n=8.

Considerando que a exposição perinatal ao MeHg prejudicou a coordenação motora dos filhotes (Figura 9A) e que estudos apontam que a exposição perinatal a este toxicante pode alterar a histogênese do cerebelo (Sakamoto *et al*, 2002; Roda *et al*, 2008), investigamos a morfologia geral do cerebelo dos filhotes, bem como a organização celular das camadas pela da avaliação morfométrica (comprimento) das camadas e a densidade das células de Purkinje nos diferentes tratamentos. A exposição ao MeHg, isoladamente ou em combinação à ração enriquecida com óleo de peixe, não alterou a morfologia geral do cerebelo, tampouco a organização das camadas granular (CG), das células de Purkinje (CP) e molecular (CM) (figura 13A-F). A morfometria, avaliada pelo comprimento das três camadas cerebelares e pelo número de células de Purkinje no ápice das folhas do cerebelo, não foi modificada pelos tratamentos durante o desenvolvimento do SNC (Figura 13G e H).

**Figura 13. Efeitos da exposição materna ao MeHg e/ou AGIP do tipo  $\omega$ -3 na coloração da técnica histológica de Azul de Toluidina no cerebelo de filhotes.**



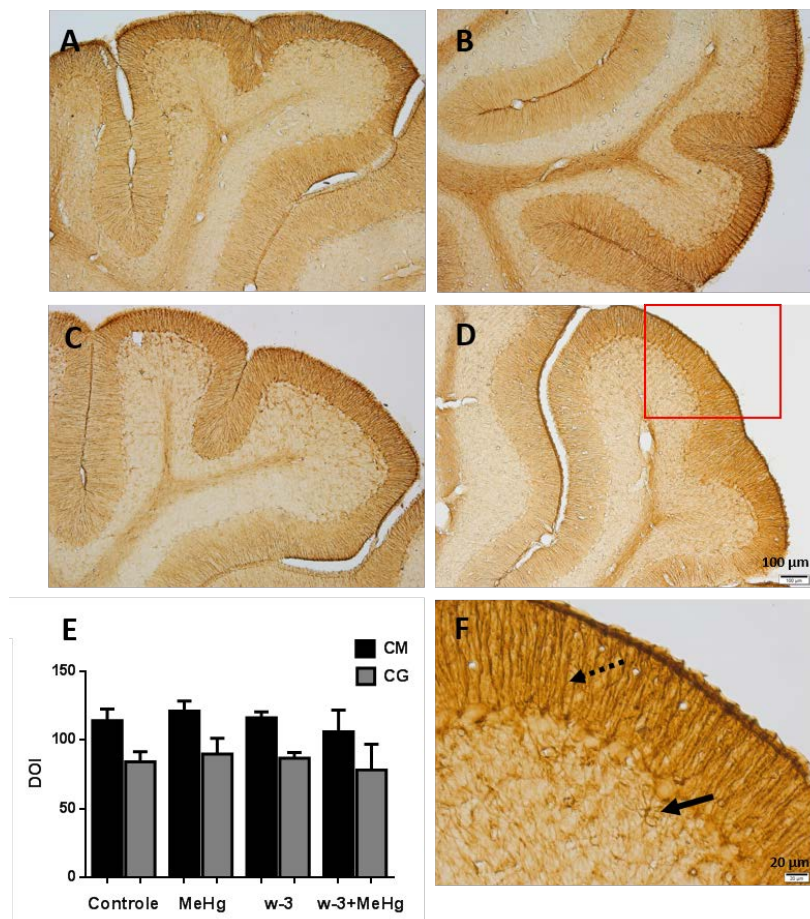
(Legenda na próxima página)

Os filhotes foram expostos durante a gestação e lactação ao MeHg (5 mg/L) e/ou a uma dieta enriquecida com ácidos graxos  $\omega$ -3 (4,5%) e o controle recebeu água e dieta padrão (AIN- 93G). Secções sagitais de cerebelo (5  $\mu$ m) foram coradas com Azul de Toluidina e representadas no aumento de 4x. Visão geral do cerebelo, (A) grupo controle, (B) grupo MeHg, (C) grupo  $\omega$ -3 e (D) grupo MeHg +  $\omega$ -3. (E) e (F) Secção sagital do cerebelo do grupo controle no aumento de 10x e 40x, respectivamente, indicando o aumento utilizado para a obtenção do comprimento das camadas celulares do cerebelo (10x) e o aumento utilizado para realização da contagem do número de células de Purkinje (40x). (G) Morfometria ( $\mu$ m) das camadas granular (CG), das células de Purkinje (CP) e molecular (CM) nos filhotes dos grupos experimentais, obtidas no ápice das folhas do cerebelo. (H) Quantificação das células de Purkinje nas folhas cerebelares dos filhotes nos diferentes grupos experimentais. (G) e (H) Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n=4.

Por fim, avaliamos se os tratamentos durante o período gestacional e lactacional poderiam alterar a imunomarcção cerebelar de GFAP, um marcador utilizado para avaliar presença de gliose (Roda *et al.*, 2008). Observamos que a exposição perinatal ao MeHg e/ou aos ácidos graxos  $\omega$ -3 não foram capazes de alterar a densidade óptica (DO) da marcação nas camadas molecular e granular no cerebelo dos filhotes dos diferentes grupos experimentais (Figura 14).



**Figura 14: Efeitos da exposição perinatal ao MeHg e/ou AGIP do tipo  $\omega$ -3 sobre a imunomarcção para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no cerebelo dos filhotes.**



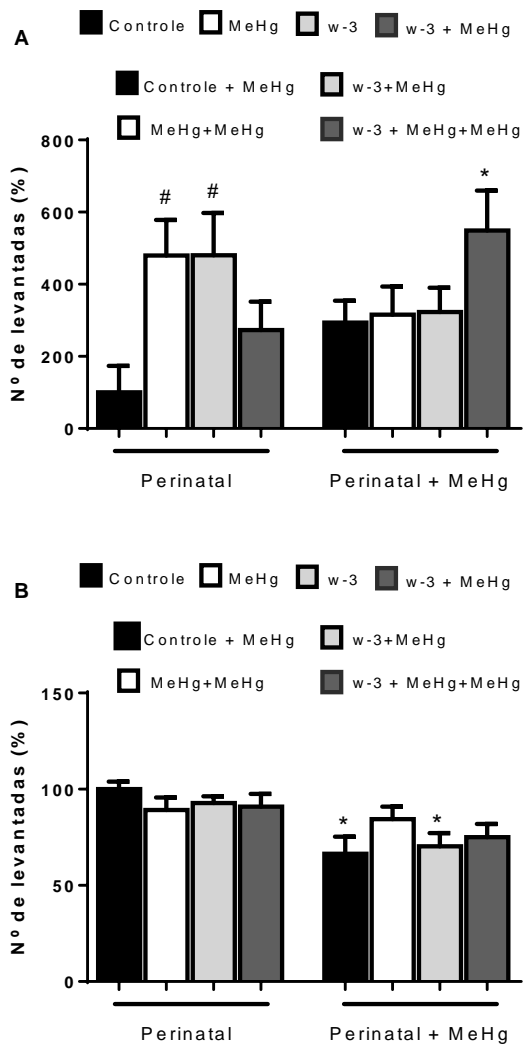
Os filhotes foram expostos durante a gestação e lactação ao MeHg (5 mg/L) e/ou a uma dieta enriquecida com ácidos graxos  $\omega$ -3 (4,5%) e o controle recebeu água e dieta padrão (AIN- 35 93G). A imunomarcção para GFAP no cerebelo no (A) grupo controle, (B) grupo MeHg, (C) grupo  $\omega$ -3 e (D) grupo MeHg +  $\omega$ -3. (F) Detalhe da foto D mostrando um prolongamento celular imunomarcado para GFAP na camada molecular (CM – seta pontilhada) e um astrócito cerebelar GFAP-positivo na camada granular (CG - seta). (E) Representação da densidade óptica da região de interesse (DO) nas CM e CG do cerebelo em filhotes. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n= 5.

## 5.2 Protocolo experimental 2 – exposição adulta ao MeHg em animais expostos ou não ao MeHg e/ou óleo de peixe no período perinatal

A fim de investigar o efeito da exposição ao MeHg na vida adulta em animais expostos no período perinatal ao MeHg isolado e/ou combinado a uma ração enriquecida com óleo de peixe, os camundongos machos remanescentes do protocolo experimental 1 (4 animais/ninhada) receberam MeHg ou água (controle) via gavagem (Figura 6), conforme descrito na seção de Metodologia. Esta exposição ocorreu da 10<sup>a</sup> - 12<sup>a</sup> semana de vida dos animais. Após este período, os camundongos adultos foram avaliados por testes comportamentais para verificar a locomoção e coordenação motora, bem como a força neuromuscular. A figura 15 mostra que a atividade locomotora espontânea e o comportamento exploratório nos adultos apresentaram um perfil semelhante. A exposição perinatal ao MeHg diminuiu o número de cruzamentos nos animais quando avaliados na idade adulta ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (Figura 15A). O número de levantadas (comportamento exploratório; Figura 15B) foi significativamente menor nos animais expostos perinatalmente ao MeHg ( $p < 0,01$ ) e nos animais expostos perinatalmente ao MeHg combinado à ração enriquecida com óleo de peixe ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle.

Ainda em relação aos cruzamentos e levantadas, a figura 15 mostra que a exposição ao MeHg na vida adulta teve um efeito significativo sobre número de cruzamentos [ $F_{(1,75)} = 15,57$ ;  $p = 0,00017$ ] e de levantadas [ $F_{(1,74)} = 18,78$ ;  $p = 0,000046$ ]. No entanto, nos animais cujas mães haviam sido tratadas com MeHg (isoladamente ou combinado com a ração enriquecida com óleo de peixe) e receberam novamente MeHg na vida adulta, este fenômeno não foi observado (Figura 15)

**Figura 15. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) na atividade locomotora e exploratória em machos adultos (3 meses de vida).**



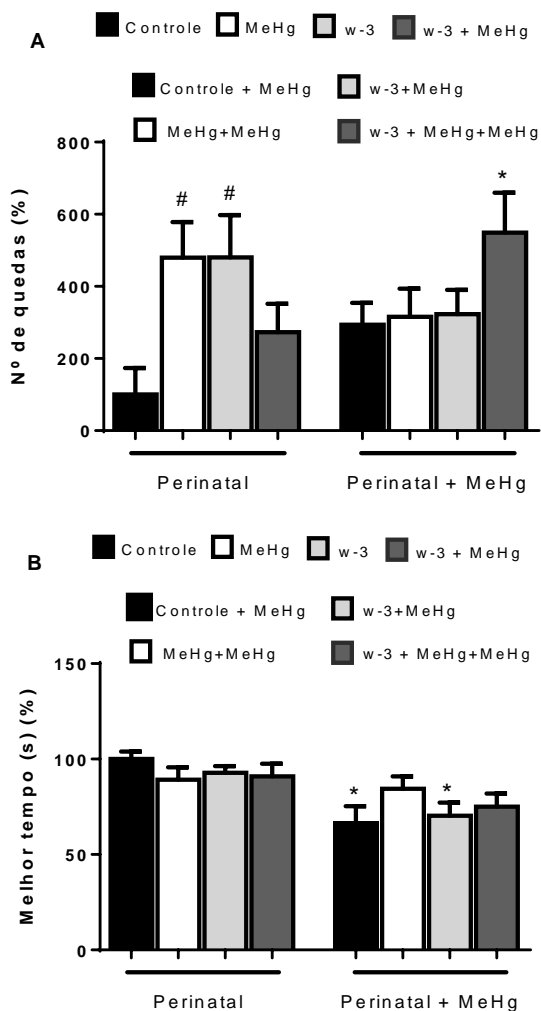
(Legenda na próxima página)

O teste do campo aberto foi realizado 24h após o término do tratamento na vida adulta (Protocolo experimental 2). Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como (A) número de cruzamentos (100% corresponde à média de  $62,2 \pm 4,8$  cruzamentos) e (B) número de levantadas (100% corresponde à média de  $34,4 \pm 2,5$  levantadas) dos camundongos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n= 8-12. O teste estatístico realizado foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. As barras agrupadas em cores sólidas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam veículo (água) quando adultos e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento perinatal a longo prazo. As barras hachuradas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam MeHg quando adultos e \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento com MeHg na vida adulta quando comparados animais que receberam o mesmo tratamento perinatal.

Com relação ao número de quedas, avaliado pelo teste do *rotarod*, a exposição perinatal ao MeHg ou ração enriquecida com óleo de peixe isolados (grupos ii e iii, respectivamente) aumentaram o número de quedas nos animais adultos ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 16A). A força neuromuscular, avaliada pelo teste da inversão da grade, mostrou que os tratamentos maternos não alteraram este parâmetro a longo prazo (Figura 16B).

A exposição ao MeHg na fase adulta foi capaz de alterar a coordenação motora e a força neuromuscular nos camundongos (Figura 16A e B, respectivamente). O tratamento com MeHg na fase adulta levou ao aumento no número de quedas apenas nos animais expostos perinatalmente ao MeHg combinado à ração rica em óleo de peixe (grupo iv) ( $p < 0,05$ ). A avaliação da força neuromuscular revelou que a exposição adulta ao MeHg diminuiu o tempo de permanência do animal agarrado à grade naqueles expostos perinatalmente ao veículo (controle) e à ração com óleo de peixe ( $p < 0,05$ ) (Figura 16B). Já nos animais adultos cujas mães haviam sido tratadas com MeHg, isolado ou combinado com a ração enriquecida com óleo de peixe, este parâmetro não foi alterado pela nova exposição ao MeHg na vida adulta (Figura 16B).

**Figura 16. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs no desempenho motor no teste da barra giratória (*rotarod*) e sobre a força neuromuscular no teste da grade invertida em machos adultos (3 meses).**

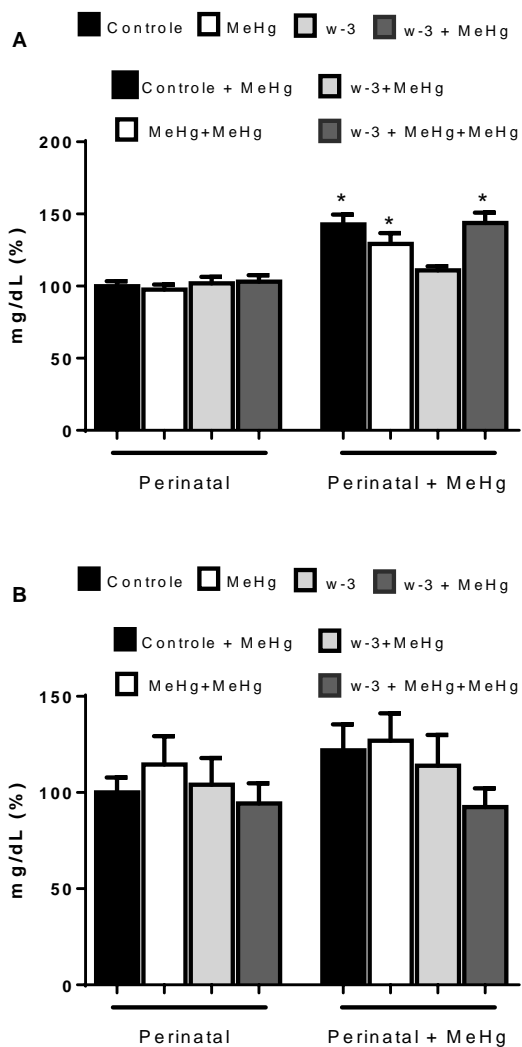


(Legenda na próxima página)

O teste do *rotarod* e da grade invertida foram realizados 24h após o término do tratamento. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como (A) número de quedas (n= 12-22) (100% corresponde à média de  $2,1 \pm 0,4$  quedas) e (B) melhor tempo (n=9-14) (100% corresponde à média de  $90,1 \pm 5,4$  do melhor tempo). Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. O teste estatístico realizado foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. As barras agrupadas em cores sólidas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam veículo (água) quando adultos e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento perinatal a longo prazo. As barras hachuradas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam MeHg quando adultos e \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento com MeHg na vida adulta quando comparados animais que receberam o mesmo tratamento perinatal.

Após a avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e das estruturas encefálicas. A análise do perfil lipídico no plasma mostrou que os tratamentos perinatais não alteraram os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos dos animais quando avaliados na fase adulta (Figuras 17A e B, respectivamente). Já a exposição ao MeHg na fase adulta foi capaz de alterar significativamente os níveis de colesterol nos animais [ $F_{(1,133)} = 65,04$ ;  $p < 0,000001$ ]. Entretanto, análises post hoc demonstraram que a exposição ao MeHg na fase adulta não foi capaz de alterar significativamente os níveis de colesterol nos animais que haviam sido expostos perinatalmente a ração enriquecida com óleo de peixe (Figura 17A), embora este fenômeno tenha sido observado para os demais grupos. Com relação ao nível de triglicerídeos, não foram constatadas alterações pelos tratamentos (Figura 17B).

**Figura 17. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs no perfil lipídico em machos adultos (3 meses de vida).**



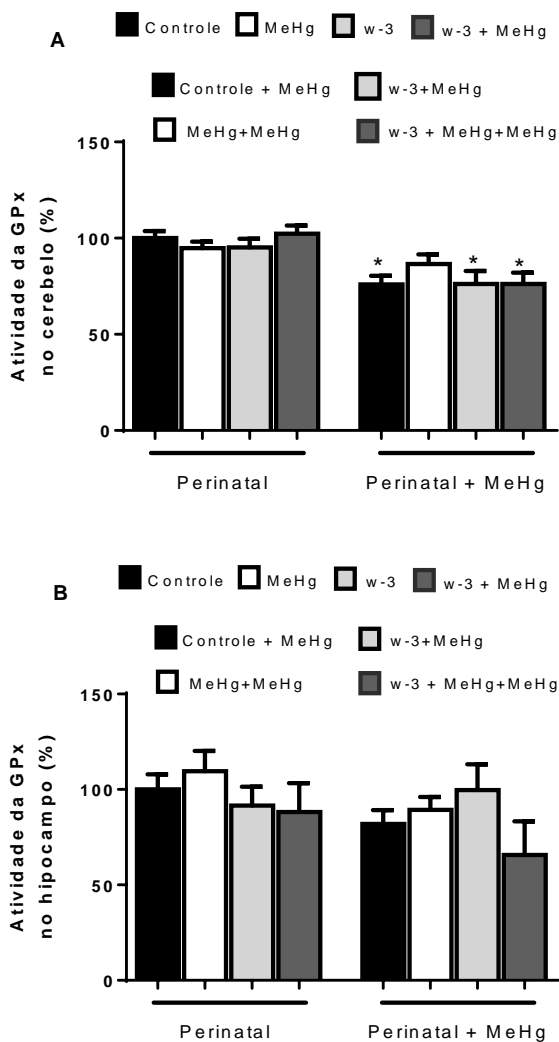
(Legenda na próxima página)

Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como (A) nível de colesterol total (100% corresponde ao nível médio de  $79,7 \pm 4,4$  mg/dL) e (B) nível de triglicerídeos (100% corresponde ao nível médio de  $104,7 \pm 12,5$  mg/dL) em mg/dL. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A) n= 17-18 (B) n= 11-15. O teste estatístico realizado foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. As barras agrupadas em cores sólidas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam veículo (água) quando adultos e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento perinatal a longo prazo. As barras hachuradas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam MeHg quando adultos e \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento com MeHg na vida adulta quando comparados animais que receberam o mesmo tratamento perinatal.

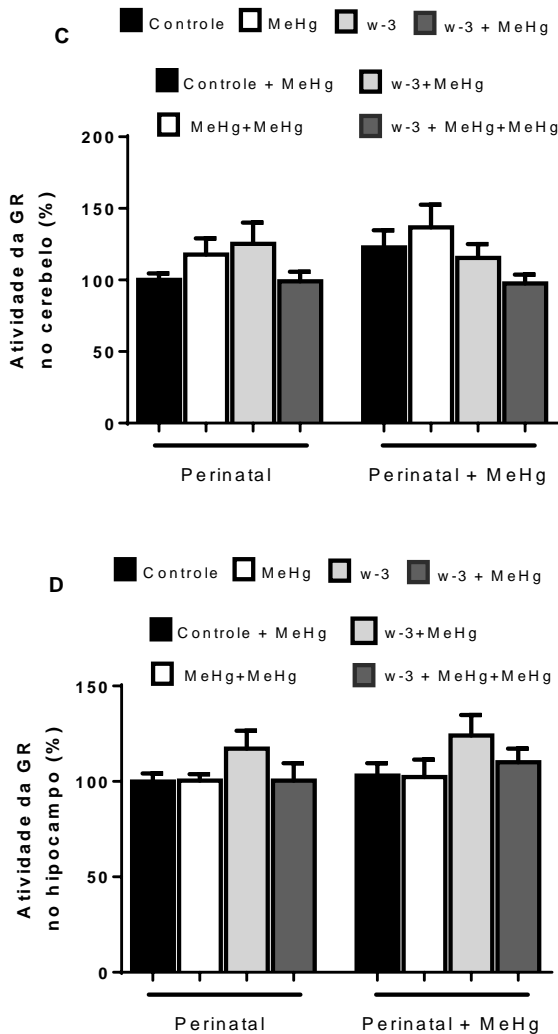
A fim de investigar possíveis alterações bioquímicas induzidas pelos tratamentos, a atividade das enzimas GPx e GR foram mensuradas no cerebelo e hipocampo dos camundongos adultos. A Figura 18 mostra que a atividade das enzimas GPx e GR nas estruturas de cerebelo e hipocampo não foram alteradas pela exposição materna aos diferentes tratamentos nos animais adultos. Já a exposição ao MeHg durante a fase adulta alterou significativamente [ $F_{(1,87)} = 29,9$ ;  $p < 0,000001$ ] a atividade da GPx no cerebelo dos animais (Figura 18A). Entretanto, o teste post hoc demonstrou que a exposição ao MeHg na fase adulta não foi capaz de alterar significativamente a atividade da GPx cerebelares em animais que haviam sido expostos perinatalmente ao MeHg de forma isolada (mães do grupo ii). Já no hipocampo não foram observadas mudanças na atividade da GPx (Figura 18B). A atividade da enzima GR não foi alterada pela exposição aguda ao MeHg no cerebelo (Figura 18C) e no hipocampo (Figura 18D). Ainda, o conteúdo de NPSH e os níveis de TBARS não sofreram alterações em função da exposição materna (longo prazo) ou pelo tratamento na vida adulta com MeHg em ambas as estruturas encefálicas (Tabela 6).



**Figura 18. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs na atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) em machos adultos (3 meses de vida).**



(Continua na próxima página)



As análises da atividade das enzimas são expressas como nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como atividade das enzimas GPx no (A) cerebelo (100% corresponde à média de  $4,8 \pm 0,4$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e (B) hipocampo (100% corresponde à média de  $2,1 \pm 0,2$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e da GR em (C) cerebelo (100% corresponde

à média de  $13,5 \pm 0,1$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) e (D) hipocampo (100% corresponde à média de  $12,6 \pm 1,4$  nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína) nos camundongos adultos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A) n= 11-14 (B) n=10-14 (C) n=6-8 (D) n=6-9. O teste estatístico realizado foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. As barras agrupadas em cores sólidas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam veículo (água) quando adultos e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento perinatal a longo prazo. As barras hachuradas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam MeHg quando adultos e \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento com MeHg na vida adulta quando comparados animais que receberam o mesmo tratamento perinatal.

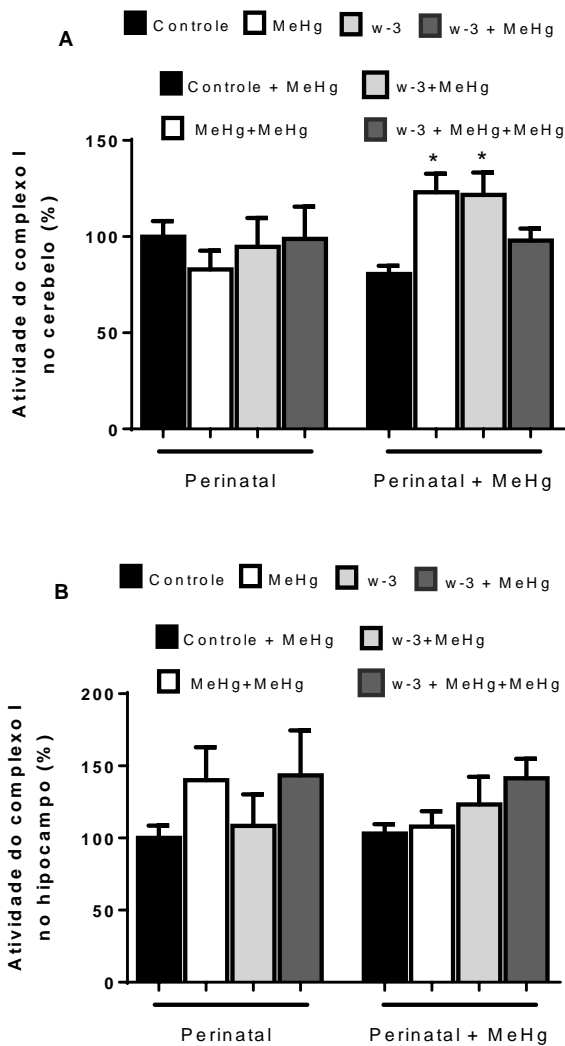
**Tabela 6. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs sobre parâmetros de estresse oxidativo em machos adultos (3 meses de vida).**

Período da Exposição	Grupos	NPSH cerebelo	NPSH hipocampo	TBARS cerebelo	TBARS hipocampo
<b>Perinatal</b>	Controle	34,72 ( $\pm 2,26$ )	31,48 ( $\pm 2,21$ )	4,61 ( $\pm 1,57$ )	1,68 ( $\pm 0,85$ )
	MeHg	32,6 ( $\pm 2,28$ )	34,51 ( $\pm 2,61$ )	2,76 ( $\pm 1,3$ )	1,25 ( $\pm 0,37$ )
	$\omega$ -3	37,81 ( $\pm 2,36$ )	41,92 ( $\pm 4,89$ )	5,62 ( $\pm 1,41$ )	1,74 ( $\pm 0,52$ )
	$\omega$ -3 + MeHg	36,78 ( $\pm 3,26$ )	37,21 ( $\pm 3,2$ )	4,05 ( $\pm 1,5$ )	1,14 ( $\pm 0,36$ )
<b>Perinatal + Adulto</b>	Controle	33,31 ( $\pm 2,39$ )	35,94 ( $\pm 3,99$ )	3,21 ( $\pm 1,32$ )	1,32 ( $\pm 0,11$ )
	+ MeHg	36,01 ( $\pm 2,93$ )	40,27 ( $\pm 2,69$ )	5,71 ( $\pm 1,93$ )	3,92 ( $\pm 0,88$ )
	$\omega$ -3 + MeHg	32,75 ( $\pm 0,71$ )	38,27 ( $\pm 2,38$ )	2,35 ( $\pm 0,53$ )	4,04 ( $\pm 1,6$ )
	$\omega$ -3 + MeHg	35,46 ( $\pm 1,98$ )	38,58 ( $\pm 3,07$ )	3,2 ( $\pm 0,58$ )	0,79 ( $\pm 0,34$ )
	+ MeHg				

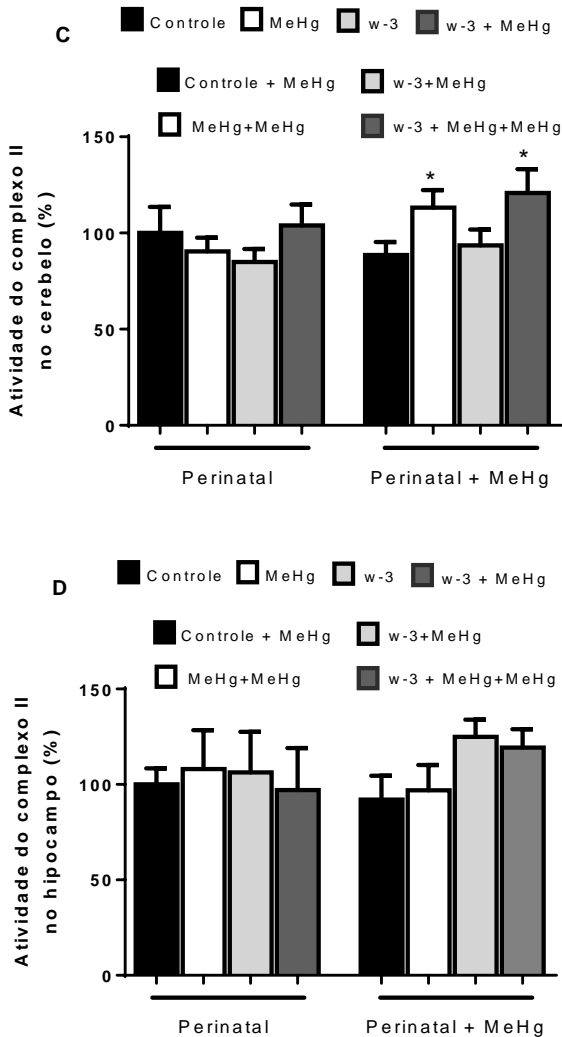
O conteúdo de NPSH e os níveis de TBARS são expressos como nmol NPSH/mg proteína e nmol de MDA/mg de proteína, respectivamente. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como conteúdo de NPSH no (A) cerebelo e (B) hipocampo, níveis de TBARS em (C) cerebelo e (D) hipocampo nos camundongos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. n= 4-6.

Para avaliar o efeito dos tratamentos durante a gestação e lactação a longo prazo e da exposição adulta ao MeHg, a atividade dos complexos mitocondriais foi mensurada no cerebelo e hipocampo dos camundongos adultos. Os tratamentos realizados durante o período perinatal não alteraram a atividade dos complexos mitocondriais I e II no cerebelo e hipocampo de animais quando avaliados na fase adulta. Já a exposição ao MeHg durante a fase adulta aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade NADH desidrogenase no cerebelo dos animais que haviam sido expostos perinatalmente ao MeHg ou à ração enriquecida, quando comparados com seus respectivos controles (animais tratados na fase adulta apenas com veículo) (Figura 19A). Porém, no hipocampo, a atividade não se mostrou alterada em função dos tratamentos (Figura 19B). Já a atividade do complexo II foi aumentada no cerebelo pela exposição ao MeHg na fase adulta apenas nos animais que já haviam sido expostos a este toxicante durante o desenvolvimento, de maneira isolada ou combinada à ração rica de óleo de peixe (prole dos grupos ii e iv) ( $p < 0,05$ ) (Figura 19C); no entanto, este efeito não foi observado no hipocampo (Figura 19D).

**Figura 19. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs na atividade dos complexos mitocondriais em machos adultos (3 meses de vida).**



(Continua na próxima página)



As análises da atividade dos complexos mitocondriais plasmáticas são expressas como nmol/min/mg de proteína. Os resultados foram normalizados como porcentagem do controle e representados como atividade de NADH desidrogenases no (A) cerebelo (100% corresponde à média de  $56,5 \pm 5,8$  nmol/min/mg de proteína) e (B) hipocampo (100% corresponde ao nível médio de  $27,2 \pm 4,3$  nmol/min/mg de proteína) e atividade do complexo II no (C)

cerebelo (100% corresponde à média de  $1,4 \pm 0,2$  nmol/min/mg de proteína) e (D) hipocampo (100% corresponde à média de  $1,2 \pm 0,5$  nmol/min/mg de proteína) nos adultos. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (A) (B) n= 5-8 (C) n=4-8 (D) n=5-7. O teste estatístico realizado foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste post-hoc de Fisher LSD. As barras agrupadas em cores sólidas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam veículo (água) quando adultos e # indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento perinatal a longo prazo. As barras hachuradas representam os tratamentos realizados durante o período perinatal em animais que receberam MeHg quando adultos e \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ): efeito do tratamento com MeHg na vida adulta quando comparados animais que receberam o mesmo tratamento perinatal.

Por fim, avaliamos os efeitos da exposição perinatal ao MeHg isolado e/ou combinado à ração enriquecida com óleo de peixe, assim como os efeitos da exposição ao MeHg na fase adulta, sobre os níveis cerebelares de Hg na fase adulta. Para tal análise, comparamos apenas os animais que receberam tratamento durante a gestação e lactação (efeito a longo prazo) e na tabela 7, é possível observar que a exposição perinatal aos dois agentes (grupo iv) aumentou o nível tecidual de Hg ( $p < 0,05$ ) no cerebelo dos animais adultos quando comparados aqueles animais expostos apenas ao veículo (água) e dieta padrão durante o período perinatal.

A fim de se avaliar o efeito do tratamento perinatal com MeHg e os AGPIs  $\omega$ -3 derivados do óleo de peixe sobre a deposição de Hg no cerebelo dos animais após uma exposição ao MeHg na fase adulta, comparou-se apenas os animais que receberam MeHg nesta fase (3 meses de vida). A ANOVA de duas vias (MeHg perinatal vs. AGPIs perinatal) demonstrou um efeito significativo do tratamento com MeHg perinatal [ $F_{(1,18)} = 5,86$ ;  $p = 0,026$ ], embora os AGPI não apresentaram efeito significativo [ $F_{(1,18)} = 0,0003$ ;  $p = 0,986$ ]. Entretanto, houve uma significativa interação MeHg perinatal vs. AGPI perinatal [ $F_{(1,18)} = 17,87$ ;  $p = 0,0005$ ]. Corroborando com esta significativa interação, o teste de post hoc demonstrou que o houve uma menor ( $p = 0,007$ ) deposição de Hg no cerebelo dos animais que receberam AGPIs perinatalmente quando comparados aos animais do grupo controle. Interessantemente, este efeito foi perdido quando os animais foram expostos perinatalmente ao MeHg + AGPIs. De fato, os níveis de Hg cerebelar nestes animais (MeHg + AGPI perinatal) não diferiram estatisticamente dos animais do grupo controle e foram praticamente o triplo dos níveis dos animais tratados apenas com AGPIs durante o período perinatal.

**Tabela 7. Efeitos de exposições ao MeHg e/ou AGPIs nos níveis de Hg no cerebelo em machos adultos (3 meses de vida).**

<b>Período da Exposição</b>	<b>Grupos</b>	<b>Níveis de Hg</b>
<b>Perinatal</b>	Controle	340,3 ( $\pm$ 101,9)
	MeHg	614,8 ( $\pm$ 186,6)
	$\omega$ -3	242,7 ( $\pm$ 85,67)
	$\omega$ -3 + MeHg	1628 ( $\pm$ 676,3)#
<b>Perinatal + Adulto</b>	Controle + MeHg	13408 ( $\pm$ 619,5)
	MeHg + MeHg	10266 ( $\pm$ 2973)
	$\omega$ -3 + MeHg	6021 ( $\pm$ 1557)*
	$\omega$ -3 + MeHg + MeHg	17594 ( $\pm$ 1157)**

Os níveis de mercúrio (Hg) são expressos como  $\mu\text{g/g}$  de proteína. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. Diferenças estatísticas para os dois grandes grupos de animais (expostos ou não ao MeHg na fase adulta) foram analisados separadamente a partir de uma ANOVA de duas vias (MeHg vs. dieta enriquecida com óleo de peixe). n= 5-6. # indica  $p < 0,05$  quando comparados aos grupo controle e grupo  $\omega$ -3 no período perinatal. \* indica  $p < 0,05$  quando comparados aos grupo controle + MeHg na vida adulta e ao grupo  $\omega$ -3 + MeHg perinatal + MeHg na vida adulta. \*\* indica  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo MeHg perinatal + MeHg na vida adulta e ao grupo  $\omega$ -3 perinatal + MeHg na vida adulta.



## 6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do SNC representa um período crítico, onde a exposição materna a fatores exógenos, como determinados nutrientes e toxinas ambientais, pode modular a susceptibilidade ao surgimento de respostas biológicas imediatas e a longo prazo na prole (Barouki *et al*, 2012). A exposição ao MeHg, um neurotóxico ambiental encontrado em frutos do mar, tem mostrado inúmeros efeitos deletérios sobre o SNC em humanos e em modelos animais, principalmente quando esta exposição se dá no período perinatal (Grandjean *et al*, 2014). No entanto, o consumo de peixes durante as fases de gestação e lactação ainda é uma tema controverso, uma vez que este grupo alimentar é fonte de importantes nutrientes benéficos à formação do SNC, especialmente os ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 (Oken & Bellinger, 2008; Innis, 2014). Ainda, alguns estudos sugerem que a presença destes ácidos graxos poderia ter efeitos protetores frente à neurotoxicidade induzida pelo MeHg (Strain *et al*, 2008; Julvez *et al*, 2016). No entanto, até o presente momento, os mecanismos que permeiam esta possível neuroproteção ainda precisam ser esclarecidos.

Com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos protetores dos ácidos graxos  $\omega$ -3 frente ao insulto promovido pelo MeHg no SNC a curto e longo prazo, este trabalho procurou responder algumas questões, tais como (1) Quais os efeitos imediatos da exposição perinatal de camundongos ao MeHg isolada ou concomitante aos ácidos graxos  $\omega$ -3 na prole após o desmame? (2) Quais os efeitos a longo prazo (3 meses de vida) da exposição de camundongos a estes agentes durante o neurodesenvolvimento? (3) Quais os efeitos de uma nova exposição ao MeHg nesses animais na vida adulta?

Para elucidar tais questões, fêmeas prenhas de camundongo foram expostas durante os períodos de gestação e lactação ao MeHg isoladamente ou em combinação a uma ração enriquecida com óleo de peixe, fonte dos AGPIs  $\omega$ -3. Primeiramente, investigamos se os tratamentos poderiam alterar o consumo alimentar, bem como modificar o peso das progenitoras e das ninhadas durante o período de exposição (6 semanas). Observamos que o consumo de ração e líquidos não variou entre os grupos, dando indícios de que o MeHg acrescido na água e o óleo de peixe presente na ração não modificaram a palatabilidade (Tabelas 2 e 3, respectivamente). Através do monitoramento da ingestão diária de líquidos e ração, podemos contatar que as progenitoras dos grupos ii e iv consumiram, em média, uma dose de 900  $\mu$ g de Hg/kg/dia. Com relação ao consumo dos AGPIs  $\omega$ -3, as fêmeas dos grupos iii e iv obtiveram,

através da ração com óleo de peixe, a oferta de 956 mg de DHA/kg/dia e 1064 mg de EPA/kg/dia. A razão DHA:Hg encontrada em nosso estudo (aproximadamente de 1) mimetizou o consumo de peixes como atum, anchova, linguado, carpa e peixe-espada, os quais possuem uma razão DHA:Hg menor que 17:1 (Mahaffey *et al*, 2011). As oscilações no peso das progenitoras e da prole ao longo da gestação e lactação também foram semelhantes entre os grupos (Figura 7). Estes achados corroboram com outros estudos que observaram que o tratamento com doses relativamente baixas de MeHg durante os períodos gestacional e de lactação não altera o consumo de ração e o peso das progenitoras e filhotes (Manfroi *et al*, 2004; Chu *et al*, 2008; Stringari *et al*, 2008; Cheng *et al*, 2015), sendo que o mesmo foi observado em relação ao consumo na exposição isolada e/ou concomitante do MeHg a uma ração enriquecida com DHA (Jayashankar *et al*, 2012). No entanto, outros estudos mostraram que o consumo de ração enriquecida com óleo de peixe, porém deficiente de vitamina B<sub>12</sub>, nestes períodos, foi menor em relação ao grupo controle (Roy *et al*, 2012; Sable *et al* 2012).

Embora o SNC seja considerado o alvo primário dos efeitos deletérios da ação do MeHg, estudos epidemiológicos têm apontado o sistema cardiovascular como outro potencial alvo deste toxicante. Estes achados relacionam o MeHg a eventos como infarto do miocárdio, alteração na pressão arterial, aterosclerose e dislipidemias, bem como estresse oxidativo em células endoteliais (Karagas *et al*, 2012; Moreira *et al*, 2012; Ghizoni *et al*, 2017). Todavia, os ácidos graxos  $\omega$ -3, também oriundos de frutos do mar, têm um conhecido papel cardioprotetor, principalmente no controle da pressão arterial, função endotelial vascular, atividade anti-inflamatória, assim como na diminuição nos níveis de triglicerídeos e aumento nos níveis de HDL (Gribble *et al*, 2016; Morin *et al*, 2015; Moreira & Farina, 2014; Kimura *et al*, 2013). Logo, investigamos o efeito dos tratamentos sobre o perfil lipídico dos filhotes (PN 23) e observamos que não houve alterações nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos nos camundongos (Tabela 4).

Com o objetivo de investigar o efeito dos tratamentos a longo prazo e as respostas frente a uma nova exposição ao MeHg, os animais remanescentes das proles foram expostos ao MeHg na vida adulta e avaliados aos 3 meses de vida. Com relação ao perfil lipídico destes animais, a exposição adulta ao MeHg promoveu um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol em todos os grupos, exceto nos animais oriundos de mães que receberam ração com óleo de peixe (Figura 17A). Por outro lado, os níveis de triglicerídeos não foram alterados pelos tratamentos no período perinatal e na vida adulta (Figura 17B). Moreira e

col (2012) demonstraram que o tratamento com MeHg, também por 14 dias, levou à hipercolesterolemia em camundongos adultos, corroborando com estudos que relacionam o MeHg a eventos cardiovasculares. Em ratos expostos perinatalmente a uma mistura de contaminantes ambientais, dentre eles o MeHg, também foi observado um aumento no nível de colesterol nas proles no PN 35 (Chu *et al*, 2008). Em nosso estudo, nos animais que receberam óleo de peixe via dieta materna (grupo iii) e foram expostos ao MeHg na vida adulta, este efeito não foi visto, o que sugere que ácidos graxos  $\omega$ -3 ingeridos durante o período perinatal protegeram os animais da hipercolesterolemia induzida pelo MeHg na fase adulta (Figura 17). No entanto, este efeito protetor não foi encontrado nos animais oriundos de mães que receberam ração com óleo de peixe combinada ao MeHg, uma vez que a exposição adulta ao MeHg também aumentou os níveis de colesterol (Figura 17A). A literatura acerca dos efeitos dos ácidos graxos  $\omega$ -3 sobre os níveis de colesterol ainda é controversa; apesar do seu efeito em reduzir triglicerídeos ser bem descrito, alguns trabalhos sugerem que a suplementação com óleo de peixe pode aumentar ou reduzir os níveis de colesterol circulantes. Em estudos com humanos, a suplementação com EPA e DHA e o consumo de peixes aumentam os níveis plasmáticos das frações de colesterol, inclusive o HDL; no entanto, alguns autores relatam que estas partículas de colesterol são menores e menos aterogênicas, o que justifica os benefícios do seu uso (Smith *et al*, 2009; Berge *et al*, 2015). Ainda, proles oriundas de mães que receberam uma dieta rica em óleo de peixe no período perinatal e pós-natal apresentaram valores reduzidos de colesterol e triglicerídeos aos 3 meses de vida, quando comparados a uma dieta pós-natal rica em ácidos graxos  $\omega$ -6 (Hussain *et al*, 2013). De qualquer forma, os nossos resultados mostrando que ácidos graxos  $\omega$ -3 ingeridos na fase perinatal protegem os animais da hipercolesterolemia induzida pelo MeHg na fase adulta parecem ser bastante relevantes e representam uma novidade na literatura, embora os mecanismos relacionados a este evento ainda sejam desconhecidos.

Em humanos, os efeitos nocivos da exposição ao MeHg vieram à tona pela primeira vez em 1956, devido a uma intoxicação massiva pela ingestão de peixes e frutos do mar contaminados com MeHg na baía de Minamata no Japão. Esta contaminação foi consequência de uma indústria química de fertilizantes e plástico que utilizava Hg e descartava seus dejetos industriais nas águas da baía. A partir de então, designou-se o termo “doença de Minamata” para um conjunto de sintomas observados nesta população, dentre eles: distúrbios sensoriais, ataxia, prejuízos na fala e na audição, constrição do campo de visual, tremores e, em casos

mais graves, morte dos indivíduos (Harada, 1995). Ainda, em crianças recém-nascidas, o efeito dessa intoxicação aguda, através da ingestão materna, levou a danos graves ao SNC, como atrofia generalizada, hipoplasia do córtex cerebral e anormalidades na citoarquitetura no cérebro, além de hipoplasia do cerebelo e atrofia das camadas cerebelares (Harada, 1995). Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos têm apontado aos efeitos deletérios da exposição materna crônica ao MeHg sobre o desenvolvimento neuromotor e cognitivo em crianças e adolescentes. Em particular, os estudos de coorte nas ilhas Faroe (Dinamarca) e Seychelles (Oceano Índico), locais onde a alimentação baseia-se no consumo de pescados, apresentam dados expressivos acerca dos efeitos da exposição materna ao MeHg no desenvolvimento neurológico de crianças, adolescentes e adultos. Os estudos com estas populações serviram como base para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos reconhecer os efeitos neurotóxicos do MeHg durante o desenvolvimento e definir níveis de Hg considerados seguros em biomarcadores, como cabelo materno e no cordão umbilical (U.S. Environmental Protection Agency, 1997). Atualmente, os níveis de Hg considerados seguros, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental americana, são de 5,8 µg/L no sangue (U.S. Environmental Protection Agency, 2015). Dentre as evidências apontadas nestas populações, a exposição ao MeHg via consumo materno de frutos do mar resulta no prejuízo em testes de atenção, linguagem, função e coordenação motora e cognição durante a infância, adolescência e vida adulta (Granjean *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 2003; Debes *et al.*, 2006, 2016; Davidson *et al.*, 2008). No entanto, como mencionado previamente, os pescados são fontes de nutrientes essenciais para o neurodesenvolvimento, como os ácidos graxos  $\omega$ -3, que podem modular os efeitos deletérios do MeHg no período pré-natal (Strain *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2014). Para auxiliar na compreensão dos efeitos do MeHg durante o desenvolvimento sobre parâmetros comportamentais, estudos têm utilizado modelos animais de exposição perinatal a este agente (Patel & Reynolds, 2013; Bisen-Hersh *et al.*, 2014). Em nosso estudo, verificamos que o tratamento materno com MeHg e/ou ração enriquecida com óleo de peixe não alterou o comportamento locomotor e exploratório, tampouco a força neuromuscular nas proles no PN 22 (Figuras 15A e B, respectivamente). No entanto, a coordenação motora nos filhotes, avaliada através do número de quedas no teste da barra giratória (*Rotarod*), foi afetada de maneira significativa pela exposição perinatal ao MeHg, mesmo na prole onde as mães receberam MeHg concomitante a ração rica em óleo de peixe (grupos ii e iv) (Figura 16). Ou seja, os ácidos graxos  $\omega$ -3 não foram

capazes de proteger do prejuízo na coordenação motora dos filhotes mediado pela exposição ao MeHg. Este achado corrobora com outros estudos que mostram alterações na coordenação em proles expostas ao MeHg. Ratos expostos ao MeHg na dose de 5 ppm perinatalmente demonstraram um déficit na coordenação motora no PN 35, além de diminuição na expressão da sinaptosifina nas células granulares cerebelares, o que corrobora com a noção de que o cerebelo, estrutura envolvida na coordenação motora, é alvo da ação deletéria do MeHg (Fujimura *et al*, 2012). Ainda, nestes animais, o tratamento com MeHg induziu alterações na locomoção, concomitantes ao acúmulo de Hg no cerebelo e hipocampo (Cheng *et al*, 2015). A exposição ao MeHg via lactação também tem impacto no comportamento da prole. Em ratos no PN 45, a exposição ao MeHg via leite materno levou a prejuízos na coordenação motora e aprendizado, além de induzir morte neuronal no cerebelo (Sakamoto *et al*, 2004). Franco e col (2006) mostraram que o tratamento com MeHg na lactação provocou prejuízos na coordenação motora, porém sem afetar a locomoção, concomitante a diminuição do conteúdo de GSH no cerebelo de camundongos desmamados (Franco *et al*, 2006). A exposição perinatal a uma dieta combinada com MeHg e DHA promoveu a aceleração no desenvolvimento do reflexo de agarrar em camundongos no PN 15 (parâmetro utilizado para avaliar o desenvolvimento neuromotor) em paralelo ao acúmulo de DHA no tecido nervoso, sendo que esta resposta não foi encontrada na prole exposta apenas ao MeHg. Ainda nestes animais, o DHA reduziu o acúmulo de MeHg no cérebro de filhotes cujas mães se expuseram a ambas as substâncias (Jayashankar *et al*, 2012). Apesar de não termos observado em nosso estudo, a exposição durante o neurodesenvolvimento aos ácidos graxos  $\omega$ -3 tem mostrado efeitos sobre o desenvolvimento motor nas proles. Coluccia e col (2009) reportaram que a exposição perinatal aos ácidos graxos EPA e DHA melhora a coordenação motora em ratos desmamados (PN 21) e em adultos (PN 90), sem alterar comportamentos relacionados à locomoção, força muscular e aprendizado, sugerindo o envolvimento dos ácidos graxos  $\omega$ -3 na habilidade motora (Coluccia *et al*, 2009). O estudo conduzido por Janssen e col (2015) comparou os efeitos de uma dieta materna inadequada em ácidos graxos  $\omega$ -3 frente a uma dieta materna balanceada nestes lipídeos e constataram que a dieta inadequada levou a prejuízos na coordenação motora, memória espacial e diminuição da expressão gênica de sinaptofisina em filhotes no PN 30 (Janssen *et al*, 2015). Controversamente, Gonzales e col (2015) mostraram que uma dieta materna suplementada com óleo de peixe durante a gestação e lactação não promoveu alterações na coordenação

motora e locomoção em filhotes desmamados, porém melhorou significativamente parâmetros relacionados ao aprendizado (Gonzales *et al.*, 2015).

Após observarmos o efeito da exposição perinatal sobre parâmetros comportamentais nos filhotes, verificamos que os tratamentos perinatais com MeHg e a ração suplementada com óleo de peixe foram capazes de modificar a longo prazo a locomoção, exploração e coordenação motora dos camundongos adultos com 3 meses de vida. A exposição perinatal ao MeHg isolada (grupo ii) causou um prejuízo a longo prazo, uma vez que diminuiu a locomoção espontânea e o comportamento exploratório em adultos (Figura 15). Interessantemente, nos adultos oriundos de mães que consumiram MeHg com a ração enriquecida com óleo de peixe (grupo iv), não observamos prejuízo na locomoção, uma vez que estes animais apresentaram uma média de cruzamentos semelhante aos dos adultos proles de mães controle (grupo i) e mães que consumiram apenas a ração fonte de óleo de peixe (grupo iii) (Figura 15). Este resultado sugere que os ácidos graxos  $\omega$ -3 (oriundos da ração) foram capazes de proteger contra um prejuízo locomotor induzido pelo MeHg durante o desenvolvimento. Porém, esta proteção não foi vista no comportamento exploratório, onde o MeHg apresentou um efeito principal na redução no número de levantadas, mesmo em combinação com a ração enriquecida (Figura 15). Com relação à exposição adulta ao MeHg, verificamos que esta prejudicou significativamente o comportamento locomotor e exploratório apenas nos adultos cujas mães não haviam sido expostas ao MeHg durante a gestação e lactação (grupos i e iii, controle e  $\omega$ -3, respectivamente) (Figura 15). No entanto, nos animais que já haviam sido expostos ao MeHg via dieta materna e foram novamente expostos ao composto, esta última exposição na fase adulta não alterou o número de cruzamentos (locomoção) e de levantadas (exploração) nos adultos quando comparados aos adultos da mesma prole que não foram expostos ao MeHg (controle na vida adulta). Logo, esta resposta pode sugerir que nos animais que foram pré-expostos ao MeHg são menos susceptíveis ou mais adaptados aos efeitos deletérios do MeHg na locomoção e exploração na vida adulta e que os ácidos graxos  $\omega$ -3 parecem não ter efeito sobre estes comportamentos. Um perfil semelhante foi encontrado quando avaliamos a força neuromuscular pelo teste da grade invertida (*hang test*) nos adultos expostos ao MeHg. A exposição ao MeHg na fase adulta diminuiu a força neuromuscular apenas nos adultos onde as progenitoras não foram expostas ao MeHg (grupos i e iii) (Figura 16), ou seja, também neste parâmetro, os adultos expostos ao MeHg perinatalmente parecem ser mais adaptados ao efeito prejudicial

de uma segunda exposição a este contaminante. Por fim, avaliamos a coordenação motora dos adultos, também pelo número de quedas no teste da barra giratória. Constatou-se que a exposição materna ao MeHg prejudicou a coordenação motora, aumentando significativamente o número de quedas em machos adultos (controle adulto). Já nos adultos que foram expostos perinatalmente ao MeHg e ração enriquecida (grupo iv), este efeito negativo foi abolido (Figura 16). Interessantemente, nos adultos cujas mães foram tratadas apenas com a ração enriquecida com óleo de peixe, este tratamento também levou a prejuízos na coordenação motora. Na literatura, a exposição aguda ao MeHg mostrou-se capaz de causar prejuízos na performance motora e na atividade locomotora de camundongos adultos, sendo estes achados correlacionados a danos oxidativos e teciduais no cerebelo (Moreira *et al*, 2012; Zimmermann *et al*, 2014; Kirkpatrick *et al*, 2015; Sumathi & Christinal, 2016). Já a exposição ao MeHg durante os períodos fetal e pós-natal não foi capaz de alterar a coordenação motora em camundongos no PN 42, porém prejudicou a locomoção apenas nas fêmeas com 9 semanas de vida (Goulet *et al*, 2003). No estudo conduzido por Maia e col (2009), a exposição perinatal ao MeHg levou à hiperlocomoção e comportamento tipo-depressivo em ratos aos 2 meses de vida (Maia *et al*, 2009). Recentemente, Albores-Garcia e col (2016) demonstraram que o tratamento perinatal com MeHg causou prejuízos na atividade locomotora, exploratória e na memória em ratos no PN 40, sendo que estes prejuízos não foram observados no PN 90, o que sugere que a longo prazo o MeHg não compromete estes comportamentos (Albores-Garcia *et al*, 2016). Em humanos, van Wijngaarden e col (2013) reportaram que prejuízos em testes de controle motor em habitantes da ilha de Seychelles aos 19 anos foram associados principalmente à exposição recente ao MeHg (via consumo de pescados) e não a exposição materna ao contaminante, uma vez que estes indivíduos não apresentavam efeitos deletérios induzidos pela exposição pré-natal ao MeHg aos 5 anos de idade (van Wijngaarden *et al*, 2013; Strain *et al*, 2012). Além disso, com o objetivo de avaliar se a exposição aos ácidos graxos  $\omega$ -3 poderia atenuar o dano causado pela exposição perinatal ao MeHg, Paletz e col (2007) expuseram ratas prenhas e lactantes a ambos os compostos e avaliaram, em adultos, o efeito dos tratamentos sobre comportamentos relacionados a testes visuais e espaciais. Foi observado que, a longo prazo, a exposição ao MeHg causou prejuízos nestes parâmetros; porém, estes não foram atenuados pelo uso de uma dieta rica em ácidos graxos, sugerindo que, assim como nós observamos em nosso estudo, a exposição perinatal ao

MeHg pode impactar o comportamento na vida adulta (Paletz *et al*, 2007) e que a dieta rica em ácidos graxos parece não reverter estes prejuízos.

O sistema antioxidante da glutathiona, como mencionado anteriormente, representa um importante mecanismo de defesa para o SNC. Os efeitos do MeHg sobre este sistema, particularmente na redução da atividade da enzima GPx, têm sido descritos em diferentes estruturas e linhagens celulares neurais (Carvalho *et al*, 2007; Farina *et al*, 2009). Sendo assim, investigamos o impacto dos tratamentos do período perinatal em camundongos aos 23 dias de vida, sobre a atividade das enzimas antioxidantes do sistema da glutathiona nas estruturas de cerebelo e hipocampo. O cerebelo é considerado alvo principal da ação neurotóxica do MeHg, em particular, durante o desenvolvimento (Patel & Reynolds, 2013; Padhi *et al*, 2015; Bradford *et al*, 2016). Entretanto, alguns estudos têm observado efeitos tóxicos também no hipocampo, como alterações no sistema antioxidante (Vicente *et al*, 2004), na neurogênese e diferenciação neural (Obiorahet *et al*, 2015; Tian *et al*, 2016). Cheng e col (2015) demonstraram que o tratamento com MeHg durante a gestação e lactação causa um acúmulo tecidual de Hg em estruturas encefálicas, principalmente no cerebelo, seguido do hipocampo em animais no PN 22. Em nosso estudo, nos filhotes, a exposição perinatal ao MeHg e/ou óleo de peixe via dieta materna não alterou a atividade cerebelar das enzimas GPx e GR (Figura 10A e B, respectivamente). Esta mesma resposta, foi encontrada no cerebelo de camundongos desmamados (PN 21) que foram expostos ao MeHg apenas via leite materno (Franco *et al*, 2006). Stringari e col (2008) investigaram o efeito da exposição *in utero* ao MeHg sobre ontogênese do sistema da glutathiona no SNC e mostraram que o MeHg prejudica o aumento fisiológico da atividade das enzimas GPx, GR e dos níveis de GSH inerentes ao SNC em desenvolvimento (Stringari *et al*, 2008). Ainda, o tratamento pós-natal com este metal tóxico prejudica a capacidade antioxidante das células do cerebelo, pela diminuição na atividade da GPx e GR, em camundongos no PN 16-20 (Stringari *et al*, 2006). Um estudo conduzido por Patten e col (2013) mostrou que a suplementação com ácidos graxos  $\omega$ -3 durante a lactação (via dieta materna) foi capaz de reverter o dano oxidativo induzido no modelo de exposição pré-natal ao etanol, por aumentar o conteúdo de GSH no cerebelo e hipocampo e a atividade cerebelar de GPx da prole aos 2 meses de vida (Patten *et al*, 2013). Já em ratos adultos, Singh e col (2016) mostraram que o tratamento com ácidos graxos  $\omega$ -3 atenuou a diminuição da atividade da GPx e dos níveis de GSH induzida pelo tratamento com chumbo no cérebro, bem como reduziu danos



teciduais no córtex e cerebelo induzidos pela exposição ao metal (Singhet *et al*, 2016).

Avaliou-se também a atividade das enzimas antioxidantes do sistema da glutatona no hipocampo de filhotes no PN 23. O tratamento materno com MeHg diminuiu a atividade da GPx no hipocampo (Figura 10C), sendo que a dieta rica em óleo de peixe não foi capaz de promover um efeito protetor. Vicente e col (2004) demonstraram que injeções de MeHg em ratas prenhas modificam parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no hipocampo da prole, dentre estes, a diminuição da atividade da GPx nos PN 1 e PN 30 (Vicente *et al*, 2004). Apesar de alguns trabalhos apontarem mudanças nos parâmetros de peroxidação lipídica e conteúdo de GSH em virtude da exposição ao MeHg ou aos ácidos graxos  $\omega$ -3, não constatamos mudanças no conteúdo de NPSH, níveis de TBARS e imunoconteúdo de 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) no cerebelo e hipocampo de filhotes (Figura 12). Assim como a técnica de avaliação dos níveis de TBARS, a detecção do conteúdo de 4-HNE é uma ferramenta utilizada para avaliar peroxidação lipídica, consequência do ataque de espécies reativas aos ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática, formando hidroperóxidos de lipídeos. Estes hidroperóxidos podem novamente ser oxidados, formando o 4-HNE, que pode levar a danos em proteínas, como alterações na função e interações entre elas (Ayala *et al*. 2014). Diferente dos nossos achados, o tratamento com MeHg em ratos lactentes (PN 2) foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica no hipocampo após 2 dias (PN 4) e 7 dias (PN 9) de exposição (Abdalla *et al*, 2011, 2012). Os efeitos neurotóxicos do MeHg no hipocampo também têm sido descritos sobre outros aspectos, onde o tratamento com MeHg no período pós-natal (PN 7) foi capaz de diminuir a proliferação celular hipocampal por até 14 dias após o tratamento (PN 21) em ratos, sem que estas alterações fossem detectadas no cerebelo, sugerindo um prejuízo na neurogênese região-específica no SNC (Burke *et al*, 2006; Obiorah *et al*, 2015). Ainda, sob este mesmo regime de tratamento pós-natal, o MeHg foi capaz de inibir a progressão do ciclo celular e induzir apoptose em precursores neuronais no hipocampo de filhotes (Falluel-Morel *et al* 2007, 2012). Com relação aos efeitos dos ácidos graxos  $\omega$ -3 nesta estrutura, a suplementação com óleo de peixe via dieta materna (períodos de gestação e lactação) mostrou-se capaz de aumentar os níveis hipocampais do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, neurotrofina envolvida em neurogênese) concomitante a melhora da memória espacial e desempenho cognitivo em ratos com 3 meses de vida (Rathod *et al*, 2014; 2015), bem como estimular a diferenciação de neurônios no hipocampo na prole no PN 60 (Janssen *et al*, 2015). Além

disto, o tratamento de ratos adultos com ácidos graxos  $\omega$ -3 aumentou a atividade hipocampal da GPx e o conteúdo de GSH, além de recuperar estes parâmetros de dano oxidativo induzido em um modelo de epilepsia (Abdel-Wahabet *et al*, 2015), bem como diminuiu a lipoperoxidação no hipocampo induzida no modelo de bipolaridade (Model *et al*, 2013). Salvati e col (2008) mostraram que a exposição pós-natal (PN 2) ao EPA e DHA promoveu a expressão de genes envolvidos na mielinização de neurônios do cerebelo e córtex cerebral em ratos neonatos no PN 5 (Salvati *et al*, 2008). Em cultura de células de hipocampo, a exposição ao DHA promoveu um aumento na atividade da GPx e na razão GSH/GSSH, além de estimular a expressão gênica de enzimas antioxidantes (peroxiredoxinas e tioredoxinas), sugerindo um efeito antioxidante também indireto neste tipo celular (Casañas-Sánchez *et al*, 2014). Ainda, em cultura primária de neurônios de hipocampo de embriões de roedores, o tratamento com DHA estimulou o crescimento de neuritos e sinaptogênese, resultados que corroboram com a importância dos ácidos graxos  $\omega$ -3 para o neurodesenvolvimento e nos processos de aprendizado e memória (Cao *et al*, 2009; Kim *et al*, 2011).

Uma vez detectadas alterações nas enzimas do sistema da glutatona nos filhotes após o desmame, investigou-se os efeitos dos tratamentos perinatais a longo prazo, em animais com 3 meses de vida, e como estes poderiam modular a exposição adulta ao MeHg. No hipocampo dos camundongos adultos, a atividade da GPx não foi alterada pela exposição perinatal a longo prazo, tampouco pela exposição adulta ao MeHg (Figura 18). Este mesmo perfil foi observado com relação aos demais parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no hipocampo, onde os tratamentos não modificaram a atividade da GR, o conteúdo de GSH e os níveis de TBARS (Tabela 6). No cerebelo, observamos que a atividade da enzima GPx manteve-se semelhante entre os adultos que não receberam tratamento com MeHg na vida adulta. Ou seja, assim como observado nos filhotes no PN 23, o tratamento com MeHg e/ou ração com óleo de peixe não alterou este parâmetro a curto e longo prazo no cerebelo (Figura 18). Interessantemente, quando os animais foram expostos ao MeHg por 14 dias na vida adulta, a atividade da GPx cerebelar reduziu significativamente em todos os grupos (cerca de 25%), exceto nos adultos cujas mães haviam sido tratadas apenas com MeHg (grupo ii) (Figura 18A). Este resultado pode indicar que os animais que já haviam sido expostos isoladamente ao MeHg *in utero* e via leite materno sejam adaptados a diminuição da GPx provocada pela exposição aguda ao MeHg e que os ácidos graxos  $\omega$ -3 podem modular este efeito no cerebelo. No entanto, outros parâmetros de estresse oxidativo, como atividade da

GR, conteúdo de GSH e níveis de TBARS não foram modificados em virtude dos tratamentos no desenvolvimento e na vida adulta (Figura 18 e tabela 6, respectivamente). Em adultos, a exposição ao MeHg já demonstrou ser capaz de alterar marcadores de estresse oxidativo no SNC, particularmente no cerebelo, estrutura alvo de sua neurotoxicidade. *In vitro*, Fujimura & Usuki (2014) demonstraram que as células granulares são mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos do MeHg sobre o sistema antioxidante e as células de Purkinje e neurônios da camada molecular parecem ser mais resistentes (Fujimura & Usuki, 2014). Farina e col (2009) mostraram que o tratamento com baixas concentrações (nM) de MeHg reduz a atividade da isoforma GPx-1, presente no citoplasma, em cultura de células granulares do cerebelo após 4 dias de exposição, concomitante ao aumento na peroxidação lipídica (Farina *et al*, 2009). Em camundongos adultos, a exposição ao MeHg via oral por 21 dias induz uma redução na atividade e no imunoc conteúdo da enzima GPx no cerebelo, concomitante a prejuízos motores e astrogliose cerebelar (Moreira *et al*, 2012; Zemolin *et al*, 2012). Uma resposta semelhante foi encontrada por Sumathi & Christinal (2016) em ratos adultos, onde o MeHg também reduziu o número de células de Purkinje e estresse oxidativo no cerebelo. Já sobre os efeitos dos ácidos graxos  $\omega$ -3, a suplementação com óleo de peixe por 45 dias não foi capaz de modificar a atividade das enzimas antioxidantes do sistema da glutatona (GPx e GR) no cerebelo de ratos adultos (Polotow *et al*, 2015). Em camundongos adultos, o tratamento com ácidos graxos  $\omega$ -3 protegeu dos danos provocados pelo MeHg sobre parâmetros de estresse oxidativo no cérebro, como peroxidação lipídica, níveis de GSH e óxido nítrico (Karapehliyan *et al*, 2014). Um efeito protetor sobre marcadores de estresse oxidativo no cerebelo também foi encontrado no tratamento com DHA em ratos adultos expostos ao alumínio, porém o DHA não preveniu contra o dano induzido por este metal às células de Purkinje (Chaudhary *et al*, 2014).

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo representa um dos principais mecanismos de neurotoxicidade envolvidos na exposição ao MeHg. Este desbalanço no estado redox das células neurais pode se dar pela depleção das defesas antioxidantes do sistema da glutatona, bem como pela geração das EROs na mitocôndria. A perturbação na homeostase do glutamato induzido pelo MeHg é apontado como um importante mecanismo capaz de afetar o metabolismo mitocondrial, levando à alteração na cadeia transportadora de elétrons e consequente aumento na produção de EROs (Aschner *et al*, 2007; Farina *et al* 2011b). Após constatar os efeitos dos tratamentos no sistema

antioxidante da glutatona no SNC, investigamos como o MeHg e os ácidos graxos  $\omega$ -3 poderiam influenciar na função mitocondrial nos camundongos filhotes e adultos. Observamos que a exposição perinatal isolada a ração enriquecida com óleo de peixe foi capaz de promover um aumento na atividade do complexo I no cerebelo e hipocampo da prole, o que não foi constatado nos filhotes cujas mães receberam a ração enriquecida concomitante ao MeHg (Figura 11). Já a atividade do complexo II não foi modificada pelos tratamentos nos filhotes no PN 23 (Figura 11). As enzimas dos complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) estão presentes na membrana mitocondrial interna e têm um papel central no metabolismo energético, sendo que os complexos I e III são principais locais relacionados à produção de EROs (Murphy, 2009). Dentre os fatores que podem influenciar a atividade das enzimas da CTE, estão a composição dos fosfolipídeos presentes na membrana mitocondrial, como a cardiolipina, a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina, importantes para a atividade dos complexos I e III (Daum, 1985; Paradies *et al*, 2002). Dentre as organelas celulares, em particular, a mitocôndria contém uma alta concentração de cardiolipina, perfazendo de 13-15% do total de fosfolipídeos e está relacionada às funções mitocondriais (Daum & Vancet, 1997). Recentemente, Ting e col (2015) demonstraram que a suplementação com DHA e EPA foi capaz de aumentar o conteúdo mitocondrial de cardiolipina em mioblastos, bem como alterar o nível de insaturação deste lipídeo, sugerindo que suas concentrações e o remodelamento podem ser influenciados pela dieta (Ting *et al*, 2015). Em cultura de células de cólon, o tratamento com DHA também promoveu um aumento na concentração mitocondrial de cardiolipina; no entanto, nestas células enriquecidas com DHA, houve um aumento substancial na produção de EROs (Watkins *et al*, 1998). Em ratos adultos, uma dieta enriquecida com óleo de peixe foi capaz de aumentar a concentração dos fosfolipídeos de membrana mitocondrial, sendo que o aumento no grau de insaturação de cardiolipina demonstrado foi relacionado ao aumento na geração de EROs e liberação de citocromo c em células intestinais (Hong *et al*, 2002). Por outro lado, em camundongos transgênicos *fat-1*, capazes de sintetizar ácidos graxos  $\omega$ -3 de cadeia longa mais efetivamente, o aumento da concentração de fosfolipídeos na membrana mitocondrial foi acompanhado de uma diminuição na atividade do complexo I e da produção de EROs em mitocôndrias hepáticas (Hagopian *et al*, 2010). Embora alguns estudos tenham demonstrado que a suplementação com ácidos graxos  $\omega$ -3 pode promover um aumento na geração de EROs pela modificação na composição lipídica da mitocôndria, não constatamos

alterações na peroxidação lipídica (níveis de TBARS) nas estruturas analisadas (Tabela 5). No entanto, o tratamento materno isolado com óleo de peixe via dieta levou ao aumento na atividade do complexo I mitocondrial na prole, resposta que pode estar relacionada justamente à mudança da composição lipídica. Ainda, a exposição concomitante à ração enriquecida com óleo de peixe e ao MeHg não promoveu este efeito, o que sugere que o MeHg poderia interferir, por exemplo, neste remodelamento de fosfolípidos da membrana.

Com relação ao metabolismo mitocondrial nas estruturas do SNC nos adultos, verificamos que os tratamentos durante o desenvolvimento não alteraram a atividade dos complexos I e II a longo prazo no cerebelo e hipocampo (Figura 19). No entanto, a exposição adulta ao MeHg aumentou a atividade do complexo I no cerebelo em animais cujas mães haviam sido expostas ao MeHg (grupo ii) e a ração enriquecida com óleo de peixe (grupo iii) isoladamente, sendo que este efeito não foi visto nos adultos proles das mães que se expuseram a ambos tratamentos (grupo iv) (Figura 19). Com relação à atividade do complexo II nos camundongos adultos, observamos que a exposição ao MeHg na fase adulta aumentou sua atividade no cerebelo dos animais que já haviam sido expostos perinatalmente ao MeHg, de forma isolada ou combinada à ração (grupos ii e iv, respectivamente) (Figura 19), sendo que esta resposta não foi constatada no hipocampo dos adultos (Figura 19). Um estudo conduzido por Mori e col (2011) mostrou que, em ratos tratados com MeHg, apenas a atividade do complexo II da CTE no cerebelo foi afetada, sem que os demais complexos enzimáticos mitocondriais fossem afetados, além de induzir a liberação de citocromo c (Mori *et al*, 2011). Os complexos mitocondriais I e III são os principais envolvidos na geração de EROs na cadeia respiratória, porém McLennan & Esposti (2000) demonstraram que o complexo II parece também contribuir de maneira expressiva na geração destes compostos. Em cultura primária de células granulares do cerebelo, o tratamento com MeHg causa disfunção mitocondrial pela diminuição na atividade dos complexos III e IV (sem alterar os demais) em paralelo à redução na viabilidade celular e aumento na geração de EROs (Qu *et al*, 2013). Nesta mesma linhagem, Limke & Atchison (2002) mostraram que o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular mediado pelo MeHg altera o potencial de membrana mitocondrial e consequente diminuição na viabilidade celular. Em camundongos adultos, a exposição oral ao MeHg causa uma diminuição na atividade mitocondrial no cérebro (Franco *et al*, 2009) e redução na atividade dos complexos mitocondriais I-IV (Glaser *et al*, 2010). No cerebelo de ratos adultos, a exposição ao MeHg reduz a atividade das mitocôndrias, por alterar a atividade dos complexos II e III,

e aumenta a produção de EROs cerebelar e afetar as defesas antioxidantes (GSH e GPx) (Mori *et al*, 2007).

Como mencionado anteriormente, o cerebelo é um conhecido alvo da ação deletéria da exposição ao MeHg, uma vez que os neurônios desta estrutura parecem ser mais susceptíveis aos danos provocados pelo composto. Uma vez constatadas alterações na coordenação motora em filhotes expostos ao MeHg durante o desenvolvimento, investigamos o efeito dos tratamentos sobre a homeostase sináptica, através da avaliação de proteínas-alvo envolvidas na neurotransmissão no cerebelo. Dentre os alvos, investigamos, através de imunodeteção, o conteúdo cerebelar de proteínas envolvidas da modulação da função e homeostase sináptica, como a sinapsina (total e fosforilada), sinaptofisina e PSD-95 (Proteína pós-sináptica de densidade 95). A sinaptofisina pertence à família de proteínas que contêm domínios transmembrana; é encontrada em vesículas sinápticas, amplamente utilizada como marcadora de terminais pré-sinápticos e dentre suas funções destacam-se: a exocitose, sinaptogênese, biogênese e endocitose de vesículas sinápticas (Kwon & Chapman, 2011). Já a PSD-95 é uma proteína pós-sináptica localizada em sinapses excitatórias e tem como principal função promover a maturação e estabilização destas sinapses (Taft & Turrigiano, 2013).

A exposição materna ao MeHg e/ou aos AGPIs não alterou o conteúdo/fosforilação destas proteínas no cerebelo de camundongos após o período do desmame (Figura 12). A sinapsina faz parte de uma família composta por 10 proteínas homólogas; as sinapsinas Ia–b, IIa–b, and IIIa–f e são proteínas-chave na regulação da formação e plasticidade das sinapses (Cesca *et al*, 2010). Em nosso estudo, investigamos a sinapsina Ia–b, isoforma fosforilada na serina 62 e 67 pela ativação das vias de sinalização da ERK/MAPK (Jovanovic *et al*, 1996). Além do imunoc conteúdo de sinapsina, foram analisadas as proteínas sinaptofisina e PSD-95 no cerebelo.

Sabe-se que o aumento dos níveis de fosfolípídeos de membrana nas células neurais, como, por exemplo, pela suplementação com AGPIs  $\omega$ -3, estão entre os mecanismos envolvidos na formação de sinapses (sinaptogênese) e consequente aumento na expressão de sinapsina e PSD-95 (Cansev, 2016). Janssen e col (2015) mostraram que o aporte adequado de AGPIs  $\omega$ -3 durante os períodos de gestação e lactação promove o aumento na expressão de sinaptofisina no córtex cerebral, corroborando com a noção da importância destes ácidos graxos na plasticidade sináptica (Janssen *et al*, 2015). A suplementação com DHA mostrou-se capaz de recuperar os níveis de sinapsina, 4-HNE, e BDNF, parâmetros que haviam sido prejudicados em um modelo de traumatismo craniano em

ratos (Wu *et al*, 2011). Durante o período pós-natal, o tratamento com DHA em camundongos preveniu a diminuição nos conteúdos de sinaptofisina, PSD-95, bem como alterações morfológicas nos terminais sinápticos e na memória espacial em um modelo de neurotoxicidade induzida pelo anestésico sevoflurano (Tao *et al*, 2016). Yuki e col (2014) mostrou a associação entre diminuição nos níveis de DHA nos fosfolípidos de membrana e redução na expressão de PSD-95 cérebros *post-mortem* de pacientes com doença de Alzheimer, sem alterar, no entanto, a expressão de sinaptofisina em células neurais (Yuki *et al*, 2014). O MeHg também pode alterar a homeostase sináptica por alterar a expressão de proteínas envolvidas neste processo. No cerebelo, a exposição perinatal ao MeHg levou a uma redução no imunoc conteúdo de sinaptofisina em células granulares (Fijumura *et al*, 2012).

Após verificarmos que os tratamentos maternos não alteraram o imunoc conteúdo de proteínas envolvidas na neurotransmissão, investigamos possíveis efeitos da exposição materna ao MeHg isoladamente ou em combinação a uma ração enriquecida com óleo de peixe na histogênese pós-natal do cerebelo. Para tal análise, cortes sagitais de cerebelo dos camundongos no PN 23 foram processados e corados com azul de toluidina, um corante histológico metacromático do grupo de tiazinas que marca seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais (radicais carboxílicos, sulfatos e fosfatos) presentes em DNA nuclear e RNA citoplasmático (Calandro *et al*, 2011). Observamos que os tratamentos maternos não foram capazes de alterar a morfologia geral do tecido, tampouco modificar a citoarquitetura e a espessura das camadas celulares presentes no cerebelo (camadas granular, das células de Purkinje e molecular) (Figuras 13). Ainda, a densidade das células de Purkinje, obtidas através da contagem do número de células no ápice das folhas do cerebelo, não se mostrou alterada pela exposição materna aos agentes estudados (Figura 13). Em um estudo conduzido por Roegge e col (2006), a exposição materna ao MeHg não causou alterações na densidade de células de Purkinje (CP), tampouco no tamanho celular e dos seus dendritos e anormalidades estruturais nestes neurônios em ratos no PN 21, além de não alterar o volume das camadas celulares do cerebelo no PN 90 (Roegge *et al* 2006). Apesar do nosso estudo não ter evidenciado alterações na histogênese do cerebelo, controversamente, alguns trabalhos mostram que a exposição ao MeHg pode alterar a organização desta estrutura. No período embrionário, o tratamento com MeHg em aves levou à hipoplasia do cerebelo, alterações na microvasculatura cerebelar e número de astrócitos, desorganização das camadas celulares e diminuição da densidade de neurônios de Purkinje; células estas que

apresentaram sinais de degeneração, como redução do tamanho, núcleos picnóticos e vacuolização (Bertossi *et al*, 2004). Biamonte e col (2014) mostraram que a exposição ao MeHg na gestação e lactação promoveu uma redução significativa no número de células de Purkinje e, quando esta administração se deu em camundongos com fenótipo tipo-autista, a perda de CP foi acompanhada de alterações importantes na ultraestrutura destes neurônios (Biamonte *et al*, 2014). Em cultura organotípica, fatias de cerebelo de ratos (PN 8) expostas ao MeHg por 7 dias apresentaram redução na viabilidade dos neurônios da camada granular e prejuízo na migração destas células da camada granular externa para a camada granular interna, estruturas transientes durante o desenvolvimento pós-natal do cerebelo (Mancini *et al*, 2009). A exposição oral ao MeHg levou a uma redução no número de células de Purkinje em ratos adultos (Carvalho *et al*, 2007) e em pintos, além aumentar a distância entre estes neurônios no cerebelo (Carvalho *et al*, 2008). Referente aos efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 no cerebelo, em camundongos *fat-1*, o aumento endógeno destes AGPIs protegeu da perda severa de células de Purkinje induzida pelo tratamento com estreptomicina (Bak *et al*, 2015). De acordo com os autores, dentre os mecanismos que podem estar envolvidos na neuroproteção das células de Purkinje estão o aumento nos níveis de BDNF e de proteínas envolvidas na autofagia no cerebelo dos animais transgênicos *fat-1* (Bak *et al*, 2015). Além de amenizar o dano oxidativo causado pela exposição ao alumínio, Chaudhary e col (2014) também observaram que o tratamento com DHA concomitante ao alumínio preveniu as alterações na organização geral das camadas celulares do cerebelo induzidas por este toxicante (Chaudhary *et al*, 2014). Em um modelo de deficiência de iodo perinatal, a exposição materna concomitante aos ácidos graxos  $\omega$ -3 foi capaz de recuperar os danos causados pela deficiência deste mineral no cerebelo, promovendo a diminuição no número de células apoptóticas e melhora na arborização dendrítica de neurônios cerebelares (Pal *et al*, 2013).

Por fim, avaliamos nos filhotes se os tratamentos veiculados durante o desenvolvimento do SNC poderiam afetar as células da glia através da imunomarcção para GFAP em fatias de cerebelo. A gliose é definida como uma resposta do tecido nervoso frente a danos causados por agentes neurotóxicos, neurodegeneração e infecções no SNC. Imediatamente após uma lesão no tecido nervoso, os astrócitos se tornam hipertróficos e aumentam processos celulares, acompanhando de um aumento na expressão de GFAP e do aumento da liberação de moléculas envolvidas na reparação tecidual, vias inflamatórias e neuroproteção, culminando na formação da cicatriz glial (Kawano *et al*, 2012). Logo, a



detecção da GFAP, oriunda da ativação de astrócitos, é uma das ferramentas utilizadas em laboratório para avaliação da presença da gliose, a qual baseia-se na detecção do conteúdo e expressão desta proteína no tecido nervoso (Ho *et al*, 2007; Sofroniew & Vinters, 2010). Investigamos, em filhotes de camundongos, a repercussão da exposição perinatal ao MeHg e/ou os AGPIs  $\omega$ -3 sobre o conteúdo de GFAP no cerebelo por imunohistoquímica e avaliados pela densidade óptica (DO) da marcação nas camadas granular (CG) e molecular (CM). Pudemos observar que os tratamentos realizados durante o período perinatal não alteraram a imunomarcção para GFAP no cerebelo de camundongos filhotes no PN 23 (Figura 14). Como citado anteriormente, na CM estão localizados os prolongamentos das células da glia de Bergmann, onde a marcação para GFAP foi mais intensa quando comparada à CG, onde estão presentes também astrócitos cerebelares (Figura 14). Corroborando com nossos achados, Fujimura e col (2012) não evidenciaram alterações na imunomarcção para GFAP no cerebelo de ratos (PN 36) após a administração perinatal de MeHg na mesma dose utilizada em nosso estudo (5 ppm), ainda que a coordenação motora tenha sido prejudicada pela exposição ao MeHg nestes animais (Fujimura *et al*, 2012). Assim como observado em nosso estudo, os autores propõem que a exposição materna a dose baixas de MeHg não foi capaz de induzir alterações neuropatológicas no cerebelo de animais jovens (Fujimura *et al*, 2012). A literatura vem demonstrado, por outro lado, que o MeHg é capaz de causar alterações na expressão de GFAP em modelos animais (Moreira *et al*, 2012). Um estudo conduzido por Roda e col (2008) mostrou que o tratamento materno com MeHg (DG 7- PN 21) provocou gliose reativa no cerebelo de ratos no PN 21 e PN 36, observada pelo aumento de fibras GFAP-positivas na CM e de astrócitos imunomarcados na CG (Roda *et al*, 2008). Durante o período pós-natal, marcado por intensa gliogênese, o MeHg levou a uma migração anormal de astrócitos (GFAP-positivos) e oligodendrócitos no córtex cerebral, sem causar alterações histológicas nesta estrutura em ratos no PN 28 (Kakita *et al*, 2003). Neste mesmo protocolo de exposição, o MeHg causou neurodegeneração no cérebro e uma importante perda de neurônios granulares no cerebelo e gliose (aumento de células marcadas para GFAP) na região do estriado, alterações concomitantes a prejuízos na coordenação motora e memória em ratos no PN 35 (Sakamoto *et al*, 2004). Recentemente, foi demonstrado em células progenitoras neurais (Tian *et al*, 2016) e em cultivo primário de astrócitos (Malfa *et al*, 2014; Pierozan *et al*, 2016) que a exposição ao MeHg levou a alterações na GFAP, acompanhadas de modificação em proteínas do citoesqueleto destas células (Malfa *et al* 2014; Pierozan *et al*

2016). Os AGIPs do tipo  $\omega$ -3, por sua vez, são essenciais para o desenvolvimento e função do SNC e desempenham um papel importante na estrutura e função de astrócitos no cerebelo. Em cultivo primário destas células, o tratamento com DHA promoveu a maturação e modulação de vias de sinalização envolvidas em neurotransmissão e no conteúdo de GFAP no cerebelo (Joardar *et al* 2006; Joardar & Das, 2007). A ingestão materna de ração enriquecida com óleo de peixe durante a gestação e lactação, promoveu um aumento no imunocónteuo de NSE (enolase neurônio-específica), GFAP e MBP (proteína básica de mielina) no cérebro da prole de camundongos no PN 21 e PN 42, mostrando os AGIPs do tipo  $\omega$ -3 promovem o crescimento e maturação de células neurais (Tianet *et al*, 2011). Em adultos, um estudo realizado por Paterniti e col (2014), constatou que a suplementação com DHA diminuiu a expressão de GFAP e de marcadores inflamatórios em camundongos com lesão da medula espinhal, parâmetros que auxiliaram na recuperação das lesões nos animais (Paterniti *et al*, 2014).

Como descrito anteriormente, após a ingestão alimentar de MeHg, ocorre a absorção deste composto e, através da corrente sanguínea, alcança os tecidos, sendo que o SNC parece ser mais sensível a exposição a este contaminante. A autópsia do cérebro de neonatos da ilha de Seychelles expostos pré-natalmente ao MeHg revelou um acúmulo preferencial de Hg nos núcleos subcorticais profundos, tronco cerebral e cerebelo em comparação a outras estruturas do SNC (Lapham *et al*, 1995). Uma vez no compartimento intracelular, o MeHg interage com moléculas contendo grupamentos sulfidrílicos, como a cisteína, e forma, por exemplo, o complexo MeHg-S-cisteína. Este complexo tem similaridade estrutural com o aminoácido neutro metionina, logo, o MeHg atravessa as membranas celulares através do transportador de aminoácidos neutros, o LAT, particularmente o subtipo 1 deste transportador (Yin *et al*, 2008; Zimmermann *et al*, 2014). Recentemente, Straka e col (2016) demonstraram, em cultivo primário de células de trofoblasto humanas, o envolvimento dos transportadores LAT-1 e da MRP-1 (proteína de resistência multidroga-1) na captação e efluxo placentário de MeHg (Straka *et al*, 2016). Ainda, os autores deste estudo mostraram que a exposição ao MeHg resultou na diminuição na expressão de MRP-1 e consequente acúmulo de mercúrio intracelular (Straka *et al*, 2016). Neste contexto, a superexpressão de MRP-1 em células tumorais foi capaz de aumentar a resistência ao acúmulo de Hg intracelular (Vernhet *et al*, 2000; Kim *et al*, 2005). A MRP-1 pertence a uma bomba de efluxo transmembrana que confere resistência celular a fármacos, de maneira a diminuir o acúmulo intracelular destes. Além disto, a MRP-1

está envolvida no efluxo de vários xenobióticos, incluindo os metais pesados como o Hg (Ballatori, 2002). Logo, investigamos o efeito dos tratamentos veiculados no período perinatal e frente a uma exposição na vida adulta ao MeHg sobre o acúmulo de Hg no cerebelo de camundongos adultos (PN 84). Observamos que, a longo prazo, a exposição materna ao MeHg juntamente à ração suplementada com óleo de peixe (grupo iv) mostraram uma tendência ao maior acúmulo de Hg tecidual nos animais adultos (Tabela 7). Os animais deste mesmo grupo (iv), quando tratados com MeHg na vida adulta (PN 70), apresentaram níveis elevados de Hg cerebelar quando comparados aos demais grupos. No entanto, nos animais prole de mães que consumiram isoladamente a ração enriquecida com óleo de peixe, este acúmulo de Hg foi significativamente menor após uma nova exposição ao MeHg na fase adulta (Tabela 7). *In vitro*, a exposição aos ácidos graxos  $\omega$ -3 pode modular a atividade da MRP-1. Um estudo realizado por Gelsomino e col (2013) demonstrou em cultura de células tumorais de cólon resistentes à ação de quimioterápicos que o tratamento com DHA e EPA promoveu uma diminuição do conteúdo de MPR-1, e, desta forma, tornou-as novamente sensíveis à ação de fármacos antitumorais (Gelsomino *et al*, 2013). Uma resposta benéfica semelhante foi encontrada por Kuan e col (2013) em células de tumor intestinal, onde o tratamento com os AGPIs  $\omega$ -3 reduziu a expressão, conteúdo e atividade da MDR-1 (gene de resistência multidroga-1) e consequente aumento da citotoxicidade do quimioterápico paclitaxel (Kuan *et al*, 2011). Logo, os resultados encontrados em nosso trabalho, que mostram um maior acúmulo de Hg no cerebelo de animais que foram expostos concomitantemente ao MeHg e ao óleo de peixe, fonte de EPA e DHA, podem sugerir que a presença desses ácidos graxos poderiam, por exemplo, modular a MPR-1 de maneira a aumentar o conteúdo intracelular de Hg em camundongos a longo prazo e em uma exposição aguda ao MeHg.

Nossos resultados indicam que a exposição perinatal ao MeHg prejudicou a coordenação motora em filhotes no PN 22 e que os AGPIs  $\omega$ -3 não foram capazes de recuperar este dano. As doses de MeHg e de ácidos graxos  $\omega$ -3 utilizadas aqui mimetizaram o consumo de peixes predadores, espécies que, apesar de serem consideradas fonte deste ácidos graxos, também apresentam níveis elevados de contaminante ambientais, como o MeHg. No entanto, os demais parâmetros analisados nos filhotes não foram alterados pela exposição materna ao MeHg, sugerindo que a dose utilizada não foi capaz de induzir alterações neuropatológicas no cerebelo nestes animais. Já a longo prazo, os tratamentos realizados durante o período de gestação e lactação promoveram alterações a longo

prazo em parâmetros comportamentais e bioquímicos analisados em animais adultos. Além disto, a exposição ao MeHg na vida adulta causou prejuízos no comportamento e atividade enzimática no cerebelo, exceto nos animais já expostos ao MeHg previamente, o que sugere que nestes animais houve uma adaptação aos possíveis efeitos deletérios deste metal e que os ácidos graxos  $\omega$ -3 poderiam modular esta susceptibilidade na vida adulta.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, podemos inferir que:

Em filhotes:

- A exposição materna (durante os períodos de gestação e lactação) ao MeHg induziu prejuízos na coordenação motora em filhotes no PN 22, sugerindo o efeito do MeHg sobre o cerebelo, estrutura no SNC envolvida no balanço e coordenação motora. No entanto, a exposição ao MeHg concomitante a uma ração enriquecida com óleo de peixe, fonte de AGPIs  $\omega$ -3 não foi capaz de reverter esta resposta. Ainda, a locomoção, exploração e força neuromuscular não foram afetadas pelos tratamentos durante o desenvolvimento;
- A exposição perinatal ao MeHg teve impacto no sistema antioxidante da glutathione, reduzindo a atividade da GPx hipocampal e os ácidos graxos  $\omega$ -3 não foram capazes de proteger deste efeito.
- Em filhotes no PN 23, a exposição materna a ração enriquecida com óleo de peixe aumentou a atividade do complexo I cadeia transportadora de elétrons mitocondrial no cerebelo e hipocampo, por uma possível mudança na composição dos fosfolipídeos de membrana (hipótese a ser testada), porém a atividade do complexo II não foi alterada;
- No cerebelo, o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na homeostase sináptica e neurotransmissão (Sinaptofisina, PSD-95 e sinapsina) e na peroxidação lipídica (4-HNE) não foram alterados em filhotes no PN 23;
- A exposição materna ao MeHg e/ou ração com óleo de peixe não modificou a histogênese pós-natal no cerebelo, como morfologia geral desta estrutura, organização e espessura das camadas celulares e a densidade das células de Purkinje. Ainda, a imunomarcagem para GFAP, utilizado para avaliar gliose, não foi alterada nas camadas celulares do cerebelo, sugerindo que a dose de MeHg utilizada neste estudo não alterou os parâmetros investigados no cerebelo de animais no PN 23;

Em adultos:

- Nos camundongos com 3 meses de idade, a exposição perinatal ao MeHg prejudicou o comportamento locomotor espontâneo e exploratório, parâmetros que foram parcialmente revertidos nos animais tratados perinatalmente com os ácidos graxos  $\omega$ -3, indicando um possível papel protetor deste dano locomotor a longo prazo.
- A exposição na vida adulta ao MeHg não prejudicou o comportamento locomotor, exploratório e a força neuromuscular nos animais que se expuseram ao MeHg via dieta materna no período perinatal, seja isoladamente ou combinada com ração enriquecida com óleo de peixe. Estes resultados sugerem que uma possível adaptação aos efeitos neurotóxicos a uma segunda exposição aguda ao MeHg;
- A coordenação motora nos adultos foi afetada pela exposição perinatal ao MeHg e a ração enriquecida com óleo de peixe isoladamente, e a exposição adulta ao MeHg prejudicou a coordenação apenas nos adultos onde as mães consumiram ambos os compostos, o que nos dá indícios de que os ácidos graxos  $\omega$ -3 podem não proteger deste efeito mediado pelo MeHg;
- A exposição ao MeHg na fase adulta causou hipercolesterolemia nos animais de todos os grupos experimentais, exceto nos animais que se expuseram perinatalmente de maneira isolada a uma dieta rica em ácidos graxos  $\omega$ -3, sugerindo que a alimentação perinatal baseada em ácidos graxos  $\omega$ -3 pode ter papel benéfico mesmo na vida adulta;
- A exposição ao MeHg na vida adulta reduziu a atividade da enzima GPx no cerebelo em todos os grupos, exceto nos animais que já haviam sido expostos ao MeHg isoladamente no período perinatal. Este resultado dá indícios de um possível efeito dos ácidos graxos  $\omega$ -3 na modulação da susceptibilidade ao efeito deletério induzido pela exposição aguda ao MeHg;
- A exposição perinatal ao MeHg e/ou ração suplementada com óleo de peixe e a exposição adulta ao MeHg não modificaram os parâmetros de estresse oxidativo e atividade do Complexo I mitocondrial no cerebelo e hipocampo em adultos. No entanto, a exposição ao MeHg na fase adulta levou ao aumento da atividade com complexo II no cerebelo de animais expostos perinatalmente ao MeHg isoladamente ou em combinação a dieta, sugerindo que

a exposição a este contaminante pode modular, a longo prazo, a susceptibilidade frente a uma segunda exposição;

- A longo prazo, a exposição ao MeHg em combinação a uma ração rica em  $\omega$ -3 ocasionou um maior acúmulo de Hg no cerebelo em camundongos adultos. Esta mesma resposta de aumento no acúmulo cerebelar de Hg foi observada nos adultos deste grupo frente a uma nova exposição adulta ao MeHg. No entanto, nos animais expostos isoladamente a uma ração enriquecida com óleo de peixe no período perinatal e tratados agudamente com MeHg, o acúmulo de Hg cerebelar foi menor, dando indícios de que, quando ofertado de maneira isolada, os AGPIs  $\omega$ -3 parecem conferir uma proteção a longo prazo neste parâmetro.





## 8. REFERÊNCIAS

Abdalla FH, Bellé LP, et al. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biomaterials**, v.24, n.2, Apr, p.349-56.2011.

Abdalla FH, Bellé LP, et al. Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups. **Exp Toxicol Pathol**, v.64, n.6, Sep, p.605-9.2012

Abdel-Wahab BA, Al-Qahtani JM, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in large doses attenuate seizures, cognitive impairment, and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. **Neurosci Lett**, v.584, Jan, p.173-7.2015.

Agrawal S, Bhatnagar P, et al. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. **Food Chem Toxicol**, v.86, Dec, p.208-16.2015.

Albores-Garcia D, Acosta-Saavedra LC, et al. Early Developmental Low-Dose Methylmercury Exposure Alters Learning and Memory in Periadolescent but Not Young Adult Rats. **Biomed Res Int**, v.2016, Jan, p.1-12. 2016.

Arnal E, Miranda M, et al. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v.166, n.1, p.271-8.2010.

Aschner M, Du YL, Gannon M, et al. Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. **Brain Res**, v.602, n.2, Mar, p.181-6.1993.

Aschner M, Syversen T, et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz J Med Biol Res**, v.40, n.3, p.285-91.1993.

Aschner M, Yao CP, et al. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochem Int**, v.37, n.2-3, Mar, p.199-206.2000.

Axelrad DA, Bellinger DC, et al. Dose-response relationship of prenatal Mercury exposure and IQ: an integrative analysis of epidemiologic data. **Environ Health Perspect**, v.115, n.4, Apr, p.609-15. 2007.

Ayala A, Muñoz MF, et al. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**, v.2014, May, p.1-31. 2014.

Bak DH, Zhang E, et al. High  $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy. **SciRep**, v.5, Oct, p.1-10. 2015.

Baker EJ, Miles EA, et al. Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. **Progress in Lipid Research**, v.64, Oct, p.30-56. 2016.

Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environ Health Perspect**, v.110Suppl 5, Oct, p.689-94. 2002.

Balsters JH, Cussans E, et al. Evolution of the cerebellar cortex: the selective expansion of prefrontal-projecting cerebellar lobules. **Neuroimage**, v.49, n.3, Feb, p.2045-52.2010.

Barouki R, Gluckman PD, et al. Developmental origins of noncommunicable disease: implications for research and public health. **Environ Health**, v.11, n.42, Jun, p.1-9. 2012.

Bas O, Songur A, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neurochem Int**, v.50, n.3, Feb, p.548-54.2007.

Bassett T, Bach P, et al. Effects of methylmercury on the secretion of pro-inflammatory cytokines from primary microglial cells and astrocytes. **Neurotoxicology**, v.33, n.2, Mar, p.229-34.2012.

Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. **NatRev Neurosci**, v.15, n.12, Dec, p.771-85.2014.

Bellum S, Thuett KA, et al. The effect of methylmercury exposure on behavior and cerebellar granule cell physiology in aged mice. **J Appl Toxicol**, v.33, n.9, Sep, p.959-69.2013.

Bernal AJ, Jirtle RL. Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.88, n.10, Jun, p.938-44.2010.

Bertossi M, Girolamo F, et al. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. **Neurotoxicology**, v.25, n.5, Sep, p.849-57.2004.

Biamonte F, Latini L, et al. Associations among exposure to methylmercury, reduced Reelin expression, and gender in the cerebellum of developing mice. **Neurotoxicology**, v.45, Dec, p.67-80.2014.

- Bisen-Hersh EB, Farina M, et al. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. **J Trace Elem Med Biol**, v.28, n.2, Apr, p.117-24.2014.
- Björnberg KA, Vahter M, et al. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. **Environ Health Perspect**, v.113, n.10, Oct, p.1381-5.2005.
- Boucher O, Bastien CH, et al. Prenatal exposure to methylmercury and PCBs affects distinct stages of information processing: an event-related potential study with Inuit children. **Neurotoxicology**, v.31, n.4, Aug, p.373-84.2010.
- Bousquet M, Saint-Pierre M, et al. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **FASEB J**, v.22, n.4, Apr, p.213-25.2008.
- Bradberry SM. Lead and mercury. **Medicine**, v.40, n.3, Mar, p.133-134. 2012.
- Bradford AB, Mancini JD, et al. Methylmercury-Dependent Increases in Fluor4 Fluorescence in Neonatal Rat Cerebellar Slices Depend on Granule Cell Migrational Stage and GABAA Receptor Modulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.356, n.1, Jan, p.2-12.2016.
- Brenna JT, Carlson SE. Docosahexaenoic acid and human brain development: evidence that a dietary supply is needed for optimal development. **J Hum Evol**, v.77, Dec, p.99-106.2014.
- Burke K, Cheng Y, et al. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. **Neurotoxicology**, v.27, n.6, Dec, p.970-81.2006.
- Butts T, Green MJ, et al. Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. **Development**, v.141, n.21, Nov, p.4031-41.2014.
- Cabañero AI, Carvalho C, et al. Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. **Biol Trace Elem Res**, v.103, n.1, Jan, p.17-35.2005.
- Calandro TLL, Werneck JT, et al. Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v.68, n.2, Jul-dec, p.196-9.2011.
- Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies.

**Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, n.5-6, Nov-Dec, p.287-93. 2007.

Campoy C, Escolano-Margarit MV, et al. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. **Br J Nutr**, v.107 Suppl 2, Jun, p.S85-106.2012.

Cansev M. Synaptogenesis: Modulation by Availability of Membrane Phospholipid Precursors. **Neuromolecular Med**, v.18, n.3, Sep, p.426-40.2016.

Cao D, Kevala K, et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **J Neurochem**, v.111, n.2, Oct, p.510-21.2009.

Cao DH, Xu JF, et al. Protective effect of chronic ethyl docosahexaenoate administration on brain injury in ischemic gerbils. **Pharmacol Biochem Behav**, v.79, n.4, Dec, p.651-9.2004.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-90.1985.

Cardoso C, Afonso C, et al. Dietary DHA and health: cognitive function ageing. **Nutr Res Ver**, v.29, n.2, Dec, p.281-294.2016.

Carratù MR, Coluccia A, et al. Prenatal methylmercury exposure: effects on stress response during active learning. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.81, n.6, Dec, p.539-42.2008.

Carvalho MC, Franco JL, et al. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. **Toxicology**, v.239, n.3, Oct, p.195-203.2007.

Carvalho MC, Nazari EM, et al. Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. **Toxicol Sci**, v.106, n.1, Nov, p.180-5.2008.

Casañas-Sánchez V, Pérez JA, et al. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. **J Neurochem**, v.131, n.4, Nov, p.470-83.2014.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**, v.328, n.2, Apr, p.309-16.1996.

Castoldi AF, Coccini T, et al. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res Bull**, v.55, n.2, Jan-Mar, p.197-203.2001.

Cesca F, Baldelli P, et al. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. **Prog Neurobiol**, v.91, n.4, Aug, p.313-48.2010.

Chang JY. Methylmercury causes glial IL-6 release. **Neurosci Lett**, v.416, n.3, Jun, p.217-20.2007.

Chaudhary M, Joshi DK, et al. Docosahexaenoic acid ameliorates aluminum induced biochemical and morphological alteration in rat cerebellum. **Ann Neurosci**, v.21, n.1, Jan, p.5-9.2014.

Chen, CT, Bazinet, RP.  $\beta$ -oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.92, Jan, p.33-40.2015.

Cheng J, Fujimura M, et al. Assessing pre/post-weaning neurobehavioral development for perinatal exposure to low doses of methylmercury. **J Environ Sci (China)**, v.38, Dec, p.36-41.2015.

Choi AL, Mogensen UB, et al. Negative confounding by essential fatty acids in methylmercury neurotoxicity associations. **Neurotoxicol Teratol**, v.42, Mar-Apr, p.85-92.2014.

Chrobak AA, Soltys Z. Bergmann Glia, Long-Term Depression, and Autism Spectrum Disorder. **Mol Neurobiol**, p.1-11. Jan. 2016.

Chu I, Bowers WJ, et al. Toxicological effects of in utero and lactational exposure of rats to mixture of environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations. **J Toxicol Environ Health A**, v.71, n.2, p.93-108.2008.

Clarkson TW, Magos L, et al. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v.349, v.18, Oct, p.1731-7. 2003.

Coluccia A, Borracci P, et al. Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. **Int J Dev Neurosci**, v.27, n.6, Oct, p.599-605.2009.

Costa LG, Aschner M, et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.44, p.87-110. 2004.

Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.198, n.2, Jul, p.209-30. 2004.

Crump KS, Kjellström T, et al. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. **Risk Anal**, v.18, n.6, Dec, p.701-13. 1998.

Daum G. Lipids of mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v.822, Jun, p.1-42.1985.

Daum G, Vance JE. Import of lipids into mitochondria. **Prog Lipid Res**, v.36, n.2-3, Sep, p.103-30.1997.

Davidson PW, Palumbo D, et al. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children from the pilot cohort at 108 months following prenatal exposure to methylmercury from a maternal fish diet. **Environ Res**, v.84, n.1, Sep, p.1-11.2000

Davidson PW, Cory-Slechta DA, et al. Fish consumption and prenatal methylmercury exposure: cognitive and behavioral outcomes in the main cohort at 17 years from the Seychelles child development study. **Neurotoxicology**, v.32, n.6, Dec, p.711-7.2011.

Davidson PW, Strain JJ, et al. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. **Neurotoxicology**, v.29, n.5, Dec, p.767-75.2008.

Debes F, Budtz-Jørgensen E, et al. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicol Teratol**, v.28, n.5, Sep-Oct, p.536-47.2006.

Debes F, Weihe P, et al. Cognitive deficits at age 22 years associated with prenatal exposure to methylmercury. **Cortex**, v.74, Jan, p.358-69.2016.

Dringen R, Pawlowski PG, et al. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res**, v.79, n.1-2, Jan, p.157-65.2005.

Dyall SC, Michael-Titus AT. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. **Neuromolecular Med**, v.10, n.4, Jun, p.219-35.2008.

Eckert GP, Lipka U, et al. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: Focus on mitochondria. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.88, n.1, Jan, p.105-14.2013.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v.82, n.1, May, p.70-7.1959.

Falluel-Morel A, Sokolowski K, et al. Developmental Mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. **J Neurochem**, v.103, n.5, Dec, p.1968-81.2007.

Falluel-Morel A, Lin L, et al. N-acetyl cysteine treatment reduces mercury-induced neurotoxicity in the developing rat hippocampus. **J Neurosci Res**, v.90, n.4, Apr, p.743-50.2012.

Farina M, Aschner M, et al. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.256, n.3, Nov, p.405-17.2011a.

Farina M, Rocha JB, et al. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci**, v.89, n.15-16, Oct, p.555-63.2011b.

Farina M, Campos F, et al. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicol Sci**, v.112, n.2, Dec, p.416-26.2009.

Farina M, Dahm KC, et al. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicol Sci**, v.73, n.1, May, p.135-40.2003.

Fischer JC, Ruitenbeek W, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v.153, n.1, Nov, p.23-36.1985.

Franco JL, Posser T, et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic Biol Med**, v.47, n.4, Aug, p.449-57.2009.

Franco JL, Teixeira A, et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environ Res**, v.102, n.1, Sep, p.22-8.2006.

Fujimura M, Cheng J, et al. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. **Brain Res**, v.1464, Jun, p.1-7.2012.

Fujimura M, Usuki F. Low in situ expression of antioxidative enzymes in rat cerebellar granular cells susceptible to methylmercury. **Arch Toxicol**, v.88, n.1, Jan, p.109-13.2014.

Garg TK, Chang JY. Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2. **J Neuroimmunol**, v.171, n.1-2, Feb, p.17-28.2006.

Gelsomino G, Corsetto PA, et al. Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by downregulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. **MolCancer**, v.12, n.137, Nov, p.1-20.2013.

Ghizoni H, de Souza V, et al. Superoxide anion generation and oxidative stress in methylmercury-induced endothelial toxicity in vitro. **Toxicol In Vitro**, v.S0887-2333, n.16, Oct, p.15-26.2017.

Gil A, Gil F. Fish, a Mediterranean source of n-3 PUFA: benefits do not justify limiting consumption. **BrJ Nutr**, v.113 Suppl 2, Apr, p.S58-67.2015.

Glantz LA, Gilmore JH, et al. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. **Neuroscience**, v.149, n.3, Nov, p.582-91.2007.

Glaser V, Nazari EM, et al. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. **Int J Dev Neurosci**, v.28, n.7, Nov, p.631-7.2010.

Gonzales E, Barrett DW, et al. Omega-3 fatty acids improve behavioral coping to stress in multiparous rats. **Behav Brain Res**, v.279, Feb, p.129-38.2015.

Goulet S, Doré FY, et al. Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. **Neurotoxicol Teratol**, v.25, n.3, May-Jun, p.335-47.2003.

Grandjean P, Jørgensen PJ, et al. Human milk as a source of methylmercury exposure in infants. **Environ Health Perspect**. v.102, n.1, Jan, p.74-7.1994.

Grandjean P, Weihe P, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol Teratol**, v.19, n.6, Nov-Dec, p.417-28.1997.

Grandjean P, Weihe P, et al. Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol Teratol**, v.43, May-Jun, p.39-44.2014.



- Gribble MO, Karimi R, et al. Mercury, selenium and fish oils in marine food webs and implications for human health. **J Mar Biol Assoc U.K.**, v.96, n.1, Feb, p.43-59.2016.
- Guesnet P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS)- Implications for dietary recommendations. **Biochimie**, v.93, n.1, Jan, p.7-12.2011.
- Guzzi G, La Porta CA. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**, v.244, n.1, Feb, p.1-12.2008.
- Hagopian K, Weber KL, et al. Complex I-associated hydrogenperoxide production is decreased and electron transport chain enzyme activities are altered in n-3 enrichedfat-1 mice. **PLoS One**, v.5, n.9, Sep, p.1-11. 2010.
- Halliwell B. The wanderings of a free radical. **Free Radic Biol Med**, v.46, n.5, Mar, p.531-42.2009.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd. ed. **Oxford: Oxford University Press**, 543p. 1999.
- Hampson DR, Blatt GJ. Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. **FrontNeurosci**, v.9, n.420, Nov, p.1-16.2015.
- Harada, M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, v.25, n.1, p.1-24.1995.
- Hardman WE. (n-3) fatty acids and cancer therapy. **J Nutr**, v.134 12 Suppl, Dec, p.3427S-3430S.2004.
- Heras-Sandoval D, Pedraza-Chaverri J, et al. Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. **JNeuroinflammation**, v.13, n.1, Mar, p.1-13. 2016.
- Hiragi CO, Miranda-Vilela AL, et al. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 genepolymorphisms in three Brazilian population groups. **Genet Mol Biol**, v.34, n.1, Jan, p.11-8.2011.
- Ho G, Zhang C, et al. Non-invasive fluorescent imaging of gliosis in transgenic mice for profiling developmental neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.221, n.1, May, p.76-85.2007.

- Hong MY, Chapkin RS, et al. Fish oil increases mitochondrial phospholipid unsaturation, upregulating reactive oxygen species and apoptosis in rat colonocytes. **Carcinogenesis**, v.23, n.11, Nov, p.1919-25.2002.
- Huang CF, Liu SH, et al. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. **Toxicol Lett**, v.201, n.3, Mar, p.196-204.2011.
- Hussain A, Nookaew I, et al. A maternal diet of fatty fish reduces body fat of offspring compared with a maternal diet of beef and a post-weaning diet of fish improves insulin sensitivity and lipid profile in adult C57BL/6 male mice. **Acta Physiol (Oxf)**, v.209, n.3, Nov, p.220-34.2013.
- Hwang GW. Role of Intracellular Defense Factors against Methylmercury Toxicity. **Biol Pharm Bull**, v.35, n.11, p.1881-4.2012.
- Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **J Nutr**, v.4, Dec, p.855-9.2007.
- Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Res**, v.1237, Oct, p.35-43.2008.
- Innis SM. Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. **Matern Child Nutr**, v.7 Suppl 2, Apr, p.112-23.2011.
- Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **Am J Clin Nutr**, v.99, n.3, Mar, p.734S-41S.2014.
- Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. **Prog Lipid Res**, v.53, Jan, p.1-17.2014.
- Janssen CI, Zerbi V, et al. Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice. **J Nutr Biochem**, v.26, n.1, Jan, p.24-35.2015.
- Jayashankar S, Glover CN, et al. Cerebral gene expression and neurobehavioural responses in mice pups exposed to methylmercury and docosahexaenoic acid through the maternal diet. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.33, n.1, Jan, p.26-38.2012.
- Jensen CL, Voigt RG, et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. **Am J Clin Nutr**, v.82, n.1, Jul, p.125-32.2005.

Jensen CL, Lapillonne A. Docosahexaenoic acid and lactation. **Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids**, v.81, n.2-3, Aug-Sep, p.175-8.2009.

Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. **Oxid Med CellLongev**, v.163913, Apr, p.1-13.2012.

Joardar A, Das S. Effect of fatty acids isolated from edible oils like mustard, linseed or coconut on astrocytes maturation. **Cell Mol Neurobiol**, v.27, n.8, Dec, p.973-83.2007.

Joardar A, Sen AK, Das S. Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and beta-adrenergic transmission in astrocytes. **J Lipid Res**, v.47, n.3, Mar, p.571-81.2006.

Jovanovic JN, Benfenati F, et al. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, n.8, Apr, p.3679-83.1996.

Julvez J, Méndez M, et al. Maternal consumption of seafood in pregnancy and child neuropsychological development: a longitudinal study based on a population with high consumption levels. **Am J Epidemiol**, v.183, n.3, Feb, p.169-82.2016.

Kakita A, Inenaga C, et al. Disruption of postnatal progenitor migration and consequent abnormal pattern of glial distribution in the cerebrum following administration of methylmercury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.62, n.8, Aug, p.835-47.2003.

Karagas MR, Choi AL, et al. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. **Environ Health Perspect**, v.120, n.6, Jun, p.799-806.2012.

Karapehliyan M, Ogun M, et al. Protective effect of omega-3 fatty acid against mercury chloride intoxication in mice. **J Trace Elem Med Biol**, v.28, n.1, Jan, p.:94-9.2014,

Kaur P, Aschner M, et al. Biochemical factors modulating cellular neurotoxicity of methylmercury. **J Toxicol**, v.2011, Sep, p.1-9.2011.

Kaur P, Schulz K, et al. Role of docosahexaenoic acid in modulating methylmercury induced neurotoxicity. **Toxicol Sci**, v.100, n.2, Dec, p.423-32.2007.

- Kaur P, Schulz K, et al. The use of fluorescence for detecting MeHg-induced ROS in cell cultures. **Toxicol In Vitro**, v.2008, n.5, Aug, p.1392-8.2008a.
- Kaur P, Hegglund I, et al. Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotectorformethylmercury-induced neurotoxicity in primary neural cell cultures. **Neurotoxicology**, v.29, n.6, Nov, p.978-87.2008b.
- Kawano H, Kimura-Kuroda J, et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. **Cell Tissue Res**, v.349, Jul, p.169-180.2012.
- Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? **Carcinogenesis**, v.31, n.1, Jan, p.90-9.2010.
- Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. **Altern Med Ver**, v.12, n.3, Sep, p.207-27.2007.
- Kim HY, Moon HS, et al. N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons. **BiochemJ**, v.435, n.2, Apr, p.327-36.2011.
- Kimura R, Takahashi N, et al. DHA attenuates postprandial hyperlipidemia via activating PPAR $\alpha$  in intestinal epithelial cells. **J Lipid Res**, v.54, n.12, Dec, p.3258-68.2013.
- Kirkpatrick M, Benoit J, et al. The effects of methylmercury exposure on behavior and biomarkers of oxidative stress in adult mice. **Neurotoxicology**, v.50, Sep, p.170-8.2015.
- Knickmeyer RC, Gouttard S, et al. A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. **J Neurosci**, v.28, n.47, Nov, p.12176-82.2008.
- Kuan CY, Walker TH, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids promote paclitaxel cytotoxicity via inhibition of the MDR1 gene in the human colon cancer Caco-2 cell line. **J Am Coll Nutr**, v.30, n.4, Aug, p.265-73.2011.
- Kuratko CN, Barrett EC, et al. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: a review. **Nutrients**, v.5, n.7, Jul, p.2777-810.2013.
- Kwon SE, Chapman ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. **Neuron**, v.70, n.5, Jun, p.847-54.2011.

Lapham LW, Cernichiari E, et al. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. **Neurotoxicology**, v.16, n.4. p.689-704. 1995.

Latini A, da Silva CG, et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v.86, n.1-2, Sep-Oct, p.188-99. 2005.

Layé S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.82, n.4-6, Apr-Jun, p.295-303.2010.

Lee KJ, Kim H, et al. The roles of dendritic spine shapes in Purkinje cells. **Cerebellum**, v.4, n.2, p.97-104.2005.

Leonardi F, Attorri L, et al. Effect of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidative status of C6 glioma cells. **Free Radic Res**, v.39, n.8, Aug, p.865-74.2005.

Leonardi F, Attorri L, et al. Docosahexaenoic acid supplementation induces dose and time dependent oxidative changes in C6 glioma cells. **Free Radic Res**, v.41, n.7, Jul, p.748-56.2007.

Leto K, Arancillo M, et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. **Cerebellum**, v.15, n.6, Dec, p.789-828.2016.

Limke TL, Atchison WD. Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.178, n.1, Jan, p.52-61.2002.

Lowry OH, Rosebrough NJ, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n.1, Nov, p.265-75.1951.

Lucena GM, Porto FA, et al. Cipurapaludosa attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.73, n.6, Sep, p.1150-8.2010.

Mahaffey KR. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. **Environ Res**, v.95, n.3, p.414-28.2004.

Mahaffey KR, Clickner RP, et al. Methylmercury and omega-3 fatty acids: co-

occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. **Environ Res**, v.107, n.1, Jun, p.20-9.2008.

Mahaffey KR, Sunderland EM, et al. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. **Nutr Rev**, v.69, n.9, Sep, p.493-508.2011.

Maia CS, Lucena GM, et al. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. **Neurotoxicology**, v.30, n.1, Jan, p.23-30.2009.

Makrides M. DHA supplementation during the perinatal period and neurodevelopment: Do some babies benefit more than others? **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.88, n.1, Jan, p.87-90. 2013.

Malagutti KS, da Silva AP, et al. 17 $\beta$ -estradiol decreases methylmercury-induced neurotoxicity in male mice. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.27, n.2, Mar, p.293-7.2009.

Malfa GA, Tomasello B, et al. "Reactive" response evaluation of primary human astrocytes after methylmercury exposure. **J Neurosci Res**, v.92, n.1, Jan, p.95-103. 2014.

Mancini JD, Autio DM, et al. Continuous exposure to low concentrations of methylmercury impairs cerebellar granule cell migration in organotypic slice culture. **Neurotoxicology**, v.30, n.2, Mar, p.203-8.2009.

Manfroi CB, Schwalm FD, et al. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicol Sci**, v.81, n.1, Sep, p.172-8. 2004.

Manto M, Bower JM, et al. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. **Cerebellum**, v.11, n.2, Jun, p.457-87. 2012.

Marques RC, Abreu L, et al. Neurodevelopment of Amazonian children exposed to ethylmercury (from Thimerosal in vaccines) and methylmercury (from fish). **Environ Res**, v.pii: S0013-9351, n.15, Aug, p.30184-5.2016.

Martinez S, Andreu A, et al. Cellular and molecular basis of cerebellar development. **Front Neuroanat**, v.7, n.18, Jun, p.1-12.2013

Marzban H, Del Bigio MR, et al. Cellular commitment in the developing cerebellum. **Front Cell Neurosci**, v.8, n.450, Jan, p.1-26. 2015

- McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. **Am J Clin Nutr**, v.82, n.2, Aug, p.281-95. 2005.
- McLennan HR, Degli Esposti M. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. **J Bioenerg Biomembr**, v.32, n.2, Apr, p.153-62. 2000.
- Mita T, Mayanagi T, *et al.* Docosahexaenoic Acid Promotes Axon Outgrowth by Translational Regulation of Tau and Collapsin Response Mediator Protein 2 Expression. **J Biol Chem**, v.291, n.10, Mar, p.4955-65. 2016.
- Model CS, Gomes LM, *et al.* Omega-3 fatty acids alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. **Metab Brain Dis**, v.29, n.1, Mar, p.185-92. 2014.
- Mohanasundari M, Srinivasan MS, *et al.* Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and Hypericum perforatum extract against MPTP induced neurotoxicity in mice. **J Neurol Sci**, v.249, n.2, Nov, p.140-4. 2006.
- Moreira EL, de Oliveira J, *et al.* Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? **Toxicol Sci**, v.130, n.2, Dec, p.373-82. 2012.
- Moreira ELG, Farina M. An unsolved puzzle: the complex interplay between methylmercury and fish oil derived fatty acids within the cardiovascular system. **Toxicol. Res**, v.2014, n.3, Apr, p.300-310. 2014.
- Mori N, Yasutake A, *et al.* Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Arch Toxicol**, v.81, n.11, Nov, p.769-76. 2007.
- Mori N, Yasutake A, *et al.* Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria. **J Toxicol Sci**, v.36, n.3, Jun, p.253-9. 2011.
- Morin C, Rousseau E, *et al.* Effect of docosahexaenoic acid monoacylglyceride on systemic hypertension and cardiovascular dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.309, n.1, Jul, p.93-102. 2015.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v.417, Jun, p.1-13. 2009.

Myers GJ, Davidson PW, *et al.* Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. **J Nutr**, v.137, n.12, Dec, p.2805-8. 2007.

Myers GJ, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. **Environ Health Perspect**, v.106 Suppl 3, Jun, p.841-7. 1998.

Myers GJ, Davidson PW, *et al.* Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. **Lancet**, v.361, p.9370, Sep, p.1686-92. 2003.

Ni M, Li X, *et al.* Glia and methylmercury neurotoxicity. **J Toxicol Environ Health A**, v.75, n.16-17, p.1091-101.2012.

Ni M, Li X, *et al.* Methylmercury induces acute oxidative stress, altering Nrf2 protein level in primary microglial cells. **Toxicol Sci**, v.116, n.2, Aug, p.590-603. 2010.

Ni M, Li X, *et al.* Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. **Glia**, v.59, n.5, May, p.810-20. 2011.

Obiorah M, McCandlish E, *et al.* Hippocampal developmental vulnerability to methylmercury extends into prepubescence. **Front Neurosci**, v.9, n.150, May, p.1-13. 2015.

Ohkawa H, Ohishi N, *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v.95, n.2, Jun, p.351-8. 1979.

Oken E, Bellinger DC. Fish consumption, methylmercury and child neurodevelopment. **Curr Opin Pediatr**, v.20, n.2, Apr, p.178-83.2008.

Padhi BK, Rosales M, *et al.* Perinatal methylmercury exposure perturbs the expression of Plp1 and Cnp splice variants in cerebellum of rat pups. **Neurotoxicology**, v.48, May, p.223-30. 2015.

Pal A, Mohan V, *et al.* Iodine plus n-3 fatty acid supplementation augments rescue of postnatal neuronal abnormalities in iodine-deficient rat cerebellum. **Br J Nutr**, v.110, n.4, Aug, p.659-70. 2013.

Paletz EM, Craig-Schmidt MC, *et al.* Gestational exposure to methylmercury and n-3 fatty acids: effects on high- and low-rate operant behavior in adulthood. **Neurotoxicol Teratol**, v.28, n.1, Jan-Feb, p.59-73.2006.



Paletz EM, Day JJ, *et al.* Spatial and visual discrimination reversals in adult and geriatric rats exposed during gestation to methylmercury and n-3 polyunsaturated fatty acids. **Neurotoxicology**, v.28, n.4, Jun, p.707-19. 2007.

Paradies G, Petrosillo G, *et al.* Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. **Gene**, v.286, Mar, p.135-141. 2002.

Patel E, Reynolds M. Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. **Toxicol Lett**, v.222, n.3, Oct, p.265-72. 2013.

Paterniti I, Impellizzeri D, *et al.* Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies. **J Neuroinflammation**, v.11, n.6, Jan, p.1-18. 2014.

Patten AR, Brocardo PS, *et al.* Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. **J Nutr Biochem**, v.24, n.5, May, p.760-9. 2013.

Pettersen K, Monsen VT, *et al.* DHA-induced stress response in human colon cancer cells- Focus on oxidative stress and autophagy. **Free Radic Biol Med**, v.90, Jan, p.158-72. 2016.

Pierozan P, Biasibetti H, *et al.* Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: the Cytoskeleton as a Main Target. **Mol Neurobiol**, Sep, p.1-16. 2016.

Pifferi F, Jouin M, *et al.* n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, n.5-6, Nov-Dec, p.279-86. 2007.

Polotow TG, Poppe SC, *et al.* Redox Status and Neuro Inflammation Indexes in Cerebellum and Motor Cortex of Wistar Rats Supplemented with Natural Sources of Omega-3 Fatty Acids and Astaxanthin: Fish Oil, Krill Oil, and Algal Biomass. **Mar Drugs**, v.13, n.10, Sep, p.6117-37. 2015.

Qu M, Nan X, *et al.* Protective effects of lycopene against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat cerebellar granule neurons. **Brain Res**, v.1540, Dec, p.92-102. 2013.

Rathod R, Khaire AA, *et al.* Maternal omega-3 fatty acid supplementation on vitamin B12 rich diet improves brain omega-3 fatty acids, neurotrophins and

- cognition in the Wistar rat offspring. **Brain Dev**, v.36, n.10, Nov, p.853-63. 2014.
- Rathod RS, Khaire AA, *et al.* Beneficial effects of omega-3 fatty acids and vitamin B12 supplementation on brain docosahexaenoic acid, brain derived neurotrophic factor, and cognitive performance in the second-generation Wistar rats. **Biofactors**, v.41, n.4, Jul-Aug, p.261-72.2015.
- Roda E, Coccini T, *et al.* Cerebellum cholinergic muscarinicreceptor (subtype-2 and -3) and cytoarchitecture after developmental exposure to methylmercury: an immunohistochemical study in rat. **J Chem Neuroanat**, v.35, n.3, May, p.285-94. 2008.
- Roegge CS, Morris JR, *et al.* Purkinje cell and cerebellar effects following developmental exposure to PCBs and/or MeHg. **Neurotoxicol Teratol**, v.28, n.1, Jan-Feb, p.74-85. 2006.
- Rooney JP. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v.234, n.3, May, p.145-56. 2007.
- Roy S, Kale A, *et al.* Maternal micronutrients (folic acid and vitamin B(12)) and omega 3 fatty acids: implications for neurodevelopmental risk in the rat offspring. **BrainDev**, v.34, n.1, Aug, p.64-71. 2012.
- Russell FD, Bürgin-Maunders CS. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **Mar Drugs**, v.10, n.11, Nov, p.2535-59. 2012.
- Sable PS, Dangat KD, *et al.* Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. **Neuroscience**, v.217, Aug, p.46-55.2012.
- Sakamoto M, Kakita A, *et al.* Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. **Brain Res**, v.949, n.1-2, Sep, p.51-9.2002.
- Sakamoto M, Kubota M, *et al.* Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. **Environ Sci Technol**, v.38, n.14, Jul, p.3860-3. 2004.
- Salvati S, Natali F, *et al.* Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. **J Neurosci Res**, v.86, n.4, Mar, p.776-84. 2008.

Santos DB, Peres KC, *et al.* Probuocol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid  $\beta$ -peptide in mice. **Exp Neurol**, v.233, n.2, Feb, p.767-75. 2012.

Sass JB, Haselow DT, *et al.* Methylmercury-induced decrement in neuronal migration may involve cytokine-dependent mechanisms: a novel method to assess neuronal movement in vitro. **Toxicol Sci**, v.63, n.1, Sep, p.74-81. 2001.

Saw CL, Yang AY, *et al.* Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. **Food Chem Toxicol**, v.62, Dec, p.869-75.2013.

Schilling K, Oberdick J, *et al.* Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. **Histochem Cell Biol**, v.130, n.4, Oct, p.601-15. 2008.

Shinozaki Y, Nomura M, *et al.* Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. **Sci Rep**, v.4, n.4329, Mar, p.1-11. 2014

Sillitoe RV, Fu Y, *et al.* Cerebellum In: The Mouse Nervous System. **Academic Press**, p360-397. 2012.

Silva CA, Tessier E, *et al.* Mercury speciation in fish of the Cabo Frio upwelling region, SE-Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.59, n.3, p.259-66. 2011.

Singh PK, Nath R, *et al.* Attenuation of lead neurotoxicity by supplementation of polyunsaturated fatty acid in Wistar rats. **Nutr Neurosci**, v.19, n.9, Nov, p.396-405. 2016.

Sitarek K, Gralewicz S. Early developmental effects of separate or combined perinatal exposure to methylmercury (MeHg) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in the rat. **Int J Occup Med Environ Health**, v.22, n.2, p.89-105. 2009.

Smith KM, Barraj LM, *et al.* Relationship between fish intake, n-3 fatty acids, Mercury and risk markers of CHD (National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002). **Public Health Nutr**, v.12, n.8, Aug, p.1261-9. 2009.

Smith KL, Guentzel JL. Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: Preferential consumption for maximum health benefits. **Mar Pollut Bull**, v.60, n.9, Sep, p.1615-8. 2010.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v.19, n.1, Jan, p.7-35. 2010.

Stokes-Riner A, Thurston SW, *et al.* A longitudinal analysis of prenatal exposure to methylmercury and fatty acids in the Seychelles. **Neurotoxicol Teratol**, v.33, n.2, Mar-Apr, p.325-8.2011.

Strain JJ, Davidson PW, *et al.* Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles Child Development Nutrition Study. **Neurotoxicology**, v. 29, n.5, Sep, p.776-82. 2008.

Strain JJ, Yeates AJ, *et al.* Prenatal exposure to methyl mercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 mo of age in an observational study in the Republic of Seychelles. **Am J Clin Nutr**, v.101, n.3, Mar, p.530-7. 2015.

Strain JJ, Davidson PW, *et al.* Maternal PUFA status but not prenatal methylmercury exposure is associated with children's language functions at age five years in the Seychelles. **J Nutr**, v.142, n.11, Nov, p.1943-9.2012.

Straka E, Ellinger I, *et al.* Mercury toxicokinetics of the healthy human term placenta involve amino acid transporters and ABC transporters. **Toxicology**, v.340, Jan, p.34-42. 2016.

Stringari J, Meotti FC, *et al.* Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. **Neurochem Res**, v.31, n.4, Apr, p.563-9. 2006.

Stringari J, Nunes AK, *et al.* Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.227, n.1, Feb, p.147-54. 2008.

Sumathi T, Christinal J. Neuroprotective Effect of Portulaca oleraceae Ethanolic Extract Ameliorates Methylmercury Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Stress in Cerebellum and Cortex of Rat Brain. **Biol Trace Elem Res**, v.172, n.1, Jul, p.155-65. 2016.

Taft CE, Turrigiano GG. PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.369, n.1633, Dec, p.1-8. 2013.

Tanaka M, Yamaguchi K, *et al.* Connexin43 and Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. **Front Neurosci**, v.2, n.2, Dec, p.225-33. 2008.

- Tao G, Luo Y, *et al.* Docosahexaenoic Acid Rescues Synaptogenesis Impairment and Long-Term Memory Deficits Caused by Postnatal Multiple Sevoflurane Exposures. **Biomed Res Int**, v.2016, n.4062579. Aug, 2016.
- Tau GZ, Peterson BS. Normal development of brain circuits. **Neuropsychopharmacology**, v.35, n.1, Jan, p.147-68. 2010.
- Tchounwou PB, Ayensu WK, *et al.* Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environ Toxicol**, v.18, n.3, Jun, p.149-75. 2003.
- Tian C, Fan C, *et al.* Brain histological changes in young mice submitted to diets with different ratios of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids during maternal pregnancy and lactation. **Clinical Nutrition**, v.30, n.5, Oct, p.659-667.2011.
- Tian J, Luo Y, *et al.* MeHg Suppressed Neuronal Potency of Hippocampal NSCs Contributing to the Puberal Spatial Memory Deficits. **Biol Trace Elem Res**, v.172, n.2, Aug, p.424-36. 2016.
- Tillerson JL, Miller GW. Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP-treated mouse model of parkinsonism. **J Neurosci Methods**, v.123, n.2, Mar, p.189-200. 2003.
- Ting HC, Chao YJ, *et al.* Polyunsaturated fatty acids incorporation into cardiolipin in H9c2 cardiac myoblast. **J Nutr Biochem**, v.26, n.7, Jul, p.769-75. 2015.
- Toyama T, Sumi D, *et al.* Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, v.363, n.3, Nov, p.645-50. 2007.
- Toyama T, Yoshida E, *et al.* DNA microarray analysis of human neuroblastoma SHSY5Y cells exposed to methylmercury. **J Toxicol Sci**, v.36, n.6, p.843-5. 2011.
- U.S. Environmental Protection Agency. Mercury Study Report to Congress Volumes I to VII. WashingtonDC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development. 1997. **EPA-452/R-97-003**. Disponível em: <http://www.epa.gov/hg/report.htm>.
- U.S. Environmental Protection Agency. Mercury. In: **America's Children and**

**the Environment**. 3rd edition, Updated October 2015. Disponível em [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/ace3\\_mercury.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/ace3_mercury.pdf).

van Wijngaarden E, Thurston SW, *et al*. Prenatal methylmercury exposure in relation to neurodevelopment and behavior at 19 years of age in the Seychelles Child Development Study. **Neurotoxicol Teratol**, v.39, Sep-Oct, p.19-25.2013.

Vernhet L, Allain N, *et al*. Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. **Toxicology**, v.142, n.2, p.127-34. 2000.

Vicente E, Boer M, *et al*. Hippocampal antioxidant system in neonates from methylmercury-intoxicated rats. **Neurotoxicol Teratol**, v.26, n.6, Jan, p.817-23. 2004.

Visentainer JV, Carvalho PO, *et al*. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.20, n.1, Apr, p.90-93. 2000.

Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proc Nutr Soc**, v.61, n.1, p.61-9. 2002.

Wakabayashi N, Slocum SL, *et al*. When NRF2 talks, who's listening? **Antioxid Redox Signal**, v.13, n.11, Feb, p.1649-63. 2010.

Wall R, Ross RP, *et al*. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of longchain omega-3 fatty acids. **Nutr Rev**, v.68, n.5, May, p.280-9. 2010.

Wang L, Jiang H, *et al*. Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes. **Toxicol Sci**, v.107, n.1, Jan, p.135-43. 2009.

Watkins SM, Carter LC, *et al*. Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. **J Lipid Res**, v.39, n.8, Aug, p.1583-8. 1998.

Weiss B, Stern S, *et al*. Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: behavioral effects. **Neurotoxicology**, v.26, n.4, Aug, p.675-90. 2005.

Wendel A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-33.1981.

World Health Organization (WHO). **Environmental Health Criteria For Methylmercury**. 1990. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101>.

Wu A, Ying Z, *et al.* The salutary effects of DHA dietary supplementation on cognition, neuroplasticity, and membrane homeostasis after brain trauma. **J Neurotrauma**, v.28, n.10, Oct, p.2113-22. 2011

Xu B, Xu ZF, *et al.* Protective effects of MK-801 on methylmercury induced neuronal injury in rat cerebral cortex: involvement of oxidative stress and glutamate metabolism dysfunction. **Toxicology**, v.300, n.3, Oct, p.112-20. 2012.

Xu H, Yang Y, *et al.* Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. **Mol Neurobiol**, v.47, n.2, Apr, p.833-44. 2013.

Yin Z, Jiang H, *et al.* The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. **J Neurochem**, v.107, n.4, Nov, p.1083-90. 2008.

Yoshida M, Shimizu N, *et al.* Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice. **Environ Health Perspect**, v.116, n.6, Jun, p.746-51. 2008.

Youdim KA, Martin A, *et al.* Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Dev Neurosci**, v.18, n.4-5, Jul-Aug, p.383-99. 2000.

Yuki D, Sugiura Y, *et al.* DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. **Sci Rep**, v.4, n.7130, Nov, p.1-9. 2014.

Zeilmaker MJ, Hoekstra J, *et al.* Fish consumption during child bearing age: A quantitative risk-benefit analysis on neurodevelopment. **Food Chem Toxicol**, v.54, Apr, p.30-4. 2013.

Zemolin AP, Meinerz DF, *et al.* Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. **Toxicology**, v.302, n.1, Dec, p.60-7. 2012.

Zhang Y, Gao D, *et al.* Induction of autoimmunity to brain antigens by developmental mercury exposure. **Toxicol Sci**, v.119, n.2, Feb, p.270-80. 2011.

Zhao W, Cheng J, *et al.* Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. **Chemosphere**, v.112, Oct, p.170-6. 2014.

Zimmermann LT, dos Santos DB, *et al.* Methionine stimulates motor impairment and cerebellar mercury deposition in methylmercury-exposed mice. **J Toxicol Environ Health A**, v.77, n.1-3, p.46-56. 2014.

Zimmermann LT, Santos DB, *et al.* 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**, v.38, Sep, p.1-8. 2013.