



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANA GUIMARÃES EIRÓ

**EXPOSIÇÃO AO MEHG PROVOCA DANO NA MEDULA ESPINHAL:
PERCEPÇÕES A PARTIR DA ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO**

BELEM

2020

LUCIANA GUIMARÃES EIRÓ

**EXPOSIÇÃO AO MEHG PROVOCA DANO NA MEDULA ESPINHAL:
PERCEPÇÕES A PARTIR DA ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima.

BELÉM

2020

LUCIANA GUIMARÃES EIRÓ

**EXPOSIÇÃO AO MEHG PROVOCA DANO NA MEDULA ESPINHAL:
PERCEPÇÕES A PARTIR DA ANÁLISE PROTEÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 27/08/2020

Banca Examinadora



Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Orientador

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – UFPA



Prof.ª. Dr.ª Luanna de Melo Pereira Fernandes

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – UEPA



Universidade Federal do Pará
Faculdade de Medicina
Prof.ª Ana Carolina Alves
SIAPE 2390863

Prof.ª. Dr.ª Ana Carolina Alves de Oliveira

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA - UFPA

Á aquele que desde antes da fundação do mundo me escolheu e me amou de maneira única, que escreveu cada linha da minha história de forma tão doce e amável, apesar de mim mesma.

A minha família que não mediu esforços e que me incentivam a ser melhor todos os dias: Leonardo, o amor da minha vida e o melhor parceiro de todos; meus pais que são meus maiores exemplos de cristãos, profissionais e seres-humanos; minhas irmãs e cunhados que sempre se orgulharam das minhas conquistas; aos meus sobrinhos que iluminam as nossas vidas; aos meus sogros que desde o primeiro momento me cercaram de todo o amor e carinho.

Ao professor Rafael que acreditou e depositou em mim a sua confiança; aos colaboradores deste trabalho que aceitaram esse desafio junto comigo; ao Labef pelo acolhimento e por ser parte de quem eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao Criador de todas as coisas que nos permeiam e envolvem pela maravilhosa graça de poder estudar e me especializar na maior Universidade de Norte, por ter acesso ao estudo público e poder empregar meus dons e talentos, apesar de mim mesma.

À Universidade Federal do Pará por me proporcionar realizar este trabalho, em especial a Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por incentivar e dispor de ferramentas capazes de formar novos profissionais e pesquisadores.

Ao CNPQ, órgão fomentador da minha bolsa de mestrado, que mesmo em um mundo e governo caótico, pela graça de Deus, continuou me dando condições financeiras para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Márcia Cristina, Prof. Dra. Marília Buzalaf, Prof. Dra. Maria Elena Crespo-Lopez, Aline Dionízio, Michel Platini, Walessa Aragão, Leonardo Bittencourt, Maria Karolina Martins e prof. Dr. Rafael Lima por todo o suporte e ajuda desde a formulação do projeto até o momento final de confecção deste manuscrito.

Ao Instituto Evandro Chagas e à Universidade de São Paulo, especialmente a seção de Parasitologia e Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Odontologia de Bauru, respectivamente.

Agradeço a banca examinadora deste trabalho, professora Luanna e prof. Ana Carolina, que desde o início foram sempre muito amáveis, dispostas e parceiras.

Aos LABEF, meus parceiros de trabalho, de vida e de laboratório que sempre de maneira muito carinhosa me receberam e me fizeram parte de si. A labuta diária jamais teria sido mais leve sem vocês, que continuemos lutando por aquilo que acreditamos e gerando conhecimento. Em especial, agradecer ao Leonardo, Victória, Walessa, Maria, Deborah, Deiweson, Olímpia, Dannilo por toda amizade, amor ao longo dos dias e ainda por dividir as adversidades do dia a dia comigo.

Às professoras Cristiane Maia e Maria Elena Crespo-Lopes que durante esses anos cuidaram de mim não só como aluna, mas como amiga/filha durante esses anos e viagens pelo PROCAD e trabalhos em parceria.

Ao meu noivo, Leonardo, que tem segurado a minha mão em todas as aventuras, enxugado as minhas lágrimas e me amado de maneira única e singular. Aos meus pais, um dos meus maiores incentivadores, que me educaram da melhor maneira possível e me ensinaram que estudar é um privilégio. As minhas irmãs, cunhados e sobrinhos que sempre torceram por mim e se alegraram com as minhas vitórias. Aos meus sogros e cunhada que desde o primeiro momento me acolheram como filha e irmã.

Aos meus avós, João e Cléo Eiró (*In memorian*), Jessé (*In memorian*) e Laíce Guimarães por sempre serem os melhores avós que alguém poderia ter, certamente vocês estariam/estão muito orgulhosos de todas essas conquistas.

À minha família em Cristo, família do coração, pelas orações, encorajamento e por demonstrar sempre que existem realmente amigos mais chegados que irmãos (Pv. 18.14).

Aos meus amados familiares que desde o primeiro momento torceram por mim e que envidam todos os esforços para serem sempre presentes em todos os momentos.

E por fim e não menos importante, ao meu amável orientador Rafael Rodrigues Lima que acreditou em mim e depositou mais do que a sua confiança no meu trabalho, me incentivou a crescer todos os dias e tem sido mais do que um orientador. É uma honra poder fazer parte deste laboratório tão seletivo e ainda mais ser orientada por um profissional e pesquisador tão competente e amigo.

A todos o meu muito obrigada.

*Verei em Ti
Tão profundo amor
Que irá minha alma inundar
Sentirei de Ti
Uma paz tão maior
Meus medos irá dissipar
Estar Contigo oh! Pai
Tua presença desfrutar
Pois Tua glória sempre me
transportará
E ao Te contemplar posso antever
O que o futuro hoje vem oferecer
Paz, força e amor
Glória e honra
Estar Contigo*

ESTAR CONTIGO - Guilherme Kerr Neto

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é considerado pela Organização Mundial da Saúde como um dos produtos químicos de maior preocupação de saúde pública. Assim, conhecendo a suscetibilidade das regiões do sistema nervoso central e a ausência de evidências sobre os efeitos na medula espinhal, este estudo teve como objetivo investigar mudanças proteômicas e bioquímicas na medula espinhal após a exposição prolongada do MeHg em doses baixas. Para isto, ratos Wistar machos foram expostos a uma dose de 0,04 mg/kg/dia por 60 dias. Depois disso, o proteoma foi identificado com posterior análise de sobre-representação (ORA). Para a bioquímica oxidativa, os parâmetros antioxidantes (ACAP, TEAC, GSH) e pró-oxidantes (LPO e íons nitritos) foram avaliados. A análise proteômica mostrou várias proteínas alteradas que participam de processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares. Houve um aumento nos níveis totais de mercúrio (Hg) na medula espinhal, assim como um aumento nos íons LPO e nitrito e uma redução nos parâmetros ACAP, TEAC e GSH. Portanto, a exposição a baixas doses de MeHg pode desencadear estresse oxidativo associado a mudanças no perfil proteômico.

Palavras-chave: Metilmercúrio. Sistema Nervoso Central. Medula Espinhal. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is considered by the World Health Organization as one of the chemicals of greatest public health concern. Thus, knowing the susceptibility of central nervous system regions and the absence of evidence about the effects on the spinal cord, this study aimed to investigate proteomic and biochemical changes in the spinal cord after MeHg long-term exposure at low doses. For this, male Wistar rats were exposed to a dose of 0.04 mg/kg/day by for 60 days. After that, the proteome was identified with subsequent overrepresentation analysis (ORA). For the oxidative biochemistry, the antioxidant (ACAP, TEAC, GSH) and pro-oxidants (LPO and nitrite ions) parameters were evaluated. The proteomic analysis showed several altered proteins that participate in biological processes, cellular components, and molecular functions. There was an increase in total mercury (Hg) levels in the spinal cord, as well as an increase in LPO and nitrite ions and a reduction in ACAP, TEAC and GSH. Therefore, exposure to low doses of MeHg can trigger oxidative stress associated with changes in the proteomic profile.

Keywords: Methylmercury. Central Nervous System. Spinal cord. Oxidative Stress. MeHg.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proteínas identificadas com expressão significativamente alterada na medula espinhal de ratos do grupo controle versus expostos ao metilmercúrio (MeHg).....	31
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Figura metodológica do estudo.....	23
Figura 2 – Gráfico do desenvolvimento de peso corporal dos animais.....	28
Figura 3 – Gráfico de avaliação dos níveis de mercúrio total no parênquima medular.....	28
Figura 4 – Gráfico dos níveis de estresse oxidativo.....	29
Figura 5 – Gráfico do perfil proteômico da medula espinhal de ratos expostos ao MeHg.....	33
Figura 6 – Gráfico da distribuição funcional das proteínas alteradas pelo MeHg – Componente Celular.....	35
Figura 7 – Gráfico da distribuição funcional das proteínas alteradas pelo MeHg – Função Molecular.....	37
Figura 8 - Gráfico circular da interação proteína-proteína (PPI) na medula espinhal de ratos expostos ao MeHg vs grupo controle.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT-	Catalase
GLU-	Glutamato
GSH-	Glutaciona Reduzida
GSSG-	Glutaciona Oxidada
LPO-	Lipoperoxidação
SNC-	Sistema Nervoso Central
OMS-	Organização Mundial da Saúde
SOD-	Superóxido dismutase
TEAC-	Capacidade antioxidante total relativa ao trolox
GSH-	Conteúdo de glutaciona reduzida
LPO-	Peroxidação lipídica
ACAP-	Capacidade Antioxidante contra radicais peroxil
MeHg-	Metilmercúrio

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Mercúrio.....	13
1.2. Estresse Oxidativo.....	15
1.3. Sistema Nervoso.....	16
1.4. Medula Espinhal.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivo Específico.....	19
3. Corpo do Artigo.....	20
3.1. Introdução	21
3.2. Material e Método.....	22
3.2.1. Animais e Desenho do Estudo.....	22
3.2.2. Quantificação de Mercúrio.....	24
3.2.3. Bioquímica Oxidativa.....	24
3.2.3.1. Capacidade Antioxidante Contra Radicais Peroxil (ACAP)...	24
3.2.3.2. Medição da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).....	25
3.2.3.3. Glutathione Redutase (GSH)	25
3.2.3.4. Peroxidação Lipídica (LPO).....	25
3.2.3.5. Nitrito.....	25
3.2.4. Análise Proteômica.....	26
3.2.4.1. Análise de sobre-representação (ORA).....	26
3.3. Análise Estatística.....	27
3.4. Resultados.....	27
3.4.1. A exposição prolongada do MeHg não afetou o peso corporal de ratos adultos.....	27
3.4.2. A exposição MeHg aumentou a biodisponibilidade do Hg total no parênquima espinhal da medula espinhal de ratos adultos.	28
3.4.3. O MeHg modulou o equilíbrio redox da medula espinhal de ratos expostos.....	29

3.4.4. A exposição ao MeHg durante 60 dias promoveu mudanças no perfil proteômico da medula espinhal de ratos adultos.....	30
3.5. Discussão.....	40
3.6. Conclusão.....	45
Referências Bibliográficas.....	52
ANEXO 1- (Termo de Aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA-UFPA).	71
ANEXO 2- Comprovante de Submissão de Artigo na Revista Food and Chemical Toxicology.....	72

1. Introdução

1.1. Mercúrio

O Mercúrio (Hg) tem várias formas químicas, orgânica e inorgânica, e em diversos estados físicos, com estado sólido, dissolvido ou em fase gasosa, contudo, ele é considerado um elemento raro, uma vez que apenas 0,08 ppm da crosta terrestre é composta por ele, o que o faz ocupar a 66ª posição quando se trata de abundância em comparação aos demais elementos químicos da tabela periódica (LEE, 2000). Diferentemente ocorre em seu ciclo biogeoquímico, pois são diversos processos e que podem envolver água, solo ou atmosfera. (TINÔCO et al., 2009).

Em um breve histórico, Caley (1928) relata que os povos antigos já se utilizavam de mercúrio, porém com um diferente nome, cinábrio, e era utilizado como pigmento em pinturas rupestres e como fonte do mercúrio metálico.

Em 133 a.C., na China, um alquimista ofereceu ao então imperador, Han Wu-Ti, cinábrio, afirmando que a ingestão de líquidos embebidos em frascos feitos daquele metal conferiria imortalidade. Tal ideia era compartilhada por povos hindus pelo fato de o Mercúrio metálico ser produzido pela condensação do vapor do cinábrio, era capaz de produzir intensa coloração avermelhada, assemelhando-se à cor de sangue e, por isso, à capacidade de devolver a vida. Dessa forma, muitos povos o utilizavam para tentar trazer vida aos mortos (Caley, 1928; Marr, 1999).

No final da década de 1970 e início da década de 1980 é que se iniciam os primeiros relatos da utilização de mercúrio na Amazônia, justificado pela vasta exploração de ouro na região (MAL, 1998). Esse metal era utilizado pelos garimpeiros com a finalidade de separar o ouro dos sedimentos provenientes dos rios, formando assim um composto que foi denominado de amálgama, ou seja, uma mistura de ouro com mercúrio. Posterior a isso, essa amálgama era aquecida em altas temperaturas para que os resíduos de mercúrio fossem evaporados e assim restasse apenas o ouro.

Dessa maneira, diversas vias de contaminação se estabeleciam na população que manejava estas técnicas: A primeira era o depósito de mercúrio nos leitos dos rios da região, e a segunda era a liberação de vapores ricos em mercúrio provenientes do aquecimento da amálgama e, com isso, consequente inalação destes vapores tóxicos pelos garimpeiros e por parte da população local. É estimado que cerca de 130 mil toneladas de Mercúrio tenham sido lançadas por ano, durante a chamada corrida do ouro na Amazônia, sendo motivador de danos irreparáveis tanto ao meio ambiente como às populações residentes na Amazônia (MALM e col., 1990).

O Mercúrio tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores, tanto *in vitro* como *in vivo*, e para maior elucidação sobre seus mecanismos de ação é necessário entender a farmacocinética e farmacodinâmica deste metal (BRANCO et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Mercúrio é um dos elementos mais tóxicos e por causa disso, tem se configurado um problema de saúde pública, uma vez que é possível encontrar diversas maneiras de contaminação por esse metal. É possível quantificar níveis elevados de Mercúrio em água, sedimentos e em peixes. O Hg é capaz de desbalancear funções em uma grande variedade de órgãos no corpo humano.

Este metal é um contaminante de caráter global e que é determinado pela sua capacidade toxicológica em diversos sistemas biológicos, pois possui propriedades como bioacumulação, processo pelo qual substâncias são absorvidas nos organismos, e biomagnificação, aumento da concentração de uma substância em organismos vivos ao longo da cadeia trófica (SIQUEIRA e col., 2005).

O Mercúrio é encontrado de maneira natural no ecossistema, porém, em determinadas regiões é possível encontrá-lo por causa das ações antropogênicas, ou seja, resultados devidos à utilização e descarte inadequado do material (NRIAGU, 1989; SCHROEDER e col., 1998; HSU-KIM e col., 2013).

Como já mencionado anteriormente, Hg pode facilmente se espalhar pelo meio ambiente por meios complexos de transporte e transformação. Na natureza, é possível encontrá-lo de duas maneiras: inorgânica e orgânica (WASSERMAN e col., 2001). Na forma inorgânica, o mercúrio apresenta três estados de oxidação diferentes entre si, possuindo também características toxicológicas distintas: mercúrio metálico ou elementar (Hg_0), íon mercuroso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}); que tem a capacidade de se ligar a compostos, como cloro (Cl), enxofre (S) e oxigênio (O), originando sais de mercúrio, como o $HgCl_2$ ($HgCl_2$), que tem capacidade tóxica semelhante para os seres vivos. Já as formas orgânicas do Hg são conhecidas, como etilmercúrio ($C_2H_5Hg^+$), metilmercúrio (MeHg) e dimetilmercúrio ($[CH_3]_2Hg$) e são caracterizadas por sua maior solubilidade e toxicidade para os seres vivos (MOREL e col., 1998; WHO, 2003; ZAMBRANO e col., 2004).

Apenas 10% das 5500-8900 toneladas totais que são emitidas por ano provêm de fontes naturais, como atividade vulcânica, atividade geotérmica ou composição de rochas (UNEP, 2013; MATOS et al., 2011). De maneira geral, as atividades antropogênicas têm aumentado e são responsáveis por 30% das emissões desse metal no meio ambiente, de acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA, 2013).

De acordo com Martiniano et al. (2008), o garimpo é a fonte principal de poluição por esse metal, entretanto, outros estudos associam essa intoxicação ao Mercúrio a locais sem influência direta do garimpo, mas aos processos de erosão e lixiviação das partículas que o contêm, tais processos ocorrem favorecidos pelo desmatamento e promovem a exposição do solo (BARBIERI e GARDON, 2009).

Estudos realizados especialmente entre 1980 e 1990, revelaram uma grande contaminação por esse metal nos afluentes Amazônicos, áreas próximas a garimpos, e levantaram questões relacionados aos mecanismos de dispersão,

vias de emissão e aos efeitos deletérios à saúde de populações expostas ou não.

Estudos toxicológicos apontam que existe uma via de contaminação particular para cada forma mercurial existente. Por exemplo, a contaminação por Cloreto de Mercúrio, $HgCl_2$, ocorre, na prevalência dos casos, por meio da exposição a produtos industriais, acidentes com lâmpadas fluorescentes, utilização de cosméticos e medicamentos que possuem o metal em sua composição, assim como através da ingestão de alimentos cultivados em áreas contaminadas (DYALL-SMITH e SCURRY, 1990; WELDON, 2000; MICARONI e col., 2000). Já a contaminação por Metil Mercúrio, MeHg, ocorre essencialmente por meio da ingestão de peixes contaminados. Essa forma de contaminação é grandemente influenciada pelo ciclo biogeoquímico do mercúrio (BRADL e col., 2002; LINDBERG e col., 2007).

Os alvos principais de toxicidade a esse metal são o sistema nervoso, os rins e o sistema cardiovascular, porém, outros sistemas também podem ser afetados, como respiratório, gastrointestinal, hematológico, imunológico e reprodutivo (UNEP, 2010).

O SNC é um dos primeiros e o mais sensível sistema alvo deste metal, apresentando diversos distúrbios neurológicos como prejuízos visuais, ataxia, parestesia, neurastenia, perda de audição, neurodegeneração entre outros. Todas essas alterações neurológicas podem ser associadas a fatores bioquímicos, celulares e a danos histológicos em várias áreas do SNC, como cerebelo, hipocampo, amígdala, hipotálamo, córtex pré-frontal, tálamo, córtex visual e auditivo (CRESPO- LOPEZ et al., 2015; PUTY et al., 2014).

1.2. Estresse Oxidativo

Existem diversas vias de danos que são desencadeadas com a exposição ao Mercúrio, vias essas muito bem exemplificadas por Crespo-Lopez et al., (2009). Um dos primeiros mecanismos descritos para explicar possíveis alterações orgânicas e genotóxicas foi o Estresse Oxidativo, mecanismo desencadeado por meio da ação dos radicais livres gerados pelo metal.

Os radicais livres são espécies altamente reativas instáveis e circulantes no organismo, que tem importância na manutenção do equilíbrio celular, mas que são capazes de causar dano ao DNA quando estão em grande quantidade descompensando assim o sistema. As espécies reativas de oxigênio também são responsáveis por dar início a reações catalíticas onde proteínas, lipídeos, e hidratos de carbono são transformados em radicais livres, culminando assim em um efeito em cadeia. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são o tipo de radicais livres que mais aparecem relacionados em processos patogênicos. As ROS podem levar a processos carcinogênicos pois promovem proliferação, invasividade, angiogênese, metástase e apoptose celular (HALLIWEL B., 2007).

Espécies reativas formadas por meio do estresse oxidativo tem alto poder de reação com diversas macromoléculas celulares que são capazes de causar danos em níveis metabólicos, proteômicos e transcriptômicos (LIMA et al., 2018; REICHMANN, VOTH et al. 2018). Portanto, podemos citar o Estresse Oxidativo como um dos principais danos causados pela neurotoxicidade ao Mercúrio, que é capaz de inibir e/ou alterar parâmetros antioxidantes como glutatona redutase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, além de ser capaz de alterar níveis de peroxidação lipídica, a exemplo do malondialdeído (MDA), nitritos nas regiões hipocâmpais e em tecido hematopoiético (RIZZETTI, FERNANDEZ ET AL. 2016; ARAGÃO, TEIXEIRA et al. 2018).

Entretanto, os danos bioquímicos não são os únicos a serem desencadeados pelo Mercúrio. Estudos primários demonstraram que o mercúrio é capaz de modular a função neuroquímica excitatória, que é definida por um aumento significativo de neurotransmissores glutamatérgicos na fenda sináptica, em áreas relacionadas com a memória e motricidade (TEIXEIRA, DE OLIVEIRA et al. 2018).

1.3. Sistema Nervoso Central

A exposição ao mercúrio é capaz de causar um desequilíbrio na homeostase sináptica, levando a um aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica e, conseqüentemente, maior influxo de Ca^{+2} pós-sináptico, causando assim, morte e disfunção de organelas citoplasmáticas.

Em estudos em que a administração escolhida foi a via oral do mercúrio, a justificativa se apresenta como a possibilidade de mimetizar a ingestão diária deste metal se fosse uma dieta por contaminação por água ou alimentos (HUANG et al., 2008; KONG, WONG e CHAN, 2013).

O mercúrio é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, aumentando assim a vulnerabilidade do sistema nervoso fetal aos efeitos tóxicos a esse metal (ARAGÃO et al., 2018; ARRIFANO et al., 2018; CASTRO et al., 2018). Além disso, o MeHg tende a se acumular em fetos devido à sua incapacidade de secretar esse metal (RUELAS-INZUNZA et al., 2017).

Estudos apontam que as anormalidades neuropsicológicas causadas pelo Mercúrio formam três grandes grupos: anormalidades no sistema motor, como tremor fino, danos intelectuais, como agravamento progressivo de memória, e por fim, dificuldades emocionais (REYNOLDS et al., 2013).

O déficit motor, quando há exposição ao MeHg, mostrado na literatura não é referente a alteração morfológica muscular e sim como uma espécie de seqüela clínica dos danos neuronais sofridos por tal exposição (DEBES et al. 2006). Esses efeitos ocorrem de maneira dose dependente, ou seja, quanto maior a dose e/ou período dessa exposição, maior o prejuízo, ocasionando uma redução na velocidade motora, atenção e da linguagem, todos efeitos da exposição e consumo ao MeHg.

Estudo realizado em 2013 (KONG e col., 2013) descreveu um modelo de exposição em que os animais eram expostos ao metilmercúrio, em uma dose diária de 0,04 mg/kg/dia. Através deste estudo, é possível ressaltar a capacidade de promover alterações bioquímicas e moleculares nas regiões cerebrais, incluindo córtex por meio dessa exposição pelo período de 60 dias em ratos, fazendo uma associação da ingestão de baixas doses diárias de mercúrio, por meio de frutos do mar, com alterações de ordem neurodegenerativa.

Baseado no protocolo estabelecido por Kong et al. (2013) e adaptado por Bittencourt et al. (2017), o nosso estudo adotou a dose de 0,04 mg/kg durante 60 dias onde ambos os estudos apontam que nesta dose o MeHg é capaz de promover a distribuição sistêmica e assim desencadear alterações bioquímicas além de promover alterações moleculares hipocampais.

Em estudos em que a administração escolhida foi a via oral do mercúrio, a justificativa se apresenta como a possibilidade de mimetizar a ingestão diária deste metal semelhante a uma contaminação através da ingestão de água ou alimentos (HUANG et al., 2008; KONG, WONG e CHAN, 2013).

Diversos modelos experimentais já foram utilizados com objetivo de investigar os efeitos citotóxicos deste metal (MYERS et al., 2009). Até em concentrações bem baixas, doses bem menores quando comparadas a dose segura descrita pela literatura, o MeHg é capaz de ser nocivo e causar danos celulares no desenvolvimento do SNC podendo até se tornar um problema irreversível (PATEL et al., 2013). A principal razão para que esses efeitos graves estejam relacionados é com a grande janela de susceptibilidade a agentes exógenos apresentada pelo SNC em desenvolvimento, uma vez que, inicialmente, o sistema está em desenvolvimento e não está completamente protegido pela barreira hemaencefálica (CARRATÙ et al., 2006).

Geralmente as estruturas utilizadas para estudos relacionados ao desenvolvimento de neurotoxicidade são estruturas encefálicas, tais como cerebelo, hipocampo e cérebro. Porém, o estudo com medula espinhal apresenta-se como um modelo interessante para estudos de toxicidade no desenvolvimento neurológico pois sua organização estrutural é menos complexa, apresentando menos camadas de tecido, permitindo assim a observação dos efeitos neurotóxicos em células com diferentes estágios de maturação e diferenciação (HUYCK et al., 2015; BISEN-HERSH et al., 2014; FERREIRA et al., 2015).

1.4. Medula Espinhal

Levando em consideração que o SNC é um dos principais alvos tóxicos do MeHg e o objeto de estudo deste trabalho é a medula espinhal, estrutura anatômica pertencente a este sistema, é necessário entender melhor sua anatomia. A medula espinhal está localizada no canal vertebral e possui aspecto cilíndrico alongado. Ela se estende desde a primeira vértebra cervical até a segunda lombar, no seu fim apresenta uma cauda que é composta pelas

meninges, membranas fibrosas, e raízes dos últimos nervos espinhais. Sua extremidade superior tem conectividade com o bulbo encefálico, próximo à altura do forâmen magno do osso occipital do crânio. A medula ainda possui intumescências, a cervical onde encontram-se as conexões nervosas com os plexos braquial, e a lombo-sacral, inervando assim os membros superiores e inferiores. Cada um de seus segmentos origina dois nervos espinhais que são formados por raízes dorsais sensitivas que são condutores de impulsos nervosos aferentes e raízes ventrais motoras que são condutoras de impulsos nervosos eferentes. Partem da medula cerca de 31 pares de nervos que se ramificam, sendo eles: oito cervicais, doze torácicos, cinco lombares, cinco sacrais e um coccígeo. Através dessas ramificações, a medula é capaz de se conectar com o corpo e receber dele diversos impulsos, enviando cada um para o cérebro, recebendo-as de volta e transmitindo as respostas para todo o organismo (AMATO et al., 2015)

A medula espinhal é uma estrutura que faz parte do SNC trazendo e levando informações para o restante do corpo. Apesar da sua grande importância, poucos são os relatos envolvendo esta estrutura anatômica, em contrapartida existem diversos trabalhos na literatura que elucidam os mecanismos desencadeados pela intoxicação mercurial no SNC em estruturas como córtex motor e hipocampo.

Santana et al. (2019) avaliou o córtex motor em ratos adultos expostos ao MeHg por longos períodos em concentração equivalente a encontrada em populações que se alimentam do pescado exposto a este metal. Os parâmetros utilizados avaliaram o total de Mercúrio acumulado, estresse oxidativo, dano tecidual além do comportamento funcional que envolvia a região cortical. Os resultados demonstraram que os animais expostos ao Mercúrio apresentaram grande acúmulo de Hg no córtex motor, seguido de diminuição nos níveis de nitrito e de peroxidação lipídica, associado com o decréscimo da capacidade antioxidante contra radicais peróxil, uma severa redução neuronal e densidade de astrócitos, comprometimento da coordenação e aprendizagem motora. Dessa maneira, esse estudo demonstrou que a exposição por longo período em doses baixas de Hg é capaz de promover danos ao córtex motor em animais adultos, com mudanças no equilíbrio da bioquímica oxidativa, neurodegeneração, além de comprometimento da função motora.

Porém, é sabido que o córtex motor é apenas uma parte dessa via e que danos à medula espinhal podem também estar associados ao dano motor já diagnosticado em outros trabalhos.

A literatura possui diversos trabalhos elucidando os mecanismos tóxicos do MeHg no SNC, porém, os trabalhos envolvendo medula espinhal são muito escassos e nenhum aborda os danos causados pelo estresse oxidativo e proteômico. Estudar a medula espinhal, principal via de comunicação entre o cérebro e o organismo, é de suma importância para compreender os danos no SNC como um todo.

Sendo assim, a hipótese a ser testada nesta investigação é que a exposição ao MeHg por longo prazo e em baixa dose é capaz de promover aumento nos níveis de mercúrio no parênquima neural da medula espinhal, desencadeando estresse oxidativo, alterações proteômicas e morte neuronal, associadas a alterações/danos/morte de populações de células gliais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as possíveis alterações proteômicas e bioquímicas na medula espinhal de ratos adultos, mediante a exposição por longo tempo e em baixa dose ao metilmercúrio.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de mercúrio na medula espinhal após o período de intoxicação proposto;
- Descrever a modulação do perfil proteômico da medula espinhal após exposição mercurial;
- Avaliar o balanço bioquímico oxidativo na medula espinhal perante a dose e tempo de exposição mercurial proposto;

MEHG EXPOSURE CAUSES SPINAL CORD IMPAIRMENT: INSIGHTS FROM PROTEOMICS AND OXIDATIVE STRESS

Luciana Guimarães Eiró ^{1†}, Maria Karolina Martins Ferreira^{1†}, Leonardo Oliveira Bittencourt^{1†}, Walessa Alana Bragança Aragão^{1†}, Michel Platini Caldas de Souza², Marcia Cristina Freitas da Silva¹, Aline Dionizio⁴, Marília Afonso Rabelo Buzalaf⁴, Maria Elena Crespo-López³, Rafael Rodrigues Lima ^{1*}

† Estes autores contribuíram igualmente para este estudo.

1 Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil.; labef.icb.ufpa@gmail.com

2 Section of Parasitology, Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Brazil

3 Laboratory of Molecular Pharmacology, Federal University of Pará, Belém-PA 66075-110, Brazil;

4 Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

* Correspondence: Rafael Rodrigues Lima, PhD – rafalima@ufpa.br. Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, 01 Augusto Correa Street, Guama, 66075-900 Belem, PA, Brazil.

Destaques:

- O MeHg se acumula na medula espinhal após longas exposições em baixas doses.
- A exposição por longos períodos ao MeHg causa alteração na bioquímica oxidativa.
- O perfil proteômico é modulado com a exposição ao MeHg.

3.1. Introdução

O metilmercúrio (MeHg) é um contaminante global determinado por sua capacidade toxicológica em vários sistemas biológicos, pois tem a capacidade de bioacumulação em organismos e de biomagnificação ao longo da cadeia trófica [1]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [2], o MeHg é um dos elementos mais tóxicos e, devido a ele, um problema de saúde pública foi configurado já que é possível encontrar muitas formas de contaminação por este metal. O MeHg é encontrado naturalmente no ecossistema, mas em certas regiões, é possível encontrá-lo também como resultado de ações antropogênicas [3-5]. A contaminação pelo MeHg ocorre essencialmente através da ingestão de peixes contaminados, e esta forma de contaminação é muito influenciada pelo ciclo biogeoquímico do metal [6, 7].

O principal alvo da toxicidade deste metal é o sistema nervoso central (SNC), apresentando vários distúrbios neurológicos, tais como deficiência visual, ataxia, parestesia, neurastenia, perda auditiva, neurodegeneração, entre outros [8-10]. Isto pode estar associado à capacidade do MeHg de atravessar a barreira hemato-encefálica e acumular-se em várias áreas do cérebro [11]. Numerosos estudos mostram que áreas do SNC são suscetíveis a danos desencadeados por MeHg, como o córtex motor [12], cerebelo [13], hipocampo [14], mas muito pouco se sabe sobre os efeitos na medula espinhal.

A medula espinhal, objeto desta pesquisa, é de grande importância para o SNC porque serve como ponte entre as informações coletadas através dos nervos espinais e tem numerosos grupos de fibras nervosas que se dirigem ou partem do cérebro, chamadas vias ascendentes e descendentes da medula espinhal, respectivamente. Estas vias, também denominadas tratos, são responsáveis pelo transporte de estímulos motores e sensoriais de e para a periferia [15]. Além disso, possui circuitos neuronais que são importantes na propagação dos movimentos musculares, exercendo controle direto sobre os músculos [16]. A obstrução ou dano à medula espinhal implica na perda da descarga contínua das fibras nervosas, da função e reflexos da medula espinhal, causando assim o choque da medula espinhal [15].

Na literatura, após exposição ao MeHg, os neurônios presentes na medula espinhal de ratos mostraram degeneração cerebral a partir do 11^o dia, além disso, as células granulares começaram a apresentar sinais de degeneração,

com vacuolização citoplasmática e perda da substância Nissl, no 14º dia. Já no 18º dia os grandes neurônios motores estavam quase todos extintos, enquanto os de tamanho pequeno/médio permaneceram intactos [17].

Uma revisão lista vários resultados de estudos que analisam os danos causados pelo MeHg à medula espinhal [18], parestesias associadas à degeneração dos neurônios, assim como mudanças na morfologia celular e propriedades elétricas antes da apoptose. Além disso, a literatura também mostra que os neurônios motores da medula eram altamente suscetíveis à exposição ao MeHg, culminando em aumentos significativos na excitabilidade espontânea da rede e interrupção da função normal. A hiperexcitabilidade prolongada pode levar à eventual neurodegeneração e, portanto, à perda da função motora, como observado na medula espinhal após exposição in vivo ao MeHg e pode contribuir para a aceleração dos sintomas de doenças neurodegenerativas induzidas pelo MeHg [19]. Apesar de sua importância, não há relatos sobre os efeitos moleculares e oxidativos associados ao MeHg na medula espinhal.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa investigou os efeitos nocivos do mercúrio (Hg), sendo a escolha da dose baseada no protocolo de Kong [20] e no protocolo adaptado por nosso grupo [21] que sugere que doses baixas durante longos períodos de tempo podem alterar o sistema metabólico, reduzir os níveis de piruvato, ATP e cálcio total [20]. Através destes protocolos, nosso grupo encontrou mudanças nas regiões hipocâmpais [14] e no córtex motor [12]. Nossos dados mostraram que neste tempo e dose de exposição o MeHg pode desencadear danos motores e cognitivos associados ao estresse oxidativo e à modulação do perfil proteômico. Questiona-se, portanto, se a medula espinhal, sob as mesmas condições experimentais, também seria suscetível ao dano desencadeado pelo MeHg como outras regiões cerebrais.

Desta perspectiva, este estudo visa investigar os efeitos da exposição ao MeHg sobre a medula espinhal de ratos adultos em um modelo de baixa dose e longo prazo. Para examinar possíveis alterações da medula espinhal em ratos, usamos a análise da modulação proteômica e bioquímica oxidativa..

3.2. Material e método

3.2.1. Animais e desenho do estudo

Vinte e oito ratos Wistar machos de 90 dias (120-150g) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais cada gaiola), em sala climatizada (25°C) em um ciclo luz/escuro 12:12h (luzes acesas às 7:00h), e comida e água ad libitum. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pará (protocolo CEPAE-UFGA: 7037071217) e seguindo o Guia NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: o grupo de exposição (EG) e o grupo de controle (CG) (Figura 1). O modelo de exposição foi estabelecido por Kong [20] e adaptado por nosso grupo [12, 14, 22]. Utilizamos cloreto de MeHg (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em óleo de milho para intoxicar os animais com uma dose diária de 0,04 mg kg⁻¹ de massa corporal via gavagem intra-gástrica. O grupo controle recebeu água destilada, por gavagem intra-gástrica, durante 60 dias. Os animais eram pesados semanalmente para o ajuste da dose.

Após o período experimental, 14 animais por grupo foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/kg), sendo eutanaziados por deslocamento cervical. A laminectomia foi realizada para remover a medula espinhal, que foi submetida a congelamento imediato e armazenada em ultrafreezer até a análise. Os desenhos metodológicos foram resumidos na figura 1.

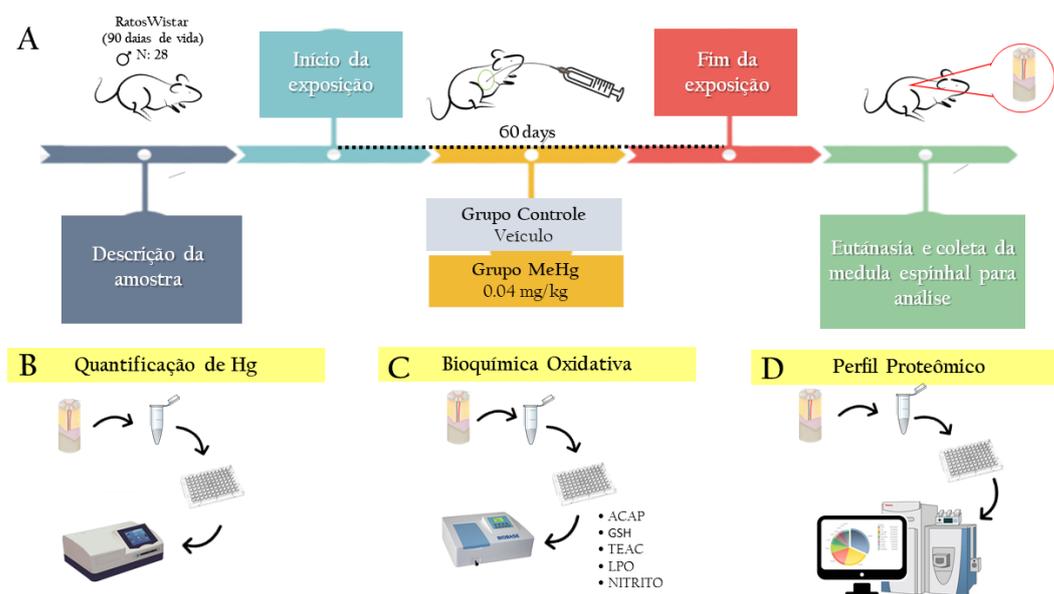


Figura 1. Descrição da amostra e passos experimentais. (A) Descrição da amostra, definições de grupos experimentais e coleta de amostras; (B) Quantificação de Hg total; (C) Análise de bioquímica oxidativa (ACAP, TEAC, GSH, LPO, e íons nitritos); (D) Análise do perfil proteômico.

3.2.2. Quantificação de mercúrio

O conteúdo total de Hg nas amostras foi determinado por absorção atômica a vapor frio, redução e espectrometria de digestão (CVAAS) utilizando um analisador semi-automático de mercúrio (modelo Hg-201, Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tóquio, Japão). Este protocolo já foi utilizado em estudos anteriores do nosso grupo [12, 14, 22-24]. Os resultados da análise da amostra foram expressos em $\mu\text{g/g}$.

3.2.3. Bioquímica Oxidativa.

Para estas análises, as amostras foram descongeladas e ressuspendidas em 20 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4, a 4°C) para desintegração sônica (~1g/mL). A homogeneização foi realizada com a ajuda de um banho de geloabaixo dos microtubos, para evitar qualquer tipo de calor que possa afetar os lipídios e proteínas da amostra. Todos os testes bioquímicos foram realizados em triplicata e utilizaram o sobrenadante após a centrifugação, com tempo e rotação variáveis de acordo com os seguintes protocolos descritos.

3.2.3.1. Capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (ACAP)

A avaliação da capacidade antioxidante contra os radicais peroxil é feita através da determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e foi realizada de acordo com os estudos [25, 26]. Para isto, a competência antioxidante total contra os radicais peroxil foi analisada através da determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em amostras com concentração proteica fixa (2,5 mg mL⁻¹) ao expor as amostras a um gerador de radicais peroxil. 31 Radicais peroxil foram produzidos pela decomposição térmica (35 1C) de 2,20 -azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloro (ABAP; 4 mM; Sigma-Aldrich, EUA). Para determinação de ROS, o composto 20, 70 -diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Invitrogen, EUA) foi utilizado com uma concentração final de 40 mM. As leituras foram medidas usando um leitor de microplaca fluorescente (Victor X3, Perkin Elmer) a cada 5 minutos durante 1 hora. A produção total de fluorescência foi calculada pela integração das unidades de fluorescência (FU; eixo y) ao longo do tempo da medição (eixo x), após ajustar os dados FU para uma função polinomial de segunda ordem. Os resultados foram calculados como a diferença de área de FU x min na mesma amostra com e sem adição de ABAP e padronizados para a área ROS sem ABAP (área de fundo). Usando esta metodologia, uma área relativa reduzida significa maior capacidade antioxidante, pois baixos níveis de fluorescência obtidos após a adição de ABAP, indicam alta competência na neutralização de radicais peroxil. Para uma leitura direta dos resultados, o inverso da diferença relativa entre a área ROS com e sem ABAP foi considerado como uma medida da capacidade antioxidante. Os resultados são expressos como % do controle.

3.2.3.2. Medição da Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC).

O método utilizado para analisar os níveis de TEAC é descrito por Ruffino [27]. Este é um método não específico para a determinação da atividade antioxidante total dos fluidos corporais [28]. Para isto, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)- ácido sulfônico 6 (ABTS; 7 mM) foi incubado pela adição de persulfato de potássio (2,45 mM) à temperatura ambiente durante 16 h para produzir ABTS+ radical. A solução de trabalho foi preparada a partir do radical ABTS+ em solução salina básica de fosfato (PBS) (pH 7,2) até absorção de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Posteriormente, 30 μ L padrões de plasma ou trolox (curva padrão) foram adicionados a 2970 μ L de solução ABTS, e a absorbância foi adquirida após 5 minutos. As absorbâncias foram medidas em triplicata e calculadas seguindo uma curva padrão com trolox [29] como padrão. A capacidade total de antioxidante no plasma foi expressa em μ mol/mL.

3.2.3.3. Glutationa Redutase (GSH)

As medidas de nível de GSH foram determinadas usando um método Ellman modificado [30]. Primeiro, a medula espinhal foi homogeneizada em água fria destilada. Uma alíquota (20 μ L) de homogeneizada foi adicionada em um tubo contendo água destilada (20 μ L) e solução tampão PBS-EDTA pH 8,0 (3 mL) para realizar a primeira medição. Depois, 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB; 0,47mmol) foi adicionado à solução, e outra medição foi realizada após 3 minutos. A concentração de GSH foi expressa como μ g/mL.

3.2.3.4. Peroxidação Lipídica (LPO)

A análise de peroxidação lipídica (LPO) foi realizada de acordo com Souza Monteiro [31] [Kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical)]. Em resumo, as cordas espinhais homogeneizadas foram centrifugadas a 5.600 rpm, após o que o sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de LPO. Para a análise, uma solução contendo ácido metanossulfônico e N-metilfenil indole (10,3 mM em acetonitrila) diluído em metanol (1:3) foi adicionado ao sobrenadante e incubado por 40 min a 45 1C. A absorvância foi medida a 570 nm e comparada às concentrações padrão de malondialdeído.³⁵ Os resultados da absorvância foram convertidos para as respectivas concentrações e corrigidos após a mensuração da proteína pelo método de Bradford [32]. Os resultados são expressos em nM/ μ g como % do controle.

3.2.3.5. Nitrito

O nitrito determinante estava de acordo com o protocolo [33]. As amostras foram homogeneizadas a 14.000 rpm. O sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de nitritos. O teste para determinar o nível de nitrito foi realizado pelo método Griess, que consiste na reação do reagente Griess (0,1%

de naftilenodiamina e 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%, 1: 1, v / v) com 50 mL do sobrenadante de cada amostra ou 50 mL de solução padrão de nitrito de sódio. Os resultados são expressos $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ como % do controle.

3.2.4. Análise proteômica

Esta análise foi realizada conforme descrito em protocolos anteriores de nosso grupo [14, 34, 35]. A análise proteômica foi realizada por homogeneização de amostras, extração de proteínas, redução, alquilação, digestão, dessalinização e purificação. Para esta análise, foram necessárias 03 amostras de cada grupo, que foram agrupadas, e as análises foram realizadas em triplicata. As amostras foram criofraturadas em nitrogênio líquido por um moinho criogênico e com posterior extração de proteínas solúveis com tampão de lise [7 M uréia, 2 M tiouréia, diluída em AMBIC: BioRad, EUA] sob agitação constante a 4 °C. Depois disso, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 14 000 rpm a 4 °C para quantificação total de proteínas no sobrenadante pelo método de Bradford [32]. Para isto, 50 mg de proteína foram preenchidos com AMBIC (50 mM) até 50 mL (1 mg mL⁻¹). Para cada amostra, 10 mL de 50 mM AMBIC e 25 mL de 0,2% de RapiGEST TM (Waters Co., Manchester, UK) foram adicionados e incubados a 37 °C durante 30 min. Em seguida, 2,5 mL de 100 mM TDT foram adicionados e incubados a 37 °C durante 60 min, seguidos da adição consecutiva de 2,5 mL de 300 mM IAA (BioRad, EUA) e incubação durante 30 min à temperatura ambiente (no escuro). Na etapa seguinte, 10 mL de tripsina (Thermo Fischer, EUA) foram adicionados e a digestão ocorreu durante 14 horas a 37 °C, com adição subsequente de 10 mL de ácido trifluoroacético a 5% (Sigma-Aldrich, EUA) durante 90 min a 37 °C e centrifugação posterior a 14 000 rpm a 6 °C durante 30 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e purificados usando colunas de centrifugação C18 (Pierce, EUA). As amostras foram ressuspensas em 12 mL de ADH (1 pmol mL⁻¹) + 108 mL de 3% de acetonitrila (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Thermo Fischer, EUA).

A leitura e identificação dos peptídeos foram realizadas em um sistema UPLC-Xevo QToF MS (Waters, Manchester, UK), utilizando o Protein Lynx Global Server (PLGS), como descrito anteriormente [14, 34, 36]. A identificação da Proteína foi realizada através do download do banco de dados Uniprot. Em seguida, análises bioinformáticas foram realizadas utilizando Cytoscape (v. 3.6.1, Java®) com o ClueGO Plugin para a determinação de grupos de processos biológicos baseados nas Ontologias Genéticas (GO) [37]. Após estas etapas, foram identificadas as proteínas que foram consideradas únicas, down? reguladas e up reguladas em ambos os grupos.

3.2.4.1. Análise de sobre-representação (ORA)

Para a análise ORA, foram utilizadas proteínas com diferença de expressão e únicas, e os dados referentes à proporção da análise anterior foram processados e os valores de corte foram aplicados para triagem de proteínas

com valor de expressão em 50% acima ou abaixo na condição exposta em comparação com o controle. A análise foi realizada considerando apenas proteínas com valores de $\log_2\text{ratio} \leq -0,58$ ou $\geq 0,58$. Usando a ferramenta de conversão UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uploadlists/>), os códigos das proteínas foram convertidos no registro entre os IDs dos genes. Para proteínas com mudanças absolutas, foram atribuídos valores -1 (para proteínas detectadas somente no controle) e 1 (para proteínas detectadas somente na amostra exposta). Para a análise ORA, foi utilizado o programa de estúdio R [38] EGSEA plugin [39]. Nesta etapa, foi consultado o banco de dados UNIPROT, para a identificação das proteínas e dos processos biológicos dos quais participam, disponibilizado pela Bader Lab e após esta verificação utilizamos o software Cytoscape [40] com o plugin do Enrichment Lab para agrupar os conjuntos de proteínas consultados anteriormente e, em seguida, os principais processos biológicos foram selecionados para análise gráfica.

Posteriormente, foi realizada uma análise de interação proteína-proteína (PPI) (<https://www.networkanalyst.ca/>) [41] para construir a imagem representativa, de acordo com o número de interações das proteínas com as outras proteínas encontradas alteradas, resultando em 60 proteínas. A imagem foi gerada pelo programa de estúdio R com o plugin GOplot.

3.3. Análise estatística

Todos os resultados foram tabulados após a coleta de dados e analisados pelo software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Para verificar a normalidade, foi utilizado o método Shapiro-Wilk. A avaliação da massa corporal dos animais foi analisada estatisticamente usando ANOVA bidirecional com o teste post-hoc de Tukey. Os outros resultados foram analisados através do teste t de Student. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As análises estatísticas de proteômica foram realizadas pelo software PLGS, aplicando o algoritmo Monte-Carlo, para obter a diferença de expressão de proteínas entre os grupos, considerando $p < 0,05$ para as proteínas desreguladas e $1 - p > 0,95$ para as proteínas up-regulated.

3.4. Resultados

3.4.1. **A exposição prolongada do MeHg não afetou o peso corporal de ratos adultos.**

Os animais de ambos os grupos ganharam peso ($p < 0,0001$). Entretanto, ao final do período de exposição de 60 dias, não houve diferença significativa no peso corporal na comparação dos grupos de controle e expostos ($p > 0,05$).

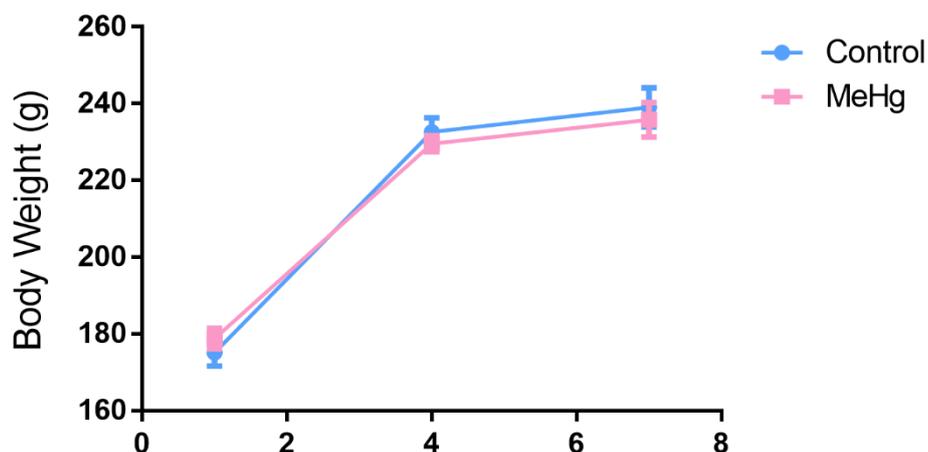


Fig. 2 Efeitos da exposição MeHg (0,04 mg/kg/dia) durante 60 dias sobre o peso corporal (g) de rato. Os resultados são expressos como média \pm SEM. ANOVA bidirecional e o teste pós-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2. A exposição MeHg aumentou a biodisponibilidade do Hg total no parênquima espinal da medula espinal de ratos adultos.

Os níveis totais de Hg na medula espinal de ratos adultos foram significativamente mais altos após exposição prolongada ao MeHg a 0,04 mg kg⁻¹ de massa corporal. Os níveis de Hg no grupo exposto foram de $0,02 \pm 0,002$ $\mu\text{g} / \text{g}$ quando comparados com o grupo controle ($p < 0,0001$) que apresentou níveis de Hg abaixo do limite de detecção (Fig. 3).

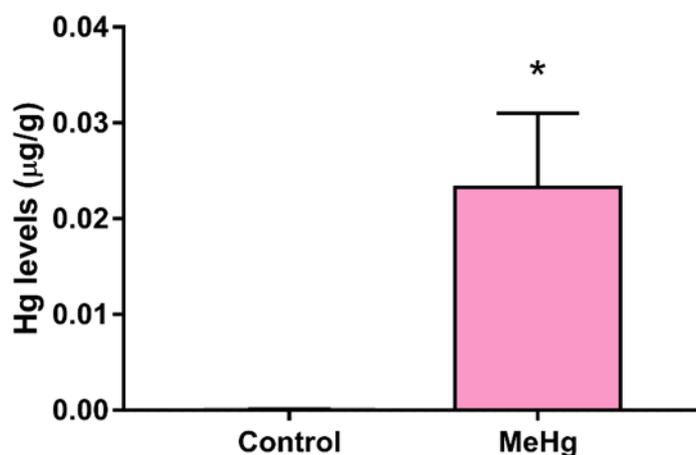


Fig. 3 Níveis totais de Hg na medula espinal após exposição a MeHg (0,04 mg/kg/dia) por 60 dias. Os resultados são expressos como erro padrão médio. Os dados foram analisados utilizando o teste t Student. * $p < 0,05$.

3.4.3. O MeHg modulou o equilíbrio redox da medula espinal de ratos expostos.

Como mostrado na figura 4, as análises bioquímicas mostraram que o MeHg foi capaz de reduzir a capacidade antioxidante da medula espinal reduzindo significativamente os níveis de TEAC em 18,15% ($\pm 3,65\%$), o conteúdo de GSH em 28,59% ($\pm 3,68\%$) e ACAP em 38,12% ($\pm 8,67\%$) em comparação com o grupo de controle ($p < 0,05$). Além disso, os parâmetros pró-oxidantes também foram afetados pela exposição prolongada MeHg, pelo aumento dos níveis de nitritos em 57% ($\pm 13,31\%$) ($p = 0,02$) e os níveis de MDA em 97% ($\pm 24,8\%$) ($p = 0,008$). A fim de confirmar que houve estresse oxidativo, a relação entre TEAC/MDA foi avaliada e mostrou uma redução significativa no grupo exposto ($37,96 \pm 5,83\%$), quando comparado ao grupo controle ($100 \pm 17,83\%$; $p = 0,0079$).

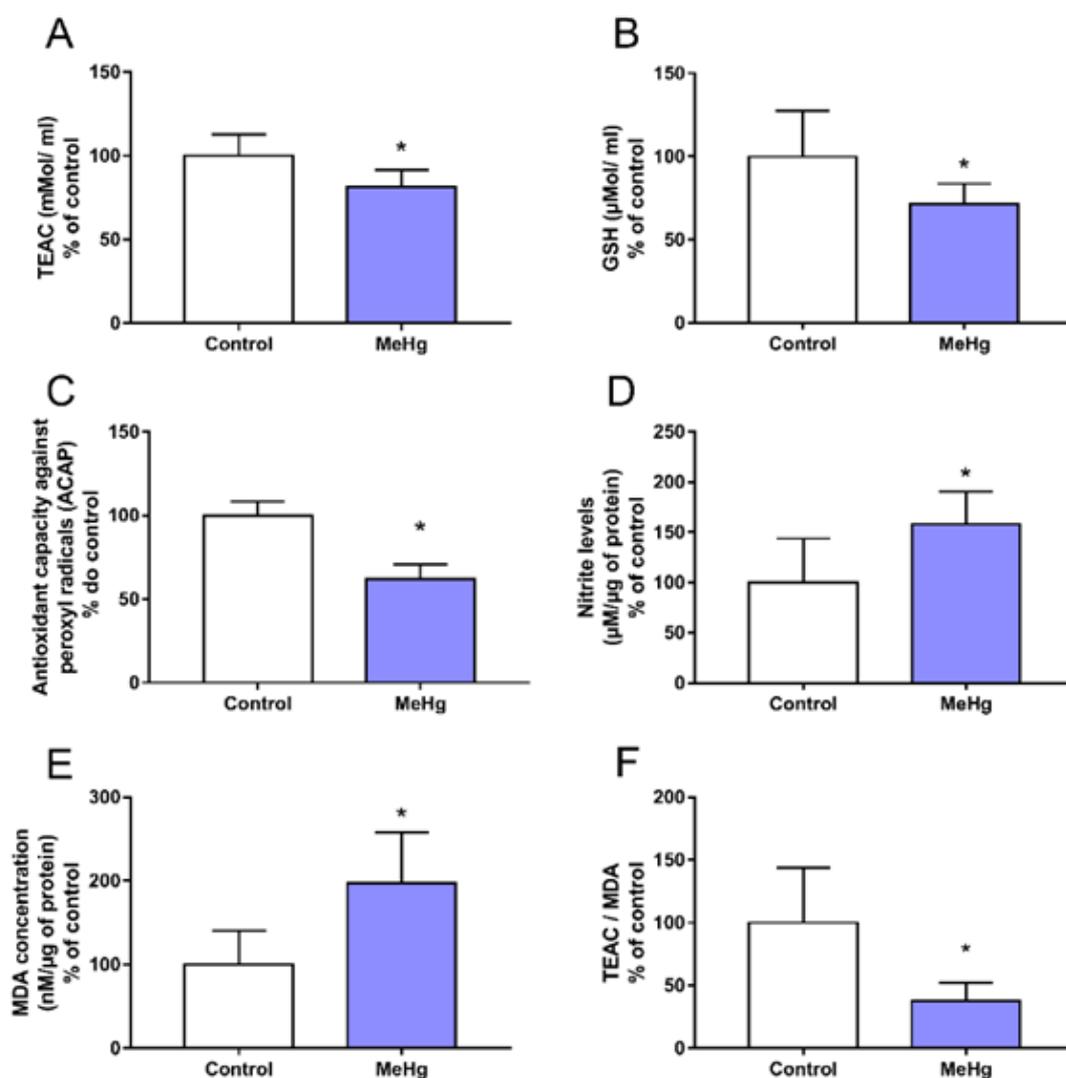


Fig.4 Avaliação da bioquímica oxidativa na medula espinal de ratos expostos ao MeHg durante 60 dias. Os gráficos mostram os resultados como uma porcentagem do controle: (A) TEAC, (B) GSH, (C) ACAP, (D) Nitrito, (E) MDA, e (F) razão TEAC / MDA. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Teste t Student, * $p < 0,05$.

3.4.4. A exposição ao MeHg durante 60 dias promoveu mudanças no perfil proteômico da medula espinhal de ratos adultos.

A exposição de longo prazo ao MeHg modulou o perfil proteômico dos animais expostos ao metal. A análise do perfil proteômico da medula espinhal revelou um total de 229 proteínas com status de regulação diferentes (Tabela 1). Destas, 80 proteínas foram exclusivas no grupo exposto e apenas 1 única para o grupo de controle. Ao analisarmos as proteínas com diferença de expressão, obtivemos um total de 131 proteínas expressas de forma diferente entre os grupos, com 130 sendo super-regulada e apenas 1 sub-regulada. A tabela completa de proteínas está disponível em material suplementar (Tabela S1).

Tabela 1. Proteínas identificadas com expressão significativamente alterada na medula espinhal de ratos do grupo controle versus expostos ao metilmercúrio (MeHg)

Código de Acesso Id^a	Descrição da Proteína	Score	Fold Change MeHg
P15999	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	1429	1,3
P10719	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	3222	1,35
P0DMW0	Heat shock 70 kDa protein 1A	27	2,05
P0DMW1	Heat shock 70 kDa protein 1B	27	2,18
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	90	2,69
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	48	2,86
Q63716	Peroxiredoxin-1	177	1,36
P35704	Peroxiredoxin-2	452	1,34
Q9R063	Peroxiredoxin-5_ mitochondrial	445	1,65
P16638	ATP-citrate synthase	29	+
P10888	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial	64	+
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial	49	+
P07895	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial	114	+
+ 216 proteínas com status de regulação diferente			

^aAccession ID de acordo com o banco de dados Uniport.org. Valores positivos e negativos de mudança de dobra indicam proteínas reguladas para cima e para baixo, respectivamente. Os sinais de + indicam expressão exclusiva no MeHg. Resultados da comparação entre o grupo MeHg e o grupo controle.

As análises bioinformáticas dos processos biológicos por Gene Ontologies (GO) mostraram um total de 25 processos alterados na medula espinhal pelo MeHg. Os principais processos biológicos prejudicados pela exposição ao MeHg foram: respostas a substâncias inorgânicas (9,2%), geração de metabólitos precursores e energia (8,9%), processo metabólico de fosfato de ribose (8,9%), processo metabólico de ribonucleotídeos puros (8,2%), processo metabólico de piruvato (4,9%) e constituinte estrutural do citoesqueleto (4,2%) (Figura 5).

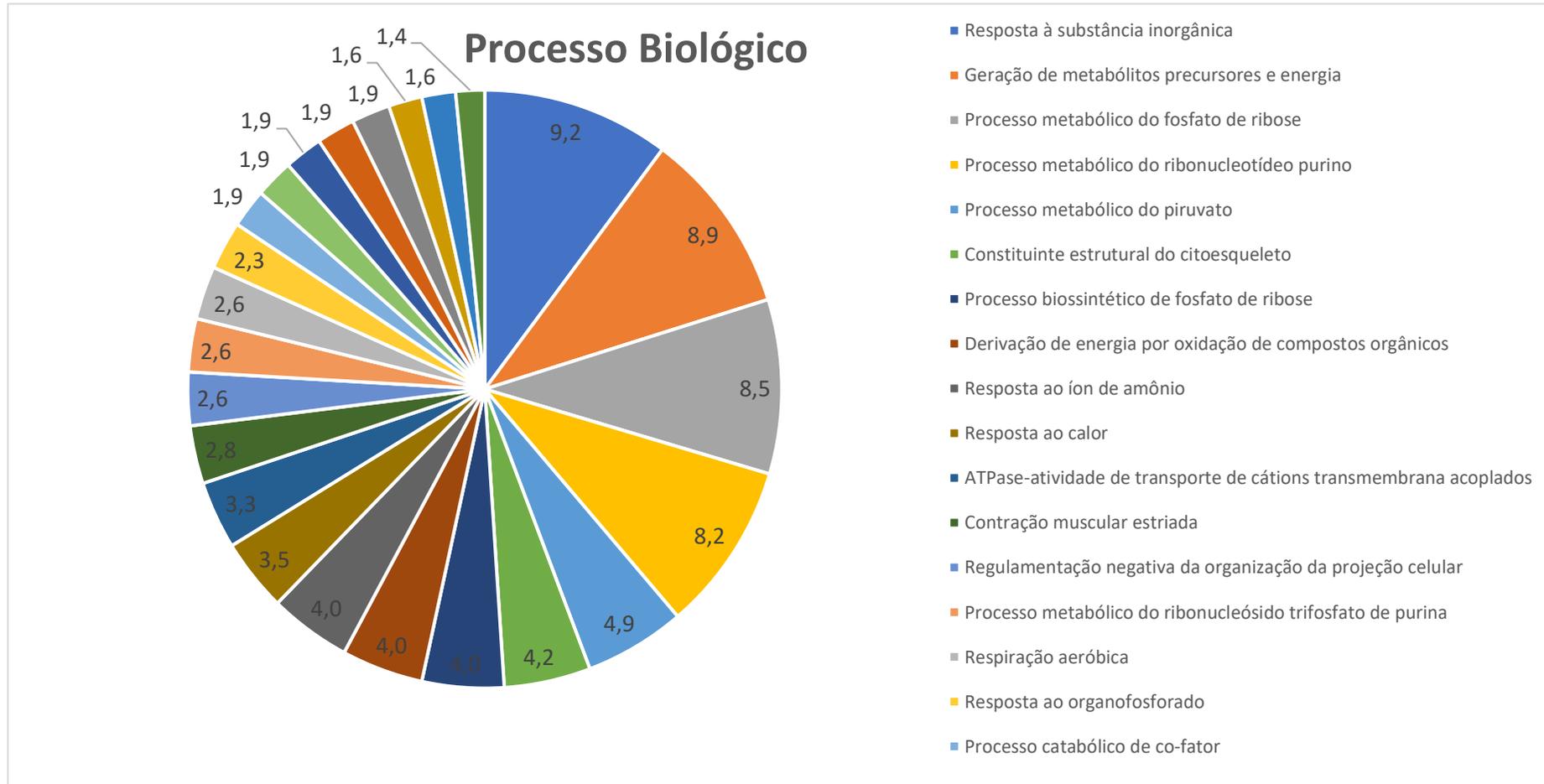


Fig. 5 Distribuição funcional das proteínas identificadas com expressão diferencial na medula espinhal de ratos expostos ao MeHg vs grupo de controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da Ontologia Genética do processo biológico. Termos significativos (Kappa Score = 0,4) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acesso às proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.1.

Além disso, as análises dos componentes celulares revelaram 22 componentes envolvidos. Os 5 principais envolvidos foram fibra supramolecular (20,1%), parte axonal (12,3%), jangada de membrana (12,3%), matriz mitocondrial (9,1%) e bainha de mielina (6,8%) (Figura 6).

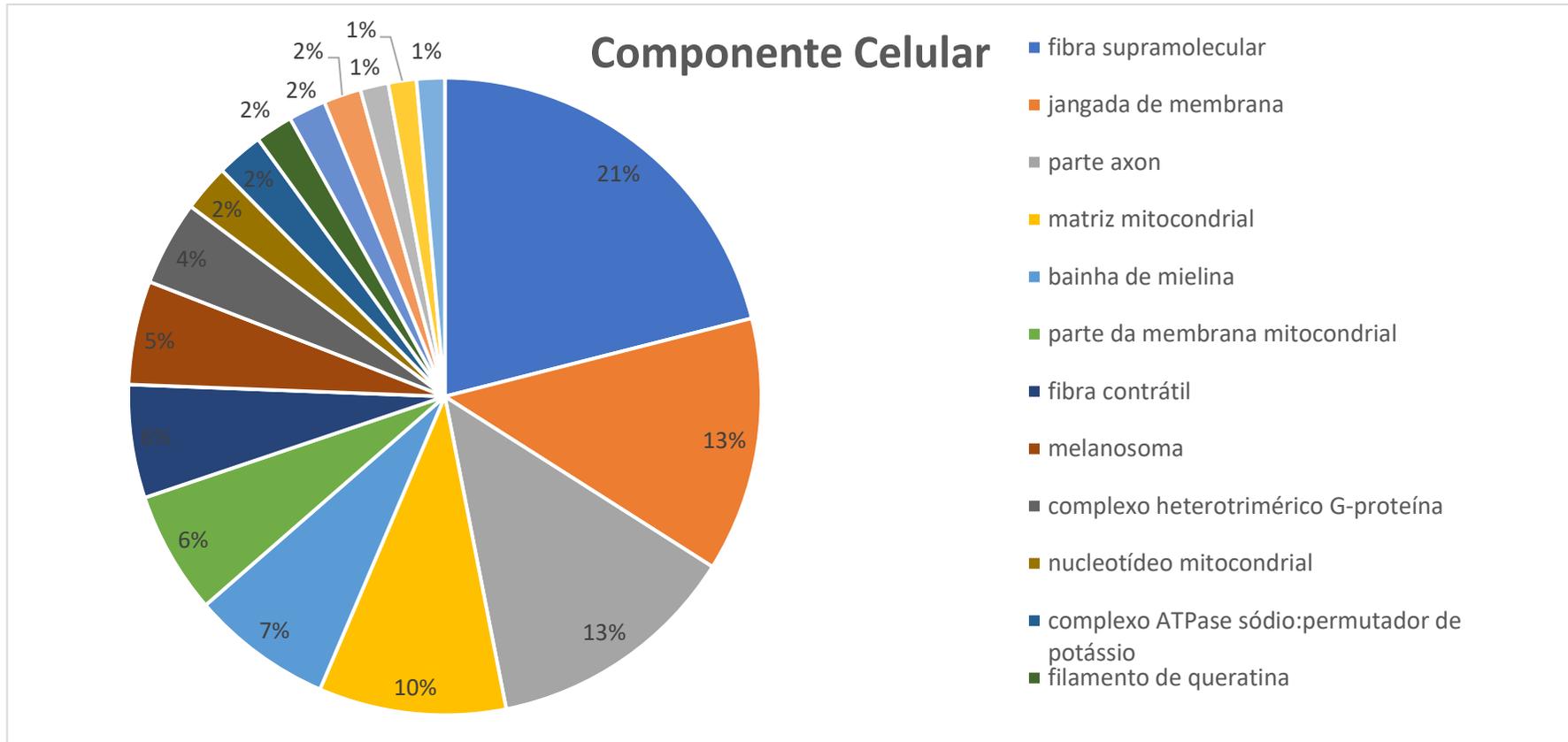


Fig. 6 Distribuição funcional das proteínas identificadas com expressão diferencial na medula espinhal de ratos expostos ao MeHg vs grupo de controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da Ontologia Genética de componentes celulares. Termos significativos (Kappa Score = 0,4) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acesso às proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.1.

As análises das funções moleculares pelas Ontologias Genéticas mostraram 24 funções alteradas na medula espinhal após a exposição prolongada ao MeHg, nas quais as principais foram a ligação do ribonucleósido purínico (22,1%), ligação da proteína ligase ubiquitina (10.7%), atividade do transportador de cátion transmembrana ATPase-acoplado (9,4%), atividade do transportador de prótons transmembrana (7,4%), ligação de NAD (6,7%), além da ligação do receptor de dopamina (3,4%) e atividade de superóxido dismutase (2,0%) (Figura 7).

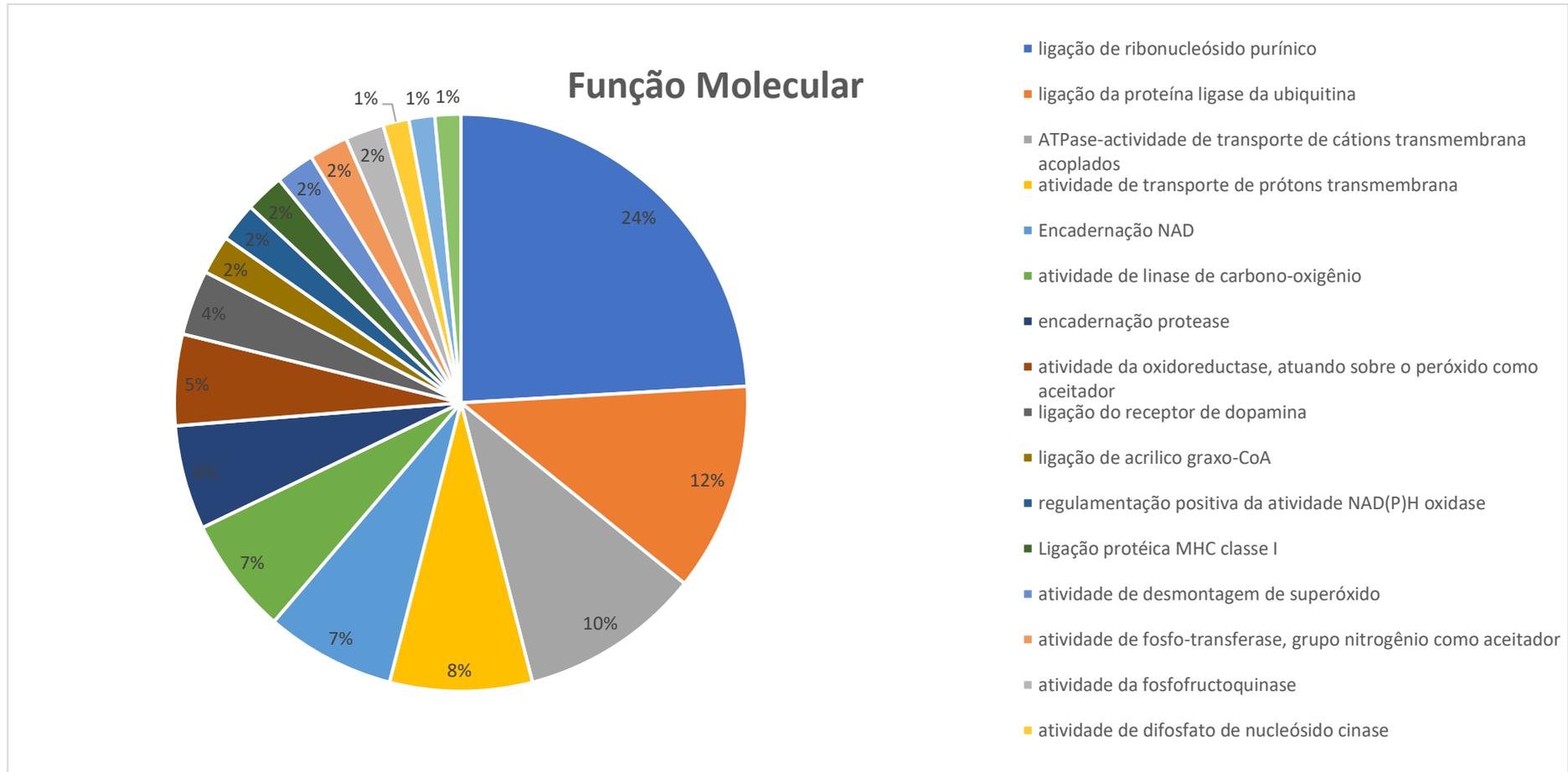


Fig.7 Distribuição funcional das proteínas identificadas com expressão diferencial na medula espinhal de ratos expostos ao MeHg vs grupo de controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da função molecular da Ontologia Genética. Termos significativos (Kappa Score = 0,4) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de genes. O número de acesso às proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plugin ClueGo® do software Cytoscape® 3.7.1

A análise ORA permitiu a observância de alguns processos alterados devido à exposição ao MeHg. No total de 62 proteínas foram encontradas como responsivas à apoptose (30 proteínas), atividade mitocondrial (15 proteínas), citoesqueleto (22 proteínas) e resposta ao estresse (41 proteínas). Dessas 62 proteínas, 16 foram subexpressas e 46 foram superexpressas no grupo exposto quando comparadas ao grupo controle (Figura 8).

Ao analisar o proteoma gerado, notamos mudanças em algumas proteínas essenciais ao desempenho orgânico do sistema, tais como Citocromo C (P20788), Superóxido dismutase (P07895), Heatshock HSP 70 1A (P0DMWO), Heatshock 70 (P55063), HSP 90 alfa (P82995), entre outras. Os processos analisados foram atividade mitocondrial, resposta ao estresse, citoesqueleto e apoptose.

3.5. Discussão

De acordo com a literatura, este é o primeiro estudo que investiga o perfil proteômico da medula espinhal de ratos expostos a baixas doses de MeHg em um modelo de longo prazo associado à modulação da bioquímica oxidativa. A triagem profunda do estado redox da medula espinhal mostrou que a baixa dose de MeHg e a exposição a longo prazo podem desencadear estresse oxidativo, aumentando os fatores pro-oxidantes e diminuindo a capacidade antioxidante, possivelmente associada com a modulação do proteoma. Esta investigação proteômica sem precedentes revelou alteração? de proteínas associadas ao metabolismo de energia, funções neurais, sinalização celular, morte celular e outras. Além disso, a análise bioinformática traz para a literatura, potenciais biomarcadores preditivos de danos morfológicos, atividade mitocondrial, resposta ao estresse e apoptose desencadeados pelo MeHg.

O protocolo de exposição proposto neste estudo, previamente estabelecido por Kong [20] e adaptado por nosso grupo de estudo [12, 14, 21, 24], demonstrou ser capaz de desencadear danos sistêmicos em ratos adultos, especialmente em regiões do SNC como córtex motor e hipocampo. Embora o consideremos como dose baixa, já demonstramos os efeitos prejudiciais desencadeados pela distribuição sistêmica e pelos níveis locais de Hg total. Esta baixa dose imita o consumo humano em áreas endêmicas de contaminação mercurial, especialmente quando consideramos a principal via de exposição: a dieta humana.

Sabe-se que a dieta baseada em peixe é uma importante fonte de intoxicação MeHg em áreas contaminadas. Desta forma, um estudo anterior [42] mostrou que a carne de peixe comercial em uma região endêmica da Amazônia poderia apresentar uma concentração média de MeHg de 3,2µg/g e, do total de mercúrio, até 93% correspondiam ao MeHg em algumas espécies. Então, considerando que os peixes e frutos do mar podem representar a principal dieta desses ribeirinhos e pessoas urbanas, reflete uma séria preocupação com a saúde pública devido ao consumo diário. Desta forma, uma abordagem destinada a investigar, numa perspectiva translacional, os possíveis efeitos sobre o SNC é necessária. Aqui, apontamos que aproximadamente 0,02µg/g de Hg estava presente no parênquima espinhal da medula espinhal de ratos adultos após 60 dias de exposição. Então, nossos resultados mostram que o modelo de exposição foi capaz de entregar Hg através da barreira cerebral do sangue e aumenta seus níveis, o que também foi observado no hipocampo e no córtex motor [12, 14, 24].

Muitas pesquisas que tratam do tema da neurotoxicidade geralmente usam componentes do SNC, como o cerebelo e o hipocampo, elucidando assim vários mecanismos de aprendizagem e memória, além das funções motoras que podem ser alteradas devido à exposição ao MeHg [9, 11]. Surpreendentemente, mesmo diante de vários estudos que investigam o sistema nervoso central, pouco se sabe acerca dos efeitos sobre a medula espinhal. Os poucos estudos existentes revelaram alterações morfológicas, apresentando mitocôndrias com

ruptura, inchaço ou vacuolização, provando que essas organelas podem ser alvos da toxicidade deste metal, pois a ação oxidativa causada pela toxicidade deste metal causa danos à estrutura destas mitocôndrias e compromete a função essencial das proteínas, assim como o aumento das ROS [37]. A literatura descreve que a exposição altera o desenvolvimento da medula espinhal ao perturbar a proliferação celular e ocasionar a morte, interferindo também na diferenciação neuronal precoce [38], causando uma diminuição nos corpúsculos de Nissl [17], substância presente nas células do tecido nervoso, culminando na parestesia associada à degeneração neuronal [18].

O SNC requer uma enorme demanda de oxigênio para desempenhar todas as funções celulares e para suprir o alto metabolismo [43]. Desta forma, as estruturas do SNC são suscetíveis à superprodução de radicais livres, daí o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) [44, 45] capazes de desencadear o estresse oxidativo. Este evento celular é devido ao aumento de agentes pró-oxidantes em detrimento da capacidade antioxidante, jogado por fatores enzimáticos e não enzimáticos [46]. Em nosso estudo, realizamos uma abordagem bioquímica oxidativa profunda com o objetivo de triagem do equilíbrio redox da medula espinhal após a exposição ao MeHg.

Com o aumento do nível de Hg no tecido da medula espinhal, houve uma modulação do equilíbrio redox, tendo como produto ROS e causando estresse oxidativo. Podemos destacar a redução dos parâmetros antioxidantes como TEAC, GSH e ACAP.

O TEAC é baseado na inibição antioxidante do cation radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal diamônio) (C₁₈H₂₄N₆O₆ S₄, M.M. 548,7 g/mol, ABTS+) e é a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, ou seja, fornece uma estimativa da quantidade de moléculas radicais consumidas pelo antioxidante. GSH é uma das enzimas antioxidantes endógenas do organismo e sua principal função é defendê-lo do estresse oxidativo [47]. Ele atua na remoção de ROS/RNS de duas formas, doando os radicais do grupo thiol ou hidrogênio através de elétrons aos radicais livres, conduzindo assim o processo de reparação oxidativa ou pela reação do thiolato com eletrofilos, levando à reciclagem de outros antioxidantes. O GSH é sintetizado no citoplasma e através dos poros extracelulares é transportado para as mitocôndrias (Mari et al. 2009). A capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (ACAP) foi reduzida no grupo exposto. Este parâmetro é importante para a manutenção da homeostase, e uma redução está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e ao funcionamento inadequado das enzimas e das vias metabólicas [22].

Além do aumento dos níveis de nitrito e LPO, houve também uma redução na relação TEAC/MDA, confirmando que a exposição ao MeHg desencadeou estresse oxidativo na medula espinhal. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que os principais danos são causados por altos níveis de LPO, um mecanismo que ocorre pela oxidação das membranas celulares, causando o aparecimento de marcadores característicos do estresse oxidativo [48]. Como dito anteriormente, o sangue não é a única forma de transportar o Hg para o

SNC, por isso acredita-se que os altos níveis ocorrem através da soma do Hg proveniente da corrente sanguínea e do Hg proveniente dos terminais axonais [49, 50], embora a medula espinhal não seja um órgão muito vascularizado, o que indica claramente os efeitos tóxicos que este metal pode causar uma vez que atinge o SNC.

As ROS parecem estar relacionadas à oxidação do DNA que leva à morte celular ou lesão tecidual no SNC e periférico [51, 52]. Assim, o estresse oxidativo causado pela exposição ao MeHg provavelmente age sobre as vias clássicas que provocam a apoptose através de uma cadeia oxidativa mitocondrial [53], resultante de um aumento do influxo intracelular de Ca^{2+} [54] ou da ativação de várias vias de morte celular [55]. Portanto, as hipóteses de toxicidade do MeHg são baseadas na ruptura da cadeia respiratória mitocondrial, causando um aumento nos níveis de peróxido seguido por alterações no processo de proliferação celular e morte celular programada [56].

Entretanto, devemos também levar em conta o altíssimo nível de lipídios presentes na composição da bainha da mielina, de modo que esta região seria o primeiro contato com o metal que atravessaria facilmente a barreira hematoencefálica, podendo até agravar os danos que estão relacionados à condução dos estímulos nervosos e da comunicação neuronal [16]. Um aumento nos níveis de nitritos também foi observado em nosso estudo. Sabemos que o nitrito é um subproduto do metabolismo do óxido nítrico e que esta molécula participa de vários processos fisiológicos normais, tais como nocicepção, neurotransmissão em condições normais [57]. Outro parâmetro alterado foram os níveis de MDA, que também é conhecido como uma indicação de LPO, e que foram elevados no grupo exposto. Vale mencionar que a medula espinhal possui altos níveis de ácidos graxos polinsaturados, o que dá a este tecido uma alta suscetibilidade a danos oxidativos por processos de peroxidação lipídica [58]. A LPO é um marcador de dano oxidativo, pois a oxidação das membranas lipídicas celulares pode levar à morte celular [59].

Os principais ROS e RNS, tais como superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO^-), hidroxil (OH^-), peroxinitrito (ONOO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxil (ROO^-) e alcóxil (RO radical $-$) são gerados por algum desequilíbrio no corpo. Em condições normais, existe um equilíbrio entre parâmetros antioxidantes e oxidantes, nos quais os sistemas antioxidantes, enzimáticos ou não, são encarregados de manter esta estabilidade. Entretanto, quando ocorre um aumento em ROS ou RNS, estas moléculas podem afetar outros componentes celulares iniciais, como DNA, RNA e proteínas [60]. As EROs geradas como produto de estresse oxidativo podem promover alterações e danos a níveis metabólicos, transcriptômicos e proteômicos, pois apresentam um poder de reação extremamente elevado com várias macromoléculas [45].

Devido à exposição mercurial, a via de estresse oxidativo foi ativada desencadeando a modulação proteômica [45]. A literatura descreve que o estresse é capaz de modular o proteoma para promover o restabelecimento do sistema orgânico [61], uma vez que as proteínas estão relacionadas em quase todos os aspectos conhecidos da função biológica. Cada proteína tem um papel

importante na manutenção do sistema, a modulação da proteína saudável começa desde a formação de um polipéptido até a morte coordenada da proteína madura por degradação, cada fase deste processo é cuidadosamente orquestrada [62, 63], qualquer falha neste caminho pode gerar o acúmulo de proteínas tóxicas desdobradas [64, 65].

De acordo com a Gene Ontology, cerca de 25 grupos de processos biológicos foram afetados pela exposição ao mercúrio. Destes 25, podemos citar os cinco primeiros grupos mais afetados, resposta a uma substância inorgânica (9,2%), ou seja, este grupo está relacionado a uma mudança no estado/atividade de uma célula (em termos de movimento, secreção, produção enzimática, expressão gênica, etc.) como resultado de um estímulo de uma substância inorgânica, assim podemos ver que houve uma mudança na atividade celular devido à exposição a mercurial. O segundo mais afetado foi a geração de metabólitos e precursores de energia (8,9%), que são reações e vias químicas que resultam na formação de metabólitos precursores, substâncias das quais se deriva energia e qualquer processo envolvido na liberação de energia destas substâncias [66]. Depois disso, o processo metabólico do fosfato de ribose (8,5%), são reações químicas e vias envolvendo o fosfato de ribose, qualquer açúcar fosforilato de ribose [67]. Finalmente, o processo metabólico de ribonucleotídeos puros (8,2%), reações químicas que estão relacionadas a um ribonucleotídeo, ou seja, um nucleósido no qual a base purina está ligada a uma ribose [68].

Do ponto de vista do componente celular, obtivemos 22 grupos afetados. O mais afetado foi a fibra supermolecular (20,1%), que é um polímero composto de subunidades ou complexos protéicos que visam formar fibras celulares [69]. Em segundo lugar, temos a jangada de membrana (12,3%), que são pequenos domínios da membrana plasmática rica em esteróis e esfingolipídios [70]. Depois disso vem a parte axonal (12,3%) que é a parte de um axônio, projeção de um neurônio [71]. A matriz mitocondrial (9,1%) também foi alterada, esta matriz é de grande importância porque contém um grande número de enzimas que atuam na respiração celular [72]. Finalmente, o quinto grupo mais afetado do componente biológico foi a bainha de mielina, que é uma camada isolante que se forma ao redor dos nervos, especialmente os do cérebro e da medula espinhal, com o objetivo de permitir a rápida e eficaz transmissão dos impulsos nervosos e elétricos ao longo das células nervosas [73].

Finalmente, 23 grupos foram alterados na função molecular. Entre os mais afetados, podemos citar a ligação de ribonucleósido purino (22,1%) que participa dos processos de diferenciação celular [74]. Depois encontramos alteração na ligação da proteína ligase da ubiquitina (10,7%), a ubiquitina desempenha um papel importante na regulação da proteína a nível celular [75]. ATPase-atividade transmembrana de catião acoplado que permite a transferência de um soluto ou soluto de um lado de uma membrana para o outro de acordo com a reação: $ATP + H_2O + \text{cátion (exterior)} = ADP + \text{fosfato} + \text{cátion(interior)}$ também foi encontrado alterado [76].

Em vista deste desequilíbrio redox, várias proteínas podem ser recrutadas para restabelecer o estado de homeostasia ou sinalizar outros processos biológicos. A literatura tem apontado que as Proteínas de Choque de Calor (HSP) podem desempenhar um papel na proteção do proteoma celular contra insultos de estresse oxidativo e processos apoptóticos [77] e nossa análise proteômica mostrou uma modulação proteômica de HSP 70 1A (P0DMW0) e 1B subunidades (P0DMW1) em animais expostos; HSP 90 alfa (P82995) e subunidades beta (P34058), apresentando uma modulação proteômica após danos por estresse oxidativo.

A abordagem proteômica também revelou a expressão exclusiva da superóxido dismutase (SOD, P07895) no grupo exposto, sugerindo um aumento da demanda de ROS, como ânions superóxidos e outros compostos que podem oxidar DNA e proteínas, gerando espécies reativas de nitrogênio (RNS) como óxido nítrico [78]; Associada à resposta ao estresse, a peroxiredoxina 6 (O35244) foi encontrada única no grupo MeHg, pois as subunidades 1 (Q63716), 2 (P35704) e 5 (Q9R063) foram reguladas em alta.

A tensão oxidativa pode prejudicar a membrana mitocondrial, o DNA e as proteínas, levando a danos sobre a cadeia de elétrons e a uma maior interrupção da síntese de ATP [79, 80]. Desta forma, o perfil proteômico da medula espinhal dos ratos expostos ao MeHg mostrou a upregulação da subunidade alfa ATP-sintase (P15999) e beta (P10719), e a expressão exclusiva ATP-citrate synthase (P16638) no grupo tratado com MeHg. Além disso, foi observada a modulação do citocromo C Oxidase subunidade 2 (P00406, up-regulated), 5A (P11240, up-regulated) e 4 (P10888, único no grupo exposto), componente de acetiltransferase dihidroliproliprolisina residual do complexo piruvato desidrogenase (P08461, único no grupo exposto), sugerindo um comprometimento mitocondrial na medula espinhal que pode levar a uma falha energética [78].

Entre os proteomas analisados, verificamos as proteínas que apresentaram as maiores conexões protéicas em uma perspectiva de rede PPI. Com isso, podemos destacar algumas dessas proteínas que estão organizadas em categorias de maior relevância biológica dentro do que foi observado na análise de ORA.

Assim, entre as proteínas alteradas, podemos destacar a Peroxiredoxina-6 (O35244), que atua na redução de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos em água e álcoois [81], e a Superóxido dismutase [Mn] mitocondrial (P07895), que atua na eliminação dos radicais O_2^- dentro das mitocôndrias [82]. Estes foram subexpressos no grupo MeHg em comparação com o controle e estas mudanças mostram uma redução na capacidade antioxidante celular que favorece a ocorrência de estresse oxidativo, o que está de acordo com os resultados de nossas análises bioquímicas. Além disso, as proteínas HSP (P0DMW0, P55063, P82995) foram superexpressas, indicando uma possível resposta celular ao aumento das ROS. Estas proteínas estão associadas a mudanças na atividade mitocondrial, resposta ao estresse e processos apoptóticos [83].

Além destas, a proteína citocromo c oxidase (P10888) pode ser destacada devido ao seu papel no processo de redução do oxigênio na água nas mitocôndrias [84]. Esta proteína demonstrou estar sob expressão levando ao processo de estresse oxidativo.

Todo este desequilíbrio redox pode culminar em mudanças em outras estruturas celulares, como as associadas ao citoesqueleto [85]. A partir disto, identificamos algumas proteínas alteradas, tais como Actin (P68136), Tubulin beta-2A chain (P85108), e Tubulin alfa-8 chain (Q6AY56) que foram superexpressas no grupo MeHg.

O estresse oxidativo é considerado um dos principais desencadeadores da toxicidade do Hg, especialmente no sistema nervoso [52]. Em vista disto, devemos analisar esta superprodução de EROs a partir da perspectiva de dois caminhos: o desequilíbrio do metabolismo energético e a oxidação das macromoléculas [44].

Portanto,

3.6. Conclusão

O perfil proteômico analisado através da exposição ao MeHg neste estudo nos permitiu ver o que está subjacente aos efeitos do estresse oxidativo sobre a medula espinhal. Nossos resultados mostraram que a medula espinhal também é um órgão alvo para a deposição do MeHg, em baixas doses e exposição por longos períodos, o que pode desencadear desequilíbrios na bioquímica oxidativa e, conseqüentemente, na modulação do perfil proteômico em nível espinhal. Nosso estudo sugere que as proteínas encontradas devem ser melhor investigadas para encontrar um possível biomarcador de danos na medula espinhal ou mesmo possíveis biomarcadores de danos precoces.

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse.

Declaração de financiamento

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Código de Financiamento 001. O financiador não esteve envolvido na concepção do estudo, coleta de dados, análise e interpretação dos dados e na redação do manuscrito.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPA (PROPEP, UFPA, Brasil).

Referências

1. Harding, G., J. Dalziel and P. Vass. "Bioaccumulation of methylmercury within the marine food web of the outer bay of fundy, gulf of maine." *PLoS One* 13 (2018): e0197220. 10.1371/journal.pone.0197220.
2. Sheehan, M. C., T. A. Burke, A. Navas-Acien, P. N. Breyse, J. McGready and M. A. Fox. "Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: A systematic review." *Bull World Health Organ* 92 (2014): 254-69f. 10.2471/blt.12.116152.
3. Nriagu, J. O. J. N. "A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals." 338 (1989): 47-49.
4. Schroeder, W. H. and J. J. A. e. Munthe. "Atmospheric mercury—an overview." 32 (1998): 809-22.
5. Hsu-Kim, H., K. H. Kucharzyk, T. Zhang and M. A. Deshusses. "Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: A critical review." *Environ Sci Technol* 47 (2013): 2441-56. 10.1021/es304370g.
6. Bradl, H. *Heavy metals in the environment: Origin, interaction and remediation*. Elsevier, 2005,
7. Lindberg, S., R. Bullock, R. Ebinghaus, D. Engstrom, X. Feng, W. Fitzgerald, N. Pirrone, E. Prestbo and C. Seigneur. "A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition." *Ambio* 36 (2007): 19-32. 10.1579/0044-7447(2007)36[19:asopau]2.0.co;2.
8. Puty, B., C. Maximino, A. Brasil, W. L. da Silva, A. Gouveia, Jr., K. R. Oliveira, J. Batista Ede, M. E. Crespo-Lopez, F. A. Rocha and A. M. Herculano. "Ascorbic acid protects against angiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: Action on the serotonergic system." *Zebrafish* 11 (2014): 365-70. 10.1089/zeb.2013.0947.
9. Crespo-López, M. E., A. M. Herculano, T. C. Corvelo and J. L. Do Nascimento. "[mercury and neurotoxicity]." *Rev Neurol* 40 (2005): 441-7. Mercurio y neurotoxicidad.
10. Farina, M., J. B. Rocha and M. Aschner. "Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies." *Life Sci* 89 (2011): 555-63. 10.1016/j.lfs.2011.05.019.
11. Crespo-López, M. E., A. Lima de Sá, A. M. Herculano, R. Rodríguez Burbano and J. L. Martins do Nascimento. "Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system." *Environ Int* 33 (2007): 141-6. 10.1016/j.envint.2006.08.005.
12. Santana, L., L. O. Bittencourt, P. C. Nascimento, R. M. Fernandes, F. B. Teixeira, L. M. P. Fernandes, M. C. Freitas Silva, L. S. Nogueira, L. L. Amado, M. E. Crespo-Lopez, *et al.* "Low doses of methylmercury exposure during adulthood in rats display oxidative stress, neurodegeneration in the motor cortex and lead to impairment of motor skills." *J Trace Elem Med Biol* 51 (2019): 19-27. 10.1016/j.jtemb.2018.09.004.
13. Heimfarth, L., J. Delgado, M. R. Mingori, K. S. Moresco, R. P. Pureur, D. P. Gelain and J. C. F. Moreira. "Delayed neurochemical effects of prenatal exposure to mehg in the cerebellum of developing rats." *Toxicol Lett* 284 (2018): 161-69. 10.1016/j.toxlet.2017.12.006.
14. Bittencourt, L. O., A. Dionizio, P. C. Nascimento, B. Puty, L. K. R. Leão, D. A. Luz, M. C. F. Silva, L. L. Amado, A. Leite, M. R. Buzalaf, *et al.* "Proteomic approach underlying the hippocampal neurodegeneration caused by low doses of methylmercury after long-term exposure in adult rats." *Metallomics* 11 (2019): 390-403. 10.1039/c8mt00297e.

15. Cho, T. A. "Spinal cord functional anatomy." *Continuum (Minneapolis)* 21 (2015): 13-35. 10.1212/01.CON.0000461082.25876.4a.
16. Bican, O., A. Minagar and A. A. Pruitt. "The spinal cord: A review of functional neuroanatomy." *Neurol Clin* 31 (2013): 1-18. 10.1016/j.ncl.2012.09.009.
17. Su, M., K. Wakabayashi, A. Kakita, F. Ikuta and H. Takahashi. "Selective involvement of large motor neurons in the spinal cord of rats treated with methylmercury." *J Neurol Sci* 156 (1998): 12-7. 10.1016/s0022-510x(98)00030-6.
18. Colón-Rodríguez, A., H. E. Hannon and W. D. Atchison. "Effects of methylmercury on spinal cord afferents and efferents-a review." *Neurotoxicology* 60 (2017): 308-20. 10.1016/j.neuro.2016.12.007.
19. Sceniak, M. P., J. B. Spitsbergen, S. L. Sabo, Y. Yuan and W. D. Atchison. "Acute neurotoxicant exposure induces hyperexcitability in mouse lumbar spinal motor neurons." *J Neurophysiol* 123 (2020): 1448-59. 10.1152/jn.00775.2019.
20. Kong, H. K., M. H. Wong, H. M. Chan and S. C. Lo. "Chronic exposure of adult rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex." *J Proteome Res* 12 (2013): 5233-45. 10.1021/pr400356v.
21. Bittencourt, L. O., B. Puty, S. Charone, W. A. B. Aragão, P. M. Farias-Junior, M. C. F. Silva, M. E. Crespo-Lopez, A. L. Leite, M. A. R. Buzalaf and R. R. Lima. "Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to methylmercury." *Oxid Med Cell Longev* 2017 (2017): 5653291. 10.1155/2017/5653291.
22. Aragão, W. A. B., F. B. Teixeira, N. C. F. Fagundes, R. M. Fernandes, L. M. P. Fernandes, M. C. F. da Silva, L. L. Amado, F. E. S. Sagica, E. H. C. Oliveira, M. E. Crespo-Lopez, *et al.* "Hippocampal dysfunction provoked by mercury chloride exposure: Evaluation of cognitive impairment, oxidative stress, tissue injury and nature of cell death." *Oxid Med Cell Longev* 2018 (2018): 7878050. 10.1155/2018/7878050.
23. Teixeira, F. B., R. M. Fernandes, P. M. Farias-Junior, N. M. Costa, L. M. Fernandes, L. N. Santana, A. F. Silva-Junior, M. C. Silva, C. S. Maia and R. R. Lima. "Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats." *Int J Environ Res Public Health* 11 (2014): 9171-85. 10.3390/ijerph110909171.
24. Freire, M. A. M., L. N. S. Santana, L. O. Bittencourt, P. C. Nascimento, R. M. Fernandes, L. K. R. Leão, L. M. P. Fernandes, M. C. F. Silva, L. L. Amado, W. Gomes-Leal, *et al.* "Methylmercury intoxication and cortical ischemia: Pre-clinical study of their comorbidity." *Ecotoxicol Environ Saf* 174 (2019): 557-65. 10.1016/j.ecoenv.2019.03.009.
25. Amado, L. L., M. L. Garcia, P. B. Ramos, R. F. Freitas, B. Zafalon, J. L. Ferreira, J. S. Yunes and J. M. Monserrat. "A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity." *Sci Total Environ* 407 (2009): 2115-23. 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038.
26. Teixeira, F. B., A. C. A. de Oliveira, L. K. R. Leão, N. C. F. Fagundes, R. M. Fernandes, L. M. P. Fernandes, M. C. F. da Silva, L. L. Amado, F. E. S. Sagica, E. H. C. de Oliveira, *et al.* "Exposure to inorganic mercury causes oxidative stress, cell death, and functional deficits in the motor cortex." *Front Mol Neurosci* 11 (2018): 125. 10.3389/fnmol.2018.00125.
27. Rufino, M., R. Alves and E. Brito *et al.* "Determination of the total antioxidant activity in fruits by the capture of free radical DPPH." *J Press Release Embrapa* 127 (2007): 1-4.
28. Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner. "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin Sci (Lond)* 84 (1993): 407-12. 10.1042/cs0840407.
29. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radic Biol Med* 26 (1999): 1231-7. 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
30. Ellman, G. L. "Tissue sulfhydryl groups." *Arch Biochem Biophys* 82 (1959): 70-7. 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

31. Souza-Monteiro, J. R., M. Hamoy, D. Santana-Coelho, G. P. Arrifano, R. S. Paraense, A. Costa-Malaquias, J. R. Mendonça, R. F. da Silva, W. S. Monteiro, H. Rogez, *et al.* "Anticonvulsant properties of euterpe oleracea in mice." *Neurochem Int* 90 (2015): 20-7. 10.1016/j.neuint.2015.06.014.
32. Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72 (1976): 248-54. 10.1006/abio.1976.9999.
33. Green, L. C., S. R. Tannenbaum and P. Goldman. "Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat." *Science* 212 (1981): 56-8. 10.1126/science.6451927.
34. Dionizio, A. S., C. G. S. Melo, I. T. Sabino-Arias, T. M. S. Ventura, A. L. Leite, S. R. G. Souza, E. X. Santos, A. D. Heubel, J. G. Souza, J. Perles, *et al.* "Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: Insights from proteomics and enteric innervation analysis." *Sci Rep* 8 (2018): 3180. 10.1038/s41598-018-21533-4.
35. Corrêa, M. G., L. O. Bittencourt, P. C. Nascimento, R. O. Ferreira, W. A. B. Aragão, M. C. F. Silva, W. Gomes-Leal, M. S. Fernandes, A. Dionizio, M. R. Buzalaf, *et al.* "Spinal cord neurodegeneration after inorganic mercury long-term exposure in adult rats: Ultrastructural, proteomic and biochemical damages associated with reduced neuronal density." *Ecotoxicol Environ Saf* 191 (2020): 110159. 10.1016/j.ecoenv.2019.110159.
36. Lima Leite, A., J. Gualium Vaz Madureira Lobo, H. A. Barbosa da Silva Pereira, M. Silva Fernandes, T. Martini, F. Zucki, D. H. Sumida, A. Rigalli and M. A. Buzalaf. "Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride." *PLoS One* 9 (2014): e106646. 10.1371/journal.pone.0106646.
37. Bindea, G., B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W.-H. Fridman, F. Pagès, Z. Trajanoski and J. J. B. Galan. "Cluego: A cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks." 25 (2009): 1091-93.
38. Team, R. C. R. *A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria, 2013,
39. Alhamdoosh, M., M. Ng, N. J. Wilson, J. M. Sheridan, H. Huynh, M. J. Wilson and M. E. Ritchie. "Combining multiple tools outperforms individual methods in gene set enrichment analyses." *Bioinformatics* 33 (2017): 414-24. 10.1093/bioinformatics/btw623.
40. Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker. "Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* 13 (2003): 2498-504. 10.1101/gr.1239303.
41. Xia, J., M. J. Benner and R. E. Hancock. "Networkanalyst--integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration." *Nucleic Acids Res* 42 (2014): W167-74. 10.1093/nar/gku443.
42. Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., J. J. Berzas Nevado, F. J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, G. P. Arrifano, A. M. Herculano, J. L. do Nascimento and M. E. Crespo-López. "Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the brazilian amazon." *Environ Sci Pollut Res Int* 21 (2014): 7466-79. 10.1007/s11356-014-2680-7.
43. Angelova, P. R., V. Kasymov, I. Christie, S. Sheikhabaehi, E. Turovsky, N. Marina, A. Korsak, J. Zwicker, A. G. Teschemacher, G. L. Ackland, *et al.* "Functional oxygen sensitivity of astrocytes." *J Neurosci* 35 (2015): 10460-73. 10.1523/jneurosci.0045-15.2015.
44. Islam, M. T. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders." *Neurol Res* 39 (2017): 73-82. 10.1080/01616412.2016.1251711.
45. Reichmann, D., W. Voth and U. Jakob. "Maintaining a healthy proteome during oxidative stress." *Mol Cell* 69 (2018): 203-13. 10.1016/j.molcel.2017.12.021.

46. Gandhi, S. and A. Y. Abramov. "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration." *Oxid Med Cell Longev* 2012 (2012): 428010. 10.1155/2012/428010.
47. Murphy, M. P. "Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: Distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications." *Antioxid Redox Signal* 16 (2012): 476-95. 10.1089/ars.2011.4289.
48. Teixeira, F. B., L. N. Santana, F. R. Bezerra, S. De Carvalho, E. A. Fontes-Júnior, R. D. Prediger, M. E. Crespo-López, C. S. Maia and R. R. Lima. "Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress." *PLoS One* 9 (2014): e101074. 10.1371/journal.pone.0101074.
49. Arvidson, B. "A review of axonal transport of metals." *Toxicology* 88 (1994): 1-14. 10.1016/0300-483x(94)90107-4.
50. Pamphlett, R. and P. Waley. "Motor neuron uptake of low dose inorganic mercury." *J Neurol Sci* 135 (1996): 63-7. 10.1016/0022-510x(95)00258-4.
51. Huang, H., H. Rong, X. Li, S. Tong, Z. Zhu, L. Niu and M. Teng. "The crystal structure and identification of nqm1/ygr043c, a transaldolase from *saccharomyces cerevisiae*." *Proteins* 73 (2008): 1076-81. 10.1002/prot.22237.
52. Crespo-López, M. E., G. L. Macêdo, S. I. Pereira, G. P. Arrifano, D. L. Picanço-Diniz, J. L. do Nascimento and A. M. Herculano. "Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms." *Pharmacol Res* 60 (2009): 212-20. 10.1016/j.phrs.2009.02.011.
53. Kaur, N., M. Dhiman, J. R. Perez-Polo and A. K. Mantha. "Ginkgolide b revamps neuroprotective role of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and mitochondrial oxidative phosphorylation against β 25-35 -induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells." *J Neurosci Res* 93 (2015): 938-47. 10.1002/jnr.23565.
54. Chan, H., D. P. Bartos and L. B. Owen-Schaub. "Activation-dependent transcriptional regulation of the human fas promoter requires nf-kappab p50-p65 recruitment." *Mol Cell Biol* 19 (1999): 2098-108. 10.1128/mcb.19.3.2098.
55. Ceccatelli, S., E. Daré and M. Moors. "Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis." *Chem Biol Interact* 188 (2010): 301-8. 10.1016/j.cbi.2010.04.007.
56. Sava, G., A. Bergamo and P. J. Dyson. "Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: What comes next?" *Dalton Trans* 40 (2011): 9069-75. 10.1039/c1dt10522a.
57. Dreiem, A., C. C. Gertz and R. F. Seegal. "The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent." *Toxicol Sci* 87 (2005): 156-62. 10.1093/toxsci/kfi224.
58. Hall, E. D., J. A. Wang, J. M. Bosken and I. N. Singh. "Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury." *J Bioenerg Biomembr* 48 (2016): 169-74. 10.1007/s10863-015-9600-5.
59. Gaschler, M. M. and B. R. Stockwell. "Lipid peroxidation in cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 482 (2017): 419-25. 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
60. Oparka, M., J. Walczak, D. Malinska, L. van Oppen, J. Szczepanowska, W. J. H. Koopman and M. R. Wieckowski. "Quantifying ros levels using cm-h(2)dcfda and hyper." *Methods* 109 (2016): 3-11. 10.1016/j.ymeth.2016.06.008.
61. Balchin, D., M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl. "In vivo aspects of protein folding and quality control." *Science* 353 (2016): aac4354. 10.1126/science.aac4354.
62. Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl. "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* 475 (2011): 324-32. 10.1038/nature10317.
63. Taipale, M., G. Tucker, J. Peng, I. Krykbaeva, Z. Y. Lin, B. Larsen, H. Choi, B. Berger, A. C. Gingras and S. Lindquist. "A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways." *Cell* 158 (2014): 434-48. 10.1016/j.cell.2014.05.039.
64. Brehme, M., C. Voisine, T. Rolland, S. Wachi, J. H. Soper, Y. Zhu, K. Orton, A. Vilella, D. Garza, M. Vidal, *et al.* "A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in

- aging and neurodegenerative disease." *Cell Rep* 9 (2014): 1135-50. 10.1016/j.celrep.2014.09.042.
65. Kaushik, S. and A. M. Cuervo. "Proteostasis and aging." *Nat Med* 21 (2015): 1406-15. 10.1038/nm.4001.
 66. Spinelli, J. B. and M. C. Haigis. "The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism." *Nat Cell Biol* 20 (2018): 745-54. 10.1038/s41556-018-0124-1.
 67. Stincone, A., A. Prigione, T. Cramer, M. M. Wamelink, K. Campbell, E. Cheung, V. Olin-Sandoval, N. M. Grüning, A. Krüger, M. Tauqeer Alam, *et al.* "The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway." *Biol Rev Camb Philos Soc* 90 (2015): 927-63. 10.1111/brv.12140.
 68. Williams, J. S., S. A. Lujan and T. A. Kunkel. "Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication." *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (2016): 350-63. 10.1038/nrm.2016.37.
 69. Fernández-Castaño Romera, M., X. Lou, J. Schill, G. Ter Huurne, P. K. H. Fransen, I. K. Voets, C. Storm and R. P. Sijbesma. "Strain-stiffening in dynamic supramolecular fiber networks." *J Am Chem Soc* 140 (2018): 17547-55. 10.1021/jacs.8b09289.
 70. Sonnino, S. and A. Prinetti. "Membrane domains and the "lipid raft" concept." *Curr Med Chem* 20 (2013): 4-21.
 71. Geden, M. J. and M. Deshmukh. "Axon degeneration: Context defines distinct pathways." *Curr Opin Neurobiol* 39 (2016): 108-15. 10.1016/j.conb.2016.05.002.
 72. Sousa, J. S., E. D'Imprima and J. Vonck. "Mitochondrial respiratory chain complexes." *Subcell Biochem* 87 (2018): 167-227. 10.1007/978-981-10-7757-9_7.
 73. Liu, B., W. Xin, J. R. Tan, R. P. Zhu, T. Li, D. Wang, S. S. Kan, D. K. Xiong, H. H. Li, M. M. Zhang, *et al.* "Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (2019): 22347-52. 10.1073/pnas.1910292116.
 74. Sekelova, Z., O. Polansky, H. Stepanova, R. Fedr, M. Faldynova, I. Rychlik and L. Vlasatikova. "Different roles of cd4, cd8 and $\gamma\delta$ t-lymphocytes in naive and vaccinated chickens during salmonella enteritidis infection." *Proteomics* 17 (2017): 10.1002/pmic.201700073.
 75. Watson, E. R., N. G. Brown, J. M. Peters, H. Stark and B. A. Schulman. "Posing the apc/c e3 ubiquitin ligase to orchestrate cell division." *Trends Cell Biol* 29 (2019): 117-34. 10.1016/j.tcb.2018.09.007.
 76. Gourdon, P., X. Y. Liu, T. Skjørringe, J. P. Morth, L. B. Møller, B. P. Pedersen and P. Nissen. "Crystal structure of a copper-transporting pib-type atpase." *Nature* 475 (2011): 59-64. 10.1038/nature10191.
 77. Awasthi, N. and B. J. Wagner. "Upregulation of heat shock protein expression by proteasome inhibition: An antiapoptotic mechanism in the lens." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (2005): 2082-91. 10.1167/iovs.05-0002.
 78. Bhatti, J. S., G. K. Bhatti and P. H. Reddy. "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - a step towards mitochondria based therapeutic strategies." *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863 (2017): 1066-77. 10.1016/j.bbadis.2016.11.010.
 79. Dröge, W. "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82 (2002): 47-95. 10.1152/physrev.00018.2001.
 80. Murphy, M. P. "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* 417 (2009): 1-13. 10.1042/bj20081386.
 81. Fisher, A. B. "The phospholipase a(2) activity of peroxiredoxin 6." *J Lipid Res* 59 (2018): 1132-47. 10.1194/jlr.R082578.
 82. Zou, X., B. A. Ratti, J. G. O'Brien, S. O. Lautenschlager, D. R. Gius, M. G. Bonini and Y. Zhu. "Manganese superoxide dismutase (sod2): Is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling?" *J Bioenerg Biomembr* 49 (2017): 325-33. 10.1007/s10863-017-9718-8.
 83. Mizzen, L. A., A. N. Kabling and W. J. Welch. "The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins." *Cell Regul* 2 (1991): 165-79. 10.1091/mbc.2.2.165.

84. Rak, M., P. Bénit, D. Chrétien, J. Bouchereau, M. Schiff, R. El-Khoury, A. Tzagoloff and P. Rustin. "Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency." *Clin Sci (Lond)* 130 (2016): 393-407. 10.1042/cs20150707.
85. Aragão, W. A. B., N. M. M. da Costa, N. C. F. Fagundes, M. C. F. Silva, S. M. Alves-Junior, J. J. V. Pinheiro, L. L. Amado, M. E. Crespo-López, C. S. F. Maia and R. R. Lima. "Chronic exposure to inorganic mercury induces biochemical and morphological changes in the salivary glands of rats." *Metallomics* 9 (2017): 1271-78. 10.1039/c7mt00123a.

Referências Bibliográficas

AMORIM, M. I. M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 72, 2000. pp.497-507.

ASCHNER, M. AND ASCHNER, J. L. "Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport," **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, vol. 14, no. 2, pp. 169–176, 1990.

PUTY, B., MAXIMINO, C., BRASIL, A., DA SILVA, W.L., GOUVEIA, A., OLIVEIRA, JR., K.R., BATISTA, EDE.J., CRESPO-LOPEZ, M.E., ROCHA, F.A., HERCULANO, A.M. Ascorbic acid protects against anxiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: action on the serotonergic system, **Zebrafish** 11 (2014) 365–370, <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0947>

BARBIERI, F.L.; GARDON, J. Hair mercury levels in Amazonian populations: spatial distribution and trends, **International Journal of Health Geographics**, 8 (71), 2009.

BISEN-HERSH, E.B., FARINA, M., BARBOSA, F., ROCHA, J.B.T, AND ASCHNER, M. "Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents," **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 28, no. 2, pp. 117–124, 2014.

BITTENCOURT, L.O., PUTY, B., CHARONE, S., ARAGÃO, W.A.B., FARIAS-JUNIOR, P.M. SILVA, M.C.F., CRESPO-LOPEZ, M.E., LEITE, A.D.L., BUZALAF, M.A.R., LIMA, R.R. Oxidative Biochemistry Disbalance and Changes on Proteomic Profile in Salivary Glands of Rats Induced by Chronic Exposure to Methylmercury, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2017 (2017) 15.

BITTENCOURT, L.O.; PUTY, B.; CHARONE, S.; ARAG, #x00E3, o WAB, et al. Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to Methylmercury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017:15.

BOSE-O'REILLY, S., MCCARTY, K. M., STECKLING, N., LETTMEIER, B. "Mercury exposure and children's health," **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, vol. 40, no. 8, pp. 186–215, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976. pp.72:248-54.

BRADL, H. (Ed.). **Heavy Metals in the Environment**: origin, Interaction and remediation. Vol. 6. London: Academic Press, 2002.

CALEY, E. R. Mercury and its Compounds in Ancient Times. **Journal of Chemical Education**, 5, 1928. pp. 419.

CARRATU, M.R., BORRACCI, P., COLUCCIA, A., GIUSTINO, A., RENNA, G., TOMASINI, M.C., RAISI, E., ANTONELLI, T., CUOMO, V., MAZZONI, E., FERRARO, L. Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring, **Neuroscience** 141(3) (2006) 1619- 29.

CARRATÙ, M.R., BORRACCI, P., COLUCCIA, A. ET AL., "Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring," **Neuroscience**, vol. 141, no. 3, pp. 1619–1629, 2006.

CHOI, A. L.; WIHE, P.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; JORGENSEN, P. J.; SALOMEN, J. T.; TUOMAINEN, T.; MURATA, K.; NIELSEN, H. P.; PETERSEN, M. S.; ASKHAN, J.; GRANDJEAN, P. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in eagent whaling men. **Environ. Health Perspect.** Vol. 117, p. 367-372, 2009.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ. Health Perspect.** Vol. 110, 2002. p.11-23.

CRESPO-LOPEZ, Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of

DEBES, F., BUDTZ-JORGENSES, E., WEIHE, P., WHITE, R. F., GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol. Teratol.* Vol. 28, 2006. pp. 363-375.

DIEGUEZ-ACUÑA, F. J.; POLK, W. W.; ELLIS, M. E.; SIMMONDS, P. L.; KUSHLEIKA, J. V.; WOODS, J. S. Nuclear Factor B Activity Determines the Sensitivity of Kidney Epithelial Cells to Apoptosis: Implications for Mercury-Induced Renal Failure. *Toxicol Scienc.* Vol. 82, 2004. p. 114–123. Doi:10.1093/toxsci/kfh236.

DYALL-SMITH, D.J.; SCURRY, J.P. Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. *Med. J. Aust.*, 153, 1990. pp. 409–415.

ESKES, C., HONEGGER, P., JUILLERAT-JEANNERET, L., MONNET-TSCHUDI, F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release, *Glia* 37(1) (2002) 43-52.

Ferreira, F.F., Ammar, D., Bourckhardt, G.F., Kobus-Bianchini, K., Müller, Y.M.R, and Nazari, E.M. “MeHg developing exposure causes DNA double-strand breaks and elicits cell cycle arrest in spinal cord cells,” *Journal of Toxicology*, vol. 2015, Article ID 532691, 10 pages, 2015.

G.P.F. Arrifano, R.C.R. Martin-Doimeadios, M. Jimenez-Moreno, V. Ramirez-Mateos, N.F.S. da Silva, HANNINEN, H., 1982. Behavioral effects of occupational exposure to mercury and lead. *Acta Neurologica Scandinavica*, 92: 167-175.

HSU-KIM, H., KUCHARZYK, K.H., ZHANG, T., DESHUSSES, M.A. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.*47, 2013. pp. 2441–2456.

HUANG, C. F.; HSU, C. J.; LIU, S. H. e LIN-SHIAU, S. Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in

mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase involved. **Toxicol Lett.** Vol. 176, n. 3, 2008. pp. 188-197.

ITO, S. Emissions of Mercury and other trace elements from coal-fired power plants in Japan. **Science of the Total Environment**, 2006. pp. 368, 397.

J.R. Souza-Monteiro, M. Augusto-Oliveira, R.S.O. Paraense, B.M. Macchi, J.L.M. do Nascimento, M.E.

JOHANSSON, C., CASTOLDI, A.F., ONISHCHENKO, N., MANZO, L., VAHTER, M., CECCATELLI, S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development, **Neurotoxicity research** 11(3-4) (2007) 241-60.

KONG, H., WONG, M., CHAN, H., LO, S. C. Chronic exposure of adults rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex. **Journal of proteome research**, v. 12, 2013. pp. 5233-5245.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCCOTE, M.; AMORIN, L.F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the amazon basin. **Enviromental research**,79, 1998. pp. 20-32.

LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão concisa**, 5. ed., São Paulo: Editora Blucher, 2000.

LINDBERG, S.; BULLOCK, R.; EBINGHAUS, R.; ENGSTROM, D.; FENG, X.; FITZGERALD, W.; PIRRONE, N.; PRESTBO, E.; SEIGNEUR, C. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. **Ambio**, 36 (1), 2007. pp.19–32.

CRESPO-LÓPEZ, M.E., HERCULANO, A.M., CORVELO, T.C., DO NASCIMENTO, MERCURY, J.L., PUTY, B. et al. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 52 (2019) 100–110 108 neurotoxicity, Rev. Neurol. 40 (2015) 441–447.

MAAR, J. H. **Pequena História da Química**, ed. Papa-Livro: Florianópolis, 1999.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environ Res.** May, 1998. 77(2). Pp.73-78.

MATOS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Relação entre Parâmetros Reprodutivos e Sazonalidade com a Acumulação de Mercúrio em *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) da Plataforma Continental SE do Brasil. **Revista Virtual de Química.** 3, 2, 2011.

MICARONI, R.C.M.; SILVEIRA BUENO, M.I.M.; JARDIM, W.F.; Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, 23(4), 2000.

MITRA, J., GUERRERO, E.N., HEGDE, P.M., WANG, H., BOLDOGH, I., RAO, K.S., MITRA, S., Hegde, M.L. New perspectives on oxidized genome damage and repair inhibition by pro-oxidant metals in neurological diseases, **Biomolecules** 4(3) (2014) 678-703.

MOREL, F. M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual reviews in ecology and systematics.** 29, 1998. pp.543 -566.

N. SANTOS SERRAO DE CASTRO AND M. DE OLIVEIRA LIMA, Hair as a Biomarker of Long Term Mercury Exposure in Brazilian Amazon: A Systematic Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, 15(3), 500.

NISHIOKU, T., TAKAI, N., MIYAMOTO, K., MURAO, K., HARA, C., YAMAMOTO, K. NAKANISHI, H., Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia, **Brain research** 871(1) (2000) 160-4.

NRIAGU, J.O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. **Nature.** 338, 1989. pp. 47 – 49.

PASSOS, C.J.; MERGLER, D.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; MERTENS, F.; GUIMARÃES, J.R.; PHILIBERT, A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environ Res.** Oct;105(2), 2007. pp. 183-93.

PATEL, E., and Reynolds, M. "Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells," **Toxicology Letters**, vol. 222, no. 3, pp. 265–272, 2013.

RODIER, P. M., ASCHNER, M., SAGER, P. R. "Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury," **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, vol. 6, no. 5, pp. 379–385, 1984.

SANTANA, L. N. da S., BITTENCOURT, L.O., NASCIMENTO, P.C., FERNANDES, R.M., TEIXEIRA, F.B, FERNANDES, L.M.P., SILVA, M.C.F., NOGUEIRA, L.S., AMADO, L.L., CRESPO-LOPES, M.E., MAIA, C.S.F., LIMA, R.R. During Adulthood In Rats Display Oxidative Stress, Neurodegeneration In The Motor Cortex And Lead To Impairment Of Motor Skills. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.09.004>.

SCHROEDER, W.H.; MUNTHES, J. Atmospheric mercury-an overview. **Atmospheric Env.** Vol.32, No 5, 1998. pp. 809.822.

SIQUEIRA, G.W. *et al.* Distribuição do mercúrio em sedimentos de fundo no Estuário de Santos SP/Brasil, **Rem: Rev. Esc. Minas**, Ouro Preto, 58 (4), 309-316, 2005.

TAKAHASHI, T., FUJIMURA, M., KOYAMA, M., KANAZAWA, M., USUKI, F., NISHIZAWA, M., SHIMOHATA, T., Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression, **PloS one** 12(1) (2017) e0170623.

THE TUCURUI DAM, **Ecotoxicology and environmental safety** 147 (2018) 299-305.

TINÔCO, A.A.P.; *et al.* Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto, MG, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 15 (4), 305–314, 2010.

UNEP. **Global Mercury Assessment 2013**: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport, 2013. Disponível em: <<http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf>>. Acesso em 15 de novembro de 2013.

V. BRANCO, S. CAITO, M. FARINA, J. TEIXEIRA DA ROCHA, M. ASCHNER, C. CARVALHO, Biomarkers of mercury toxicity: past, present, and future trends, **J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.** 20 (2010) 119–154, <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1289834>

ARAGAO, W. A. B., *et al.*, Hippocampal Dysfunction Provoked by Mercury Chloride Exposure: Evaluation of Cognitive Impairment, Oxidative Stress, Tissue Injury and Nature of Cell Death, **Oxid. Med. Cell. Longevity**, 2018, 2018, 7878050.

WASSERMAN JC., HACON, S.S., WASSERMAN, M.A. Mercury speciation in sediments of a tropical coastal environment. **Mundo&Vida**, vol.2 (1/2) 2001.

WELDON, M.M., SMOLINSK, M.S., MAROUFI, A., HASTY, B.W., GILLIS, D.L., BOULANGER, L.L., BALLUZ, S.L., DUTTON, R. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. **West J Med**, 2000; 173:15-18.

WHO, 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. **Concise International Chemical Assessment Document** 50.

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

YURDAK"OK, K. "Environmental pollution and the fetus," **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, vol. 1, no. 1, pp. 33–42, 2012.

ZAMBRANO, B. Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas. **RevMedUruguay**, 2004; 20: 4-11.

ZIMMERMANN, L.T., SANTOS, D.B., COLLE, D., SANTOS, A.A. DOS, HORT, M.A., GARCIA, S.C., BRESSAN, L.P., BOHRER, D., FARINA, M. Methionine stimulates motor impairment and cerebellar mercury deposition in methylmercury-exposed mice, **Journal of toxicology and environmental health**. Part A 77(1-3) (2014) 46-56.

HARDING, G., J. Dalziel and P. Vass. "Bioaccumulation of methylmercury within the marine food web of the outer bay of fundy, gulf of maine." **PLoS One** 13 (2018): e0197220. 10.1371/journal.pone.0197220.

SHEEHAN, M. C., T. A. Burke, A. Navas-Acien, P. N. Breysse, J. McGready and M. A. Fox. "Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: A systematic review." **Bull World Health Organ** 92 (2014): 254-69f. 10.2471/blt.12.116152.

NRIAGU, J. O. J. N. "A global assessment of natural sources of atmospheric". **Trace metals**. 338 (1989): 47-49.

SCHROEDER, W. H. and J. J. A. e. Munthe. "Atmospheric mercury—an overview." 32 (1998): 809-22.

HSU-KIM, H., K. H. Kucharzyk, T. Zhang and M. A. Deshusses. "Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: A critical review." **Environ Sci Technol** 47 (2013): 2441-56. 10.1021/es304370g.

BRADL, H. Heavy metals in the environment: Origin, interaction and remediation. **Elsevier**, 2005,

LINDBERG, S., R. BULLOCK, R. EBINGHAUS, D. ENGSTROM, X. FENG, W. FITZGERALD, N. PIRNONE, E. PRESTBO AND C. SEIGNEUR. "A synthesis of

progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition." **Ambio** 36 (2007): 19-32. 10.1579/0044-7447(2007)36[19:asopau]2.0.co;2.

PUTY, B., C. MAXIMINO, A. BRASIL, W. L. DA SILVA, A. GOUVEIA, JR., K. R. OLIVEIRA, J. BATISTA EDE, M. E. CRESPO-LOPEZ, F. A. ROCHA AND A. M. HERCULANO. "Ascorbic acid protects against anxiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: Action on the serotonergic system." **Zebrafish** 11 (2014): 365-70. 10.1089/zeb.2013.0947.

CRESPO-LÓPEZ, M. E., A. M. HERCULANO, T. C. CORVELO AND J. L. DO NASCIMENTO. "[mercury and neurotoxicity]." **Rev Neurol** 40 (2005): 441-7. Mercurio y neurotoxicidad.

Farina, M., J. B. Rocha and M. Aschner. "Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies." **Life Sci** 89 (2011): 555-63. 10.1016/j.lfs.2011.05.019.

CRESPO-LÓPEZ, M. E., A. LIMA DE SÁ, A. M. HERCULANO, R. RODRÍGUEZ BURBANO AND J. L. MARTINS DO NASCIMENTO. "Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system." **Environ Int** 33 (2007): 141-6. 10.1016/j.envint.2006.08.005.

SANTANA, L., L. O. BITTENCOURT, P. C. NASCIMENTO, R. M. FERNANDES, F. B. TEIXEIRA, L. M. P. FERNANDES, M. C. FREITAS SILVA, L. S. NOGUEIRA, L. L. AMADO, M. E. CRESPO-LOPEZ, et al. "Low doses of methylmercury exposure during adulthood in rats display oxidative stress, neurodegeneration in the motor cortex and lead to impairment of motor skills." **J Trace Elem Med Biol** 51 (2019): 19-27. 10.1016/j.jtemb.2018.09.004.

HEIMFARTH, L., J. DELGADO, M. R. MINGORI, K. S. MORESCO, R. P. PUREUR, D. P. GELAIN AND J. C. F. MOREIRA. "Delayed neurochemical effects of prenatal exposure to mehg in the cerebellum of developing rats." **Toxicol Lett** 284 (2018): 161-69. 10.1016/j.toxlet.2017.12.006.

BITTENCOURT, L. O., A. DIONIZIO, P. C. NASCIMENTO, B. PUTY, L. K. R. LEÃO, D. A. LUZ, M. C. F. SILVA, L. L. AMADO, A. LEITE, M. R. BUZALAF, ET AL. "Proteomic approach underlying the hippocampal neurodegeneration caused

by low doses of methylmercury after long-term exposure in adult rats." **Metalomics** **11** (2019): 390-403. 10.1039/c8mt00297e.

CHO, T. A. "Spinal cord functional anatomy." **Continuum (Minneap Minn)** **21** (2015): 13-35. 10.1212/01.CON.0000461082.25876.4a.

BICAN, O., A. MINAGAR AND A. A. PRUITT. "The spinal cord: A review of functional neuroanatomy." **Neurol Clin** **31** (2013): 1-18. 10.1016/j.ncl.2012.09.009.

SU, M., K. WAKABAYASHI, A. KAKITA, F. IKUTA AND H. TAKAHASHI. "Selective involvement of large motor neurons in the spinal cord of rats treated with methylmercury." **J Neurol Sci** **156** (1998): 12-7. 10.1016/s0022-510x(98)00030-6.

COLÓN-RODRÍGUEZ, A., H. E. HANNON AND W. D. ATCHISON. "Effects of methylmercury on spinal cord afferents and efferents-a review." **Neurotoxicology** **60** (2017): 308-20. 10.1016/j.neuro.2016.12.007.

SCENIAK, M. P., J. B. SPITSBERGEN, S. L. SABO, Y. YUAN AND W. D. ATCHISON. "Acute neurotoxicant exposure induces hyperexcitability in mouse lumbar spinal motor neurons." **J Neurophysiol** **123** (2020): 1448-59. 10.1152/jn.00775.2019.

KONG, H. K., M. H. WONG, H. M. CHAN AND S. C. LO. "Chronic exposure of adult rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex." **J Proteome Res** **12** (2013): 5233-45. 10.1021/pr400356v.

BITTENCOURT, L. O., B. PUTY, S. CHARONE, W. A. B. ARAGÃO, P. M. FARIAS-JUNIOR, M. C. F. SILVA, M. E. CRESPO-LOPEZ, A. L. LEITE, M. A. R. BUZALAF AND R. R. LIMA. "Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to methylmercury." **Oxid Med Cell Longev** **2017** (2017): 5653291. 10.1155/2017/5653291.

ARAGÃO, W. A. B., F. B. TEIXEIRA, N. C. F. FAGUNDES, R. M. FERNANDES, L. M. P. FERNANDES, M. C. F. DA SILVA, L. L. AMADO, F. E. S. SAGICA, E. H. C. OLIVEIRA, M. E. CRESPO-LOPEZ, et al. "Hippocampal dysfunction provoked by mercury chloride exposure: Evaluation of cognitive impairment, oxidative stress, tissue injury and nature of cell death." **Oxid Med Cell Longev** 2018 (2018): 7878050. 10.1155/2018/7878050.

TEIXEIRA, F. B., R. M. FERNANDES, P. M. FARIAS-JUNIOR, N. M. COSTA, L. M. FERNANDES, L. N. SANTANA, A. F. SILVA-JUNIOR, M. C. SILVA, C. S. MAIA AND R. R. LIMA. "Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats." **Int J Environ Res Public Health** 11 (2014): 9171-85. 10.3390/ijerph110909171.

FREIRE, M. A. M., L. N. S. SANTANA, L. O. BITTENCOURT, P. C. NASCIMENTO, R. M. FERNANDES, L. K. R. LEÃO, L. M. P. FERNANDES, M. C. F. SILVA, L. L. AMADO, W. GOMES-LEAL, et al. "Methylmercury intoxication and cortical ischemia: Pre-clinical study of their comorbidity." **Ecotoxicol Environ Saf** 174 (2019): 557-65. 10.1016/j.ecoenv.2019.03.009.

AMADO, L. L., M. L. GARCIA, P. B. RAMOS, R. F. FREITAS, B. ZAFALON, J. L. FERREIRA, J. S. YUNES AND J. M. MONSERRAT. "A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity." **Sci Total Environ** 407 (2009): 2115-23. 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038.

TEIXEIRA, F. B., A. C. A. DE OLIVEIRA, L. K. R. LEÃO, N. C. F. FAGUNDES, R. M. FERNANDES, L. M. P. FERNANDES, M. C. F. DA SILVA, L. L. AMADO, F. E. S. SAGICA, E. H. C. DE OLIVEIRA, et al. "Exposure to inorganic mercury causes oxidative stress, cell death, and functional deficits in the motor cortex." **Front Mol Neurosci** 11 (2018): 125. 10.3389/fnmol.2018.00125.

RUFINO, M., R. ALVES AND E. BRITO ET AL. "DETERMINATION OF THE TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FRUITS BY THE CAPTURE OF FREE RADICAL DPPH." J PRESS RELEASE EMBRAPA 127 (2007): 1-4.

MILLER, N. J., C. RICE-EVANS, M. J. DAVIES, V. GOPINATHAN AND A. MILNER. "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." **Clin Sci (Lond)** 84 (1993): 407-12. 10.1042/cs0840407.

RE, R., N. PELLEGRINI, A. PROTEGGENTE, A. PANNALA, M. YANG AND C. RICE-EVANS. "Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay." *Free Radic Biol Med* 26 (1999): 1231-7. 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

Ellman, G. L. "Tissue sulfhydryl groups." ***Arch Biochem Biophys* 82** (1959): 70-7. 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

SOUZA-MONTEIRO, J. R., M. HAMOY, D. SANTANA-COELHO, G. P. ARRIFANO, R. S. PARAENSE, A. Costa-Malaquias, J. R. Mendonça, R. F. da Silva, W. S. Monteiro, H. Rogez, et al. "Anticonvulsant properties of euterpe oleracea in mice." ***Neurochem Int* 90** (2015): 20-7. 10.1016/j.neuint.2015.06.014.

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." ***Anal Biochem* 72** (1976): 248-54. 10.1006/abio.1976.9999.

GREEN, L. C., S. R. TANNENBAUM AND P. GOLDMAN. "Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat." ***Science* 212** (1981): 56-8. 10.1126/science.6451927.

DIONIZIO, A. S., C. G. S. MELO, I. T. SABINO-ARIAS, T. M. S. VENTURA, A. L. LEITE, S. R. G. SOUZA, E. X. SANTOS, A. D. HEUBEL, J. G. SOUZA, J. PERLES, et al. "Chronic treatment with fluoride affects the jejunum: Insights from proteomics and enteric innervation analysis." ***Sci Rep* 8** (2018): 3180. 10.1038/s41598-018-21533-4.

CORRÊA, M. G., L. O. BITTENCOURT, P. C. NASCIMENTO, R. O. FERREIRA, W. A. B. ARAGÃO, M. C. F. SILVA, W. GOMES-LEAL, M. S. FERNANDES, A. DIONIZIO, M. R. BUZALAF, et al. "Spinal cord neurodegeneration after inorganic mercury long-term exposure in adult rats: Ultrastructural, proteomic and biochemical damages associated with reduced neuronal density." ***Ecotoxicol Environ Saf* 191** (2020): 110159. 10.1016/j.ecoenv.2019.110159.

LIMA LEITE, A., J. GUALIUME VAZ MADUREIRA LOBO, H. A. BARBOSA DA SILVA PEREIRA, M. SILVA FERNANDES, T. MARTINI, F. ZUCKI, D. H.

SUMIDA, A. RIGALLI AND M. A. BUZALAF. "Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride." **PLoS One** **9** (2014): e106646. 10.1371/journal.pone.0106646.

BINDEA, G., B. MLECNIK, H. HACKL, P. CHAROENTONG, M. TOSOLINI, A. KIRILOVSKY, W.-H. FRIDMAN, F. PAGÈS, Z. TRAJANOSKI AND J. J. B. GALON. "Cluego: A cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks." **25** (2009): 1091-93.

TEAM, R. C. R: A LANGUAGE AND ENVIRONMENT FOR STATISTICAL COMPUTING. VIENNA, AUSTRIA, 2013, ALHAMDOOSH, M., M. NG, N. J. WILSON, J. M. SHERIDAN, H. HUYNH, M. J. WILSON AND M. E. RITCHIE. "Combining multiple tools outperforms individual methods in gene set enrichment analyses." **Bioinformatics** **33** (2017): 414-24. 10.1093/bioinformatics/btw623.

SHANNON, P., A. MARKIEL, O. OZIER, N. S. BALIGA, J. T. WANG, D. RAMAGE, N. AMIN, B. SCHWIKOWSKI AND T. IDEKER. "Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." **Genome Res** **13** (2003): 2498-504. 10.1101/gr.1239303.

XIA, J., M. J. BENNER AND R. E. HANCOCK. "Networkanalyst--integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration." **Nucleic Acids Res** **42** (2014): W167-74. 10.1093/nar/gku443.

RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C., J. J. BERZAS NEVADO, F. J. GUZMÁN BERNARDO, M. JIMÉNEZ MORENO, G. P. ARRIFANO, A. M. HERCULANO, J. L. DO NASCIMENTO AND M. E. CRESPO-LÓPEZ. "Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the brazilian amazon." **Environ Sci Pollut Res Int** **21** (2014): 7466-79. 10.1007/s11356-014-2680-7.

ANGELOVA, P. R., V. KASYMOV, I. CHRISTIE, S. SHEIKHBAHAEI, E. TUROVSKY, N. MARINA, A. KORSACK, J. ZWICKER, A. G. TESCHEMACHER, G. L. ACKLAND, et al. "Functional oxygen sensitivity of astrocytes." **J Neurosci** **35** (2015): 10460-73. 10.1523/jneurosci.0045-15.2015.

ISLAM, M. T. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders." **Neurol Res** **39** (2017): 73-82. 10.1080/01616412.2016.1251711.

REICHMANN, D., W. VOTH AND U. JAKOB. "Maintaining a healthy proteome during oxidative stress." **Mol Cell** **69** (2018): 203-13. 10.1016/j.molcel.2017.12.021.

GANDHI, S. AND A. Y. ABRAMOV. "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration." **Oxid Med Cell Longev** **2012** (2012): 428010. 10.1155/2012/428010.

MURPHY, M. P. "Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: Distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications." **Antioxid Redox Signal** **16** (2012): 476-95. 10.1089/ars.2011.4289.

TEIXEIRA, F. B., L. N. SANTANA, F. R. BEZERRA, S. DE CARVALHO, E. A. FONTES-JÚNIOR, R. D. PREDIGER, M. E. CRESPO-LÓPEZ, C. S. MAIA AND R. R. LIMA. "Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress." **PLoS One** **9** (2014): e101074. 10.1371/journal.pone.0101074.

ARVIDSON, B. "A review of axonal transport of metals." **Toxicology** **88** (1994): 1-14. 10.1016/0300-483x(94)90107-4.

PAMPHLETT, R. AND P. WALEY. "Motor neuron uptake of low dose inorganic mercury." **J Neurol Sci** **135** (1996): 63-7. 10.1016/0022-510x(95)00258-4.

HUANG, H., H. RONG, X. LI, S. TONG, Z. ZHU, L. NIU AND M. TENG. "The crystal structure and identification of nqm1/ygr043c, a transaldolase from *saccharomyces cerevisiae*." **Proteins** **73** (2008): 1076-81. 10.1002/prot.22237.

CRESPO-LÓPEZ, M. E., G. L. MACÊDO, S. I. PEREIRA, G. P. ARRIFANO, D. L. PICANÇO-DINIZ, J. L. DO NASCIMENTO AND A. M. HERCULANO. "Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms." **Pharmacol Res** **60** (2009): 212-20. 10.1016/j.phrs.2009.02.011.

KAUR, N., M. DHIMAN, J. R. PEREZ-POLO AND A. K. MANTHA. "Ginkgolide b revamps neuroprotective role of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and mitochondrial oxidative phosphorylation against $\alpha\beta$ 25-35 -induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells." **J Neurosci Res** **93** (2015): 938-47. 10.1002/jnr.23565.

CHAN, H., D. P. BARTOS AND L. B. OWEN-SCHAUB. "Activation-dependent transcriptional regulation of the human fas promoter requires nf-kappab p50-p65 recruitment." **Mol Cell Biol** **19** (1999): 2098-108. 10.1128/mcb.19.3.2098.

CECCATELLI, S., E. DARÉ AND M. MOORS. "Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis." **Chem Biol Interact** **188** (2010): 301-8. 10.1016/j.cbi.2010.04.007.

SAVA, G., A. BERGAMO AND P. J. DYSON. "Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: What comes next?" **Dalton Trans** **40** (2011): 9069-75. 10.1039/c1dt10522a.

DREIEM, A., C. C. GERTZ AND R. F. SEEGAL. "The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent." **Toxicol Sci** **87** (2005): 156-62. 10.1093/toxsci/kfi224.

HALL, E. D., J. A. WANG, J. M. BOSKEN AND I. N. SINGH. "Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury." **J Bioenerg Biomembr** **48** (2016): 169-74. 10.1007/s10863-015-9600-5.

GASCHLER, M. M. AND B. R. STOCKWELL. "Lipid peroxidation in cell death." **Biochem Biophys Res Commun** **482** (2017): 419-25. 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

OPARKA, M., J. WALCZAK, D. MALINSKA, L. VAN OPPEN, J. SZCZEPANOWSKA, W. J. H. KOOPMAN AND M. R. WIECKOWSKI. "Quantifying ros levels using cm-h(2)dcfda and hyper." **Methods** **109** (2016): 3-11. 10.1016/j.ymeth.2016.06.008.

BALCHIN, D., M. HAYER-HARTL AND F. U. HARTL. "In vivo aspects of protein folding and quality control." **Science** **353** (2016): aac4354. 10.1126/science.aac4354.

HARTL, F. U., A. BRACHER AND M. HAYER-HARTL. "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." **Nature** **475** (2011): 324-32. 10.1038/nature10317.

TAIPALE, M., G. TUCKER, J. PENG, I. KRYKBAEVA, Z. Y. LIN, B. LARSEN, H. CHOI, B. BERGER, A. C. GINGRAS AND S. LINDQUIST. "A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways." **Cell** **158** (2014): 434-48. 10.1016/j.cell.2014.05.039.

BREHME, M., C. VOISINE, T. ROLLAND, S. WACHI, J. H. SOPER, Y. ZHU, K. ORTON, A. VILLELLA, D. GARZA, M. VIDAL, ET AL. "A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease." **Cell Rep** **9** (2014): 1135-50. 10.1016/j.celrep.2014.09.042.

KAUSHIK, S. AND A. M. CUERVO. "Proteostasis and aging." **Nat Med** **21** (2015): 1406-15. 10.1038/nm.4001.

SPINELLI, J. B. AND M. C. HAIGIS. "The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism." **Nat Cell Biol** **20** (2018): 745-54. 10.1038/s41556-018-0124-1.

STINCONE, A., A. PRIGIONE, T. CRAMER, M. M. WAMELINK, K. CAMPBELL, E. CHEUNG, V. OLIN-SANDOVAL, N. M. GRÜNING, A. KRÜGER, M. TAUQEER ALAM, et al. "The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway." **Biol Rev Camb Philos Soc** **90** (2015): 927-63. 10.1111/brv.12140.

WILLIAMS, J. S., S. A. LUJAN AND T. A. KUNKEL. "Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication." **Nat Rev Mol Cell Biol** **17** (2016): 350-63. 10.1038/nrm.2016.37.

FERNÁNDEZ-CASTAÑO ROMERA, M., X. LOU, J. SCHILL, G. TER HUURNE, P. K. H. FRANSEN, I. K. VOETS, C. STORM AND R. P. SIJBESMA. "Strain-stiffening in dynamic supramolecular fiber networks." **J Am Chem Soc** **140** (2018): 17547-55. 10.1021/jacs.8b09289.

SONNINO, S. AND A. PRINETTI. "Membrane domains and the "lipid raft" concept." **Curr Med Chem** **20** (2013): 4-21.

GEDEN, M. J. AND M. DESHMUKH. "Axon degeneration: Context defines distinct pathways." **Curr Opin Neurobiol** **39** (2016): 108-15. 10.1016/j.conb.2016.05.002.

SOUSA, J. S., E. D'IMPRIMA AND J. VONCK. "Mitochondrial respiratory chain complexes." **Subcell Biochem** **87** (2018): 167-227. 10.1007/978-981-10-7757-9_7.

LIU, B., W. XIN, J. R. TAN, R. P. ZHU, T. LI, D. WANG, S. S. KAN, D. K. XIONG, H. H. LI, M. M. ZHANG, et al. "Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair." **Proc Natl Acad Sci U S A** **116** (2019): 22347-52. 10.1073/pnas.1910292116.

SEKELOVA, Z., O. POLANSKY, H. STEPANOVA, R. FEDR, M. FALDYNOVA, I. RYCHLIK AND L. VLASATIKOVA. "Different roles of cd4, cd8 and $\gamma\delta$ t-lymphocytes in naive and vaccinated chickens during salmonella enteritidis infection." **Proteomics** **17** (2017): 10.1002/pmic.201700073.

WATSON, E. R., N. G. BROWN, J. M. PETERS, H. STARK AND B. A. SCHULMAN. "Posing the apc/c e3 ubiquitin ligase to orchestrate cell division." **Trends Cell Biol** **29** (2019): 117-34. 10.1016/j.tcb.2018.09.007.

GOURDON, P., X. Y. LIU, T. SKJØRRINGE, J. P. MORTH, L. B. MØLLER, B. P. PEDERSEN AND P. NISSEN. "Crystal structure of a copper-transporting pib-type atpase." **Nature** **475** (2011): 59-64. 10.1038/nature10191.

AWASTHI, N. AND B. J. WAGNER. "Upregulation of heat shock protein expression by proteasome inhibition: An antiapoptotic mechanism in the lens." **Invest Ophthalmol Vis Sci** **46** (2005): 2082-91. 10.1167/iovs.05-0002.

BHATTI, J. S., G. K. BHATTI AND P. H. REDDY. "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - a step towards mitochondria based therapeutic strategies." **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis** **1863** (2017): 1066-77. 10.1016/j.bbadis.2016.11.010.

DRÖGE, W. "Free radicals in the physiological control of cell function." **Physiol Rev** **82** (2002): 47-95. 10.1152/physrev.00018.2001.

MURPHY, M. P. "How mitochondria produce reactive oxygen species." **Biochem J** **417** (2009): 1-13. 10.1042/bj20081386.

FISHER, A. B. "The phospholipase a(2) activity of peroxiredoxin 6." **J Lipid Res** **59** (2018): 1132-47. 10.1194/jlr.R082578.

ZOU, X., B. A. RATTI, J. G. O'BRIEN, S. O. LAUTENSCHLAGER, D. R. GIUS, M. G. BONINI AND Y. ZHU. "Manganese superoxide dismutase (sod2): Is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling?" **J Bioenerg Biomembr** **49** (2017): 325-33. 10.1007/s10863-017-9718-8.

MIZZEN, L. A., A. N. KABILING AND W. J. WELCH. "The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins." **Cell Regul** **2** (1991): 165-79. 10.1091/mbc.2.2.165.

RAK, M., P. BÉNIT, D. CHRÉTIEN, J. BOUCHEREAU, M. SCHIFF, R. EL-KHOURY, A. TZAGOLOFF AND P. RUSTIN. "Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency." **Clin Sci (Lond)** **130** (2016): 393-407. 10.1042/cs20150707.

ARAGÃO, W. A. B., N. M. M. DA COSTA, N. C. F. FAGUNDES, M. C. F. SILVA, S. M. ALVES-JUNIOR, J. J. V. PINHEIRO, L. L. AMADO, M. E. CRESPO-LÓPEZ, C. S. F. MAIA AND R. R. LIMA. "Chronic exposure to inorganic mercury

induces biochemical and morphological changes in the salivary glands of rats." **Metallomics** 9 (2017): 1271-78. 10.1039/c7mt00123a.

Anexo 1



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO DOS DANOS PROTEÔMICOS E TECIDUAIS A MEDULA ESPINHAL DE RATOS APÓS A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO METILMERCÚRIO", protocolada sob o CEUA nº 7037071217 (ID 000736), sob a responsabilidade de **Rafael Rodrigues Lima e equipe; Rafael Monteiro Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 22/02/2018.

We certify that the proposal "CHARACTERIZATION OF PROTEOMIC AND TISSUE DAMAGE TO THE SPINAL CORD OF RATS AFTER CHRONIC EXPOSURE TO METHYLMERCURY", utilizing 56 Heterogenics rats (56 males), protocol number CEUA 7037071217 (ID 000736), under the responsibility of **Rafael Rodrigues Lima and team; Rafael Monteiro Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 02/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018 a 12/2020**

Área: **Instituto de Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **80 a 89 dias**

N: **56**

Linhagem: **Rattus norvegicus/Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: **Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional - LABEF-ICB**

Belém, 19 de março de 2019

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Vanessa Joia de Mello
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Anexo 2

15/09/2020

Gmail - Confirm co-authorship of submission to Food and Chemical Toxicology



luciana eiro <guimaraeseiro@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Food and Chemical Toxicology

1 mensagem

Food and Chemical Toxicology <em@editorialmanager.com>
Responder a: Food and Chemical Toxicology <fct@elsevier.com>
Para: Luciana Guimarães Eiró <guimaraeseiro@gmail.com>

26 de agosto de 2020 21:47

This is an automated message.

Journal: Food and Chemical Toxicology
Title: Chronic methylmercury exposure causes spinal cord impairment: proteomic modulation and oxidative stress
Corresponding Author: Dr Rafael Rodrigues Lima
Co-Authors: Luciana Guimarães Eiró, PhD; Maria Karolina Martins Ferreira, PhD; Leonardo Oliveira Bittencourt, PhD; Walessa Alana Bragança Aragão; Michel Platini Caldas Souza; Marcia Cristina Silva; Aline Dionizio, PhD; Marília Afonso Rabelo Buzalaf, PhD; Maria Elena Crespo-López
Manuscript Number:

Dear Luciana Guimarães Eiró,

Dr Rafael Rodrigues Lima submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission. Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship:

<https://www.editorialmanager.com/fct/l.asp?i=383947&l=1PIBVK3V>

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at <https://www.editorialmanager.com/fct/>

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at rafalima@ufpa.br

Thank you,

Food and Chemical Toxicology

More information and support

FAQ: What is Editorial Manager Co-Author registration?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/kw/co-author+editorial+manager/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/fct/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.