



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS
INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO Hg (II) SOBRE O SISTEMA
ANTIOXIDANTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM *Drosophila
melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariane Trindade de Paula

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2012

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS
INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO Hg (II) SOBRE O SISTEMA
ANTIOXIDANTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM *Drosophila
melanogaster***

por

Mariane Trindade de Paula

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica
Toxicológica**.

Orientadora: Dra. Thaís Posser

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado


ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS
INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO Hg (II) SOBRE O SISTEMA
ANTIOXIDANTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM *Drosophila*
melanogaster

Elaborada por

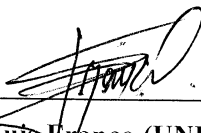
Mariane Trindade de Paula

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

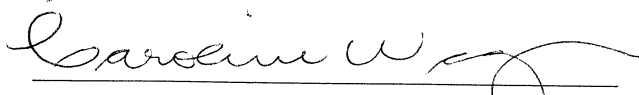
Comissão Examinadora:



Prof. Dr^a. Thaís Posser (UFSM) - Presidente/Orientadora



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco (UNIPAMPA) - Membro efetivo



Prof. Dr^a. Caroline Wagner (UNIPAMPA) - Membro efetivo

Santa Maria, RS, Brasil

2012

“Porque quando estou fraco, então é que sou forte”.

(2 Coríntios 12:10)

*Ao meu pai José Francisco de Paula (in memoriam),
meu maior incentivador, meu amor e minha saudade.....*

AGRADECIMENTOS

Este é o final de apenas uma etapa de minha vida, tendo em vista muitas outras que ainda virão. Durante toda esta trajetória muitos foram os momentos vividos, pelos quais diversas foram as pessoas que estiveram comigo nesta caminhada, cada um desenvolvendo um papel importante. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse ao fim deste mestrado gostaria de agradecer a todos pela amizade, coleguismo, parceria, carinho, paciência, dedicação...

Primeiramente a Deus, minha fonte de inspiração e fé, pelo qual me mantém sempre firmada nos meus propósitos, dando-me força coragem e humildade para chegar até aqui e seguir em frente.

A minha família, em especial minha mãe, meus avós e minha irmã, por todos os sacrifícios e horas dedicadas a mim, apostando em minha capacidade e estando sempre presentes com palavras consoladoras, entendendo os momentos em que estive ausente.

Ao meu querido Wagner Bueno Carvalho, pessoa de infinitas qualidades que entrou em minha vida para torná-la ainda mais linda, sempre me dando seu apoio e carinho. Também a sua família, pelo apoio e amizade em minha vida.

A minha orientadora Thaís Posser que apostou e acreditou no meu potencial, que me ensinou grande parte do que sei, estando sempre de braços abertos e com uma palavra amiga quando necessitei de sua ajuda. Tornou-se muito mais que minha orientadora, mas sim uma amiga que pretendo levar para sempre. Não há palavras que possam agradecê-la.

Ao professor Jeferson Franco pela grande ajuda e ensinamentos pelos quais engrandeceram ainda mais este trabalho e meus conhecimentos, muito obrigada por estar sempre disposto a me ajudar.

Ao professor João Batista Teixeira da Rocha pela confiança em proporcionar-me a oportunidade de estar junto à sua equipe, abrindo as portas de seu laboratório.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que contribuíram de alguma forma para minha formação. Em especial o professor Gilson Zeni que sempre quando precisei de seu auxílio foi incansável para me ajudar, ao professor Elgion Loreto e ao Ronaldo Golombieski pela oportunidade de realizarmos estudos que vieram a enriquecer este trabalho.

Aos amigos do Laboratório do Professor João, alguns que por lá passaram... ou que ainda lá estão (Jéssie, Roma, Cris Dalla Corte, Alessandro, Alessandra, Bruna Occai, Daia, Daniel, Rogério, Pablo, Diones, Jean Paul, Douglas, Josi, Silvio, Fernanda, Claudinha, Cris Mizdal, Fran, Stéfani, Emily) o meu muito obrigada pela amizade, ensinamentos e descontração. Em especial a Carol, que foi sempre imprescindível em determinados momentos sempre passando seus conhecimentos e disposta a me ajudar.

A Ana Paula Zemolin e Ísis, alunas da Unipampa de São Gabriel que muito me ajudaram não só no trabalho do laboratório, mas na amizade e momentos de lazer. A Prof. Ana Paula Saidelles e o pessoal do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) – UFSM que se uniram para que as dosagens fossem realizadas.

Aos funcionários do curso, em especial a Márcia pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

A professora Maria Beatriz Moretto e mais uma vez a professora Caroline Wagner por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A Unipampa Campus de São Gabriel na pessoa de seu diretor, bem como todos os professores e funcionários, pela disponibilização da estrutura desta universidade para que muitos dos estudos aqui realizados pudessem ser completados com êxito.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso, um sonho realizado!

E a todas as pessoas amigas, ou aqueles que estiveram presentes no dia-a-dia, longes ou perto, na torcida para que tudo desse certo ou até mesmo, quando necessário, fazendo as críticas construtivas o meu Muito Obrigado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO Hg (II) SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM *Drosophila melanogaster*

Autora: Mariane Trindade de Paula

Orientadora: Dra. Thaís Posser

Data e local da defesa: Santa Maria, 16 de março de 2012.

O Mercúrio (Hg) é em um metal pesado de relevância toxicológica cuja contaminação ambiental decorre principalmente de atividades antropogênicas. Dentre os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do Hg estão um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e modulação da fosforilação de proteínas que participam de vias de transdução de sinal celular, entre estas as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs). Estudos apontam *Drosophila melanogaster* como um organismo que apresenta um considerável potencial para atuar como um bioindicador de contaminantes ambientais, apresentando alterações bioquímicas e comportamentais similares a efeitos observados em mamíferos. Deste modo, nossos resultados demonstraram que o HgCl₂, quando incorporado na dieta junto com sacarose em *D. melanogaster*, causa significativa diminuição da viabilidade das mesmas a partir de 24h de modo dependente de concentração utilizada do composto. Além disso, após 48h de exposição ao Hg(II) as moscas tratadas com concentrações a partir de 100µM obtiveram prejuízos no desempenho locomotor, diminuição na atividade das enzimas: Acetilcolinesterase (Ache), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD), não alterando a atividade da Catalase (CAT). Na análise dos genes de *D. melanogaster*, através do método de Real time-PCR, observou-se que os níveis de RNAm da SOD, CAT e

NF-E2-relacionados fator 2 (Nrf2) não foram alterados em comparação ao grupo controle, sendo que os níveis de HSP83 foram aumentados em 10 vezes. Além disso, a partir de 6h de tratamento as moscas demonstraram indução na peroxidação lipídica e estresse oxidativo efeito este que persistiu até as 48h de tratamento. Na medição dos níveis de Hg, expressa em μg de Hg/g de tecido, observou-se que as moscas tratadas por 48h com HgCl_2 apresentaram 100 vezes maiores níveis de Hg em comparação ao grupo controle. Com relação à análise da modulação de MAPKs pelo tratamento com HgCl_2 observou-se aumentada fosforilação de JNK e ERK, sem alterar a fosforilação de p38^{MAPK} , bem como o conteúdo total destas proteínas. HgCl_2 levou a uma elevação na clivagem da proteína PARP, indicativo da indução de morte celular do tipo apoptótica. Os dados obtidos neste trabalho ressaltam a toxicidade do Hg(II) e estendem o conhecimento sobre seus mecanismos de ação para um modelo animal de invertebrado, além disso, o presente estudo aponta o sistema antioxidante e vias de transdução de sinal celular como mecanismos comuns envolvidos na toxicidade deste metal em vertebrados e invertebrados.

Palavras-chave: Mercúrio, *Drosophila melanogaster*, MAPK, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree

Graduate Course in Toxicological Biochemistry Federal University of Santa Maria, RS,
BrazilSTUDY OF BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS INDUCED BY Hg
(II) EXPOSURE) ON ANTIOXIDANT SYSTEM AND CELL SIGNALING
PATHWAYS IN *Drosophila melanogaster*

Author: Mariane Trindade de Paula

Advisor: Dra. Thaís Posser

Place and Date of the Defense: Santa Maria, March 16th 2011.

Mercury (Hg) consists in a heavy metal with toxicological relevance whose contamination is mainly attributed to anthropogenic activities, leading to environmental contamination. It is known that an induction in oxidative stress caused by increased production of reactive oxygen species and/or decrease in antioxidant enzymes activity and a modulation of phosphorylation of proteins that participate in processes of cellular signaling transduction, as Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) represent molecular mechanisms implicated in Hg toxicity in rodents and other vertebrates. Studies from the literature have been pointing *Drosophila melanogaster* as an organism with considerable potential to be used as a bio indicator organism to monitoring the presence of environmental contaminants, presenting biochemical and behavioral effects in response to contaminants similarly to those observed in mammals. Thus, our results showed that HgCl₂, when incorporated through the diet with sucrose in *D. melanogaster*, causes a significant decrease in viability of flies from 24h in a concentration dependent manner. Moreover, after 48h of exposure, the flies treated with Hg 100µM presented deficits in locomotor performance, decrease in the activity of enzymes: acetylcholinesterase (AChE), glutathione peroxidase (GPx) and Superoxide dismutase (SOD), without alteration in catalase activity (CAT). In this study, gene expression of *D. melanogaster* was evaluated by the method of Real-Time PCR. It was observed that mRNA levels of SOD, CAT and NF-E2-associated factor 2 (Nrf2) were

not altered by Hg (II) treatment when compared to the control group, however, Hsp83 expression was 10 times increased. Additionally, from 6h of treatment with Hg (II) 100 μ M it was verified an induction of lipid peroxidation and oxidative stress, these effects persisted until 48 h of treatment. In the present study, the amount of Hg in the treated and control flies was measured and expressed in μ g Hg / g tissue. It was observed that the flies treated for 48h with HgCl₂ (100 μ M) presented higher levels of Hg than the control group (100 times increase). With regard to the modulation of signaling pathways by Hg (II) treatment, the metal caused an increase in phosphorylation levels of ERK and JNK without altering phosphorylation of p38 as well as the total content of these proteins. Hg (II) exposure caused an induction of PARP cleavage, indicating an induction of apoptotic cell death. In conclusion, the data obtained over this work draw attention to the Hg (II) toxicity and help to extend the knowledge about the mechanisms involved in the toxicity of this metal in invertebrates. In addition, this study points the antioxidant system and modulation of specific signaling transduction pathways as common mechanisms mediating the toxicity of Hg (II) in vertebrates and invertebrates.

Keywords: Mercury, *Drosophila melanogaster*, MAPK, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Ciclo biogeoquímico do Hg no ambiente como resultado das atividades naturais e antrópicas.....	02
Figura 2. Proteínas pertencentes à família das MAPKs.....	04

MANUSCRITO

Figura 1. Effects of exposure to Hg(II) on fly survival.....	37
Figura 2. Effects of exposure to Hg(II) on locomotor performance and acetylcholinesterase activity in <i>D. melanogaster</i>	38
Figura 3. Analysis of ROS production and lipid peroxidation in response to Hg(II) exposure in <i>D. melanogaster</i>	39
Figura 4. Modulation of MAPKs phosphorylation and PARP cleavage in response to treatment of <i>D. melanogaster</i> with Hg(II) (100µM) for 48 h.....	41
Figura 5. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of MPK-2, Hsp83, NRF-2, SOD and catalase mRNA in flies exposed to Hg(II).....	42

ANEXO

Figura 1. Efeitos de diferentes concentrações do Hg (II) na formação de TBARS em <i>Drosophila melanogaster</i>	75
Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações do Hg (II) na produção de ROS em <i>Drosophila melanogaster</i>	76

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1. Genes tested by qRT-PCR and used forward and reverse primers.....**36**

Tabela 2. Summary of the effects of HgCl₂ 100 µM exposure in *Drosophila melanogaster* on metal content determination and enzymatic activities.....**36**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

APS	Persulfato de amônia
Ache	Enzima Acetilcolinesterase
(C ₂ H ₅ Hg ⁺)	Etilmercúrio
((CH ₃) ₂ Hg)	Dimetilmercúrio
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
cm	centímetros
DCF-DA	2', 7' diclorodihidrofluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
G	gramas
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSH	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
HgCl ₂	Cloreto de Mercúrio
MeHg	Metil-Mercúrio ou Mercúrio orgânico
(Hg ⁰)	Mercúrio elementar
(HgII)	Mercúrio inorgânico
M	molar
MAPKs	Proteínas quinase ativada por mitógenos
mL	mililitro (s)

mm	milímetro (s)
Mn	Manganês
mV	mili volts
Pb	Chumbo
pH	potencial de hidrogênio iônico
RNA	Ácido ribonucléico
RL	Radicais livres
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e SDS
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Temed	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	Hidroxi metil aminometano
Zn	Zinco
μL	microlitro(s)
HSP83	Proteína de choque térmico ou chaperona
NRF2	Fator de transcrição
MPK2	Proteína que representa em Drosophila a P38
ERK	Proteína quinase regulada por estresse extracelular
JNK	c-Jun N-terminal quinase

APRESENTAÇÃO

Nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, consta uma revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontradas no final desta dissertação, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os resultados do manuscrito presente neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Resumo</i>	vii
<i>Abstract</i>	ix
<i>Lista de Figuras</i>	xi
<i>Lista de Tabelas</i>	xii
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Unidades</i>	xiii
<i>Apresentação</i>	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	06
2.1 OBJETIVO GERAL.....	06
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	06
3. JUSTIFICATIVA	07
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
4.1 MERCÚRIO.....	08
4.1.1 Mercúrio metálico.....	09
4.1.2 Mercúrio inorgânico.....	10
4.1.3 Mercúrio orgânico.....	10
4.1.4 Exposição ao Hg e Mecanismos de Toxicidade.....	11
4.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	13
4.2.1 Estresse oxidativo e Hg.....	15
4.3 MAPKs.....	15
4.3.1 MAPKs e metais.....	16
4.4 <i>Drosophila melanogaster</i>	17
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	48
8. PERSPECTIVAS	49

9. REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS.....	74
<i>Anexo A - DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO.....</i>	<i>75</i>
<i>Anexo B – RESULTADOS COMPLEMENTARES.....</i>	<i>76</i>

1. INTRODUÇÃO

O Mercúrio (Hg) é um elemento que ocorre naturalmente na crosta terrestre e, embora apresente propriedades únicas que o tornam útil para muitos propósitos, o Hg não apresenta qualquer papel nos processos vitais sendo um metal pesado tóxico com efeitos deletérios sobre o ambiente e os organismos vivos (Boening, 2000).

O Hg está presente no ambiente de diferentes formas sendo: mercúrio elementar (Hg^0), mercúrio inorgânico (HgII) e orgânico (MeHg). O Hg pode ser encontrado em pequenas concentrações nos diferentes compartimentos terrestres (biosfera, atmosfera, litosfera e hidrosfera) havendo fluxo contínuo deste metal, através de um ciclo biogeoquímico o qual está representado na Figura 1 (Azevedo, 2003). Neste ciclo ocorrem seis principais etapas onde o Hg pode ser biotransformado para formas mais ou menos tóxicas deste metal sendo: (1) degaseificação do Hg a partir dos solos e águas superficiais, ou pelas emissões dos vulcões e das atividades humanas; (2) o movimento em forma gasosa através da atmosfera; (3) a deposição do Hg em águas e superfície da terra; (4) a conversão do elemento em sulfeto de Hg insolúvel ; (5) a precipitação ou bioconversão em formas mais voláteis ou solúveis, como o Metil-Hg e; (6) a reentrada na atmosfera ou sua bioacumulação em cadeias alimentares (ex. plâncton – peixes herbívoros – peixes carnívoros – homens ou animais) (Johannesson, 2002).

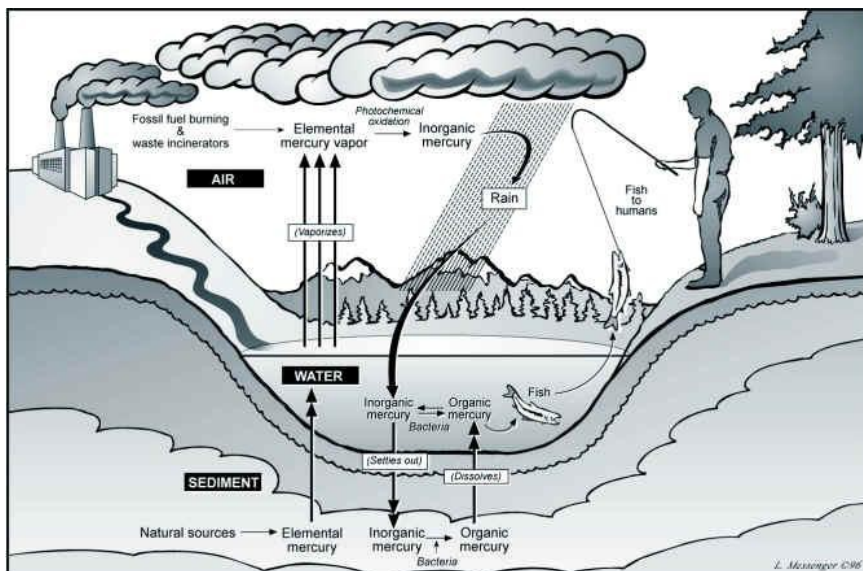


FIGURA 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente como resultado das atividades naturais (ex. atividade geotérmica) e antrópicas (ex. ação humana pela queima de combustíveis fósseis e as atividades de fundição). Ambas as atividades liberam vapor de Hg na atmosfera, que é oxidado fotoquimicamente para voltar ao Hg inorgânico depositando-se em solos e corpos d'água. Fonte: http://www.mercury.utah.gov/atmospheric_transport.htm

Hg é considerado uma neurotoxina bem documentada que pode causar danos permanentes ao sistema nervoso central (Crespo-López et al., 2005). Os íons de Hg têm a capacidade de formar complexos muito fortes com os grupos sulfidrilas (–SH) das proteínas (presentes no aminoácido cisteína), afetando vários processos entre eles a formação do fuso mitótico causando a perda de cromossomos durante as divisões celulares, estando assim este processo diretamente ligado a genotoxicidade do Hg (Rodgers et al., 2001; Thier et al., 2003; Stoiber et al., 2004; Bonacker et al., 2005). Além disso, apresenta-se como um elemento capaz de causar danos nefrotóxicos (Zalups, 2000), hepatotóxicos (Larini et al., 1997), aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição das defesas antioxidantes (depleção de GSH, inibição de enzimas como catalase, GPx entre outras) (Hultberg et al., 2001; Farina et al., 2003; Wataha et al., 2008; Franco et al., 2009), bem como outros efeitos adversos em tecidos neurais (Mirzoian & Luetje, 2002) e no sistema

imunológico onde auto-imunidade e imunossupressão têm sido relatados (Lalancette et al., 2003; Gagnaire et al., 2004; Mellegard et al., 2004). Neste sentido a detecção e controle dos níveis de mercúrio no ambiente é de alta relevância para a saúde pública e no âmbito do desenvolvimento sustentável (Frasco et al. 2007).

Os compostos de mercúrio são extremamente tóxicos e, portanto, diversas precauções devem ser tomadas para evitar qualquer inalação ou contato da pele com estes agentes ou soluções dos mesmos (Korbas et al., 2011). Diversos estudos com diferentes formas de Hg demonstraram que o MeHg é a espécie de Hg de maior toxicidade (Carmona et al., 2008). Por outro lado, anualmente toneladas de HgCl_2 são liberadas na atmosfera originadas principalmente de processos industriais e de resíduos urbanos (Boujbiha et al., 2009) deste modo, mais estudos com a forma HgCl_2 precisam ser realizados a fim de compreender não só o ciclo químico e da dinâmica ambiental do mercúrio inorgânico, mas também para avaliar os efeitos dessa forma de Hg na biota que é submetida a sua exposição (Azevedo-Pereira & Soares, 2010).

A resposta de uma célula ao estresse pode envolver vários mecanismos bioquímicos entre estes a ativação de cascatas de sinalização estimulando alterações metabólicas, gênicas e físicas permitindo que as células encontrem respostas específicas a mudanças nas condições ambientais (Dumaz & Marais, 2005). Dentre estes mecanismos a modulação da fosforilação de proteínas membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) em organismos submetidos a estresse ambiental tem recebido atenção especial.

As MAPKs representam uma família de proteínas altamente conservadas entre diferentes espécies e desempenham importantes funções regulatórias na fisiologia das células, sendo envolvidas em processos como morte celular, proliferação, diferenciação e resposta adaptativa (Chang e Karin, 2001; Leal et al., 2006). Os membros desta família de proteínas são, proteína quinase regulada por estresse extracelular (ERK1/2), c-Jun N-terminal quinase (JNK1/2) e a p38. Quando duplamente fosforiladas em resíduos de treonina e tirosina estas proteínas são ativadas podendo então fosforilar e ativar outros componentes em sua via de transdução de sinal (Chang e Karin, 2001).

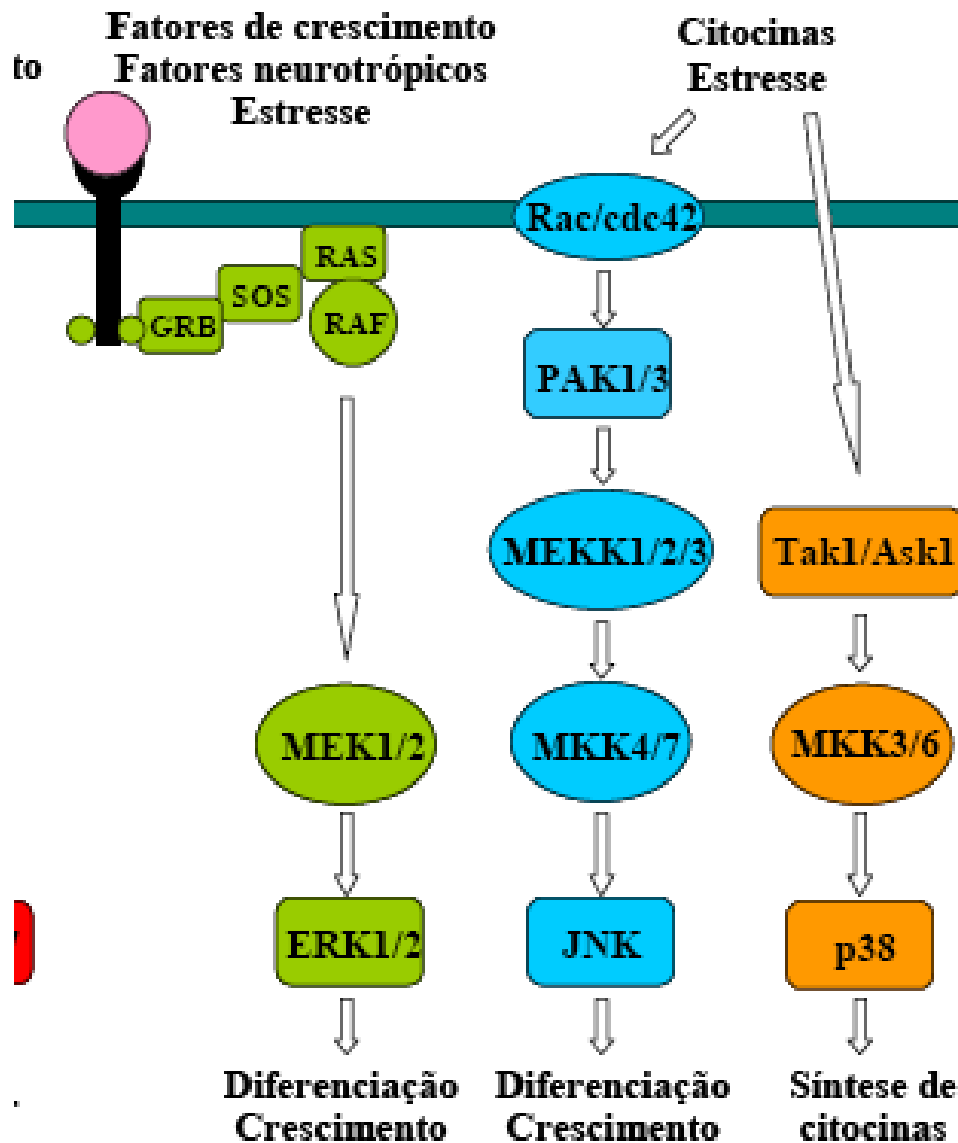


FIGURA 2: Proteínas pertencentes à família das MAPKs. As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), compõem um grupo de proteínas serina-treonina cinases que atuam na regulação de diversas funções celulares sendo conservadas evolutivamente desde organismos unicelulares à seres mais complexos.

A ativação de MAPKs tem sido observada em resposta a estresse osmótico, estresse oxidativo, exposição às citocinas e injúria tóxica (Cowan e Storey, 2003). Metais pesados, em especial o Hg, têm demonstrado afetar as vias de transdução de sinal intracelular em estudos realizados em mamíferos, dentre as quais o mercúrio aumentou a fosforilação de JNK em rim de coelhos (Turney et al., 1999) e estimulou a fosforilação de ERK1/2 e p38

em linhagem de células leucêmicas (Haase et al., 2011). Entretanto, não há estudos relacionados aos efeitos do mercúrio sobre a fosforilação de MAPKs em modelos não mamíferos, dada a relevância destas proteínas em importantes eventos celulares nestes organismos como na resposta imune e embriogênese (Stronach & Perrimon, 1999).

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e os humanos compartilham inúmeros genes, conservam vias metabólicas e sinalizadoras e, além disso, há uma crescente evidência de conservação a nível comportamental e de seus mecanismos moleculares, incluindo ritmos circadianos, aprendizagem, memória e sono, bem como, mais recentemente, estão sendo empregados como modelos animais de doenças que afetam o sistema nervoso como, por exemplo, a doença de Parkinson e Mal de Alzheimer (Nichols, 2006; Yang, 2006; Benton, 2008; Bagatini et al., 2011).

Apesar dos inúmeros estudos, os mecanismos de toxicidade do Hg não são totalmente compreendidos. Além disso, considerando a diversidade de organismos que se tornam alvo da contaminação ambiental por este metal, torna-se necessário expandir estes estudos para modelos animais não mamíferos. Alguns estudos demonstraram que *Drosophila melanogaster* pode contaminar-se por metais a partir de sua dieta, sendo o intestino do animal o principal local para a absorção de nutrientes e acumulação de metais como foi observado com o ferro, cobre e zinco (McNulty et al., 2001; Egli et al., 2006; Wang et al., 2009).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo geral investigar possíveis alterações bioquímicas e comportamentais decorrentes da exposição da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* ao HgCl₂, tendo como alvo vias de transdução de sinal intracelular bem como a atividade e expressão gênica de enzimas antioxidantes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A fim de obter mais informações sobre o potencial toxicológico, bem como os efeitos bioquímicos e comportamentais das classes de compostos de Hg em invertebrados o presente estudo objetivou investigar possíveis alterações bioquímicas e comportamentais decorrentes da exposição da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* ao HgCl₂.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da ingestão do HgCl₂ aliado à dieta de *D. melanogaster* sobre a performance locomotora;
- Avaliar o efeito da ingestão do HgCl₂ aliado à dieta de *D. melanogaster* sobre a viabilidade;
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes (Catalase, Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase e Superóxido Dismutase) em *D. melanogaster* após a ingestão de HgCl₂;
- Determinar os níveis de estresse oxidativo pela oxidação de DCF-DA em *D. melanogaster* frente à toxicidade de HgCl₂;
- Determinar a indução de lipoperoxidação em *D. melanogaster* frente à toxicidade de HgCl₂;
- Determinar os níveis de Hg em *D. melanogaster* após a exposição ao HgCl₂;
- Avaliar a expressão gênica das proteínas (MPK2, HSP83, NRF2, SOD e CAT) de *D. melanogaster* frente à toxicidade de HgCl₂, através da técnica de PCR em tempo real, com *primers* específicos e comparar estes dados com os resultados obtidos a partir da análise da atividade das enzimas antioxidantes.
- Investigar a fosforilação e expressão de proteínas MAPK, ERK, JNK e p38^{MAPK} bem como a indução de morte celular apoptótica pela exposição ao Hg(II).

3. JUSTIFICATIVA

O Mercúrio (Hg) é em um metal pesado de relevância toxicológica cujos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade inclui-se o aumento na produção de EROs, diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e modulação da fosforilação de proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), que ao mesmo tempo pode causar danos permanentes ao sistema nervoso central, rins e fígado de mamíferos. Estudos prévios de nosso laboratório apontam *Drosophila melanogaster* com um organismo que apresenta um considerável potencial para atuar como um bioindicador de contaminantes ambientais, apresentando alterações bioquímicas e comportamentais similares a efeitos observados em mamíferos. Deste modo, se faz necessário expandir este conhecimento pela investigação de possíveis alterações gênicas, comportamentais e bioquímicas em resposta à intoxicação de *D. melanogaster* com Hg (II), contribuindo assim para a elucidação dos mecanismos que medeiam a toxicidade deste metal em insetos, dada a importância destes na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, além de contribuir para uma melhor caracterização deste modelo para o estudo de toxinas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MERCÚRIO

Desde os tempos imemoriais, o mercúrio tem servido para uma série de finalidades pela humanidade (Azevedo et al., 2003). Os povos antigos já conheciam bem a forma metálica do elemento, porém não sabiam o poder toxicológico que este apresentava; para os antigos assírios, chineses, hindus e romanos o mercúrio era utilizado para tratar males como dos olhos, ouvidos, pulmões, intestinos e pele apresentando também propriedades afrodisíacas e medicamentosas que prolongariam a vida (D'itri, 1972; Damluji, 1976; Queiroz, 1995; Yamada et al., 1997). Atualmente o Hg é utilizado em diversas atividades industriais, na produção de tintas, fungicidas e eletrônicos, na medicina, em instrumentos científicos (barômetro e termômetro) (Salgado, 1996; Schoeny, 1996; Clarkson, 1997; Magos, 1997; Broussard et al., 2002; Azevedo, 2003).

O Mercúrio, elemento químico de número atômico 80, tem o símbolo Hg (derivado da palavra hidrargírio), encontra-se no grupo II B da tabela periódica de classificação dos elementos junto com o cádmio e o zinco. O Hg é um metal pesado bem estudado com alto poder de toxicidade em várias células, sistemas e órgãos (Guo et al., 1998; Silbergeld et al., 2000). No ambiente, desde meados de 1980, estudos já demonstravam que cerca de 200 toneladas de compostos de Hg são introduzidas anualmente, como efluentes de indústrias (Shaffi, 1981). Através destes indícios de toxicidade ambiental, se fez necessário o início de maiores estudos que demonstrassem os efeitos desta toxicidade em organismos vivos como, por exemplo, peixes e mamíferos (Bloom et al., 1982; Liu & Lin-Shiau, 2002). Aliado a isso se fez necessário uma análise dos níveis de Hg em pessoas que apresentavam consumo diário de peixes oriundos de regiões com ampla atividade industrial, sendo confirmado que estas tinham aumento nos níveis de Hg em 1,82 vezes acima do que aquelas que eventualmente incluíam estes a sua dieta, o que afirma a transferência e acúmulo deste metal na cadeia trófica alimentar (Latshaw et al., 2006).

A maior parte do Hg presente nos solos está fixada à matéria orgânica destes, sobretudo ao material húmico, podendo sofrer processos de eluição. Por essa razão, o

tempo de retenção do Hg no solo é longo, resultando no acúmulo deste metal, podendo ser lançado para a superfície das águas. Nas águas, a distribuição do Hg varia de acordo com a época do ano, com a profundidade das colunas de água e com os processos biológicos e químicos que podem ser efetuados (Azevedo, 2003).

Há diferentes formas do mercúrio e estas são comumente designadas “espécies”, o que é conhecido como especiação (Azevedo, 2003) sendo as mais importantes o Hg elementar (metálico), o Hg inorgânico e Hg orgânico.

4.1.1 Mercúrio Metálico

O mercúrio metálico ou mercúrio elementar (Hg^0) é a forma de Hg utilizada em grande escala na indústria (na confecção de termômetros, amálgama dental, no processo de purificação do ouro explorado pelo garimpo, e em uma variedade de outros produtos de uso industrial e doméstico). Este tipo de Hg possui uma alta capacidade de volatilização em temperatura ambiente (formando uma atmosfera de vapor de mercúrio a qual é facilmente absorvida pelos pulmões), ausência de carga elétrica e lipossolubilidade, sendo possível o Hg metálico ter um grande poder de difusão (simples difusão) nas células dos tecidos. Assim, ele atravessa facilmente as membranas celulares e pode ser transportado através das barreiras hemato-encefálica e placentária. Ao deixar o sangue, passando para os tecidos, o Hg metálico é mais rapidamente oxidado a Hg^{2+} , e este íon mercúrico tem menores possibilidades de atravessar de volta (no sentido oposto) as membranas e barreiras, por ter perdido a lipossolubilidade e ter se ligado então a proteínas celulares. A oxidação funciona, então, como uma “câmara de retenção” para o Hg, determinando sua acumulação local e a manifestação de sua toxicidade, esta que conta com o envolvimento da enzima Catalase (CAT) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, esta forma inorgânica de Hg produzida (Hg^{2+}) pode permanecer por vários anos no cérebro e outros tecidos, caracterizando assim o Hg como um elemento bioacumulativo (Hargreaves et al., 1988; Takeuchi et al., 1989; Opitze et al., 1996; Braunwald et al., 2001; Azevedo, 2003).

4.1.2 Mercúrio Inorgânico

O mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e seus derivados podem ser formados a partir do mercúrio metálico ou pela conversão de formas orgânicas de mercúrio a formas inorgânicas (Hg^{2+} e Hg^+), sendo utilizado de diferentes formas como: o calomelano (cloreto mercurioso ou Hg_2Cl_2 – muito utilizado na agricultura como fungicidas), o HgCl_2 (atualmente empregado como catalisador na indústria química, sendo então possivelmente eliminado nos efluentes líquidos industriais) dentre outras formas podendo ser encontrado em cosméticos, produtos de limpeza e outros produtos domésticos (Wood et al., 1968; Ozuah, 2000; Azevedo, 2003). As propriedades físico-químicas dos compostos mercuriais inorgânicos estão intimamente relacionadas ao ânion ao qual o metal se liga como, por exemplo, enquanto o nitrato e o sulfato de Hg possuem elevada hidrossolubilidade, o cloreto de Hg é bastante solúvel em solventes orgânicos (Azevedo, 2003).

Essa forma de Hg é facilmente absorvida por ingestão ou através da pele, mas é relativamente pouco Hg^{2+} que atravessa a barreira encefálica ou até mesmo as membranas biológicas, sendo assim excretado através da urina e/ou fezes (Takeuchi et al., 1989; Clarkson, 2002). Por isso, devido a essa dificuldade de atravessar as membranas biológicas, a forma inorgânica de mercúrio tem como principal sítio de toxicidade o meio extracelular, bem como as membranas celulares (Friberg e Mottet, 1989).

4.1.3 Mercúrio Orgânico

O MeHg (Metilmercúrio) é a principal forma orgânica encontrada na natureza, pois é formada principalmente na metilação ou biometilação do Hg metálico liberado pelas indústrias em rios e córregos por bactérias metalogênicas em processos que são considerados relativamente simples (consistem na incorporação do Hg elementar, presente no ambiente, por bactérias e organismos unicelulares pelas quais são ionizados). No entanto, o mercúrio iônico é prejudicial a essas bactérias, que tentam eliminá-lo através da metilação, transformando-o em MeHg que por ser lipossolúvel é mais facilmente eliminado por organismos unicelulares (Wasserman et al., 2001).

O etilmercúrio ($C_2H_5Hg^+$) é outra forma de mercúrio orgânico, muito conhecida e utilizada popularmente, o qual era encontrado no medicamento timerosal (Mertiolate), de uso tópico utilizado como anti-séptico (Braunwald et al., 2001), cuja industrialização e dispensação foi recentemente proibida. Já o dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$), uma forma “supertóxica” de Hg encontrada quase que exclusivamente em laboratório é absorvido facilmente através da pele. Porém, de um modo geral as formas orgânicas de mercúrio não têm boa absorção cutânea, sendo melhores absorvidas por inalação e ingestão (Braunwald et al., 2001).

4.1.4 Exposição ao Hg e Mecanismos de Toxicidade

Agentes tóxicos são substâncias químicas capazes de causar danos a quaisquer sistemas biológicos, seja alterando seu funcionamento ou até mesmo causando a morte em certos tipos de exposição (Oga et al, 2008). A exposição ambiental e ocupacional a metais pesados como mercúrio, cádmio, cromo e chumbo é considerada uma grande preocupação nos dias de hoje (De Celis et al., 1996).

O Hg ocorre normalmente em concentrações pequenas, ao longo da biosfera, atmosfera, litosfera e hidrosfera, havendo fluxo contínuo deste metal ao longo destes diferentes compartimentos através de um ciclo biogeoquímico (Azevedo, 2003). A longa permanência na atmosfera de vapor Hg^0 e sua oxidação para a forma solúvel inorgânica Hg (II) é considerada uma causa de contaminação de grandes quantidades de água e do solo por este metal e, onde, conseqüentemente, se dá a bioacumulação em cadeias alimentares (ex. plâncton – peixes herbívoros – peixes carnívoros – homens ou animais) (Klaassen, 1996; Johannesson, 2002).

A exposição a compostos de Hg pode causar efeitos adversos sobre os organismos como: ser prejudicial à função reprodutiva masculina alterando a função da espermatogênese, induzir dano celular em vários tipos celulares (células renais, astrócitos, células de linfoma, fibroblastos humanos e de células gengivais, células do epitélio alveolar e de ilhotas pancreáticas) (Mohamed et al., 1987; Reichl et al., 2001; Khan et al., 2004; Chen et al., 2006; Reichl et al., 2006; Park et al., 2007; Yin et al., 2007; Yole et al., 2007; Rao & Gangadharan, 2008).

Em especial, o cloreto de Hg (HgCl_2) quando presente no sangue em baixas concentrações o Hg é transportado unido à alfa-globulina, mas quando em concentrações mais elevadas, em que ocorre saturação da alfa-globulina, o Hg associa-se à albumina (Lu et al., 1972). Do sangue, o Hg atinge os tecidos e é encontrado nos organismos (homens e animais) causando danos permanentes ao sistema nervoso central, rins e fígado (Larini et al., 1997; Azevedo, 2003; Crespo-López et al., 2005).

A toxicidade relativa dos sais inorgânicos de Hg está muito vinculada a suas taxas de absorção. Após exposições aguda ou crônica de animais ou homens, seja por via intravenosa, subcutânea ou oral, as maiores concentrações de Hg são encontradas nos rins e depois no fígado. Essa distribuição justifica a evidência clínica de o rim ser um órgão crítico depois de exposições agudas ao Hg inorgânico (Lu et al., 1972). A retenção renal prolongada do Hg provavelmente se deve ao complexo que este metal forma, neste órgão, com a metalotioneína. O Hg estimula a síntese desta proteína, que é conhecida por ser a transportadora de metais no organismo, sendo associado a isso um processo de proteção renal pela ligação com o Hg (Mehra & Kannar, 1979; Doull et al., 1986). No entanto, essa capacidade dos rins de acumular Hg é limitada, pois a complexação tende a saturar com o aumento das doses (Morcillo & Santamaría, 1996). Os íons de Hg têm a capacidade de formar complexos muito fortes com os grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) das proteínas (presentes no aminoácido cisteína), afetando vários processos entre eles a formação do fuso mitótico causando a perda de cromossomos durante as divisões celulares, estando assim este processo diretamente ligado a genotoxicidade do Hg (Thier et al., 2003; Stoiber et al., 2004; Bonacker et al., 2005; Su et al., 2008).

O SNC (Sistema Nervoso Central) é um alvo para a toxicidade de diferentes compostos de Hg, inorgânicos e orgânicos, alterando parâmetros relacionados à função sináptica e causando deficits comportamentais e neuropatológicos (Clarkson, 1997). Na intoxicação crônica pelo Hg, têm sido observado sinais e sintomas característicos como mudanças comportamentais, tremores anormais (semelhantes aos encontrados em pacientes com Mal de Parkinson – o que determina o Parkinsonismo) e reflexos exagerados, polineuropatias e uma síndrome semelhante à esclerose lateral amiotrófica, distúrbios sensoriais, ataxia, disartria e dificuldades auditivas e visuais (Azevedo, 2003). Junto a isso, a intoxicação por Hg inorgânico parece estar relacionada a alterações no ciclo do sono:

tanto pode haver insônia quanto o paciente dormir por longos períodos (Cardoso et al., 2002).

O Hg é eliminado do organismo dos mamíferos pelos rins, fígado (via bile), mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, pele e leite (Swift, 1997). O mecanismo de eliminação pelas glândulas sudoríparas ainda não foi bem elucidado, como acontece para outros metais pesados (por exemplo, o arsênio e o chumbo) (Azevedo, 2003).

A toxicidade do Hg em organismos não mamíferos, todavia ainda são poucos explorados em se tratando de insetos. Todavia, a exposição do Hg em diversos organismos demonstrou alterações no desenvolvimento de mosquitos (*Chironomus riparius*) e nematóides (*C. elegans*), aumento na mortalidade e teratogenicidade de peixes, efeitos neurotóxicos em modelos animais e humanos e induziram efeitos genotóxicos na mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) (Franco et al., 2007; Carmona et al., 2008; Azevedo-Pereira & Soares, 2010; Nakano, 2010; Wu et al., 2010; Huang et al., 2011).

Portanto, estudos que investiguem alterações gênicas, comportamentais e bioquímicas em resposta à intoxicação por Hg em modelos experimentais não mamíferos, como na mosca *D. melanogaster*, se fazem cada vez mais necessários a fim de contribuir para a elucidação dos mecanismos que medeiam esta toxicidade em diversos tipos de organismos vivos, dada a importância que cada um apresenta na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas. Além disso, pesquisas com insetos contribuem para uma melhor caracterização de novos modelos alternativos para o estudo de toxinas e agentes tóxicos, sendo modelos economicamente acessíveis, de fácil manipulação e de menores implicações no ponto de vista ético.

4.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Os Radicais livres (RL) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (Gillhan et al., 1997). Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Gillhan et al., 1997; Sies, 1997).

Em condições fisiológicas normais, as ERO podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (Halliwell, 1994; Biesalski, 2002). Porém, quando produzidas em excesso podem ocasionar uma grande variedade de reações deletérias no organismo podendo assim lesionar diferentes estruturas celulares como exercer efeitos citotóxicos sobre os fosfolípidios de membrana resultando em peroxidação lipídica, oxidação protéica e alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Allen, 1998; Ananthan et al., 2003; Seven et al., 2004; Oga et. al, 2008). No entanto, esse aumento na sua produção e/ou diminuição na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, e caracteriza o estresse oxidativo que quando aliado a exposição ao Hg leva a mutações, danos a biomembranas e biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lipídios) ocasionando, conseqüentemente, morte celular por apoptose (Finkel & Holbrook, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2000; Junqueira & Ramos, 2005).

Além dos antioxidantes naturais oriundos da dieta, as células possuem a capacidade de detoxificação de EROs específicas, ajudando a manter os níveis fisiológicos destas espécies reativas. Como principais antioxidantes endógenos temos a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutaciona peroxidase (GPx) e a glutaciona reduzida (GSH), sendo que estas biomoléculas fazem a detoxificação de EROs e ERNs (Halliwell & Gutteridge, 2000).

A enzima CAT atua na remoção de H_2O_2 estando relacionada a diversas patologias ligadas ao EO como neoplasias e doenças neurodegenerativas. Esta enzima possui o mais alto poder de catálise conhecido dentre as enzimas, dismutando o H_2O_2 em oxigênio e água diminuído assim sua permanência nas células (Rojkind et al., 2002; Klichko et al., 2004). Em modelo de *D. melanogaster*, a superexpressão do gene da CAT apresentou um modesto efeito protetor contra o EO, porém não alterou a expectativa de vida destes organismos, confirmando que a superexpressão da enzima CAT pode estar associada a efeitos protetores nas moscas desta espécie (Orr & Sohal, 1992).

A enzima SOD possui por função catalisar a dismutação do radical superóxido; a GPx, catalisar a redução de H_2O_2 através da glutaciona reduzida (GSH) para formação de água e glutaciona oxidada (GSSH) (Oga et. al, 2008). A GST é uma enzima importante,

pois ela causa a polarização de xenobióticos, tornando-os mais solúveis para sua eliminação pelos organismos, como, por exemplo, em insetos a maioria dos estudos relacionados à GST diz respeito ao papel desta enzima no aumento da resistência destes animais aos inseticidas (Townsend et al., 2003).

4.2.1 Estresse Oxidativo e Hg

O estresse oxidativo (EO) tem demonstrado possuir um papel importante nos mecanismos implicados à toxicidade do Hg, neste caso, podendo ser induzido por uma depleção de compostos tióis (principalmente GSH), por inibição de enzimas antioxidantes, ou ambos, causando danos celulares a biomoléculas e peroxidação lipídica (Leonard et al., 2004; Franco et al., 2007).

O HgCl_2 pode formular complexos organomercuriais com proteínas, estando este fato associado a toxicidade deste metal, podendo assim desencadear uma situação de EO (El-Shenawy & Hassan, 2008; Yang et al., 2011). Além disso, após a exposição ao Hg estudos já relataram que houve eventos como: a diminuição dos níveis de GSH em diferentes tecidos e atividade das enzimas GPx e GR em camundongos e peixes, danos na peroxidação lipídica e redução da atividade da CAT e GPx em bivalvos, a alteração no desenvolvimento de nematóides machos aliado a alta produção de EROs e o desenvolvimento de danos renais e hepatotoxicidade em ratos (Monteiro et al., 2010; Ahmad et al., 2011; Liu et al., 2011; Yang et al., 2011; Deng et al., 2011).

4.3 MAPKs

As MAPKs compõem um grupo de proteínas membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógeno (serina-treonina cinases) que atuam na regulação de diversas funções celulares sendo conservadas evolutivamente desde organismos unicelulares à seres mais complexos (Nebreda & Porras, 2000).

Apenas recentemente, o estudo da modulação da fosforilação de proteínas MAPKs em organismos submetidos a estresse ambiental tem recebido atenção especial. MAPKs representam uma família de proteínas altamente conservadas entre diferentes espécies e

desempenham importantes funções regulatórias na fisiologia das células, sendo envolvidas em processos como morte celular, proliferação, diferenciação e resposta adaptativa (Chang e Karin, 2001; Leal et al., 2006). Dentre os membros desta família de proteínas inclui-se a proteína quinase regulada por estresse extracelular (ERK1/2), c-Jun N-terminal quinase (JNK) e a p38. Quando duplamente fosforiladas em resíduos de treonina e tirosina estas proteínas são ativadas podendo então fosforilar e ativar outros componentes em sua via de transdução de sinal (Chang e Karin, 2001). A ativação de MAPKs tem sido observada em resposta a estresse osmótico, estresse oxidativo, exposição às citocinas e injúria tóxica (Cowan e Storey, 2003).

4.3.1 MAPKs e metais

Os sistemas de sinalização intracelular respondem aos sinais extracelulares através da modificação da atividade de proteínas cinases e fosfatases, regulando o estado de fosforilação de proteínas alvo, modulando processos de proliferação, diferenciação, morte celular, neurogênese, neurotransmissão e neuroplasticidade (Chang & Karin, 2001; Greengard, 2001; Kandel, 2001; Leal et al., 2002b; Leal et al., 2004; Thomas & Huganir, 2004; Wong & Scott, 2004). A alteração destes sistemas por diversos insultos incluindo, estresse oxidativo, hipóxia, excesso de glutamato e drogas e agentes tóxicos como os metais, pode induzir o aparecimento de diversos distúrbios no organismo inclusive no SNC (Grandjean & Landrigan, 2006; Monnet-Tschudi et al., 2006). Neste sentido, tem sido destacada a capacidade de diversos metais, como chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), zinco (Zn) e manganês (Mn), produzirem alterações do desenvolvimento e de predispor, ou causarem, processos neurodegenerativos como Parkinson e Alzheimer (Okuda et al., 1997; Costa et al., 2004; Basha et al., 2005; Bolin et al., 2006; Coon et al., 2006; Monnet-Tschudi et al., 2006; Roos et al., 2006; Yokel, 2006; Erikson et al., 2007; Verina et al., 2007).

Nos vertebrados, tem sido demonstrada que as vias de sinalização celular dependentes de MAPKs são alvos modulados por metais como o Hg, Pb, Cd, Zn e Mn (Turney et al, 1999; Leal et al., 2002a; Cordova et al., 2004; Leal et al., 2006; Leal et al., 2007; Franco et al., 2008; Posser et al, 2007, 2010). O Hg, em especial, aumentou a

fosforilação de JNK em rim de coelhos, estimulou a fosforilação de ERK1/2 e p38 em linhagem de células leucêmicas (Turney et al., 1999; Haase et al., 2011).

Em invertebrados, MAPKs participa de inúmeros processos durante o desenvolvimento normal, assim como na regulação da resposta imune (Stronach e Perrimon, 1999). Entretanto, não há estudos relacionados aos efeitos do Hg sobre a fosforilação de MAPKs em modelos não mamíferos como, por exemplo, *Drosophila melanogaster*, dada a relevância destas proteínas em importantes eventos celulares nestes organismos como na resposta imune e embriogênese (Stronach & Perrimon, 1999).

4.4 *Drosophila melanogaster*

O inseto *D. melanogaster*, é popularmente conhecido como mosca da fruta sendo pertencente à Ordem Díptera e a Família Drosophilidae. É um modelo biológico muito utilizado em análises genéticas. Todavia, é muito reconhecido por sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas sendo considerado um bioindicador para detecção de poluentes, para a realização de ensaios que visem testar a ação biológica de substâncias naturais, representando um bom modelo de investigação de mecanismos envolvidos em doenças do sistema nervoso (Nichols, 2006; Yang, 2006).

Pesquisas já descritas na literatura demonstram que a mosca da fruta possui homologia entre cinco dos seis genes relacionados à Doença de Parkinson com humanos (Whitworth et al. 2006). Além disso, *D. melanogaster* e humanos conservam vias metabólicas e sinalizadoras em comum, havendo uma crescente evidência de conservação de mecanismos de regulação de ritmos circadianos e processos de aprendizagem e memória (Benton, 2008). Neste sentido, a busca de modelos animais economicamente acessíveis e de fácil manipulação que demonstrem resultados positivos em relação à toxicidade, a *D. melanogaster* é um bom representante que pode ser submetido a diferentes protocolos de exposição a partir de sua dieta, como já previamente demonstrado em estudos que se baseiam na investigação dos efeitos tóxicos do ferro, cobre e zinco (McNulty et al., 2001; Egli et al., 2006; Wang et al., 2009).

Geotaxia é a tendência que os seres vivos apresentam em se dirigir a favor da ação da gravidade (geotaxia positiva) ou contra ela (geotaxia negativa). Alguns insetos, como a

D. melanogaster apresentam o comportamento de geotaxia negativa. Este comportamento quando afetado, reflete déficits locomotores importantes que podem ser causados por exposição a diferentes agentes (Gargano et al., 2005).

5. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito, o qual está disposto na forma em que foi submetido para publicação.

Manuscrito

Submetido à Environmental Toxicology

Effects of Hg(II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant systems in
D. melanogaster.

¹Paula, M.T.; ²Zemolin, A.P.; ¹Vargas, A.P.; ³Golombieski, R.M.; ³Loreto, E.L.S.;
²Saidelles, A.P.; ¹Picoloto, R.S.; ¹Flores, E.M.M.; ¹Rocha, J.B.T.; ²Franco, J.L.; ^{*2}Posser, T.

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil
(thaisposser@hotmail.com)

²Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul 97300-000, Brazil

³Laboratório de Biologia Molecular de Drosophila e Sequenciamento (LabDros), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Corresponding author:

Thaís Posser

Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel

Avenida Antônio Trilha 1847, Centro, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil,

CEP 97300-000

Email: thaisposser@unipampa.edu.br

Abstract

Mercury is a toxic heavy metal used in many industrial activities. This fact has been related with the contamination of water and soil, exposing different species to this metal. The molecular mechanisms involved in organic and inorganic forms of Hg toxicity have been well demonstrated in vertebrates, however little is known about possible toxicological effects of this metal in invertebrates. In this aspect, the present study aimed to investigate the effects associated with the exposure of *D. melanogaster* to an inorganic form of Hg(II) on survival/ locomotor performance and biochemical parameters as antioxidant status, MAPK phosphorylation and gene expression. Our results demonstrated that intake of Hg(II) by *D. melanogaster* for 48 h through the diet, caused a significant increase in flies mortality and affected locomotor skills. In parallel, it was observed an inhibition of acetylcholinesterase (Ache) activity as well as glutathione S transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD). No alteration in the levels of mRNA for antioxidant enzymes or NRF-2 was detected. Hg(II) exposure significantly modulated the phosphorylation levels of JNK1/2 and ERK1/2, without altering p^{38MAPK}. As an indicative of cell stress associated to Hg(II) toxicity, treated flies presented elevated expression of HSP83 mRNA and PARP cleavage highlighting the presence of apoptotic cell death. Together, these data contribute to clarify and extend the knowledge about molecular mechanisms mediating Hg(II) toxicity and point *D. melanogaster* as sensitive organism to Hg contamination.

Keywords: Mercury, *Drosophila melanogaster*, antioxidant defenses, MAPKs, PARP.

INTRODUCTION

Mercury (Hg) is naturally present in the earth's crust constitution. Mobilization of this metal by human activities is considered the main responsible for release of this metal to the environment. Hg can be found as elemental (Hg^0), inorganic [Hg(II)] and organic forms (methylmercury - MeHg). The last two forms present important toxicological relevance for vertebrates due their high absorption rate and distribution to different tissues (Aschner and Aschner, 1990; Jarup, 2003).

Permanent damage to the Central Nervous System followed by neurological and psychological symptoms has been attributed to intoxication by organic and inorganic forms of Hg in rodents (Jarup, 2003). In this regard, there is a lack of studies addressing the effects of mercury in *D. melanogaster*, although recently has been shown that this organisms are susceptible to intoxication by inorganic and organic forms of Hg along the larval phase, causing genotoxicity (Carmona et al., 2008). Regarding the mechanisms implicated in Hg toxicity, an important role has been attributed to oxidative stress (OS) which may arise from depletion of thiol compounds (mainly GSH), inhibition of antioxidant enzymes, or both (Franco et al., 2007) causing cell injury, damage to biomolecules and lipid peroxidation (Leonard et al., 2004).

Mitogen activated protein kinases (MAPKS) compose a family of serine/threonine protein kinases that are implicated in the regulation of several cellular events as differentiation, proliferation, cell death, adaptive and immune responses (Johnson and Lapadat, 2002). Members of MAPK family include the Extracellular Activated Protein Kinase (ERK 1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2) and 38 kDa kinase (p38MAPK). The function and regulation of these proteins have been well conserved from unicellular to complex organisms (Johnson and Lapadat, 2002). Activation of MAPK occurs in response to hyperosmotic stress, cytokine exposure and toxic injury (Harper and Lograsso, 2001; Kaminska, 2005). In vertebrates, it has been well demonstrated a modulation of MAPKS activity in response to metals like mercury, lead and manganese (Turney et al., 1999; Posser et al., 2007, 2010). In invertebrates, MAPK participates in numerous processes during normal development as well as in regulation of immune response (Stronach and

Perrimon, 1999). However, little is known about the modulation of MAPK cascade by toxicants in *D. melanogaster*.

The fruit fly *Drosophila melanogaster*, belongs to the order Diptera and family Drosophilidae. This insect retain a rapid reproductive cycle being easily maintained and handled, thus presenting some advantages over other organisms for the use on in vivo bioassays. Such organism has provided a powerful system to elucidate fundamental cellular pathways involved in developing and functioning of nervous system as well as mechanisms of toxicity by heavy metals, nanoparticles and insecticides showing high sensitivity to these compounds (Ahamed et al., 2010; Bonilla-Ramirez et al., 2011).

In this aspect, the present study was performed to investigate the biochemical responses attributed to intoxication with inorganic Hg(II) in *D. melanogaster*, thus extending the knowledge about molecular targets of Hg in organisms beyond vertebrates and contributing for validation of this model for toxicological studies.

MATERIAL AND METHODS

Drosophila stock and culture

Drosophila melanogaster (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. The flies were reared in 2.5 cm x 6.5 cm bottles containing 10mL of agar, corn meal, water, dried yeast medium at constant temperature and humidity (25 °C ± 1 °C and 60% relative humidity).

Treatment schedule

It was isolated 20 adults flies per group and placed in a vial containing filter paper soaked in 2M sucrose solution with or without dissolved Hg(II) and maintained in this conditions for 24 and 48 h. HgCl₂ solution was replaced every 24 h. Finished the periods of treatment, behavioral and biochemical analysis were carried out.

Samples preparation

For enzymes and GSH levels analysis, 20 flies per group (whole body) were homogenized in 0.02 M HEPES pH 7.0 and centrifuged at $1000 \times g$. An aliquot of the supernatant (S1) was used for measurements of cholinesterase, and the remaining S1 was centrifuged at $20.000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant (S2) was isolated and utilized for measurements of antioxidant enzyme activity.

Western blotting was performed according to Franco et al., (2010) with minor modifications. Thirty flies were homogenized at 4 °C in 300 μ L of buffer (pH 7.0) containing 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 20 mM Na_3VO_4 , 100 mM sodium fluoride and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, MO). The homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatants (S1) collected. After protein determination, β -mercaptoethanol was added to samples to a final concentration of 8%. Then samples were frozen at -80 °C for further determination of phosphorylated and total forms of p38^{MAPK}, ERK, JNK and PARP cleavage. Protein levels were quantified according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Locomotor assay

Locomotor ability was determined by the negative geotaxis assay as described by Coulomn and Birman (2004), with some modifications. For the assays, 20 flies (7 days) were anesthetized and placed separately in vertical glass columns (length, 25 cm; diameter, 1.5 cm). After 30 min recovery, flies were gently tapped to the bottom of the column and the time required to reach 8 cm in the columns was registered. At least 10 individual flies were tested by day of experiment for each treatment group. The assays were repeated five times at 1 min intervals. Results are presented as mean \pm SE obtained in three independent experiments. In parallel to individual performance, in a second experiment, 20 flies were gently tapped to the bottom to the same glass column and after 1 min, the number of flies that reached the top of the column and flies that remained at the bottom were counted in separate. The results represent the mean \pm SE of the numbers of flies at the top and at the

bottom of at least 3 individual experiments and are expressed as percentages of the total number of flies.

Determination of oxidative stress and lipid peroxidation

The lipid peroxidation end products were determined in the samples by the method of Ohkawa et al. (1979) as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) with minor modifications. For in vitro lipid peroxidation, after centrifugation, the S1 fraction obtained from different group of treatments were incubated with 0.45 M acetic acid/HCl buffer pH 3.4, 0.28% thiobarbituric acid, 1.2% SDS, and thereafter at 95 °C for 60 min to promote color reaction, measured at 532 nm. Malondialdehyde (ranged from zero to 3 nmol) was used as a standard. The results represent a mean of 5 independent experiments done in duplicates. The TBARS values were normalized by protein concentration. The results were expressed as nmol TBARS/min/mg tissue at 37°C using molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As a general index of oxidative stress, it was used the compound DCFDA (Pérez-Severiano et al., 2004). The fluorescence emission of DCF resulting from DCFDA oxidation was monitored at regular intervals at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 in a Cytofluor Series 4000 multiwell fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Bedford, CA). The amount of DCF formed was calculated based on a calibration curve constructed using authentic DCF standard. The rate of DCF formation was calculated as a percentage of the DCF formation in the sucrose-treated control group.

Enzyme assays

Glutathione peroxidase (GPx), EC 1.11.1.9, activity was measured indirectly by monitoring the consumption of NADPH at 340 nm according to Wendel (1981) using the t-BOOH as a substrate. Glutathione transferase (GST), EC 2.5.1.18, activity was assayed by the procedure of Jakoby and Habig (1981) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate. Catalase (CAT), EC 1.11.1.6, activity was measured according to Aebi and Lester (1984). Superoxide dismutase (SOD), EC 1.15.1.1, activity was evaluated according with Kostyuk

and Potapovich (1989). Acetylcholinesterase activity was measured according to Ellman et al. (1961).

Metal content determination

For determination of metal levels in *D. melanogaster*, after Hg(II) exposure at 100 μM for 48 h, approximately 200 flies per group (control and treated group) were weighed and digested with HNO_3 using a model Multiwave 3000 microwave oven equipped with high-pressure quartz vessel (max 80 bar, 280°C, Anton Paar, Graz, Austria). After digestion, samples were diluted with water to 25mL and transferred to graduated polypropylene vials, it was obtained clear and colorless solutions. Blanks were run and analyzed after each 10 measurements in order to check eventual memory effects for all elements. Mercury was determined using a CV continuous flow (CF) system, built according to previous work (Kaercher et al., 2005), coupled to ICP-MS and using a CF instead of flow injection. Briefly, it consists of a CV system, composed by a peristaltic pump (Gilson, Miniplus, France), a manual injector and a U-type gas-liquid separator. Tygon® pump tubings with 1.14 mm i.d. were used to transport 0.1% (w/v) NaBH_4 and sample solutions and 1.69 mm i.d. tubings were used for 1.0 mol L^{-1} HCl transfer. Water was used as sample carrier and samples were on line mixed with 1.0 mol L^{-1} HCl using a T-type connector (0.8 mm i.d.) and carried to another T-type connector (0.8 mm i.d.). After, the NaBH_4 solution was also on line mixed. The mixture was pumped to the gas-liquid separator and Hg was measured by ICP-MS. The results were expressed in μg of Hg/g of dried weight tissue.

RT-PCR analysis

Approximately 2 Tg of total RNA from 20 young flies was extracted using the Trizol Reagent (Invitrogen) accordingly to the manufacturer's suggested protocol. After quantification, total RNA was treated with DNase I (Invitrogen). The cDNA was synthesised with M-MLV reverse transcriptase enzyme and random primer (Invitrogen) accordingly to the manufacturer's suggested protocol. Quantitative real-time polymerase chain reaction

were performed in 20 μ L PCR mixtures containing 1x PCR Buffer, 25TM dNTPs, 0,2TM of each primer, 3mM MgCl₂, 0,1x SYBR Green I (Molecular Probes) and 0,5U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The thermal cycle was carried StepOnePlus (Applied Biosystems) and protocol used was the following: activation of the Taq DNA polymerase at 95°C for 5 min, then 40 cycles of 15 s at 95°C, 15 s at 60°C and 25 s at 72°C. All samples were analyzed as technical triplicates with a notemplate control also included. Threshold and baselines were manually determined using the StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems).

Data Analyses of RT-PCR

SYBR fluorescence was analyzed by StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems), and the CT value for each sample was calculated and reported using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). For each well, analyzed in quadruplicate, a ΔC_T value was obtained by subtracting the Actin and GPDH C_T value from the C_T value of the interest gene (sequences of tested genes are represented in table 1). The ΔC_T mean value obtained from the control group of each gene was used to calculate the $\Delta\Delta Ct$ of the respective gene ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using a one or two way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Differences were considered to be significant at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

In the present study, flies (*D. melanogaster*) were exposed to HgCl₂ for 24 and 48 hours (at 30, 100 μ M and 300 μ M) through the diet which consisted of sucrose solution containing dissolved HgCl₂. As observed in figure 1A, 24 h of exposure to Hg(II) caused a significant decrease in fly survival only at highest concentration, however, from 48 h of Hg(II) exposure, it was observed a 30 % decrease in fly survival, at 30 μ M and a 50 %

decrease was reached at 300 μM . Locomotor performance of flies submitted to HgCl_2 was analyzed. As observed in figure 2 (A), flies treated with Hg(II) (100) μM for 48 h took longer to achieve 8 cm in the vials and additionally, most treated flies remained at base of flasks when tapped to the bottom of tubes, compared to control groups (2B). Flies treated with 300 μM of HgCl_2 took more than the maximum time of observation (2 min) to climb 8 cm over the flask or were unable to climb, thus they were not registered in this experiment. Both assays pointed to an important locomotor deficit in response to the metal. These effects were followed by a significant inhibition in the activity of enzyme acetylcholinesterase (figure 2C).

Oxidative stress is considered a main mechanism implicated in Hg(II) toxicity in vertebrate models. However there is a lack of studies addressing the mechanisms of toxicity of Hg(II) in insects. In this work, based on the effects promoted by Hg(II) on fly survival and locomotor deficits, it was investigated the end products of lipid peroxidation and oxidative stress in response to Hg(II) 100 μM after 48 h. As observed in figure 3, a significant induction in lipid peroxidation was observed as early as 6 hours of treatment with Hg(II) , these effects remained increased up to 48 hours (figure 3B). Induction of oxidative stress was analyzed by DCF oxidation, which represents a general index of oxidative stress. At figure 3A it is possible to observe an increase in oxidative stress even in earlier periods, however this effect was significant only after 48 hours of exposure.

The antioxidant status of flies was evaluated by measurement of the activity of antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione S transferase (GST) in response Hg (48h; 100 μM). As shown in table 2, the level of activity of GPx and SOD was significantly inhibited, while that catalase activity was no altered. The RNAm levels of SOD and catalase as well as NF-E2-related factor 2 (Nrf2) was not changed when compared with respective control as investigated by RT-PCR (figure 5).

In this work it was analyzed the uptake and accumulation of Hg(II) in flies followed exposition to Hg(II) . The levels of Hg(II) was estimated in Tg/g of dry weight tissue. As observed in the table 2, the levels of Hg(II) was 100 times improved after 48 h of treatment with HgCl_2 at 100 μM .

MAPKs proteins are well conserved between eukaryotic organisms where they mediate several responses in the cells (Tibbles and Woodgett, 1999). In this aspect phosphorylation of p38^{MAPK}, JNK and ERK was evaluated in response to 48 h Hg(II) 100 TM. As observed in figure 4, a significant increase in phosphorylation levels of JNK and ERK was induced while that no alterations in p38^{MAPK} phosphorylation was verified. It was also observed cleavage of protein PARP in a smaller fragment of 89 kDa highlighting the activation of apoptotic cascade by this metal. Molecular chaperones such as the heat shock family of stress proteins (HSPs) participate in a range of cellular processes, including cytoprotection (Benjamin and McMillan, 1998). In this regard, Hg(II) induced a 10 fold increase in HSP83 RNAm levels (Figure 5D).

DISCUSSION

Heavy metals have been used by humans for thousands of years and although their toxicity has been well reported, exposure to these elements has increased mainly in less developed countries (Jarup, 2003). Mobilization of Hg from natural sources accounts for contamination of water and soil leading to absorption by live organisms being incorporated in the chain food (Walters et al., 2011). High levels of mercury are associated with hepatotoxicity, nephrotoxicity and neurological damage in rodents and humans (Jan et al., 2011; Ceccatelli et al., 2010).

The use of alternative animal models for toxicological studies has contributed for a better comprehension and reinforcement of demonstrated mechanisms of toxicity of chemical compounds. Moreover, these models have contributed to extend the knowledge about molecular targets and susceptibility of non-mammal organisms to the presence of toxicants in the environment. In this regard, this study was carried out to investigate the effects of 24/48 h of Hg(II) exposure on antioxidant system, MAPKs cell signaling pathways, apoptotic cell damage and gene expression in *D. melanogaster*. Previous studies reported that exposure of *D. melanogaster* to Iron (Fe), manganese (Mn) and Copper (Cu) represents a model for study of Parkinson disease, since these elements induced locomotor deficits associated with neuron degeneration in these organisms after 72 h from concentration of 500 μ M (Bonilla-Ramirez et al., 2011).

Herein we showed that in a similar protocol of contamination, Hg(II) caused a decrease in fly survival even after 24 h of exposure (at 300 μ M) or after 48 h at lower concentration and caused a 80 times increase in Hg(II) intracellular levels followed by a dysfunction in locomotor skills as evaluated by negative geotaxis. All these effects occurred in parallel with inhibition of Ache activity. These data are in agreement with previous studies correlating acetylcholinesterase inhibition and locomotor deficits in invertebrates (Xuereb et al., 2009). An in vitro inhibition of *D. melanogaster* acetylcholinesterase by Hg(II) at mM concentrations (Frasco et al., 2007) was previously observed. The present study reports the in vivo inhibition of this enzyme by Hg(II) in concentration at order of μ M, this fact attributes to Ache a potential to be used as a biomarker to Hg polluted areas.

The transcriptional factor Nrf2 plays an important role in the activation of antioxidant and detoxifying enzymes such as SOD, catalase and GPx, by regulating their transcription (Vries et al., 2008). Thus we have examined a possible alteration of Nrf2 transcription factor gene expression, which acts upon the antioxidant response element (ARE) regulating antioxidant genes (Toyama et al., 2007) in response to Hg exposition. In this study, it was not observed any alteration in expression of NRF-2, as well as the enzymes SOD or catalase, pointing to a post translational effect of Hg on activity of these enzymes. Earlier work demonstrated that ectopic expression of NRF-2 transcription factor enhances embryonic development in the presence of MeHg (Rand et al., 2009), emphasizing a protective role for NRF-2 against Hg toxicity.

MAPKs are proteins that participate of important cell signaling pathways, mediating several cell responses (differentiation, death, survival). It has been demonstrated that MAPKs pathways are modulated by metals, mediating many effects attributed to these elements as in vivo as in vitro. In spite of this, there is a lack of studies investigating the involvement of these kinases in toxic effect of Hg after in vivo exposure (Assefa et al., 2011). The protein ERK regulates preferentially cell growth and cell differentiation and its activation has been associated with oxidative stress (Ho et al., 2007; Posser et al., 2009), while JNK and p38^{MAPK} activation are mainly involved in apoptosis, inflammation or differentiation process (Matsuoka and Igisu, 2002). Mercury chloride has been shown to increase JNK phosphorylation in LLC-PK1 cells (Matsuoka and Igisu, 2002). P38^{MAPK} and

JNK phosphorylation have been related with apoptotic cell death induced by Hg exposure in human kidney cell human (Hao et al., 2009).

This study shows that Hg contamination affects biochemical and behavioral parameters in a well characterized model of insect showing that other organisms than vertebrates are potential targets for heavy metal contamination. Moreover, this study reinforces the use of *D. melanogaster* as a model for toxicological analysis, including Hg exposure.

Acknowledgements

This research was supported by CNPq (# 483395/2009-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais – INCTAPA”. MTP is recipient of CNPq scholarship (# 556081/2010-2).

REFERENCES

- Aebi H, Lester P. 1984. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*: Academic Press. 13:121-26.
- Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ. 2010 Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242(3):263-269.
- Aschner M, Aschner JL. 1990. Mercury neurotoxicity: mechanisms of bloodbrain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 14(2):169-76.
- Assefa S, Curtis J, Sethi S, Davis R, Chen Y, Kaul R. 2011. Inorganic mercury exposure in prairie vole (*Microtus ochrogaster*) alters the expression of toll-like receptor 4 and activates inflammatory pathways in the liver in a sex-specific manner. *Human & experimental toxicology*.
- Benjamin IJ, McMillan DR. 1998. Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research* 83(2):117-132.

Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. 2011. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster* a model to study Parkinsonism. *BioMetals* 24(6):1045-1057.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7(72):248-254.

Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-490.

Carmona ER, Kossatz E, Creus A, Marcos R. 2008. Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. *Chemosphere* 70(10):1910-4.

Ceccatelli S, Daré E, Moors M. 2010. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 188(2):301-308.

Coulom H, Birman S. 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 24(48):10993-8.

Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7(2):88-95.

Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG and others. 2007. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20(12):1919-26.

Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, Bainy AC, Marques MR, Dafre AL, Farina M. 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free radical biology & medicine* 47(4):449-57.

Frasco MF, Colletier JP, Weik M, Carvalho F, Guilhermino L, Stojan J, Fournier D. 2007. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *The FEBS journal* 274(7):1849-61.

Hao C, Hao W, Wei X, Xing L, Jiang J, Shang L. 2009. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicology in Vitro* 23(4):660-666.

Harper SJ, LoGrasso P. 2001. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cellular Signalling* 13(5):299-310.

Ho Y, Logue E, Callaway CW, DeFranco DB. 2007. Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct brain regions following global ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 145(1):248-55.

Jan A, Ali A, Haq Q. 2011. Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Journal of postgraduate medicine.* 57:72-77.

Jarup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 68:167-82.

Jakoby WB, Habig WH. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods in enzymology* 77:218-31.

Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298(5600):1911-2.

Kaercher LE, Goldschmidt F, Paniz JNG, Flores EMM, Dressler VL. 2005. Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell. *Spectrochim. Acta. Part B* 60:705-710.

Kaminska B. 2005. MAPK signalling pathways as molecular targets for antiinflammatory therapy— from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1754(1-2):253-262.

Kostyuk VA, Potapovich AI. 1989. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry international* 19(5):1117-24.

Leonard SS, Harris GK, Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 37(12):1921-42. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95(2):351-8.

Perez-Severiano F, Rodriguez-Perez M, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sanchez-Garcia A, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Aguilera P and others. 2004. SAllylcysteine, a garlic-derived antioxidant,

ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry international* 45(8):1175-83.

Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, Neto VM, Leal RB. 2007. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Archives of toxicology* 81(6):407-14.

Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Franco JL. 2010. Human neuroblastoma cells transfected with tyrosine hydroxylase gain increased resistance to methylmercury-induced cell death. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24(6):1498-503.

Posser T, Franco JL, Bobrovskaya L, Leal RB, Dickson PW, Dunkley PR. 2009. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *Journal of neurochemistry* 110(3):848-56.

Rand MD, Dao JC, Clason TA. 2009. Methylmercury disruption of embryonic neural development in *Drosophila*. *Neurotoxicology* 30(5):794-802.

Samir AM, Aref WM. 2011. Impact of occupational exposure to elemental mercury on some antioxidative enzymes among dental staff. *Toxicology and industrial health* 27(9):779-86.

Stronach BE, Perrimon N. 1999. Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* 18(45):6172-82.

Tibbles LA, Woodgett JR. 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55(10):1230-1254.

Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. 2007. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 363(3):645-50.

Turney KD, Parrish AR, Orozco J, Gandolfi AJ. 1999. Selective activation in the MAPK pathway by Hg(II) in precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 160(3):262-70.

Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJM, Drukarch B, Hoozemans J, van Horsen J. 2008. Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radical Biology and Medicine* 45(10):1375-1383.

Walters CR, Somerset VS, Leaner JJ, Nel JM. 2011. A review of mercury pollution in South Africa: Current status. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46(10):1129-1137.

Wendel A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 77:325-33.

Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic toxicology* 93(4):225-33.

FIGURES AND TABLES

Table 1. Genes tested by qRT-PCR and used forward and reverse primers.

Genes	Primer sequences (5' – 3')
GPDH	5' ATGGAGATGATTCGCTTCGT 3'
	5' GCTCCTCAATGGTTTTTCCA 3'
Catalase	5' ACCAGGGCATCAAGAATCTG 3'
	5' AACTTCTTGGCCTGCTCGTA 3'
Superoxide dismutase	5' GGAGTCGGTGATGTTGACCT 3'
	5' GTTCGGTGACAACACCAATG 3'
HSP83	5' CAAATCCCTGACCAACGACT 3'
NRF2	5' CGCACGTACAGCTTGATGTT 3'
	5' CCAACTTCCTCAAGGAGCAG 3'
MPK2	5' CGGCGACAAATATCATCCTT 3'
	5' GGCCACATAGCCTGTCATCT 3'
	5' ACCAGATACTCCGTGGCTTG 3'

Table 2. Summary of the effects of HgCl₂ 100 µM exposure in *Drosophila melanogaster* on metal content determination and enzymatic activities.

Values are expressed as mean (mU/mg protein) ± SEM, n = 5 – 6. *p<0.05; **p<0.001

	Control group	Treated group
Hg levels	0.17 µg/g	13.5 µg/g
Catalase	5.67 ± 0.19	5.80 ± 0.24
GST	82.46 ± 2.96	69.99 ± 2.40*
GPx	15.72 ± 0.35	10.21 ± 0.33**
SOD	90.06 ± 4.27	56.38 ± 5.15*

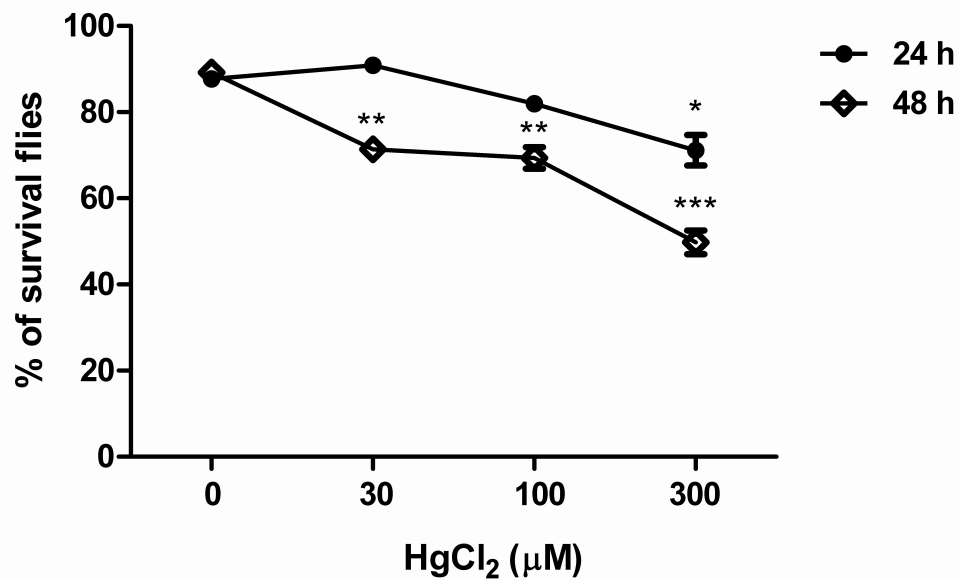


Figure 1

Fig. 1. Effects of exposure to Hg(II) on fly survival. The flies were exposed for up to 48 hours with crescent concentration of Hg(II) (10-300μM) and after the period of treatment the number of alive flies was counted. The data represent a mean ± SEM of 5 experiments performed individually and are expressed as % of alive flies compared to control group (absence of Hg). * $p < 0.05$ in comparison to control; ** $p < 0.01$ in comparison to control; *** $p < 0.001$ in comparison to control.

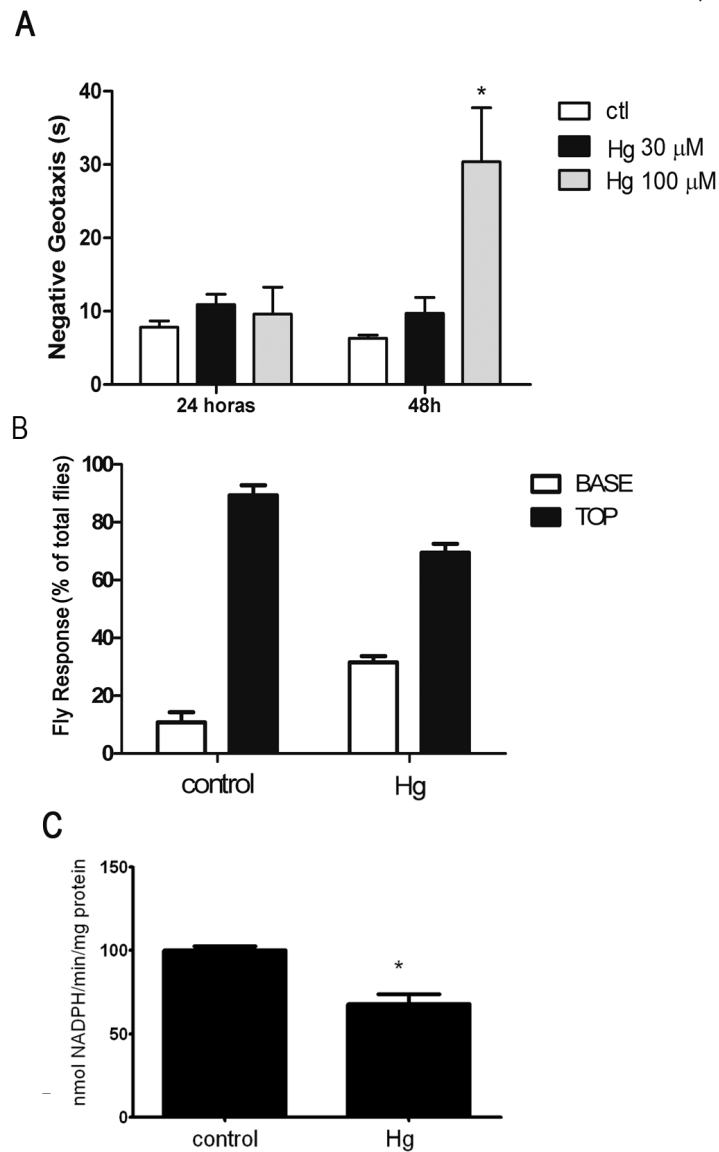


Figure 2

Fig. 2. Effects of exposure to Hg(II) on locomotor performance and acetylcholinesterase activity in *D. melanogaster*. After treatment with Hg(II) 100 μ M for 24 or 48 h the locomotor performance of flies was analyzed by negative geotaxis test (A). Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments and represent the seconds spent to reach 8 cm in a glass tube. Figure (B) represents the number of flies that reached the top of a column and those that remained at the bottom after 1 min. The results represent a mean \pm SEM of number of flies at the top and bottom of at least three individual

experiments and are expressed as percentage of total number of flies submitted to the treatment. Figure (C) shows the activity of enzyme acetylcholinesterase in total fly homogenate after 48 h of exposure to Hg(II) (100 μ M) and is expressed as nmol NADPH/min/mg protein. The data represent a mean \pm SEM of 5 experiments performed individually. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ in comparison to control.

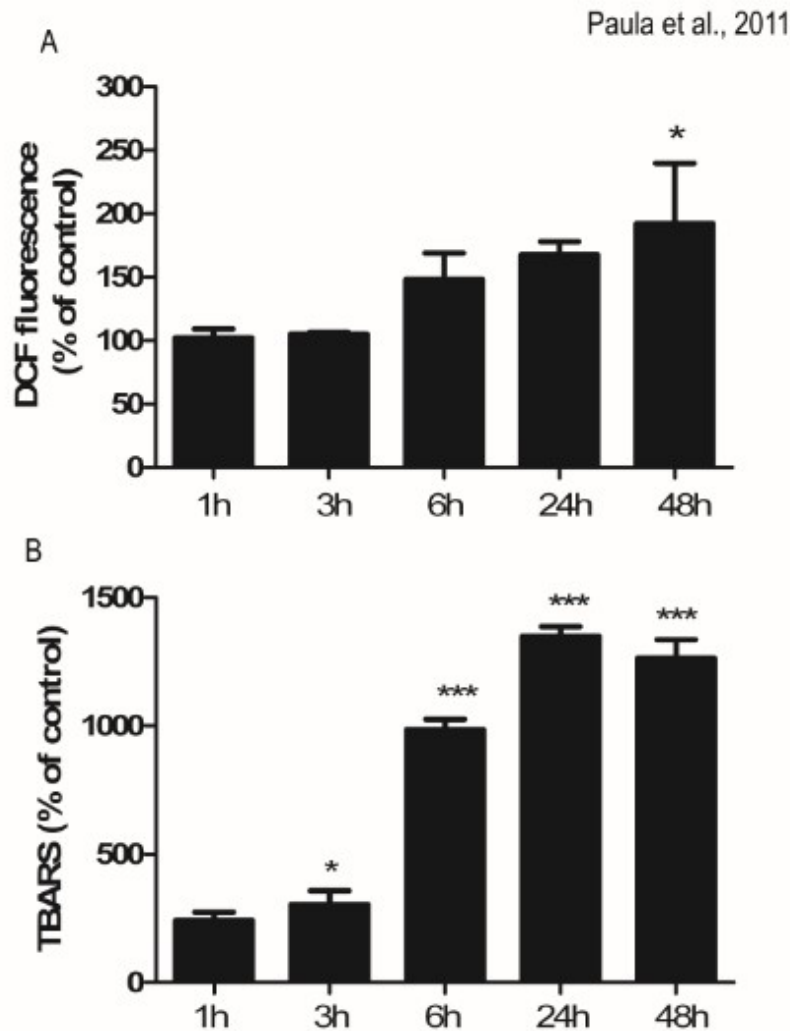


Figure 3

Fig. 3. Analysis of ROS production and lipid peroxidation in response to Hg(II) exposure in *D. melanogaster*. Flies were submitted to the treatment with 100 μ M of Hg(II) for

different periods (1 - 48 h). After treatments, flies were totally homogenized and the supernatant was used for analysis of DCF-DA fluorescence as an index of ROS production and lipid peroxidation by TBARS assay. Figure (A) shows the DCF-DA intensity of fluorescence in total flies homogenate in each period of exposition and is expressed as % of control and (B) represents the end products of lipid peroxidation determined by TBARS assay and is expressed as % of TBARS production in relation to control. The data represent a mean \pm SEM of 5 experiments performed individually. * $p < 0.05$ in comparison to control; *** $p < 0.001$ in comparison to control.

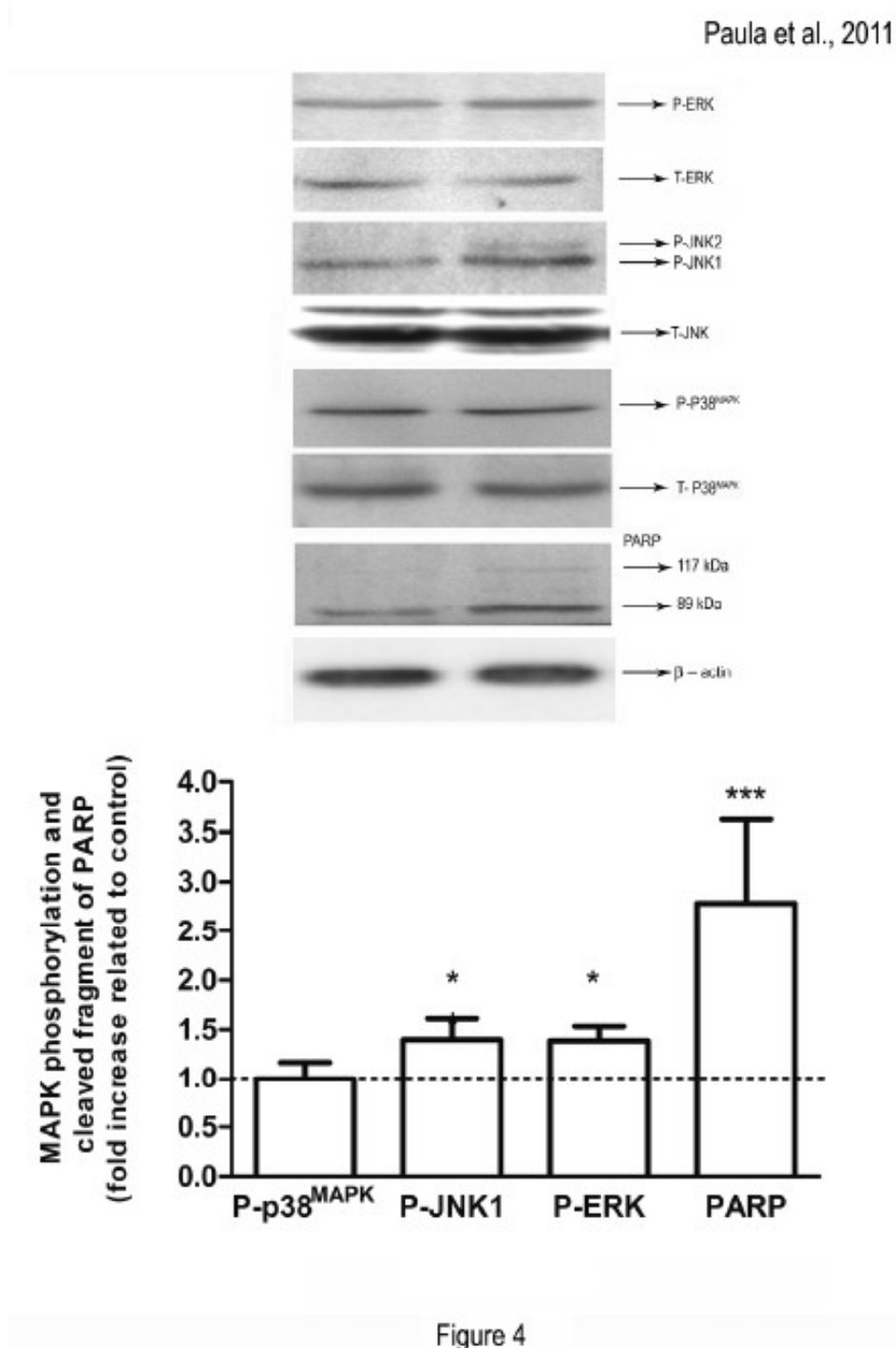


Figure 4

Fig. 4. Modulation of MAPKs phosphorylation and PARP cleavage in response to treatment of *D. melanogaster* with Hg(II) (100 μ M) for 48 h. Flies were treated for 48 h with Hg(II) (100 μ M) diluted in sucrose. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Total content and phosphorylation of proteins were

detected by specific antibodies and the reaction was developed by alkaline phosphatase detection method. (A) Western blotting of phosphorylated and total forms of ERK, JNK, p38MAPK, PARP cleaved form and β -actin content. Each blot is representative of at least 3 independent experiments. The graph represents the quantification (O.D.) of immunoreactive bands and are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiment (% of control group). The levels of phosphorylation of MAPKs are expressed as a ratio of phospho/total form of these kinases. The quantification of smaller PARP fragment in relation to control group is expressed as % of control. * $p < 0.05$ in comparison to control.

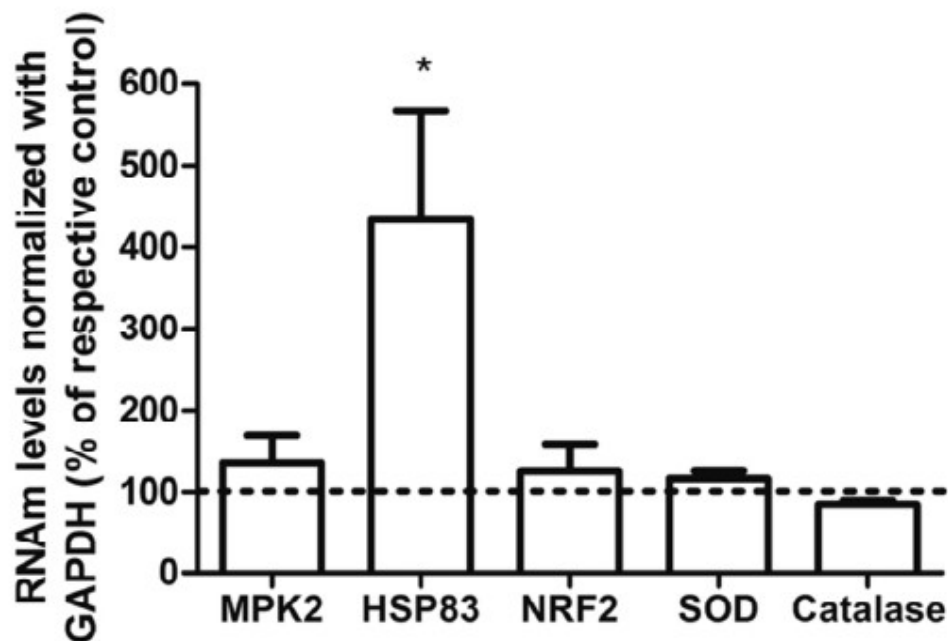


Fig. 5. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of MPK-2, Hsp83, NRF-2, SOD and catalase RNAm in flies exposed to Hg(II). Flies were treated for 48 h with HgCl₂ at 100 μ M through the diet, thus the levels of above mentioned RNAm against its respective controls was evaluated by qRT-PCR. The data which were normalized against GPDH transcript levels represents a mean \pm SEM of 4 independent experiments and is expressed as % of its respective control (dotted line). * $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Metais pesados têm sido utilizados pelos seres humanos há milhares de anos e, apesar de sua toxicidade ter sido bem relatada, a exposição a estes elementos tem aumentado, principalmente em países menos desenvolvidos (Jarup, 2003). A mobilização de Hg de fontes naturais e conseqüentemente na contaminação da água e do solo leva à absorção deste metal pelos organismos vivos sendo, então, incorporados na cadeia alimentar (Walters et al., 2011).

Radicais livres e outros ROS são gerados por todas as células aeróbias e são conhecidos por participar de uma ampla variedade de reações deletérias, influenciando os processos moleculares e bioquímicos causando diretamente algumas das mudanças observadas nas células durante a diferenciação, envelhecimento e transformação (Allen & Balin, 1989; Beckman et al., 1989; Sohal & Allen, 1990; Abate et al., 1990; Allen, 1998). Além disso, ROS e antioxidantes são conhecidos por influenciar a expressão de um número de genes e vias de transdução de sinal e também atuar como mensageiros subcelulares para determinados fatores de crescimento (Wagner, 1995; Monteiro & Stern, 1996; Sen & Packer, 1996; Sun & Oberley, 1996; Flohé et al., 1997).

A contaminação por metais pesados tem sido alvo de muitos estudos a fim de desvendar os mecanismos envolvidos em sua toxicidade e seus efeitos deletérios para os seres vivos (Cogo et al., 2009). Dentre estes metais, o Hg (II) é reconhecido por ser um agente tóxico utilizado para estudar a insuficiência renal aguda, sendo sua toxicidade associada ao estresse oxidativo e dano renal em vertebrados (Mahboob et al., 2001; Sener et al., 2007; Sharma et al., 2007). Há uma carência em estudos abordando os mecanismos de toxicidade do Hg (II) em modelos não vertebrados. Por isso, neste estudo investigaram-se os mecanismos moleculares que medeiam a toxicidade deste metal em *D. melanogaster*.

Dentre os resultados obtidos em nosso estudo, um ponto observado foram os produtos finais da peroxidação lipídica e estresse oxidativo em resposta ao Hg (II) 100µM após 48h onde pôde-se observar uma significativa indução de ambos sem alterar a atividade da enzima Catalase e causando significativa inibição da Superóxido dismutase. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que organismos expostos aos metais pesados

aumentam a formação de ROS, como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido, radical hidroxil (Atli & Canli, 2007). Todavia, por que as enzimas responsáveis pela proteção dos organismos contra o estresse oxidativo não foram atuantes para combater estes ROS? Cada enzima apresenta uma estrutura tridimensional particular com um sítio ativo que se liga ao substrato específico, ditada pela ordem dos aminoácidos na sua cadeia, porém tal estrutura pode ser desenovelada, ou desnaturada quando os compostos tóxicos se ligam à estrutura, sendo convertida em uma cadeia polipeptídica flexível que perdeu a sua conformação original, o que pode torná-la inativa (Lehninger et al. 1995).

Deste modo, a medida da atividade enzimática como biomarcador de toxicidade deve-se ao fato dos compostos tóxicos como o Hg, possuírem alta afinidade por pares de elétrons encontrados em grupamentos químicos presentes nos aminoácidos que formam as enzimas, como o grupamento sulfidril (SH) (Bertin & Averbek, 2006; Ivanina et al. 2008). Estudos recentes com bivalves e peixes demonstraram uma modificação na atividade da enzima Catalase quando os mesmos foram expostos aos metais cádmio, chumbo e zinco (Bainy et al., 1996; Alves et al., 2002; Chandran et al., 2005; Atli & Canli, 2007; Zanette et al., 2008). Todavia, em *Brycon amazonicus*, uma espécie de peixe, não se pode observar modificação na atividade da mesma enzima (Avilez et al., 2008). A enzima SOD já demonstrou ser excelente marcadora do estresse oxidativo, mexilhões expostos ao cádmio, zinco e mercúrio apresentaram inibição da atividade desta enzima dependendo da concentração do agente tóxico pelo qual o organismo é submetido (Company et al., 2004).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima que possui selenocisteína em sua estrutura, todavia nas *Drosophilas* esta característica não se apresenta, sendo ela responsável por catalisar a redução de hidroperóxidos utilizando a Glutathione (GSH) como equivalente redutor, esta enzima também tem sido utilizada como um biomarcador de toxicidade. Sua atividade enzimática pode ser inibida pela ação de compostos tóxicos, como observado em gastrópodes, bivalves e peixes expostos ao cádmio, zinco, cobre e compostos fenólicos respectivamente (Chandran et al., 2005; Jing et al., 2006; Avilez et al., 2008). A Glutathione-S-transferase (GST) pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. A enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com

moléculas endógenas ou exógenas, bem como poluentes, a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem excretados. A glutathiona-S-transferase pode atuar como peroxidases, isomerasas ou ainda tiol transferase (Carletti et al. 2008). Esta enzima é muito utilizada em programas de monitoramento de compostos químicos e poluentes, principalmente por metais pesados, pelo fato de que esta pode apresentar uma significativa inibição de sua atividade, como mostrada em nosso modelo de estudo e também em moluscos expostos ao cobre e mercúrio (Regoli et al., 1998). Além disso, a diminuição na atividade da GST, pela toxicidade do Hg (II), pode estar ocorrendo por inibição oxidativa, processo que ocorre quando há intensa formação de EROs e provável situação de estresse oxidativo (Mendes et al., 2010).

A contaminação dos organismos por pesticidas e metais pesados tem sido relacionada com a etiologia de doenças degenerativas, como Mal de Parkinson (DP), e sintomas que se assemelham à doença (Ballard et al., 1985; Hertzman et al., 1990; Liou et al., 1997; Dick et al., 2007; Jones & Miller, 2008). A contaminação por metais, em especial o Hg, leva a sérios danos neuronais, podendo causar uma perda profunda e seletiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra do SNC em mamíferos, desenvolvendo sintomas de bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade postural, assemelhando-se a DP (Braak et al., 2003). *Drosophila melanogaster* tem sido considerada um modelo de estudo para doenças neurodegenerativa como DP. Estudos *in vivo* com *D. melanogaster* exposta ao Paraquat demonstrou especialmente danos dopaminérgicos, via estresse oxidativo, sendo comparado ao observado em mamíferos e analisados através de disfunção motora (Chaudhuri et al., 2007). Em nosso estudo, também se pode observar que o Hg (II) altera a capacidade de locomoção das moscas quando submetidas à dieta contendo 100 μ M de Hg (II) por 48h.

Outros estudos demonstraram que uma variação genética da enzima que catalisa a etapa final na síntese da dopamina e serotonina está diretamente ligada a longevidade em *D. melanogaster*, sugerindo então que a variação na expectativa de vida está associada à variação nos níveis de dopamina, como já visto em humanos (De Luca et al., 2003; Zecca et al., 2003). Ao expormos as moscas por até 48h ao Hg (II) observou-se também uma significativa diminuição no tempo de vida das mesmas, podendo este fato ser atribuído em

parte, à uma diminuição dos níveis de dopamina nestes animais, levando também ao déficit locomotor, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

O mecanismo pelo qual as células monitoram seu ambiente tem sido objeto de intensa investigação, especialmente ao longo da segunda metade do século passado. As células estão constantemente expostas aos hormônios, fatores de crescimento, citocinas, as interações físicas com as células vizinhas e também a estresses químicos e físicos. Muitos destes sinais ativam receptores ligados à membrana, que em seguida, ativam cascatas de sinalização que estimulam alterações metabólicas, genéticas e físicas, permitindo as células encontrar respostas específicas a mudanças nas condições ambientais (Chang & Karin, 2001). As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são uma família de serina/treonina cinases, ativadas por fosforilação e medeiam resposta a diferentes estímulos (Chang & Karin, 2001; Chen et al., 2001). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) tais como: Jun NH₂-terminal cinase (JNK) e as p38 (Karin, 1995; Robinson e Cobb, 1997; Davis 2000; Thomas & Huganir, 2004; Waetzig & Herdegen, 2004).

As ERK1/2 é uma cinase primária em vias de transdução de sinal apresentando papel importante na proliferação e diferenciação celular e na proteção das células quando são submetidas a condições estressantes, o que tem relacionado sua ativação ao estresse oxidativo (Ho et al, 2007; Posser et al, 2009). Já a ativação de JNK e p38 é associada principalmente a fatores como inflamação, apoptose ou diferenciação (Matsuoka e Igisu, 2002). Nossos resultados demonstram que as moscas expostas ao Hg (II) apresentaram uma significativa indução no aumento nos níveis de fosforilação da JNK e ERK sem alterar a atividade de p38, ou mesmo a expressão destas proteínas. Células LLC-PK1 tiveram aumento na fosforilação de JNK, quando expostas ao Hg (II), além disso, a exposição de células renais humanas ao Hg (II) levou ao aumento da fosforilação de p38 e JNK sendo relacionada com a morte celular por apoptose (Matsuoka e Igisu, 2002; Hao et al., 2009). Em nosso estudo, observamos indução na clivagem da proteína PARP em um fragmento menor de 89 kDa o que destaca a ativação da cascata apoptótica por este metal.

Entre as proteínas cuja expressão e/ou fosforilação podem ser moduladas direta ou indiretamente por vias de sinalização celular podemos citar as pertencentes à família de

proteínas de choque térmico (HSPs), ou também denominadas chaperonas moleculares, que participam de uma série de processos celulares incluindo a citoproteção (Benjamin e McMillan, 1998) participando dos processos de enovelamento, associação e degradação de proteínas, sendo os genes relacionados à família HSP, um dos mais conservados a longo das diferentes espécies. Neste sentido, a exposição ao Hg (II) em nossos estudos induziu um aumento de 10 vezes nos níveis de expressão de RNAm de HSP83, podendo este efeito estar relacionado a um papel citoprotetor da proteína.

Ao contrário de estudos realizados em mamíferos, conhece-se relativamente pouco sobre a regulação da transcrição das respostas a agentes tóxicos em *D. melanogaster* (Misra et al., 2011). O fator de transcrição Nrf-2 desempenha um papel importante na regulação das defesas celulares contra o estresse oxidativo e eletrofilos, regulando a transcrição de enzimas antioxidantes e desintoxicantes, como SOD, catalase e GPx, sendo este processo bem conservado entre diferentes espécies (Nguyen et al., 2009; Sykiotis & Bohmann, 2008, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a expressão ectópica do fator de transcrição NRF-2 promove o desenvolvimento embrionário causando proteção contra os danos causados pela exposição ao MeHg (Rand et al., 2009), enfatizando um papel protetor para NRF-2 contra a toxicidade do Hg. Em nosso estudo, não foi observada nenhuma alteração na expressão da NRF-2, bem como a SOD ou enzimas catalase, apontando para um efeito pós-traducional de Hg sobre a atividade destas enzimas e assim promovendo sua inibição (Toyama et al., 2007; Vries et al., 2008).

Em suma, este estudo mostra que a contaminação com Hg (II) afeta os parâmetros bioquímicos e comportamentais em um modelo de inseto que é a *Drosophila melanogaster* e reforça o uso da mosca da fruta *D. melanogaster* para o estudo dos efeitos bioquímicos e comportamentais de toxinas ambientais, como o Hg (II).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação pode-se concluir que:

→ O HgCl_2 , quando incorporado na dieta em *Drosophila melanogaster*, pode causar significativa diminuição na viabilidade das mesmas a partir de 24h de modo dependente de concentração utilizada do composto;

→ Após 48h as moscas tratadas com concentrações a partir de $100\mu\text{M}$ de HgCl_2 obtiveram prejuízos no desempenho locomotor conforme analisado através do teste de Geotaxia Negativa;

→ A exposição por 48h a $100\mu\text{M}$ de HgCl_2 , diminui a atividade das enzimas: Acetilcolinesterase (Ache), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD), não alterando a atividade da Catalase (CAT) nas moscas;

→ Em análise dos genes de *Drosophila melanogaster*, tratadas com HgCl_2 , através do método de Real time-PCR pode-se observar que os níveis de RNAm da SOD, CAT e NF-E2-relacionados fator 2 (Nrf2) e MKP2 (p38) não foram alterados em comparação ao grupo controle, sendo que os níveis de HSP83 obteve um aumento em 10 vezes;

→ A partir de 6h de tratamento com HgCl_2 , as moscas apresentaram uma indução significativa na peroxidação lipídica e estresse oxidativo, tal efeito foi crescente até 48h;

→ Através da medição dos níveis de Hg, expressada em μg de Hg/g de tecido, observou-se que as moscas tratadas por 48h com HgCl_2 apresentaram 100 vezes maiores níveis de Hg em comparação ao grupo controle;

→ Em resposta à exposição a $100\mu\text{M}$ de HgCl_2 as moscas apresentaram um aumento significativo na fosforilação de JNK e ERK, clivagem da proteína PARP, enquanto que nenhuma alteração na fosforilação de p38^{MAPK} foi observada;

8. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, temos como perspectivas:

- Realizar ensaios expondo nosso modelo de estudo (*Drosophila melanogaster*) ao Hg (II) e após avaliar a possível proteção destes efeitos tóxicos por agentes antioxidantes e assim desvendar o real papel do estresse oxidativo na toxicidade do Hg(II) neste modelo animal.

- Avaliar os níveis de dopamina nas *Drosophilas* após a exposição ao Hg, bem como alteração na expressão da enzima tirosina hidroxilase, como um indicativo da perda de neurônios dopaminérgicos.

- Aprofundar os estudos sobre a ativação de NRF2 e NFkB como protagonistas na resposta adaptativa ao Hg (II).

9. REFERÊNCIAS

ABATE, C.; PATEL, L.; RAUSCHER, F. J.; CURRAN, T. Redox regulation of FOS and JUN DNA-binding activity in vitro. **Science**, v. 249, p. 1157–1161, 1990.

AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; MIEIRO, C. L.; COELHO, J. P.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury – organ specificities and age effect. **Aquat. Toxicol.**, v. 103, p. 150-158, 2011.

ALLEN, R. G. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. **Age**, v. 21, p. 47–76, 1998.

ALLEN, R. G. & BALIN, A. K. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 6, p. 631–661, 1989.

ALVES, S. R. C.; SEVERINO, P. C.; IBBOTSON, D. P.; SILVA, A. Z.; LOPES, F. R. A. S.; SÁENZ, L. A.; BAINY, A. C. D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environ. Research**, v. 54, p. 241-245, 2002.

ANANTHAN, R.; BASKAR, C.; NARMATHABAI, V.; PARI, L.; LATHA, M.; RAMKUMAR, K.M. Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes. **Pharmacol. Resear.**, v. 48, p. 551-556, 2003.

ATLI, G. & CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. and Physiol. Part C**, v. 145, p. 282-287, 2007.

AVILEZ, I. M.; HORI, T. S. F.; ALMEIDA, L. C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J. C.; BASTOS, V. L. F. C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comp. Biochem. and physiol. Part C**, v. 148, p. 136-142, 2008.

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. Ed. RiMa Editora e InterTox, 1 ed., 292p., São Carlos, São Paulo, 2003.

AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S. & SOARES, A. M. V. M. Effects of Mercury on Growth, Emergence, and Behavior of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 59, p. 216 – 224, 2010.

BAGATINI, P. B.; SAUR, L.; RODRIGUES, M. F.; BERNARDINO, G. C.; PAIM, M. F.; COELHO, G. P.; SILVA, D. V.; OLIVEIRA, R. M.; SCHIRMER, H.; SOUTO, A. A.; VIANNA, M. R.; XAVIER, L. L. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. **Invert. Neurosci.**, v. 11, n. 1, p. 43-50, 2011.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicol.**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BALLARD, P. A.; TETRUD, J. W.; LANGSTON, J. W. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. **Neurology**, v. 35, p. 949–956, 1985.

BASHA, M. R.; WEI, W.; BAKHEET, S. A.; BENITEZ, N.; SIDDIQI, H. K.; GE, Y. W.; LAHIRI, D. K.; ZAWIA, N. H. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 823-829, 2005.

BECKMAN, B. S.; BALIN, A. K.; ALLEN, R. G. Superoxide dismutase induces differentiation in *Friend erythroleukemia* cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 139, p. 370–376, 1989.

BENJAMIN, I. J. & MCMILLAN, D. R. Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. **Circulation Research**, v. 83, n. 2, p. 117-132, 1998.

BENTON, R. Chemical sensing in *Drosophila*. **Curr. Opin. in Neurob.**, v. 18, p. 357-363, 2008.

BERTIN, G. & AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, p. 1549-1559, 2006.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Curr. Opin. in Clin. Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BLOOM, G. D.; HELLMAN, B.; IDAHL, L. A.; LERNMARK, A.; SEHLIN, J.; TALJEDAL, I. B. Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic β -cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure. **Biochem. J.**, v. 129, p. 241–254, 1982.

BOENING, D. W. Ecological Effects, Transport, and Fate of Mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351, 2000.

BOLIN, C. M.; BASHA, R.; COX, D.; ZAWIA, N. H.; MALONEY, B.; LAHIRI, D. K.; CARDOZO-PELAEZ, F. Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. **Faseb. J.**, v. 20, p. 788-790, 2006.

BONACKER, D.; STOIBER, T.; BOHM, K. J.; PROTS, I.; WANG, M.; UNGER, E.; THIER, R.; BOLT, H. M.; DEGEN, G. H. Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 45, p. 346–353, 2005.

BOUJBIHA, M. A.; HAMDEN, K.; GUERMAZI, F.; BOUSLAMA, A.; OMEZZINE, A.; KAMMOUN, A.; FEKI, A. E. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. **Reprod.Toxicol.**, v. 28, p. 81–89, 2009.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E. N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 24, p. 197–211, 2003.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L. Harrison's Principles of Internal Medicine. **McGraw-Hill**, p. 467–469, 2001.

BROUSSARD, L. A.; HAMMETT-STABLER, C. A.; WINECKER, R. E. Toxicology of mercury. **Lab. Med.**, v. 33, p. 614-625, 2002.

CARDOSO, P. C. S.; LIMA, P. L.; BAHIA, M. O.; AMORIN, M. I. M.; BURBANO, R. R.; FARIAS, R. A. F. Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos: uma revisão bibliográfica. Disponível em: http://www.facome.uqam.ca/facome/pdf/cardoso_2002.PDF. Acesso em: 02 de dezembro de 2011.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; DEL BOCCIO, P.; FEDERICI, L.; DI LLIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquat. Toxicol.**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2008.

CARMONA, E. R.; KOSSATZ, E.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. **Chemosphere**, v. 70, p. 1910–1914, 2008.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comp. Biochem. and physiol. Part C**, v. 140, p. 422-426, 2005.

CHANG, L. & KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, p. 37-40, 2001.

CHAUDHURI, A.; BOWLING, K.; FUNDERBURK, C.; LAWAL, H.; INAMDAR, A.; WANG Z.; O'DONNELL, J. M. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 2457–2467, 2007.

CHEN, Z.; GIBSON, T. B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M. H. MAP kinases. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2449-2476, 2001.

CHEN, Y. W.; HUANG, C. F.; TSAI, K. S. Methylmercury induces pancreatic beta-cell apoptosis and dysfunction. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 19, p. 1080-1085, 2006.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** v. 34, n. 4, p. 369-403, 1997.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environm. Health Persp.** v. 110, n. 1, p. 11–23, 2002.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A.G. Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. *Natureza on line*, v. 7, n.

1, p. 37-42, 2009. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>, Acesso em: 22 de dezembro de 2011.

COMPANY, R.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J.; COSSON, R.; SHILLITO, B.; FIALAMÉDIONI, A. Effect of cadmium, copper and Mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. **Marine Environ. Research**, v. 58, p. 377-381, 2004.

COON, S.; STARK, A.; PETERSON, E.; GLOI, A.; KORTSHA, G.; POUNDS, J.; CHETTLE, D.; GORELL, J. Whole-body lifetime occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease. **Environ. Health Perspect.**, v. 114, p. 1872-1876, 2006.

CORDOVA, F. M.; RODRIGUES, A. L.; GIACOMELLI, M. B.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; DUNKLEY, P. R.; LEAL, R. B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res.**, v. 998, p. 65-72, 2004.

COSTA, L. G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O.P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 87-110, 2004.

COWAN, K. J. & STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 1107-1115, 2003.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M.; CORVELO, T. C., NASCIMENTO, J. L. Mercurio y neurotoxicidad. **Rev. Neurol.**, v. 40, p. 441-447, 2005.

DAMLUJI, S. F. Organomercury poisoning in Iraq: History prior to the 1971-72 outbreak. In: WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Conference on intoxication due to alkylmercury-treated seed. (Baghdad, Iraq, 9-13/09/74). Genève, WHO, p. 11-13, 1976.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, p. 239–252, 2000.

DE CELIS, R.; PEDRON-NUEVO, N.; FERIA-VELASCO, A. Toxicology of male reproduction in animals and humans. **Arch. Androl.**, v. 37, p. 201–218, 1996.

DE LUCA, M.; ROSHINA, N. V.; GEIGER-THORNSBERRY, G. L.; LYMAN, R. F.; PASYUKOVA, E. G.; MACKAY, T. F. Dopa decarboxylase (Ddc) affects variation in *Drosophila* longevity. **Nat. Genet.**, v. 34, p. 429–433, 2003.

DENG, Y.; XU, Z.; LIU, W.; YANG, H.; XU, B.; WEI, Y. Effects of Lycopene and Proanthocyanidins on Hepatotoxicity Induced by Mercuric Chloride in Rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, *publish on line*, 2011.

DICK, F. D.; DE PALMA, G.; AHMADI, A.; SCOTT, N. W.; PRESCOTT, G. J.; BENNETT, J.; SEMPLE, S.; DICK, S.; COUNSELL, C.; MOZZONI, P.; HAITES, N.; WETTINGER, S. B.; MUTTI, A.; OTELEA, M.; SEATON, A.; SODERKVIST, P.; FELICE, A. Geoparkinson study group. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. **Occup. Environ. Med.**, v. 64, p. 666–672, 2007.

D'ITRI, F. M. Biological methylamines of mercury in the environmental. **The environmental mercury problem**. Cleveland: CRC Press, p. 167, 1972.

DOULL, J.; KLASSEN, C. D.; AMDUR, M. D. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 3. ed. New York: Macmillan, 1986. 606p.

DUMAZ, N. & MARAIS, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. **FEBS J.**, v. 272, p. 3491–3504, 2005.

EGLI, D.; YEPISKOPOSYAN, H.; SELVARAJ, A.; BALAMURUGAN, K.; RAJARAM, R.; SIMONS, A.; MULTHAUP, G.; METTLER, S.; VARDANYAN, A.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W. A family knockout of all four *Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, p. 2286–2296, 2006.

EL-SHENAWY, S. M. & HASSAN, N. S. Comparative evaluation of the protective effect of selenium and garlic against liver and kidney damage induced by mercury chloride in the rats. **Pharmacol. Rep.**, v. 60, n. 2, p. 199-208, 2008.

ERIKSON, K. M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, p. 369-377, 2007.

FARINA, M.; FRIZZO, M. E.; SOARES, F. A.; SCHWALM, F. D.; DIETRICH, M. O.; ZENI, G.; ROCHA, J. B.; SOUZA, D. O. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicol. Lett.**, v. 144, p. 351-357, 2003.

FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLOHÉ, L.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SALIOU, C.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Redox regulation of NF-kappa B activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p. 1115–1126, 1997.

FRANCO, J. L.; POSSER, T.; BROCARD, P. S.; TREVISAN, R.; ULIANO-SILVA, M.; GABILAN, N. H.; SANTOS, A. R.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L.; FARINA, M.; DAFRE, A. L. Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 188, n. 2, p. 316-323, 2008.

FRANCO, J. L.; STRINGARI, J.; MISSAU, F.C.; POSSER, T.; MENDES, B. G.; LEAL, R. B.; SANTOS, A. R.; DAFRE, A. L.; PIZZOLATTI, M. G.; FARINA, M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 1919-1926, 2007.

FRASCO, M. F.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; STOJAN, J.; FOURNIER, D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **FEBS J.**, v. 274, p. 1849-1861, 2007.

FRIBERG, L. & MOTTET, N. K. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. **Biological Trace Element Research.**, v. 21, p. 201–206, 1989.

GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; RENAULT, T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. **Fish Shellfish Immun.**, v. 16, p. 501–512, 2004.

GARGANO, J. W.; MARTIN, I.; BHANDARI, P.; GROTEWI MICHAEL, S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experim. Gerontol.**, v. 40, p. 386-395, 2005.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. Wills': biochemical basis of medicine. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, p. 196-202, 1997.

GRANDJEAN, P. & LANDRIGAN, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **Lancet**, v. 368, p. 2167-2178, 2006.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, p. 1024-1030, 2001.

GU, T. L.; MILLER, M. A.; SHAPIRO, I. M.; SHENKER, B. J. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 153, p. 250–257, 1998.

HAASE, H.; ENGELHARDT, G.; HEBEL, S.; RINK, L. Mercury ions inhibit mitogen-activated protein kinase dephosphorylation by inducing reactive oxygen species. **Tox. and App. Pharm.**, v. 250, p. 78-86, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HAO, C.; HAO, W.; WEI, X.; XING, L.; JIANG, J.; SHANG, L. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. **Toxicol. in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 660-666, 2009.

HARGREAVES, R. J.; EVANS, J. G.; JANOTA, I.; MAGOS, L.; CAVANAGH, J. B. Persistent mercury in nerve cells 16 years after metallic mercury poisoning. **Neuropathology Applies Neurobiology**, v. 14, p. 443–452, 1988.

HERTZMAN, C.; WIENS, M.; BOWERING, D.; SNOW, B.; CALNE, D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. **Am. J. Ind. Med.**, v. 17, p. 349–355, 1990.

HO, Y.; LOGUE, E.; CALLAWAY, C. W.; DEFRANCO, D. B. Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct brain regions following global ischemia and reperfusion. **Neuroscience**, v. 145, n. 1, p. 248-55, 2007.

HUANG, Y. L.; CHENG, S. L.; LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 52, p. 193-206, 2011.

HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. **Toxicology**, v. 156, p. 93-100, 2001.

IVANINA, A. V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comp. Biochem. and Physiol. Part C**, v. 148, p. 72-79, 2008.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **Br. Med. Bull.**, v. 68, p. 167-182, 2003.

JING, G.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. **Comp. Biochem. and Physiol. Part C**, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2006.

JOHANNESSON, M. A review of risks associated to Arsenic, Cadmium, Lead, Mercury and Zinc. p. 62. Appendix A in Johannesson, M. (ed.) et al.: 2002, The Market Implication of Integrated Management for Heavy Metals Flows for Bioenergy use in the European Union. Kalmar University, Department of Biology and Environmental Science, Kalmar, Sweden, p. 115, 2002.

JONES, D. C. & MILLER, G. W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: a possible role in drug addiction. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n. 569-581, 2008.

JUNQUEIRA, V. B. C. & RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. Geriatria e gerontologia. Barueri: Manole Ltda, Cap. 24, p. 315-324, 2005.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, p. 1030-1038, 2001.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity in mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 16483–16486, 1995.

KHAN, A. T.; ATKINSON, A.; GRAHAM, T. C.; THOMPSON, S.J.; ALI, S.; SHIREEN, K. F. Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. **Food Chem. Toxicol. Apr.**, v. 42, n. 4, p. 571-577, 2004.

KLAASSEN, C. D. Metais pesados e Antagonistas de Metais Pesados. *In*: GOODMAN and GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Ed. Mc Graw-Hill, 9 Ed., Rio de Janeiro, 1996.

KLICHKO, V. I.; RADYUK, S. N.; ORR, W. C. Profiling catalase gene expression in *Drosophila melanogaster* during development and aging. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 56, n. 1, p. 34-50, 2004.

KORBAS, M.; MACDONALD, T. C.; PICKERING, I. J.; GEORGE, G. N.; KRONE, P. H. Chemical Form Matters: Differential Accumulation of Mercury Following Inorganic and Organic Mercury Exposures in Zebrafish Larvae. **ACS Chem. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 411-420, 2011.

LALANCETTE, A.; MORIN, Y.; MEASURES, L.; FOURNIER, M. Contrasting changes of sensitivity by lymphocytes and neutrophils. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 27, p. 735–747, 2003.

LARINI L., SALGADO P. E. T., LEPERA J. S. **Metais**. *In*: LARINI, L.: Toxicologia, Editora Manole LTDA, 1 ed., São Paulo, 1997.

LATSHAW, M. W.; GLASS, T.; PARSONS, P.; HIDALGO, J.; SCHWARTZ, B. Predictors of blood mercury levels in older urban residents. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 48, p. 715–722, 2006.

LEAL, R. B.; CORDOVA, F. M.; HERD, L.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P. R. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 178, p. 44-51, 2002a.

LEAL, R. B.; FRIZZO, J. K.; TRAMONTINA, F.; FIEUW-MAKAROFF, S.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P. R.; GONÇALVES, C. A. S100B protein stimulates calcineurin activity. **Neuroreport.**, v. 15, p. 317-320, 2004.

LEAL, R. B.; POSSER, T.; RIGON, A. P.; OLIVEIRA, C. S.; GONÇALVES, C. A.; GELAIN, D. P.; DUNKLEY, P. R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. **Toxicol.**, v. 234, p. 34-43, 2007.

LEAL, R. B.; RIBEIRO, S. J.; POSSER, T.; CORDOVA, F. M.; RIGON, A. P.; ZANIBONI FILHO, E.; BAINY, A. C. D. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic. Toxicology.**, v. 77, p. 98-104, 2006.

LEAL, R. B.; SIM, A. T.; GONÇALVES, C. A.; DUNKLEY, P. R. Tyrosine hydroxylase dephosphorylation by protein phosphatase 2A in bovine adrenal chromaffin cells. **Neurochem. Res.**, v. 27, p. 207-213, 2002b.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Savier, 1995.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 12, p. 1921-1942, 2004.

LIU, H. H.; TSAI, M. C.; CHEN, C. J.; JENG, J. S.; CHANG, Y. C.; CHEN, S. Y.; CHEN, R. C. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology**, v. 48, p. 1583–1588, 1997.

LIU, P.; HE, K.; LI, Y.; WU, Q.; YANG, P.; WANG, D. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. **Ecotoxicol. and Environ. Safety**, *in press*, 2011.

LIU, S. H. & LIN-SHIAU, S. Y. Mercuric chloride alters the membrane potential and intracellular calcium level in mouse pancreatic islet cells. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 65, p. 317–326, 2002.

LU, F. C.; BERTEAU, P. E. ; CLEGG, D. J. The toxicity of mercury in man and animals. **In: Mercury contamination in man and his environment**. ILO/FAO/WHO/IAEA. Viena: IAEA, 1972. Technical Report Series n. 137.

MAGOS, L. Physiology and toxicology of mercury. **Met. Ions. Biol. Syst.**, v. 34, p. 321-370, 1997.

MAHBOOB, M.; SHIREEN, K. F.; ATKINSON, A. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 36, n. 5, p. 687-697, 2001.

MATSUOKA, M. & IGISU, H. Effects of heavy metals on mitogen-activated protein kinase pathways. **Environ. Health Prev. Med.**, v. 6, n. 4, p. 210-217, 2002.

MC-NULTY, M.; PULJUNG, M.; JEFFORD, G.; DUBREUIL, R. R. Evidence that a copper-metallothionein complex is responsible for fluorescence in acid-secreting cells of the *Drosophila* stomach. **Cell Tissue Res.**, v. 304, p. 383–389, 2001.

MEHRA, M. & KANNAR, K. Absorption, distribution and excretion of Hg in mice. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 21, p. 733-736, 1979.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **The J. of Biol. Chem.**, v. 269, p. 9397-9400, 1994.

MELLERGARD, J.; HAVARINASAB, S.; HULTMAN, P. Short and long-term effects of T-cell modulating agents in experimental autoimmunity. **Toxicology**, v. 196, p. 197-209, 2004.

MENDES, R. H.; SIRVENTE, R. A.; CANDIDO, G. O.; MOSTARDA, C.; SALEMI, V. M.; D'ALMEIDA, V.; JACOB, M. H.; RIBEIRO, M. F.; BELLÓ-KLEIN, A.; RIGATTO, K.; IRIGOYEN, M. C. Homocysteine thiolactone induces cardiac dysfunction: role of oxidative stress. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 198-202, 2010.

MIRZOIAN, A. & LUETJE, C. W. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, p. 560-567, 2002.

MISRA, J. R.; HORNER, M. A.; LAM, G.; THUMMEL, C. S. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. **Genes Dev.**, v. 25, n. 17, p. 1796-806, 2011.

MOHAMED, M. K.; BURBACHER, T. M.; MOTTET, N. K. Effects of methyl mercury on testicular functions in *Macaca fascicularis* monkeys. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 60, n. 1, p. 29-36, 1987.

MONNET-TSCHUDI, F.; ZURICH, M. G.; BOSCHAT, C.; CORBAZ, A.; HONEGGER, P. Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. **Rev. Environ. Health**, v. 21, p. 105-117, 2006.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical

freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicol.**, v. 19, n. 1, p. 105-123, 2010.

MONTEIRO, H. P. & STERN, A. Redox regulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, p. 323–333; 1996.

MORCILLO, M. A. & SANTAMARIA, J. Mercury distribution and renal metallothionein induction after subchronic oral exposure in rats. **Biometals**, v. 9, n. 3, p. 213-220, 1996.

NAKANO, H. An examination of "Minamata disease general investigation and research liaison council". The process of making uncertain the organic mercury causal theory. **Kagakushi Kenkyu**, v. 49, n. 254, p. 91-100, 2010.

NEBREDA, A. R. & PORRAS, A. p38 MAP kinases: Beyond the stress response. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, p. 257–260, 2000.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 13291–13295, 2009.

NICHOLS, C. D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacol. Ther.**, v. 112, p. 677-700, 2006.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, J. A. O. *Fundamentos de TOXICOLOGIA*. São Paulo, 2008.

OKUDA, B.; IWAMOTO, Y.; TACHIBANA, H.; SUGITA, M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, v. 99, p. 263-265, 1997.

OPITZE, H.; SCHWEINSBERG, F.; GROSSMANN, T.; WENDT-GALLITELLI, M. F.; MEYERMANN, R. Demonstration of mercury in the human brain and other organs 17 years after metallic mercury exposure. **Clinical Neuropathology.**, v. 15, p. 139–144, 1996.

ORR, W. C & SOHAL, R. S. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 297, p. 35-41, 1992.

OZUAH, P. O. Mercury poisoning. **Current Problem Pediatric.**, v. 30, p. 91–99, 2000.

PARK, E. K.; MAK, S. K.; KULTZ, D.; HAMMOCK, B. D. Evaluation of cytotoxicity attributed to thimerosal on murine and human kidney cells. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 70, p. 2092-2095, 2007.

POSSER, T.; AGUIAR, C. B.; GARCEZ, R. C.; ROSSI, F. M.; OLIVEIRA, C. S.; TRENTIN, A. G.; NETO, V. M.; LEAL, R. B. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch. of toxicol.**, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.

POSSER, T.; DUNKLEY, P. R.; DICKSON, P. W.; FRANCO, J. L. Human neuroblastoma cells transfected with tyrosine hydroxylase gain increased resistance to methylmercury – induced cell death. **Tox. in Vitro**, v. 24, p. 1498-1503, 2010.

POSSER, T.; FRANCO, J. L.; BOBROVSKAYA, L.; LEAL, R. B.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. **J. of neurochem.**, v. 110, n. 3, p. 848-56, 2009.

QUEIROZ, I. R. Determinação do metilmercúrio em peixes de região de garimpo. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 109 f., 1995.

RAND, M. D.; DAO, J. C.; CLASON, T. A. Methylmercury disruption of embryonic neural development in *Drosophila*. **Neurotoxicol.**, v. 30, n. 5, p. 794-802, 2009.

RAO, M. V. & GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 935-942, 2008.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicol.**, v. 40, p. 375-392, 1998.

REICHL, F. X.; ESTERS, M.; SIMON, S. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. **Arch. Toxicol.**, v. 80, p. 370-377, 2006.

REICHL, F. X.; WALTHER, U. I.; DURNER, J. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. **Dent. Mater.**, v. 17, p. 95-101, 2001.

ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 180–186, 1997.

RODGERS, J. S.; HOCKER, J. R.; HANAS, R. J.; NWOSU, E. C.; HANAS, J.S. Mercuric ion inhibition of eukaryotic transcription factor binding to DNA. **Biochem Pharmacol.**, v. 61, p. 1543–1550, 2001.

ROJKIND, M. J.; DOMINGUES R.A.; NIETO, N. ; GREENWEL, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cell. and Mol. Life Sciences**, v. 59, p. 1872-1891, 2002.

ROOS, P. M.; VESTERBERG, O.; NORDBERG, M. Metals in motor neuron diseases. **Exp. Biol. Med.**, v. 231, p. 1481-1487, 2006.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. *In*: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia, Ed. Atheneu, São Paulo, 1996.

SCHOENY, R. Use of genetic toxicology data in U. S. EPA risk assessment: the mercury study report as an example. **Environ. Health. Perspect.**, v. 104, Suppl. 3, p. 663-673, 1996.

SEN, C. K. & PACKER, L. Antioxidants and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.**, v. 10, p. 709–720, 1996.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; TOZAN, A. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 4, p. 543-550, 2007.

SEVEN, A.; GÜZEL, S.; SEYMEN, O.; CIVELEK, S.; BOLAYIRLI, M.; UNCU, M.; BURÇAK, G.; Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei Medical. Journal**, v. 45, p. 703-710, 2004.

SHAFFI, S. A. Mercury toxicity: biochemical and physiological alterations in nine freshwater teleosts. **Toxicol. Lett.**, v. 8, p. 187–194, 1981.

SHARMA, M. K.; SHARMA, A.; KUMAR, A. Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 6, p. 879-887, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILBERGELD, E. K.; SACCI JR., J. B.; AZAD, A. F. Mercury exposure and murine response to *Plasmodiumyoelii* infection and immunization. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 22, p. 685–695, 2000.

SOHAL, R. S. & ALLEN, R. G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. **Exp. Gerontol.**, v. 25, p. 499–522, 1990.

STOIBER, T.; BONACKER, D.; BOHM, K. J.; BOLT, H. M.; THIER, R.; DEGEN, G. H.; UNGER, E. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). **Mutat. Res.**, v. 563, p. 97–106, 2004.

STRONACH, B. E. & PERRIMON, N. Stress signaling in *Drosophila*. **Onc.**, v. 18, p. 6172-6182, 1999.

SU, L.; WANG, M.; YIN, S. T. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 70, n. 3, p. 483-489, 2008.

SUN, Y. & OBERLEY, L. W. Redox regulation of transcriptional activators. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, p. 335–348, 1996.

SWIFT, J. A. Morphology and histochemistry of human hair. **EXS**, v. 78, p. 149-175, 1997.

SYKIOTIS, G. P. & BOHMANN, D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. **Dev. Cell**, v. 14, p. 76–85, 2008.

SYKIOTIS, G. P. & BOHMANN, D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. **Sci. Signal.**, v. 3, 2010.

TAKEUCHI, T.; ETO, K.; TOKUNAGA, H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. **Neurotoxicology**, v. 10, p. 651–657, 1989.

THIER, R.; BONACKER, D.; STOIBER, T.; BOHM, K. J.; WANG, M.; UNGER, E.; BOLT, H. M.; DEGEN, G. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicol. Lett.**, p. 75–81, 2003.

THOMAS, G. M. & HUNGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 173-183, 2004.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biom. & Pharmacother.**, v. 57, p. 145-155, 2003.

TOYAMA, T.; SUMI, D.; SHINKAI, Y.; YASUTAKE, A.; TAGUCHI, K.; TONG, K. I.; YAMAMOTO, M.; KUMAGAI, Y. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. **Biochem. and biophys. research communications**, v. 363, n. 3, p. 645-50, 2007.

TURNEY, K. D.; PARRISH, A. R.; OROZCO, J.; GANDOLFI, A. J. Selective activation in the MAPK pathway by Hg (II) in precision-cut rabbit renal cortical slices. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 160, p. 262-270, 1999.

VERINA, T.; ROHDE, C. A.; GUILARTE, T. R. Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. **Neurosc.**, v. 145, p. 1037-1047, 2007.

VRIES, H. E.; WITTE, M.; HONDIUS, D.; ROZEMULLER, A. J. M.; DRUKARCH, B.; HOOZEMANS, J.; VAN HORSSSEN, J. Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? **Free Radical Biol. and Méd.**, v. 45, n. 10, p. 1375-1383, 2008.

WAETZIG, V. & HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neurosci. Lett.**, v. 361, p. 64-67, 2004.

WAGNER, A. M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternate oxidase gene expression in *Petunia hybrid* cells. **FEBS Lett.**, v. 368, p. 339–342, 1995.

WALTERS, C. R.; SOMERSET, V. S.; LEANER, J. J.; NEL, J. M. A review of mercury pollution in South Africa: Current status. **J. of Environ. Science and Health Part A**, v. 46, n. 10, p. 1129-1137, 2011.

WANG, X.; WU, Y.; ZHOU, B. Dietary zinc absorption is mediated by ZnT1 in *Drosophila melanogaster*. **The FASEB Journ.**, v. 23, p. 2650-2661, 2009.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo e Vida**, v. 2, p. 1-2, 2001.

WATAHA, J. C.; LEWIS, J. B.; MCCLOUD, V. V.; SHAW, M.; OMATA, Y.; LOCKWOOD, P. E.; MESSER, R. L.; HANSEN, J. M. Effect of mercury(II) on Nrf2, thioredoxin reductase-1 and thioredoxin-1 in human monocytes. **Dent. Mater.**, v. 24, p. 765-772, 2008.

WHITWORTH, A. J.; WES, P. D.; PALLANCK, L. J. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. **Drug Discov. Today.**, v. 11, p. 119-126, 2006.

WONG, W. & SCOTT, J. D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 959-970, 2004.

WOOD, J. M.; KENNEDY, F. S.; ROSEN, C. E. Synthesis on methylmercury compounds by extracts of methanogenic bacterium. **Nature**. v. 220, p. 173–174, 1968.

WU, Q. L.; YANG, P., WANG, D. Y. Mercury exposure can cause transferable defects of phenotypes and behaviors in nematode *Caenorhabditis elegans*. **J. Southeast Univ.**, v. 29, p. 1–9, 2010.

YAMADA, M.; MINAMI, T.; YAMADA, G.; TOHNO, Y.; TOHNO, S.; IKEDA, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO, Y.; KAWAKAMI, K. Different element ratios of red cosmetics excavated from ancient burials of Japan. **Sci. Total Environ.**, v. 199, n. 3, p. 293-298, 1997.

YANG, H.; XU, Z.; LIU, W.; DENG, Y.; XU, B. The protective role of procyanidins and lycopene against mercuric chloride renal damage in rats. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 24, n. 5, p. 550-559, 2011.

YANG, Y.; GEHRKE, S.; IMAI, Y.; HUANG, Z.; OUYANG, Y.; WANG, J. W. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 10793-10798, 2006.

YIN, Z.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, J. L. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. **Brain. Res.**, v. 1131, p. 1-10, 2007.

YOKEL, R. A. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. **J. Alzheimers Dis.**, v. 10, p. 223-253, 2006.

YOLE, M.; WICKSTROM, M.; BLAKLEY, B. Cell death and cytotoxic effects in YAC-1 lymphoma cells following exposure to various forms of mercury. **Toxicol.**, v. 231, p. 40-57, 2007.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 113–143, 2000.

ZANETTE, J.; NUNES, F. F.; MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; MATTOS, J. J.; LUCHMANN, K. H.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environ. Research**, v. 66, p. 196-198, 2008.

ZECCA, L.; ZUCCA, F. A.; WILMS, H.; SULZER, D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 578–580, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO:

1. POSSER, T.; PAULA, M. T.; FRANCO, J. L.; LEAL, R. B. ; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.. Archives of Toxicology, v. 85, p. 645-651, 2011.

2. MEINERZ, D.F.; PAULA, M. T.; COMPARSI, B.; SILVA, M.U.; SCHMITZ, A.E.; BRAGA, H.C.; TAUBE, P.S.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J. B. T.; DAFRE, A.L.; FARINA, M.; FRANCO, J. L.; POSSER, T. Protective effects of organoselenium compounds against methylmercury-induced oxidative stress in mouse brain mitochondrial-enriched fractions. Brazilian Journal of Medical and Biological Research - on line, v. 44, p. 1156-1163, 2011

ANEXO B

RESULTADOS COMPLEMENTARES

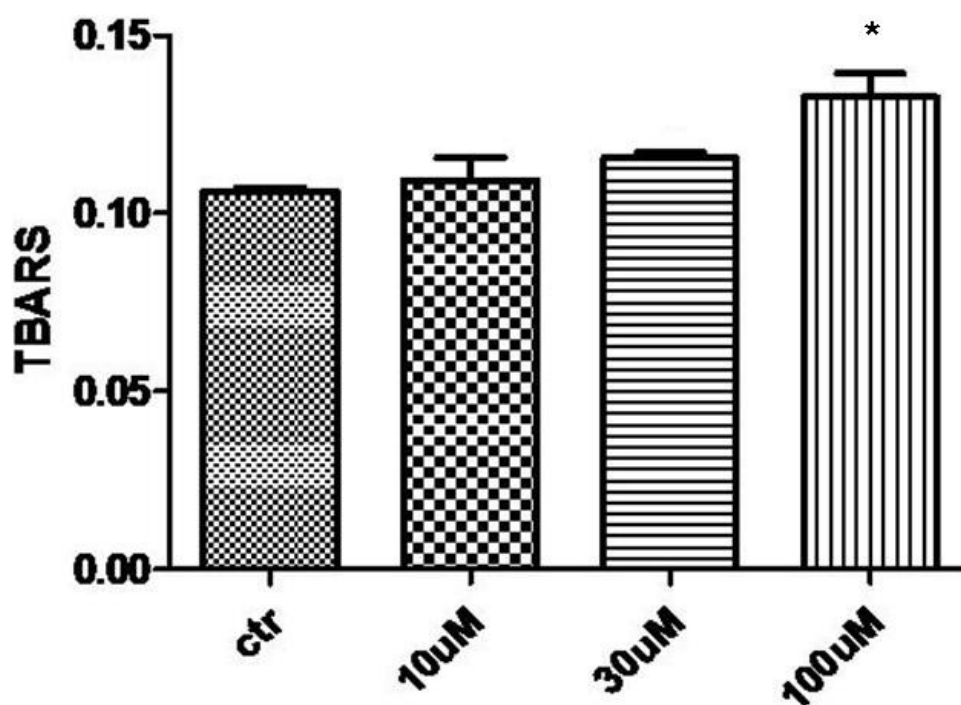


Figura 1. Efeitos de diferentes concentrações do Hg (II) na formação de TBARS em *Drosophila melanogaster*. As moscas foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Hg (II) (10-100 μ M) por até 48h. Após os tratamentos, as moscas foram homogeneizadas e o sobrenadante foi utilizado para análise da peroxidação lipídica através da indução na formação de TBARS. Os valores expressam são a média \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

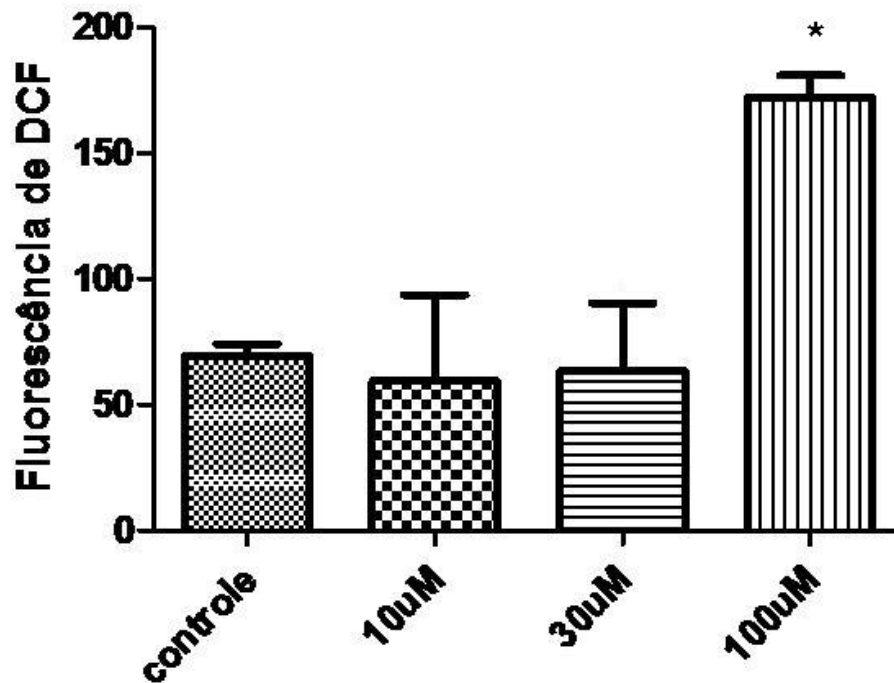


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações do Hg (II) na produção de ROS em *Drosophila melanogaster*. As moscas foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de Hg (II) (10-100µM) por até 48h. Após os tratamentos, as moscas foram homogeneizadas e o sobrenadante foi utilizado para análise da formação de ROS através da análise da fluorescência da DCF-DA. Os valores expressam são a média ± S.E.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.