

SORAIA VALÉRIA DE OLIVEIRA COELHO LAMEIRÃO

**O EFEITO DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS GANGLIONARES DA
RETINA DE TUCUNARÉ (*Cichla sp.*)**

BELÉM/PA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SORAIA VALÉRIA DE OLIVEIRA COELHO LAMEIRÃO

**O EFEITO DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS GANGLIONARES DA
RETINA DE TUCUNARÉ (*Cichla sp.*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior

BELÉM/PA

2008

SORAIA VALÉRIA DE OLIVEIRA COELHO LAMEIRÃO

**O EFEITO DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS GANGLIONARES DA
RETINA DE TUCUNARÉ (*Cichla sp.*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará a comissão de professores:

Orientadora: Profa. Dra. Silene Araújo de Lima
ICB/UFPA

Co-orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior
ICB/UFPA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira
NMT/UFPA

Profa. Dra. Anderson Manoel Herculano
ICB/UFPA

Profa. Dra. Rossineide Rocha
ICB/UFPA

Prof. Dr. Fernando Alan Rocha
ICB/UFPA

BELÉM/PA
DEZEMBRO/2008

Lameirão, Soraia Valéria de Oliveira Coelho

O efeito do metilmercúrio nas células ganglionares da retina de tucunaré (*Cichla sp.*) / Soraia Valéria de Oliveira Coelho Lameirão / Belém: UFPa / Instituto de Ciências Biológicas, 2008.

xiv, 66p.:il.

Orientadora: Silene Maria Araújo de Lima

Co-orientador: Amauri Gouveia Junior

Tese (Doutorado) / Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, 2008.

Referências Bibliográficas: f.58-66

1. Visão. 2. Retina. 3. Células Ganglionares.

4. Tucunaré. 5. Metilmercúrio – Tese. I. de Lima, Silene Maria Araújo II. Tese (Doutorado) / Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

“Nada é veneno e tudo é veneno; a diferença está na dose”
Paracelsus

Dedico este trabalho ao meu filho Victor, meu norte,
meu sul, meu leste e meu oeste.

AGRADECIMENTOS

Uma etapa da minha vida foi concluída, um sonho de menina que começou há muitos anos atrás na beira do rio. Hoje vejo o caminho que precisei percorrer para chegar até aqui, foi uma longa batalha comigo mesma. Algumas pessoas contribuíram para que isso fosse possível e a elas dedico um particular agradecimento.

A minha família por todo apoio que sempre me dedicou ao longo da minha vida, sem o qual eu não conseguiria chegar até aqui.

A Cláudio Dias, obrigada por todas as coisas boas que você trouxe para a minha vida, entre elas, o apoio incondicional que sempre tive de você. Este trabalho também é mérito seu.

A minha orientadora Silene Lima, Si, são quase dez anos desde a primeira vez que entrei no seu laboratório, percorremos um longo caminho até aqui. Obrigada por sempre acreditar em mim, independente de qualquer coisa.

Ao meu co-orientador Amauri, por todas as críticas e discussões que tivemos ao longo deste trabalho que serviram sem dúvida para deixá-lo melhor.

Ao professor Luiz Carlos, obrigada por me “desorientar” do meu caminho e me oferecer todas as oportunidades possíveis para chegar até aqui.

A minha amiga Michele, por dividir comigo as angústias de adotar um novo modelo experimental. Miga, consegui!

Ao meu amigo Fernando Alan por suas contribuições importantíssimas neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O SISTEMA VISUAL DE PEIXES	1
1.1.1 <i>A luz no ambiente aquático</i>	1
1.1.2 <i>A óptica dos peixes</i>	3
1.1.3 <i>A retina dos peixes</i>	6
1.1.4 <i>As células ganglionares</i>	7
1.2 INTERVENÇÃO ANTRÓPICA NO AMBIENTE AQUÁTICO	13
1.3 MERCÚRIO	14
1.4 O MERCÚRIO NO SISTEMA NERVOSO	16
1.4.1 <i>O mercúrio no sistema visual</i>	18
1.5 O TUCUNARÉ COMO MODELO DE ESTUDO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1. GERAL	21
2.2 ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS	22
3.2 PROCEDIMENTOS MORFOLÓGICOS	23
3.2.1 <i>Enucleação, dissecação e fixação da retina</i>	23
3.2.2 <i>Montagens Planas</i>	25
3.2.3 <i>Método de Nissl</i>	25
3.2.4 <i>Análise microscópica</i>	26
3.2.5 <i>Estimativa da densidade celular</i>	26
3.3 ANÁLISE DE HgT	27
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4 RESULTADOS	28
4.1 O OLHO DO TUCUNARÉ	28
4.2 A RETINA DE TUCUNARÉ	30
4.3 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GANGLIONARES EM RETINA DE TUCUNARÉ	33
4.4 DENSIDADE DE CÉLULAS GANGLIONARES EM RETINA DE TUCUNARÉ	36
4.4.1 <i>Número total de células ganglionares</i>	36
4.4.2 <i>Densidade média das células ganglionares</i>	36
4.4.3 <i>Variação de densidade das células ganglionares</i>	36
4.5 CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL (HgT) EM TUCUNARÉ	47
4.5.1 <i>Retina</i>	47
5 DISCUSSÃO	49
5.1 O ANIMAL EXPERIMENTAL	49
5.2 ESPECIFICIDADE DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GANGLIONARES CORADAS PELA TÉCNICA DE NISSL	50
5.3 CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ	52
5.4 CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL (HgT) EM TUCUNARÉ	53
6 CONCLUSÕES	57

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO	2
FIGURA 2: SECÇÃO VERTICAL DO OLHO DO PEIXE.	4
FIGURA 3: PROJEÇÃO CENTRAL DA VIA VISUAL EM PEIXES.....	5
FIGURA 4: CÉLULAS GANGLIONARES EM RETINA DA DANIO RERIO.....	11
FIGURA 5: <i>CICHLA SP.</i>	20
FIGURA 6: OLHO DE TUCUNARÉ CONTROLE	29
FIGURA 7: RETINA DE TUCUNARÉ (TC 090108ED CTR) EM MONTAGEM PLANA.	31
FIGURA 8: SECÇÃO TRANSVERSAL DE RETINA DE TUCUNARÉ (TC050204J).....	32
FIGURA 9: MONTAGEM PLANA DE RETINA DE TUCUNARÉ CONTROLE (TC050211J CTR)	34
FIGURA 10: MONTAGEM PLANA DE RETINA DE TUCUNARÉ CONTROLE (TC050211M CTR).....	35
FIGURA 11: NÚMERO TOTAL CÉLULAS GANGLIONARES EM FUNÇÃO DAS DOSES DE MEHG ADMINISTRADAS.	38
FIGURA 12: DENSIDADE DE CÉLULAS GANGLIONARES NO MERIDIANO NASO-TEMPORAL	40
FIGURA 13: DENSIDADE DE CÉLULAS GANGLIONARES NO MERIDIANO DORSO-VENTRAL	41
FIGURA 14: PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE DENSIDADE DE TODOS OS GRUPOS NO MERIDIANO NASO-TEMPORAL (A) E DORSO-VENTRAL (B)..	42
FIGURA 15: MAPA DE ISODENSIDADE PARA CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ CONTROLE (TC050211MO.E).....	43
FIGURA 16: MAPA DE ISODENSIDADE PARA CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ TRATADO COM DOSE DE 0,5 µG/KG (TC050211NO.E)..	44
FIGURA 17: MAPA DE ISODENSIDADE PARA CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ TRATADO COM DOSE DE 1,0 µG/KG (TC050211RO.E)..	45
FIGURA 18: MAPA DE ISODENSIDADE PARA CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ INTOXICADO COM DOSE DE 2,0 µG/KG (TC050211SO.D).....	46
FIGURA 19: QUANTIDADE DE HgT ENCONTRADO NA RETINA DE TUCUNARÉ.	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SUMÁRIO DOS TRABALHOS REALIZADOS COM A TOPOGRAFIA DE CÉLULAS GANGLIONARES DE PEIXES.....	8
TABELA 2: CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL (HGT) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES.....	17
TABELA 3: ANIMAIS UTILIZADOS, COMPRIMENTO, PESO E DOSE DE MeHg	24
TABELA 4: DENSIDADE MÉDIA (CÉLULAS/MM ²) EM FUNÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS GANGLIONARES (CÉLULAS/MM ²) E ÁREA RETINIANA (MM ²)	39
TABELA 5: QUANTIDADE DE HGT NA RETINA EM FUNÇÃO DA DOSE E TEMPO DE DEPURAÇÃO	47

RESUMO

O Tucunaré (*Cichla sp.*) foi utilizado como modelo de estudo do sistema nervoso. O presente trabalho identificou o efeito do metilmercúrio (MeHg) nas células ganglionares na retina deste animal em situação experimental. Foram utilizados 48 exemplares de tucunaré. Os animais foram expostos a doses crescentes de metilmercúrio de 0,5 µg/kg, 1,0 µg/kg e 2,0 µg/kg por injeção intraperitoneal e foram sacrificados com 15 (n=11) e 22 (n=9) dias de depuração. As análises morfológicas das células ganglionares foram realizadas em montagens planas coradas pela técnica de Nissl (n=12) em animais controle (n=3) e expostos ao MeHg (n=9). Amostras de retina foram coletados para medição dos valores de HgT pela técnica espectrofotometria de absorção atômica com amalgamação em lâminas de ouro, através do emprego do monitor de mercúrio SP3D (Nippon Instrument Corporation). Os resultados encontrados demonstram que a técnica de Nissl é eficiente na marcação de células ganglionares de tucunaré. O animal controle apresenta uma média de 203.964 células ganglionares com um pico de densidade de 18.000 células/mm² e um padrão de distribuição celular de alta densidade na região ventro-temporal e na região dorsal característico de animais que se escondem entre as raízes da vegetação. Nos animais expostos ao MeHg, embora se observe um perfil de distribuição celular semelhante ao controle, houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) da densidade de células ganglionares em todas as doses utilizadas, sendo que o menor valor encontrado foi relativo ao grupo de 0,5 µg/kg. As análises de HgT demonstram que o mercúrio ao ser injetado no animal, nos primeiros quinze se concentra na retina e somente depois tende a se depositar na musculatura. Os resultados encontrados sugerem que o efeito do MeHg podem ser danosos para o animal, comprometendo a sua interação com o meio.

Palavras chave: Tucunaré, retina, células ganglionares, metilmercúrio.

ABSTRACT

The tucunaré (*Cichla sp.*) was used as organism to study the nervous system. This study identified the effects of methylmercury in the ganglion cells of the retina of this animal in experimental parameters. 48 tucunaré were used in this study. The animals were exposed to increasing doses of methylmercury (0.5 µg / kg, 1.0 µg / kg and 2.0 µg / kg), by intraperitoneal injection, and were afterwards sacrificed with 15 (n = 11) and 22 (n = 9) day of purification. The morphological analysis of ganglion cells retina were analysed on flatmounted and Nissl staining (n = 12) both in control animals (n = 2) and animals exposed to MeHg (n = 9). Samples of retina were collected for measuring the values of HgT through atomic absorption spectrophotometry with amalgamation in layers of gold, through the use of the SP3D monitor for mercury (Nippon Instrument Corporation). The results show that the technique of Nissl is effective in labeling ganglion cells of tucunaré. The control animals showed mean density of 203,964 ganglion cells with a peak density of 18,000 cells/mm² and a pattern of cellular distribution of high density in the ventro-temporal and dorsal regions, characteristic of animals that are hiding among the roots of vegetation. In animals exposed to MeHg, although there is a similar profile cellular distribution compared with controls, there was a significant decrease (p <0.001) in the density of ganglion cells at all doses tested; the lowest density was found in the 0,5 µg / kg group. The analysis of HgT showed that the mercury injected in the animal is concentrated on the retina for the first fifteen days, and only then deposits in muscle cells. These results suggest that the effect of MeHg may be harmful to the animal, affecting its interaction with the environment.

Key words: Tucunare, retina, ganglion cells, methylmercury.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA VISUAL DE PEIXES

1.1.1 A luz no ambiente aquático

A luz é a parte visível do espectro eletromagnético que se propaga através dos diferentes meios até atingir o olho e formar uma imagem sobre a retina que será transformada em sinais elétricos e propagada até o córtex visual onde será interpretada (Rodieck, 1998).

A luz que chega ao ambiente aquático e contribui para a visão dos peixes, depende tanto da superfície da água como das condições abaixo desta superfície para se propagar. A proporção de luz transmitida através da superfície depende principalmente do ângulo de incidência sobre a superfície e o estado de agitação da mesma. Quanto mais deslocados perpendicularmente forem estes ângulos, mais luz é refletida. Uma vez na coluna de água, a luz pode ser absorvida ou espalhada pela água especialmente pelas partículas suspensas no meio e, dependendo da natureza destas partículas, diferentes comprimentos de onda são absorvidos. Existem quatro grandes classes de agentes que absorvem a luz no ambiente aquático: a água, que absorve comprimentos de onda principalmente na faixa de luz ultravioleta, verde e vermelha; as substâncias orgânicas dissolvidas, que absorvem comprimentos de onda violeta, azul e verde; o fitoplâncton e as partículas inorgânicas dispersas no meio aquático que absorvem diferentes comprimentos de onda (Sandström, 1999) de acordo com a composição do pigmento.

Aproximadamente 50% da luz que penetra na água é composta por comprimentos de ondas maiores que 780nm. A maioria das radiações ultravioleta e infravermelha se extingue nos primeiros centímetros da lâmina de água. A radiação infravermelha é convertida em calor nos primeiros centímetros da coluna de água e os 50% restantes compreendem o espectro visível, com comprimentos de ondas que variam entre 400 e 700 nm que representa o espectro visível para os animais (Pereira e Soares-Gomes, 2002) (Figura 1).

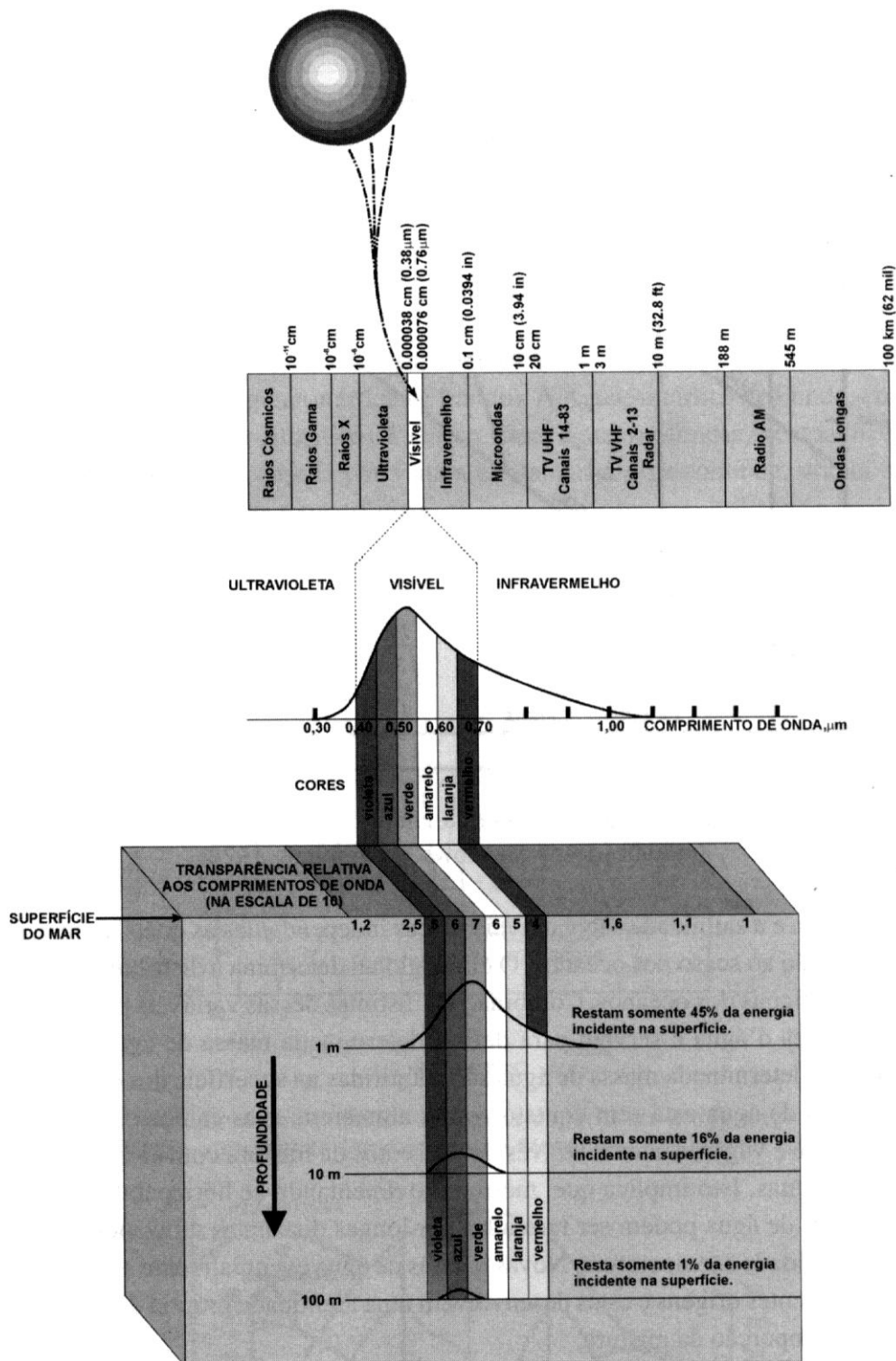


Figura 1: Espectro eletromagn3tico e absorç3o dos diferentes comprimentos de luz com a profundidade (Pereira e Soares-Gomes, 2002).

Em função da penetração de luz no ambiente aquático, a lâmina de água pode ser verticalmente dividida em três zonas ecológicas. A zona mais superficial, denominada de eufótica, se estende desde a superfície até alguns poucos centímetros de profundidade em regiões de águas turvas e até no máximo 150 metros em águas muito claras, sendo uma região caracterizada por uma grande quantidade de luz. A zona seguinte é a disfótica, onde se encontram peixes e alguns invertebrados que ainda conseguem perceber a luz, embora a luz nesta zona seja relativamente fraca. A região mais profunda e mais ampla é denominada de zona afótica e se caracteriza por apresentar uma intensidade luminosa muito baixa para ser detectada por qualquer sistema biológico (Pereira e Soares-Gomes, 2002).

1.1.2 A óptica dos peixes

O sistema visual dos peixes está organizado de maneira similar a dos vertebrados terrestres, muito embora os peixes apresentem algumas adaptações morfológicas e fisiológicas relacionadas ao meio em que vivem (Hawryshyn, 1997).

O olho é o grande responsável pela captação de luz no meio aquático (Figura 2). A óptica dos peixes difere dos animais terrestres fundamentalmente num aspecto que é a falta da interface ar-córnea, que possui um significativo poder óptico nos vertebrados terrestres, uma vez que a maior parte do poder de refração reside na córnea. O índice de refração da córnea dos peixes é similar ao do meio que os rodeia o que dificulta uma boa focalização dos objetos, diminuindo em cerca de 80% o poder óptico dos peixes quando comparado aos animais terrestres (Easter, 1975). Além disso, a córnea dos peixes pode possuir vários pigmentos coloridos que serve para diminuir os distúrbios de imagem e favorecer a camuflagem do animal, protegendo-o contra ataque de predadores (Lythgoe, 1979; Fernald, 1993).

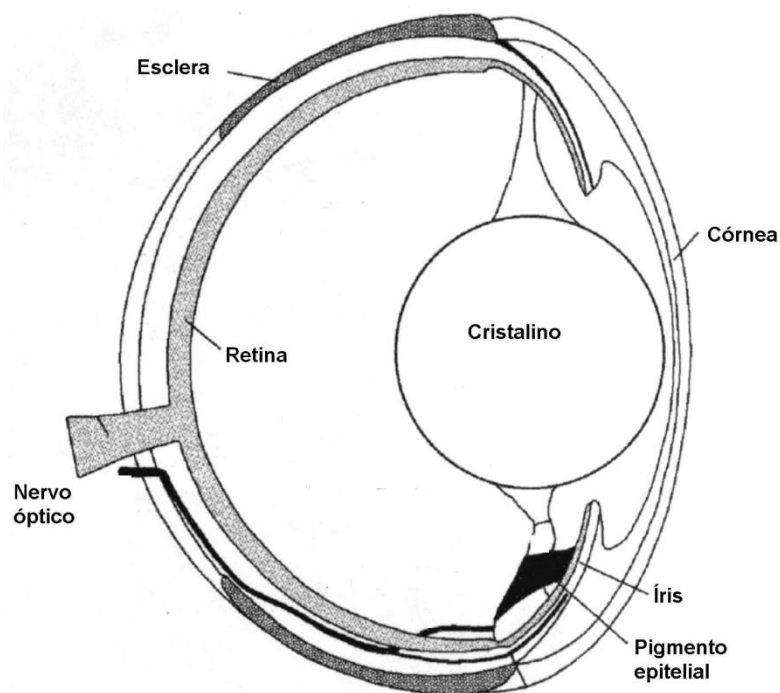


Figura 2: Secção vertical do olho do peixe (modificada de Nicol, 1989).

O cristalino dos peixes é extremamente refrativo com intuito de compensar o papel da córnea, o que faz com que ele seja bastante denso. O poder refrativo do cristalino é dado principalmente pela aproximação deste à retina, ao contrário do que ocorre em vertebrados terrestres, onde o poder de refração é dado principalmente pela alteração da forma do cristalino (Hawryshyn, 1997).

A pupila nos peixes é muito semelhante a dos mamíferos terrestres, muito embora não apresente uma ampla variação do seu diâmetro pupilar que favorece o controle da quantidade de raios luminosos que chegam até a retina. Ali (1959), demonstrou em estudos realizados com o salmão do pacífico¹ que o animal não possuía nenhuma capacidade de alterar o seu diâmetro pupilar sob diferentes condições luminosas. Charman e Tucker (1973) corroboraram com estes achados em um estudo realizado com *Carassius auratus* onde relataram que eles apresentam uma variação muito pequena do diâmetro pupilar mesmo

¹ O autor não apresenta o nome científico da espécie utilizada.

em condições de grande intensidade luminosa. A ausência de um mecanismo de controle pupilar em peixes sobre diferentes condições de luminosidade parece ser compensado por movimentos dos segmentos externos dos fotorreceptores em relação à camada pigmentar (resposta retinomotor), onde os fotorreceptores na presença de uma grande quantidade de luz tendem a penetrar na camada pigmentar (Guthrie e Muntz, 1993).

Os raios luminosos que penetram no olho convergem até a retina e são transformados em impulsos neurais. Estas mensagens saem do olho através das fibras do nervo óptico e são levadas às áreas visuais no córtex cerebral. Em teleósteos, a maior parte de fibras nervosas que saem de um olho se projetam para o lado contralateral do cérebro (Hawryshyn, 1997), onde a informação proveniente da retina adquire propriedades espaciais mais complexas e se associa a informações provenientes do cerebelo e outras áreas corticais .(Figura 3).

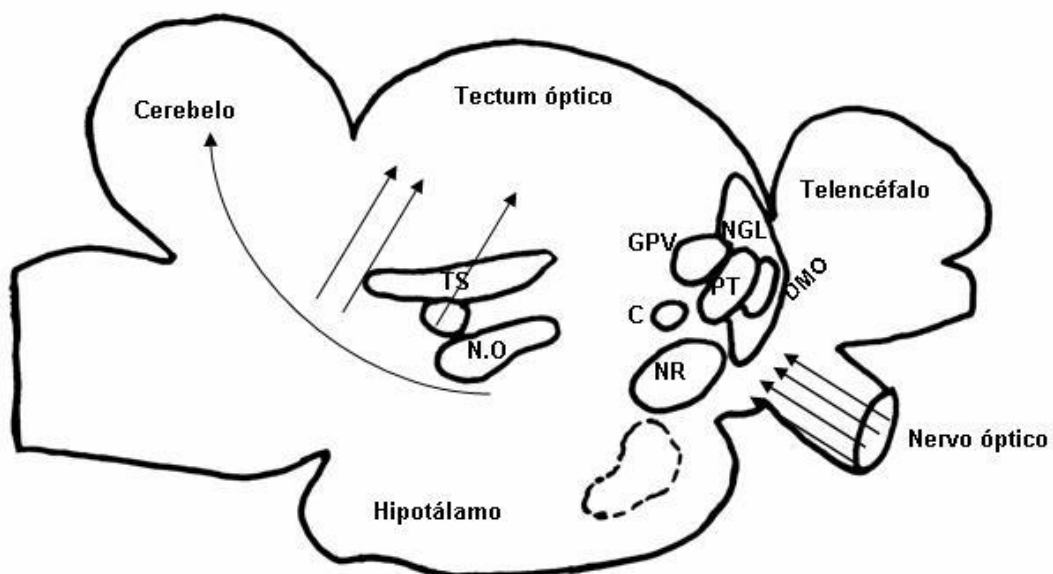


Figura 3: Projeção central da via visual em peixes (Modificado de Guthrie e Muntz,1993). NGL: núcleo geniculado lateral; NR: núcleo rotundus; DMO: núcleo óptico dorsomedial; PT: núcleo prétecal; GPV: núcleo geniculado medial; C: núcleo cortical.

1.1.3 A retina dos peixes

A retina é a porção do sistema nervoso central responsável pela transdução de informação luminosa em informação neural, localizada na porção posterior do globo ocular tem sua origem embrionária no tubo neural.

A retina está organizada em uma estrutura laminar formada por camadas nucleares, onde se encontram os corpos celulares de diferentes células, intercaladas por camadas plexiformes onde ocorrem os contatos sinápticos entre os grupos celulares.

A energia luminosa é transformada em impulsos elétricos através de uma rede neuronal que se inicia com os fotorreceptores e, através da participação direta das células bipolares e da modulação feita pelos interneurônios (células horizontais, amácrinas e interplexiformes), ativa as células ganglionares que conduzirão as informações para os núcleos visuais encefálicos via nervo óptico.

Os fotorreceptores são as primeiras células a receber informações luminosas e a transformá-las em energia neural. Existem dois tipos de fotorreceptores, os cones e os bastonetes. Os cones contribuem para visão na presença de luz ou fotópica e os bastonetes são ativados em baixos níveis de luminosidade e mediam a visão escotópica. Os cones são encontrados organizados aos pares (cones duplos), sozinhos ou em pequenos grupos com intuito de otimizar a visão fotópica (Nicol, 1989). Os bastonetes se encontram agregados em grupos de dez a vinte células com a finalidade de acentuar a sensibilidade à luz.

O padrão de organização de fotorreceptores na retina de peixes está relacionado principalmente com o hábitat do animal e seu estilo de vida. Peixes noturnos, crepusculares, de grandes profundidades ou de locais de grande turbidez, possuem uma retina com ênfase a sensibilidade luminosa, enquanto que peixes que vivem em condições fotópicas têm uma retina voltada para a acuidade visual (Sandström, 1999).

As células bipolares favorecem a comunicação vertical entre os fotorreceptores e células ganglionares, e esta comunicação pode ser de forma direta ou mediada pelas células horizontais e amácrinas que formam as redes neuronais laterais. Existem dois tipos de células bipolares, de três a cinco tipos

de células horizontais e seis ou mais tipos de células ganglionares em diferentes espécies de teleósteos (Cajal, 1893; Wagner *et al.*, 1998).

Na maioria dos teleósteos existe uma região de alta densidade celular denominada de fóvea, além de uma variedade de outras regiões que também apresentam uma alta densidade celular dependendo da espécie do animal. Em *Perca sp.*, por exemplo, existe de quatro a cinco vezes mais cones no quadrante temporal da retina do que em outras regiões (Ahlbert, 1968).

Algumas vezes, existe uma faixa horizontal proeminente ou faixas de especialização celular que podem estar relacionadas com os hábitos ou comportamentos do mesmo. Munk (1970) discutindo a ocorrência e o significado destas faixas, concluiu que elas poderiam estar associadas à detecção de objetos no oceano. Collin e Pettigrew (1988 a,b) estudando a retina de dez espécies de peixes de corais, também concluíram que as espécies que possuíam uma faixa horizontal bastante marcada habitavam regiões de mar aberto e possuíam uma visão desobstruída da areia e da água, enquanto que espécies com uma área de alta densidade celular diferente da faixa horizontal, viviam restritas a locais sem vista para o oceano.

1.1. 4 As células ganglionares

O estudo de células ganglionares é fundamental para a compreensão do funcionamento do sistema visual, já que estas células limitam a acuidade espacial. As células ganglionares recebem sinais de diferentes células bipolares e células amácrinas e enviam seus impulsos para o cérebro onde estes serão interpretados (Rodieck, 1998). A retina dos vertebrados caracteriza-se pela distribuição desigual das células ganglionares (Rodieck, 1973), com a presença de regiões com densidade celular mais alta, onde a visão tem maior resolução espacial. Em peixes, o estudo da distribuição de células ganglionares tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta na relação entre topografia celular e hábitat (Hawryshyn, 1997).

Vários estudos sobre células ganglionares foram realizados em peixes, com intuito de analisar a distribuição das células ganglionares marcadas por diferentes técnicas em diversas espécies de teleósteos, buscando relacionar os

locais de maior densidade de células com o nicho e o hábitat do animal (Tabela 1).

Tabela 1: Sumário dos trabalhos realizados com a topografia de células ganglionares de peixes

AUTOR	ESPÉCIE	HÁBITAT	REGIÃO DA RETINA	DENSIDADE CELULAR
Ito e Murakami (1984)	<i>Sebasticus marmoratus</i> <i>Novadon modestus</i>	Demersal Nada ativamente a meia água	Temporal Faixa horizontal	$1,0 \times 10^4$ $2,3 \times 10^4$
Mednick e Springer (1988)	<i>Carasius auratus</i>	Demersal	Temporal	$5,0 \times 10^3$
Collin e Pettigrew (1988a)	<i>Halophryne diemensis</i>	Cavernas e fendas	Temporal	$0,7 \times 10^4$
	<i>Pomacanthus semicircularis</i>	Cavernas e saliências sobre o coral	Faixa horizontal	$0,4 \times 10^4$
	<i>Amblyglyphidon curacao</i>	Plantas dos corais	Ventro-temporal	$1,4 \times 10^4$
	<i>Parapercis cylindrica</i> <i>Cephalopholis miniatus</i>	Areia do coral Cavernas e saliências sobre o coral	Ventro-temporal Dorso-temporal Temporal	$3,0 \times 10^4$ $4,0 \times 10^4$ $4,7 \times 10^4$
Collin e Pettigrew (1988b)	<i>Balistoides conspicillum</i>	Áreas abertas ao longo da borda do coral	Temporal Faixa horizontal	$5,1 \times 10^4$ $3,5 \times 10^4$
	<i>Choerodon albigena</i>	Áreas próximas ao coral	Dorso-temporal	$8,3 \times 10^4$
	<i>Aulostoma chinensis</i>	Calha do coral ao longo da borda	Faixa horizontal Dorso-temporal	$5,0 \times 10^4$ $4,6 \times 10^4$
	<i>Lethrinus chrysostomas</i>	Espécies semi-pelágicas de mar aberto	Faixa horizontal Temporal	$1,4 \times 10^4$ $5,0 \times 10^4$
	<i>Gymnocranius bitorquatus</i>	Áreas abertas do coral	Faixa horizontal Dorso-temporal Faixa horizontal	$4,0 \times 10^4$ $6,3 \times 10^4$ $2,0 \times 10^4$
Collin (1988)	<i>Rhinobathus batillum</i>	Lagoas rasas Sobre a areia	Temporo-dorsal Margem nasal	$4,5 \times 10^3$ $5,5 \times 10^3$
Collin e Partridge (1996)	<i>Myctophum punctatum</i>		Periferia	$19,4 \times 10^3$
	<i>Lamoanctus macdonaldi</i>		Periferia	$17,1 \times 10^3$
	<i>Xenodermichthys copei</i>		Temporal	$24,3 \times 10^3$
	<i>Howella sherborni</i>		Temporal	$24,5 \times 10^3$
	<i>Scopelarchus michaelsarsi</i>		Centro-lateral	$46,6 \times 10^3$
	<i>Argyrolepecus aculeatus</i>		Centro-lateral	$50,6 \times 10^3$
	<i>Argyrolepecus sladeni</i>		Centro-lateral	$30,0 \times 10^3$
	<i>Searsia koefoedi</i>		Temporal	$23,8 \times 10^3$
	<i>Rouleina attrita</i>		Temporal	$27,4 \times 10^3$
	<i>Conocara murrayi</i>		Temporal	$11,2 \times 10^3$
	<i>Bathytroctes microlepis</i>		Temporal	$30,8 \times 10^3$
	<i>Alepocephalus rostratus</i>		Temporal	$24,6 \times 10^3$
	<i>Synaphobranchus kaupi</i>		Nasal	$12,6 \times 10^3$
	<i>Platytrictes apus</i>		Ventral	$6,3 \times 10^3$
	<i>Bathypterois dubius</i>		Temporal	$26,2 \times 10^3$
	<i>Serrivomer beani</i>		Nasal	$5,3 \times 10^3$
		Temporal	$7,8 \times 10^3$	
		Nasal	$7,3 \times 10^3$	
		Periferia	$12,5 \times 10^3$	

Tabela 1: Continuação

AUTOR	ESPÉCIE	HÁBITAT	REGIÃO DA RETINA	DENSIDADE CELULAR
Collin, Hoskins e Partridge (1997)	<i>Argyropelecus affinis</i>	Demersal	Nasal	34.0×10^3
	<i>Argyropelecus gigas</i>	Demersal	Nasal	31.3×10^3
	<i>Argyropelecus aculeatus</i>	Demersal	Nasal	41.9×10^3
	<i>Argyropelecus sladeni</i>	Demersal	Centrolateral	30.0×10^3
	<i>Argyropelecus hemigymnus</i>	Demersal	Centrolateral	33.0×10^3
Collin, Hoskins e Partridge (1998)	<i>Scopelarchus michaelsarsi</i>	Mesopelágico	Centrolateral	56.1×10^3
Ito et al. (1999)	<i>Acipenser transmontanus</i>	Demersal	Temporal/nasal	-
Bozzano e Collin (2000)	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Bêntico	Temporal	2.3×10^3
	<i>Galeus melastomus</i>	Bentopelágico	Temporal/nasal	2.5×10^3
	<i>Etmopterus spinax</i>	Mesopelágico	Central	0.9×10^3
	<i>Isistius brasiliensis</i>	Pelágico	Temporal	1.5×10^3
	<i>Hydrolagus mirabilis</i>	Bentopelágico	Temporal/nasal	1.9×10^3
	<i>Galeocerdo cuvieri</i>	Pelágico	Central	1.9×10^3
	<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	Bêntico	Central	1.8×10^3
	<i>Raja bigelowi</i>	Bêntico	Temporal/nasal	2.2×10^3
Mangrum e Dowling (2002)	<i>Danio rerio</i>	Bentopelágico	Ventrottemporal	37.0×10^3
Douglas et al. (2002)	<i>Liposarcus pardalis</i>	Demersal	Dorso ventral	18.6×10^2
Bailes et al. (2006)	<i>Neoceratodus forsteri</i>	Demersal		
Oliveira et al. (2007)	<i>Anableps anableps</i>		Faixa horizontal (hemiretina ventral)	18.0×10^3

O padrão de distribuição de células ganglionares do *Sebasticus marmoratus* e *Novadon modestus* foi analisado por Ito e Murakami (1984) em montagens planas de retina utilizando a coloração de Nissl. Os autores observaram a existência de uma área de alta densidade celular localizada na região temporal, um possível indicativo de visão binocular. Além disto, utilizaram marcação com peroxidase de raiz forte para classificar morfologicamente as células ganglionares, levando em consideração tamanho, forma, localização do corpo celular, assim como o padrão de arborização dendrítica. Estes autores encontraram seis diferentes tipos de células ganglionares assim classificados: 1) tipo I, células com corpo celular pequeno, arredondado ou oval, com um diminuto campo dendrítico localizado na camada plexiforme interna; 2) tipo II, células semelhantes ao tipo I, mas com o campo dendrítico mais próximo a camada de células ganglionares na região mais interna da camada plexiforme interna; 3) tipo III, células com corpo celular de tamanho médio e dendritos amplamente espalhados na camada plexiforme

interna, mas com poucas ramificações; 4) tipo IV, células com corpo celular largo, com dendritos bastante ramificados, espalhados em uma área reduzida da camada plexiforme interna; 5) tipo V, células com corpo celular largo, de vários formatos, deslocados na camada nuclear e dendritos estendidos em todas as direções da camada plexiforme interna, ocupando uma grande área; e 6) tipo VI, células com corpo celular bastante grande, com a árvore dendrítica confinada em uma área triangular e três ou quatro ramificações se estendendo para a periferia da retina.

Utilizando as técnicas de coloração com azul de metileno e cresil violeta, Mangrum e Dowling (2002) observaram a distribuição de células ganglionares na retina do *Danio rerio*, encontrando valores médios de 12.000 células/mm² na retina dorso-nasal e um pico de densidade celular localizado na região ventro-temporal de 37.000 células/mm². A localização deste pico de densidade celular estaria relacionada ao hábito alimentar do animal que captura o alimento que se encontra flutuando na superfície da água utilizando um espaço visual superior e frontal. Os mesmos autores através da técnica de marcação retrógrada do nervo óptico por grânulos de Dil (*Dil C18*) identificaram onze tipos diferentes de células ganglionares em retina de *Danio rerio* baseados nos critérios de comprimento, largura do corpo celular, profundidade de estratificação na camada plexiforme interna, espessura da estratificação, largura total da árvore dendrítica e padrão de ramificação na árvore dendrítica (Figura 4).

A distribuição de células ganglionares na retina do *Carasius auratus* foi investigada por Mednick e Springer (1988) através da técnica da aplicação da lisina-cobalto no nervo óptico do animal por vinte e quatro horas. O número de células ganglionares diminui com o aumento da área da retina, ou seja, retinas de tamanhos pequeno e grande (comprimento do animal variando de 2 a 9 cm), diferem na percentagem de células ganglionares encontradas na camada de células ganglionares, no entanto, em ambos os tamanhos, a maior densidade é encontrada na região temporal com valores totais de 75% de células ganglionares nas retinas menores e 50% de células ganglionares nas retinas maiores, o restante de células da região temporal possivelmente sejam células amácrinas deslocadas.

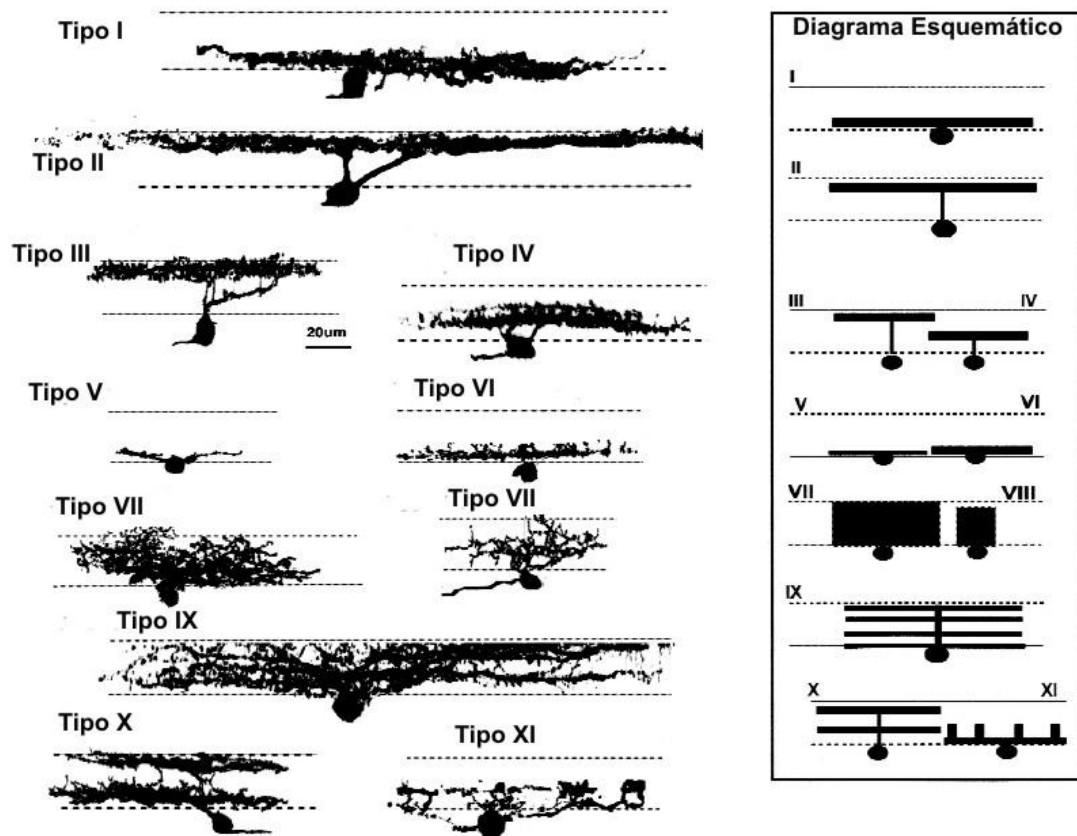


Figura 4: Células ganglionares em retina da *Danio rerio* (Modificada de Mangrum e Dowling, 2002)

A análise das células ganglionares de cinco espécies de peixes encontrados em recifes de corais foi realizada por Collin e Pettigrew (1988b), utilizando a técnica de marcação pela coloração de Nissl em montagens planas de retina, onde perceberam que animais que possuíam uma maior densidade de células ganglionares localizadas em uma faixa horizontal, caracteristicamente habitavam regiões do recife mais voltadas para o mar aberto. Em contrapartida, em outro estudo realizado pelos mesmos autores (Collin e Pettigrew, 1988a), com outras espécies de peixes, notaram que as espécies que possuíam áreas de alta densidade celular que não fosse localizadas em uma faixa horizontal, normalmente eram encontradas em áreas mais circunscritas do recife.

Collin (1988) estudou a retina duplex de *Rhinobathus batillum* e encontrou um padrão de distribuição de células ganglionares em duas

camadas, com uma grande proporção de células ganglionares deslocadas encontradas na camada plexiforme interna. A análise topográfica das células ganglionares revelou que existem duas regiões de grande densidade celular, a margem nasal e a região temporo-dorsal. A presença destas duas áreas de densidade celular pode estar relacionadas com o aumento da visão panorâmica do meio ambiente o que contribui para a natureza predatória do animal. A marcação retrógrada com lisina-cobalto revelou três tipos celulares: células pequenas, com corpo celular entre 20 a 50 μm^2 ; células grandes, com corpo celular entre 80 e 300 μm^2 e células gigantes com corpo celular maior que 300 μm^2 .

A densidade de células ganglionares através da coloração de Nissl em dezesseis espécies de peixes do fundo do mar de diferentes profundidades, habitats e zonas fóticas foi observada por Collin e Partridge (1996). Nas espécies mesopelágicas, a densidade celular aumenta na retina marginal, realçando a visão periférica. Algumas espécies bênticas, possuem uma área de alta densidade na retina temporal com o gradiente de células centro-periferia na proporção de 30:1. Estes dados sugerem que os peixes do fundo do mar usam uma região específica do campo visual para acuidade visual, o que pode ser uma vantagem para detecção e localização de fontes de luz bioluminescentes.

A avaliação da topografia das células ganglionares em retina de dez espécies de peixes do fundo do mar que possuem olhos tubulares foi estudada por Collin *et al.*, (1997). Olhos tubulares são olhos imóveis que possuem um grande e esférico cristalino e subentende um grande campo visual binocular direcionado dorsalmente ou rostralmente. São derivados de olhos não tubulares laterais e são compostos por uma fina retina principal onde ocorre a focalização da imagem, direcionando a visão binocular e uma retina acessória, lateral relacionada com a visão monocular lateral. A distribuição de células foi analisada em montagens planas de retina. Em todas as espécies, a retina principal apresentou um aumento de densidade celular no sentido centro-perifera na proporção de 60:1, o que favorece a visão binocular.

A retina do *Scopelarchus michaelsarsi*, um peixe mesopelágico com olhos tubulares foi estudada por Collin, Hoskins e Partridge (1998). Os autores

identificaram uma região de alta densidade de células ganglionares na retina principal, localizada na região centrolateral. O padrão de distribuição das células ganglionares sugere a percepção da presa em movimento o corrobora com o hábito do animal que se alimenta de presas que se encontram a meia água.

O padrão de distribuição de células ganglionares em retina de *Acipenser transmontanus* foi analisado por Ito *et al.* (1999) em células marcadas por Nissl, onde áreas de maior densidade foram encontradas na retina temporal e nasal e uma densa faixa de células ganglionares foi observada no eixo horizontal, entre as áreas de alta densidade. A densidade de células na retina dorsal é extremamente baixa o que sugere uma acuidade visual reduzida no campo visual ventral.

Bozzano e Collin (2000) examinaram a distribuição de células ganglionares em oito espécies de elasmobrânquios de diferentes profundidades e hábitos. Na maioria das espécies, a análise topográfica, revela uma faixa horizontal proeminente ao longo do meridiano dorsal da retina em conjunto com uma ou mais regiões de alta densidade. O aumento de densidade nesta região sugere uma maior acuidade visual no campo de visão ventral do animal.

1.2 INTERVENÇÃO ANTRÓPICA NO AMBIENTE AQUÁTICO

Os efeitos adversos das atividades humanas sobre o ambiente representam uma grande preocupação, principalmente a contaminação ambiental por substâncias químicas em virtude de um aumento na industrialização e dos usos intensivos dos recursos naturais pela agropecuária, silvicultura e mineração (Fericola e Oliveira, 2002). O aumento das emissões de poeiras e de gases inorgânicos e orgânicos é uma ameaça para o ambiente e para a saúde humana (Teles *et al.*, 2002), assim como, o aumento da emissão de metais tóxicos e de alguns compostos químicos orgânicos persistentes (POPs), representam perigo não somente para os organismos humanos como para toda a vida selvagem (Fericola e Oliveira, 2002).

A biota aquática está constantemente exposta a uma infinidade de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diferentes fontes de

emissão. A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, dos processos de drenagem agrícola, dos derrames acidentais de lixos químicos e dos esgotos domésticos lançados em rios e mares contribui para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos, como chumbo, o cádmio e o mercúrio que ao serem liberados no ambiente causam um grande impacto ecológico principalmente porque são assimilados na cadeia trófica, trazendo muitas vezes danos irreversíveis aos organismos expostos (Azevedo, 2003).

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico com um amplo espectro de ação sobre os tecidos dos vertebrados. As relações diretas entre as atividades profissionais que utilizam o metal começaram a ser investigadas após o uso indiscriminado de mercúrio e seus derivados. Atualmente, conhecem-se melhor os efeitos nocivos dos compostos orgânicos do metal para a saúde humana e de outros animais (Azevedo, 2003).

1.3 MERCÚRIO

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o crescimento das atividades econômicas e industriais tem aumentado de maneira proporcional à utilização de mercúrio (Hg) e seus derivados e, conseqüentemente, da contaminação do ambiente (Olivero *et al.*, 1997).

Uma das possíveis vias de exposição ao mercúrio na espécie humana é através da ingestão de alimentos intoxicados, principalmente peixes². Isto se torna um problema agravante em comunidades onde esta é à base da alimentação (Bidone *et al.*, 1997). Uma evidência para esta afirmativa foi proveniente de estudos realizados por Malm *et al.* (1990) em duas populações próximas as áreas de garimpo, onde quantidades elevadas de Hg são lançadas no ambiente. Em ambas as populações, observou-se que o nível de mercúrio total presente no cabelo de indivíduos estava acima dos aceitáveis pela WHO (1990). Para os indivíduos oriundos de uma região de garimpo no estado do Mato Grosso, os valores encontravam-se na faixa de 0,4 a 6,3 ppm (média de 2.4 p.p.m de mercúrio), enquanto que em indivíduos oriundos da região do

² O que depende principalmente da cinética do Mercúrio em ambientes aquáticos e não de características intrínsecas dos peixes.

Tapajós estes valores estavam entre 10.0 a 31.8 ppm (média de 18.7 ppm de mercúrio). A grande diferença na concentração de mercúrio total encontrada nas duas populações foi relacionada ao fato de que somente na Região do Tapajós a base de alimentação protéica da população era o pescado, tornando-se evidente a relação direta entre a quantidade de mercúrio encontrado e o consumo de peixes contaminados.

Vários estudos foram feitos para se investigar o nível de mercúrio em diferentes espécies de peixes da região (Tabela 2). Agaki *et al* (1995), analisaram a concentração de mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (MeHg) em cabelo humano e exemplares de peixes em cinco vilas localizadas na Bacia do Rio Tapajós (Rio Teles Pires, Rio Rato, Brasília Legal, Itaituba, Santarém). No Rio Teles Pires, o jau apresentou o maior valor de HgT, 3,82 ng/g; no Rio Rato, o maior valor encontrado foi de 1,60ng/g em peixe-cachorro; na vila de Brasília Legal, o tucunaré apresentou os maiores valores de HgT, 1,16 ng/g ; na vila localizada próxima a Itaituba, o maior valor encontrado foi de 1,0 ng/mg em filhote e na vila próximo ao município de Santarém, os valores de HgT estavam baixos, sendo que o maior quantidade de HgT foi encontrada no apapa e foi de 0,39 ng/mg.

Os níveis de Hg nas principais espécies de peixes utilizadas para o consumo humano no reservatório de Tucuruí e Rio Mojú foi determinado por Porvari (1995). As concentrações mais altas de Hg foram encontradas nos peixes predatórios (piranha: $2,6\pm 0,91$ mg Hg/kg, N = 15; pescada: $1,2\pm 0,58$ mg Hg/kg, N = 33 e tucunaré: $1,1\pm 0,81$ mg Hg/kg, N = 53). Estes valores estão acima do permitido que é de 0,5 mg Hg/kg (WHO, 1976) e 1,0 mg Hg/kg (ANVISA, 1998) em peso fresco de peixes.

Em trabalhos realizados na comunidade do posto indígena de Sai Cinza, Reserva Munduruku, município de Jacareacanga, Brabo *et al.* (1999), verificaram que a concentração média de mercúrio nos peixes carnívoros foi de 0,293 μ g Hg/g (DP = 0,104). Deste grupo, o barbado (N = 03), o surubim (N = 01) e a traíra (N = 07) apresentaram as concentrações médias mais altas entre os intervalos de 0,322 a 0,419 μ g Hg/g. O tucunaré (N = 17), apresentou valores médios entre 0,267 e 0,049 μ g Hg/g. Neste estudo, também demonstrou-se que o pescado representa a dieta básica diária em 100% dos indivíduos entrevistados, sendo consumido no mínimo três vezes por dia.

Apesar do pescado consumido pela população de Sai Cinza estar com as concentrações médias abaixo das consideradas prejudiciais a saúde humana, os autores sugerem que a frequência e a quantidade/dia ingerida são componentes essenciais na avaliação do risco de intoxicação por mercúrio.

As concentrações totais de mercúrio em diferentes espécies de peixes no município de Itaituba foi avaliado por Santos *et al.* (2000) na bacia do rio Tapajós. Altas concentrações de mercúrio foram encontradas nas espécies carnívoras na faixa de 112,4 -2250 µg Hg/g, enquanto que em peixes dentritívoros, herbívoros e omnívoros, os níveis achados estavam entre 3,2 e 309,8 µg Hg/g, valores aceitáveis pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1976). Dentre as espécies carnívoras, o surubim (N = 10) e a dourada (N = 10) tiveram as maiores concentrações de mercúrio, sendo que o surubim apresentou a melhor relação concentração de mercúrio/peso do animal. No tucunaré (N = 10), também foram encontradas elevadas concentrações de mercúrio, (214,4 – 610,5 µg Hg/g, com uma média de 375,9 ±155,3 µg Hg/g).

1.4 O MERCÚRIO NO SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso de vertebrados é bastante afetado pela intoxicação mercurial e muitas vezes este quadro é irreversível. Em várias espécies estudadas, o mercúrio demonstrou ser um elemento neurotóxico, com evidente prejuízo no desenvolvimento embrionário e fetal, resultando no dano cerebral e comprometimentos comportamentais e cognitivos em seres humanos (Carpenter, 2001).

Em ratos expostos ao cloreto de metilmercúrio (MeHg), observou-se o aparecimento de lesões nos nervos periféricos, nervos sensoriais, estruturas da espinha dorsal e células cerebelares, onde o principal mecanismo de dano foi a apoptose (Nagashima, 1997).

Em trabalhos realizados com intuito de avaliar a distribuição de mercúrio orgânico e inorgânico em diferentes tecidos de cérebro, rim, fígado e pele da doninha e da lontra, observou-se que a maior concentração de metilmercúrio era encontrada no cérebro destes animais (Evans *et al.*, 2000).

Tabela 2: Concentração de mercúrio total (HgT) em diferentes espécies de peixes

AUTOR	ESPÉCIE	ESTRATÉGIA ALIMENTAR	LOCAL	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	CONCENTRAÇÃO DE HGT
Agaki <i>et al</i> (1995)	Piraíba	Predador	Rio Teles Pires	-	3,82 ng/mg
	Peixe-cachorro	Predador	Rio Rato	-	1,60 ng/mg
	Tucunaré	Predador	Rio Tapajós	-	
	Filhote	Predador	(Brasília legal)	-	1,16 ng/mg
	Apapa	Predador	Rio Tapajós	-	1,0 ng/mg
				(Itaituba)	
			Rio Tapajós (Santarém)		
Porvari (1995)	Piranha	Predador	Bacia do	15	2,6 mg/kg
	Pescada	Predador	Tocantins	33	1,2 mg/kg
	Tucunaré	Predador		53	1,1 mg/kg
Brabo <i>et al</i> (1999)	Tucunaré	Predador	Jacareacanga	17	0,322 a 0,419 µg/g
	Surubim	Predador		01	0,322 a 0,419µg/g
	Traíra	Predador		07	0,322 a 0,419µg/g
	Barbado	Predador		03	0,267 a 0,049µg/g
Santos <i>et al</i> (2000)	Surubim	Predador	Itaituba	10	215,0 a 1757 µg/g
	Dourada	Predador		10	212,0 a 13560µg /g
	Tucunaré	Predador		10	214,4 a 610,5 µg/g
	Filhote	Predador		10	112,4 a 891,8 µg/g
	Pesacada	Predador		10	331 a 2250 µg/g
	branca	Predador		10	476,7 a1226,1 µg/g
	Sarda				

Fêmeas gestantes de primatas foram expostas ao vapor de mercúrio a diferentes concentrações e diferentes números de dias. Os filhotes foram sacrificados em intervalos de tempo variáveis entre um mês e três anos, os olhos foram analisados e constatou-se que porções não mielinizadas dos neurônios estavam altamente carregadas com depósitos de mercúrio, como as paredes de capilares, as células gliais, e o epitélio pigmentar, levando a um dano potencial à retina neural (Warfvinge e Bruun, 1996).

Vários estudos foram realizados em diferentes espécies de peixes para avaliar o efeito do mercúrio sobre estes animais. Em peixes, o MeHg, penetra rapidamente no organismo e é assimilado pelas vísceras e brânquias, se liga

as células sanguíneas e é transportado para todos os órgãos (Wiener e Spry, 1996). O sistema nervoso central é o principal alvo do mercúrio, sendo que a maior quantidade de mercúrio é encontrada no cérebro (Ginblin e Massaro, 1973; Hawryshyn e Mackay, 1979; Olson et al., 1978), excedendo enormemente os valores encontrados na musculatura (Miettinen *et al.*, 1970), provavelmente devido a alta concentração de grupos sulfidrilas que se ligam de forma irreversível com o MeHg (Manalis e Cooper, 1975). Os olhos também são afetados pelo MeHg, levando a uma diminuição na sensibilidade visual, alterando tanto a via fotópica quanto a via escotópica em peixes expostos ao MeHg (Hawryshyn e Mackay, 1979). O MeHg também altera o comportamento de fuga frente ao predador, aumentando a vulnerabilidade de predação do animal, contribuindo significativamente para modificações na cadeia alimentar (Webber e Haines, 2003).

1.4.1 O mercúrio no sistema visual

A intoxicação severa por MeHg provoca déficits visuais em humanos caracterizados por limitação do campo visual (Cavalleri *et al.*, 1995; Lebel *et al.*, 1996; Lebel *et al.*, 1998; Cavalleri e Gobba, 1998; Damin, 2000; Silveira *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004; Canto-Pereira *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2003a; Ventura *et al.*, 2003b; Ventura *et al.*, 2003c; Ventura *et al.*, 2005; Simões, 2004; Lago, 2005; Santana, 2006).

Existem poucos relatos na literatura dos efeitos do MeHg sobre a retina de peixes. Hawryshyn e Mackay (1979) e Hawryshyn *et al.*, (1982) foram os primeiros a evidenciar que na retina de truta arco-iris houve uma diminuição da sensibilidade visual, tanto na visão fotópica como na visão escotópica, após injeções peritoneais de cloreto de MeHg por kilo de peso, com doses variáveis entre 0; 2,3; 4,6 e 6,2 mg/kg (Hawryshyn e Mackay, 1979) e 1,9; 4,6; 6,2 mg/kg (Hawryshyn *et al.*, 1982), aplicadas anteriormente às nadadeiras pélvicas. Alguns estudos relatam seu efeito danoso no nervo óptico, camada nuclear interna e células ganglionares (Merigan, 1979 e Castodi *et al.*, 2003).

Em um trabalho realizado com traíras (*Hoplias malabaricus*) (Bonci *et al.*, 2006) expostas em laboratório a doses de 2 e 6 µg/g de MeHg, demonstrou que o MeHg altera de forma dose-dependente a densidade de células

amácricinas imunoreativas a parvalbumina, além de diminuir a densidade de células bipolares imunoreativas a PKC α . sugerindo que o MeHg possa estar influenciando no processamento retiniano da visão escotópica do animal. A traíra por ser um peixe de hábitos noturnos, prefere locais com bastante vegetação e água turva, sofreria assim alterações significativas no processamento da informação visual.

Também nesta espécie, o efeito do MeHg na amplitude de respostas a luz dada pelas células horizontais foi avaliado. A intoxicação foi realizada por injeção intraperitoneal (0.01; 0.05; 0.1; 1.0; 2.0 e 6.0 mg/kg.) e trófica (0.75 (N = 1 retina), 0.075 (N = 8 retinas) ou 0.0075 (N = 4 retinas) mg/kg por kilo de peixe). Os resultados encontrados sugerem que a intoxicação com MeHg afeta a resposta eletrofisiológica das células horizontais, aumentando ou reduzindo a amplitude em comparação aos animais controle, sendo que estes efeitos podem estar relacionados com a dose e/ou o modo de administração, já que a amplitude de resposta foi mais baixa que nos controles em indivíduos expostos a concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 mg/kg e nenhuma resposta foi registrada em doses de 1,0, 2,0 e 6,0 mg/kg. Na administração trófica, amplitude de resposta foi mais alta que em indivíduos controle nas exposições de 0,075 e 0,0075 mg/kg e menor em indivíduos expostos a 0,75 mg/kg (Tanan *et al.*2006).

1.5 O TUCUNARÉ COMO MODELO DE ESTUDO

Existem cerca de diferentes 200 espécies de peixes com importância comercial na Amazônia (Ferreira *et al.*,1998). O tucunaré é um peixe nativo da região amazônica pertencente à família Cichlidae que é constituída por vários gêneros e espécies distribuídas na África e Américas do Sul e Central (Machado-Allison, 1977). Na região amazônica, do Pantanal e Araguaia, o gênero *Cichla* é popularmente conhecido como tucunaré, constituída por várias espécies: *Cichla ocellaris* (tucunaré açu ou tucunaré comum), *Cichla temensis* (tucunaré pinima ou tucunaré .sp. (Ferreira *et al.*, 1998) (Figura 5).

O tucunaré é um predador por excelência (Machado, 1983) e usa a visão como um instrumento essencial no seu comportamento de predação. (Zaret, 1980). Além disso, o animal apresenta carne muito saborosa tornando-se uma

importante fonte para comercialização (Ruffino e Isaac, 1995, Castilhos *et. al*, 2001).

Em vários peixes, foram realizados estudos sobre os efeitos do mercúrio em processos de absorção intestinal e distribuição subcelular (Olson *et al.*, 1978); nefrotoxicidade (Trump *et al.*,1975), toxicologia endócrina (Joy e Kirubaragan, 1989), histopatológicos em brânquias, epitélio olfativo, fígado e rim (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002), sistema nervoso e músculos (Hawryshyn e Mackay, 1979) e sistema visual (Hawryshyn *et al.*, 1982). Em tucunaré, entretanto, todos os trabalhos relacionados ao mercúrio são voltados para somente a investigação dos processos de bioacumulação e biomagnificação do MeHg, não havendo relatos de possíveis alterações morfológicas nos tecidos assim como tais alterações podem modificar a ecologia do animal.



Figura 5: *Cichla sp.* (Modificada de img.mercadolivre.com.br/jm/img?s=LIB&f=87607238_388.jpg).

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar alterações quantitativas de células ganglionares na retina do tucunará sob o efeito de MeHg em situação experimental.

2.2 Específicos

Descrever o padrão de distribuição das células ganglionares na retina de tucunará controle através de técnica de coloração de Nissl;

Comparar o número de células ganglionares na retina de animais controles e expostos em laboratório a diferentes doses de metilmercúrio;

Medir e relacionar as concentrações de mercúrio total (HgT) em amostra de retina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 48 exemplares de tucunaré (*Cichla sp.*) provenientes da Piscicultura São Geraldo (Sertãozinho/SP). Os animais foram climatizados por um período de quinze dias em quatro aquários de vidro com dimensões de 45 centímetros de comprimento por 25 centímetros de largura e 35 centímetros de altura, mantidos em ciclo de 14 horas de luz por 10 horas de escuro, com temperatura ambiente de 27°C, pH de 7,3 e água reconstituída (ABNT2) antes de serem expostos ao metilmercúrio.

O MeHg (Sigma) utilizado na exposição dos animais foi diluído a partir de uma solução estoque de 100 mg/ml dissolvida por agitação em água destilada e acondicionada a temperatura de 20°C na geladeira. Toda manipulação do MeHg foi realizada com uso de EPIs e a temperatura de 22°C para evitar a evaporação durante o uso.

Após a climatização, os animais foram expostos em laboratório a doses crescentes de MeHg preparadas por diluição a partir da solução estoque nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/kilograma do animal.

A exposição dos animais ao MeHg foi realizada por via intraperitoneal uma única vez. Após a intoxicação, os animais foram separados em grupos de acordo com a dose injetada (0,5; 1,0 e 2,0 µg/kg), com 12 indivíduos por dose, mais o grupo controle (CTR), também composto por 12 indivíduos que foram expostos à solução salina, totalizando os 48 exemplares utilizados neste estudo. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas previamente.

Aproximadamente 40% da amostra morreu em até 24 horas após a exposição. Dos animais restantes, onze foram sacrificados com 15 dias de depuração e nove com 22 dias de depuração. As retinas (n=40) de 20 animais foram utilizadas em estudo morfológico de células ganglionares (n=32) e quantificação de mercúrio total (HgT) (n=8).

A intoxicação dos peixes em laboratório foi desenvolvida no Laboratório de Psicobiologia e Psicopatologia Experimental, sob orientação do Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior do Departamento de Psicologia da Faculdade de

Ciências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Bauru).

Os procedimentos experimentais foram feitos em obediência às normas da ARVO (*The Association for Research in Vision and Ophthalmology*) e SBNEC (Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento).

A tabela 3 apresenta um resumo dos animais utilizados neste trabalho, com comprimento, peso e dose de metilmercúrio (MeHg) utilizada. Somente em 60% destes animais (n= 12), destacados em negrito, foi possível a realização de todos os procedimentos experimentais, sendo os demais descartados da análise.

3.2 PROCEDIMENTOS MORFOLÓGICOS

3.2.1 Enucleação, dissecação e fixação da retina

Os animais foram anestesiados e após a secção medular, o cérebro foi destruído com o auxílio de um espinalador e os olhos enucleados. A referência do plano dorsal foi realizada com a aplicação de um alfinete histológico na superfície esclero/corneana, antes da retirada do olho para posicionar a retina do animal. O globo ocular foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma tesoura de ponta romba até o completo desprendimento do olho, com a secção do nervo óptico.

Os procedimentos de dissecação da retina foram realizados utilizando-se um estereomicroscópio (Carl Zeiss) em baixo aumento e instrumentos para cirurgia oftalmológica. Com auxílio de pinças e bisturi, inicialmente foi retirada a calota anterior, tomando-se o cuidado de não perder a orientação da retina do animal, a seguir, foram realizados cortes radiais para a visualização de todas as camadas da retina.

Tabela 3: Animais utilizados, comprimento, peso e dose de MeHg

ANIMAL	MASSA (gramas)	COMPRIMENTO (centímetros)	DOSE MeHg UTILIZADA (µg/kg)
TC050204J	4,6	6,6	CTR*
TC050204K	7,8	7,1	CTR
TC050211L	6,8	7,0	CTR
TC050211M	3,6	6,0	CTR
TC090108E	4,0	6,3	CTR
TC050204A	8,0	8,5	0,5
TC050204B	5,8	6,7	0,5
TC050204C	5,0	7,0	0,5
TC050211N	7,7	7,5	0,5
TC050211O	8,0	7,8	0,5
TC050204G	4,5	7,0	1,0
TC050204H	6,2	7,0	1,0
TC050204I	7,6	8,0	1,0
TC050211P	8,4	7,9	1,0
TC050211Q	6,1	7,2	1,0
TC050211R	5,8	7,4	1,0
TC050204D	9,5	8,2	2,0
TC050204E	6,0	7,8	2,0
TC050204F	7,1	8,2	2,0
TC050211S	5,6	7,8	2,0

*CTR: Animal controle

As retinas foram fixadas por imersão em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M por 3 horas à temperatura ambiente, sendo depois armazenadas em tampão fosfato 0,1M e mantidas sob refrigeração até o momento de sua utilização ou com formaldeído diluído em solução salina 0,9% na proporção de 1:9, sendo armazenadas neste fixador à temperatura ambiente até o momento da utilização.

3.2.2 Montagens Planas

Nas montagens planas foram utilizadas 32 retinas. O humor vítreo foi retirado o mais completamente possível já que grandes quantidades deste material acumulam-se muito ao corante prejudicando a visualização das células. Depois de fixada, a retina foi montada em lâmina gelatinizada com meio de montagem de Fol, procurando-se desfazer todas as dobras existentes. A seguir, um papel filtro embebido em solução de formaldeído 10% foi colocado sobre a retina e sobre ele uma lamínula de vidro, formando um sanduíche, sendo o conjunto disposto em uma cuba com uma solução de nove partes de álcool etílico absoluto para uma de formaldeído, por 12 horas para o completo aplanamento da retina.

3.2.3 Método de Nissl

O Método de Nissl foi realizado para a quantificação da população total de células ganglionares.

Para a coloração com acetato de cresil violeta, após o desmonte do sanduíche, a retina passou pela seguinte bateria de coloração:

- a) Etanol 95% - 2 minutos
- b) Etanol 100% - 2 minutos
- c) Etanol/xilol - 2 minutos
- d) Xilol – 2 minutos
- e) Etanol 100% - 2 minutos
- f) Etanol 95% - 2 minutos
- g) Etanol 70% - 2 minutos
- h) Etanol 50% - 2 minutos

- i) Água destilada - 30 segundos
- j) Acetato de cresil violeta 0,3% – 1 a 10 minutos, controlado no microscópio o tempo de coloração
- k) Água destilada (lavagem rápida) – 30 segundos
- l) Etanol 70% - 1 minuto
- m) Etanol 70% + 3 gotas de ácido acético - 1 minuto
- n) Etanol 95% - 1 minuto
- o) Etanol 100% - 1 minuto
- p) Etanol/xilol – 5 minutos
- q) Xilol - 1 minuto
- r) Montagem entre lâmina e lamínula com Permount

3.2.4 Análise microscópica

A análise dos resultados foi realizada em microscópio óptico de fluorescência (Olympus BX41) e uma lupa (Olympus SZX12) dotados de uma máquina digital (E-500 Olympus) com 8.0 *megapixel*. As imagens foram capturadas e processadas em computador com auxílio dos programas Image J 1.40G (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft). Ao fim das contagens os valores encontrados geraram mapas de distribuição celular ao longo de toda a retina através da utilização do software DeltaGraph 5.0 (Delta Point, Monterey, CA , USA).

3.2.5 Estimativa da densidade celular

Para a estimativa da densidade celular, primeiramente, eram originados mapas de contornos das retinas antes e após o processamento histológico com o material já montado e auxílio de um ampliador fotográfico (Opemus 6 Standard, Meopta), estes mapas foram digitalizados com um scanner de mesa (Genius) e salvos em formato JPEG e trabalhados no Image J para o cálculo da área da retina.

Também foram gerados mapas de contornos retinianos em papel milimetrado para auxiliar nas contagens das células ganglionares. Nestes mapas, montados de acordo com as coordenadas XY do microscópio, foi

marcado o ponto zero na retina, sobre o nervo óptico, e definiu-se a excentricidade como uma determinada distância de uma célula ao ponto zero da retina, expresso em milímetros (mm). As contagens foram realizadas ao longo de toda a retina, em intervalos regulares de 1mm. Ao fim das contagens, o número de células foi convertido para células por milímetro quadrado, utilizando-se a seguinte equação matemática:

$\text{Células/mm}^2 = \text{número de células encontradas} \times \text{área da gradícula} (63,02)$
em mm^2 .

O número total de células ganglionares foi obtido pela soma dos valores de densidade celular estimado pelas contagens ao longo de toda a retina.

3.3 ANÁLISE DE HgT

A análise de Hg total (HgT) presente nas amostras se deu através espectrofotometria de absorção atômica com amalgamação em lâminas de ouro, através do emprego do monitor de mercúrio SP3D (Nippon Instrument Corporation). A técnica utilizada neste equipamento é a solubilização das amostras em ácidos sob aquecimento, redução com cloreto estanhoso e posterior leitura dos conteúdos de Hg por fluorescência atômica. A atomização direta das amostras se deu por aquecimento das mesmas a temperatura de 800 °C com posterior leitura do gás formado no analisador de Hg.

Todos os instrumentais utilizados durante o procedimento foram previamente lavados em permanganato de potássio, sabão neutro e água destilada, ficando por cerca de 12 horas em ácido nítrico livre de Hg (SIGMA), antes das amostras serem submetidas a análise de Hg.

As retinas foram dissecadas e armazenadas a -20°C em tubos de vidro lavados conforme descrito anteriormente.

O material a ser analisado era pesado e colocado em um recipiente sobre uma camada de Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2), sobre ele, acrescentava-se uma camada de Hidróxido de Cálcio + Carbonato de Sódio (Na_2CO_3), outra de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)_3) e mais uma de Hidróxido de Cálcio + Carbonato de Sódio. A seguir a montagem era levada ao espectrofotômetro e em cerca de quinze minutos o material era quantificado. Todas as análises

foram realizadas em conjunto com a análise de padrões de referência internacional.

Todos os procedimentos de espectrofotometria foram realizados no Laboratório de Toxicologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos, tanto dos animais controle como dos animais tratados por metimercúrio foram analisados estatisticamente utilizando o programa Minitab 13.0 (Globaltech). Para as análises morfológicas, dado o pequeno tamanho das amostras, uma análise de reamostragem das diferenças entre as medianas de cada grupo foi feita através de 1000 re-amostras por "bootstrapped" foram geradas e a diferença entre as medianas foi calculada. A partir dos valores críticos para a estatística H do teste de Kruskal-Wallis, p-valores associados foram calculados. Nas análises relativas às medidas de MeHg foi utilizado o teste T de *student* com valores de significância de $p < 0,01$.

4 RESULTADOS

4.1 O OLHO DO TUCUNARÉ

Os olhos do tucunaré estão localizados na cavidade orbital, situados lateralmente ao corpo do animal e apresentam um diâmetro ântero-posterior menor quando comparados aos animais terrestres. Os olhos são formados por três camadas dispostas concêntricamente. A mais externa, é formada por uma camada fibrosa denominada de esclera e na sua porção mais anterior, encontra-se uma camada transparente denominada de córnea; a camada média é formada pela coróide e camada mais interna é camada nervosa denominada de retina, responsável pela transdução da luz em sinais neurais que são conduzidos para fora do olho para as áreas mais centrais do sistema nervoso através do nervo óptico. Junto a estas camadas encontra-se o cristalino, o responsável pelo maior poder refrativo da luz sobre a retina. Na

figura 6, se observa o olho do tucunaré em uma vista anterior, onde a córnea foi seccionada para exposição da retina (Figura 6.A) e cristalino (Figura 6.B), e em uma vista posterior, para a visualização do nervo óptico (Figura 6.C).

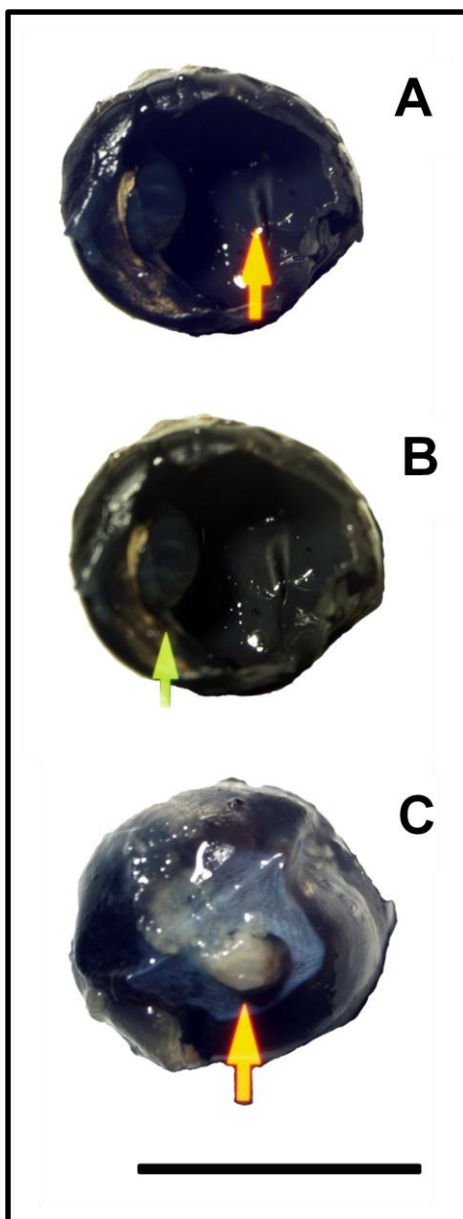


Figura 6: Olho de tucunaré controle (TC090108H). A córnea foi seccionada para a visualização do interior do globo ocular. (A) Vista anterior do olho de tucunaré. A seta está evidenciando a retina (nervo óptico). (B) Vista anterior do olho de tucunaré. A seta está mostrando o cristalino. (C) Vista posterior do olho de tucunaré onde a seta evidencia o nervo óptico.

4.2 A RETINA DE TUCUNARÉ

Na visualização de retinas de tucunaré aplanadas se observa um nervo óptico oval contínuo a uma fissura embrionária (processo falciforme) na porção ventro-temporal da retina. O processo falciforme é uma extensão da coróide e provê a retina de nutrientes, em retinas sem o epitélio pigmentar é possível visualizar o feixe de fibras nervosas convergindo para o nervo óptico (Figura 7). Esta é uma região bastante delicada, dificultando a dissecação da retina, pois se encontra bastante aderida à coróide.

A organização da retina do tucunaré é semelhante à dos vertebrados superiores, invertida e com uma estrutura laminar organizada em camadas nucleares, onde se encontram os corpos celulares e camadas plexiformes que fazem contatos sinápticos com outras células (Figura 8). Dentre as camadas de corpos celulares, distingue-se a camada nuclear externa (CNE), a qual contém os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes), a camada nuclear interna (CNI), contendo os corpos celulares das células bipolares, das células horizontais e das células amácrinas e a camada de células ganglionares (CCG) que contém os corpos celulares das células ganglionares e das células amácrinas deslocadas. As camadas plexiformes são a camada plexiforme externa (CPE), onde ocorrem os contatos sinápticos entre os fotorreceptores, células bipolares e horizontais e a camada plexiforme interna (CPI), onde ocorre as conexões entre as células bipolares, células amácrinas e as células ganglionares.

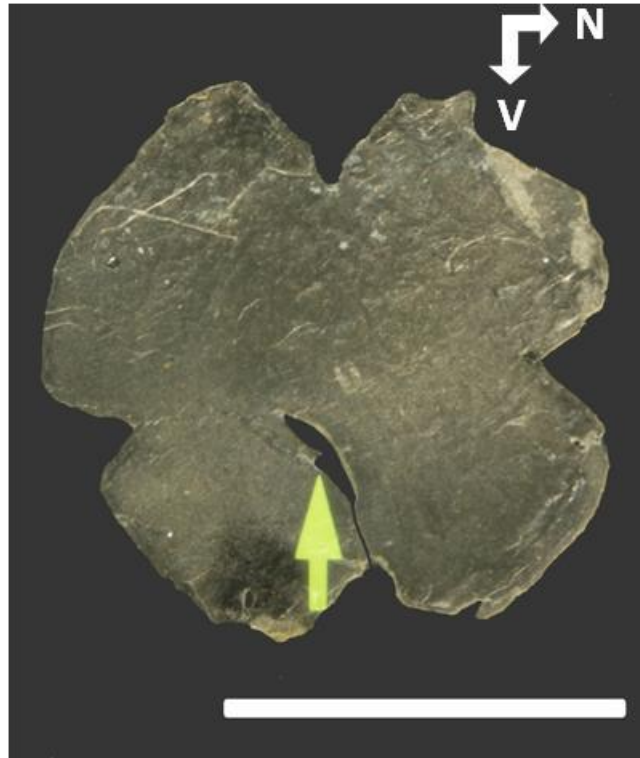


Figura 7: Retina de tucunaré (TC 090108ED CTR) em montagem plana. A seta evidencia o nervo óptico ovalado, contínuo ao nervo óptico observa-se o processo falciforme. N: nasal; V: ventral. Escala = 50mm.

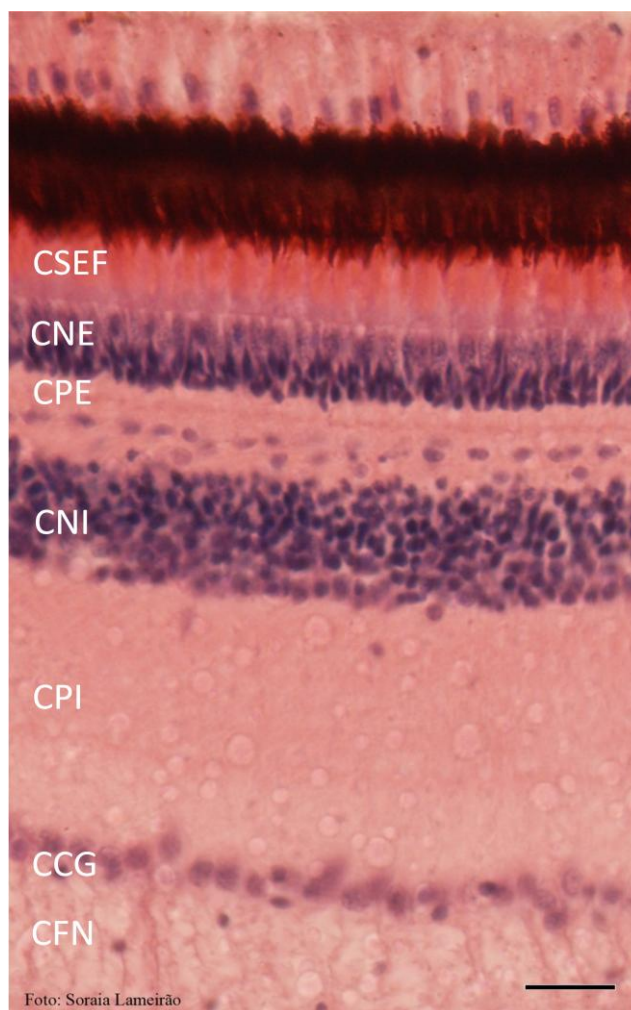


Figura 8: Secção transversal de retina de tucunaré (TC050204J) com espessura de 20 μ m corada pela técnica de hematoxilina e eosina. As abreviações indicam as camadas da retina: CSEF – camada dos segmentos externos dos fotorreceptores; CNE – camada nuclear externa; CPE – Camada plexiforme externa; CNI – camada nuclear interna; CPI – Camada plexiforme interna; CCG – camada de células ganglionares; CFN – camada de fibras nervosas. Escala = 50 μ m.

4.3 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GANGLIONARES EM RETINA DE TUCUNARÉ

A técnica de Nissl corou as células ganglionares na retina de tucunaré. A marcação das células ganglionares foi restrita ao corpo celular, onde se observou uma forma irregular e a presença de numerosos corpúsculos de Nissl devido a presença de grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso e numerosos polirribossomas livres que são corados por corantes básicos e apresentam-se como machas basófilas. Além da presença destes corpúsculos, o núcleo e o nucléolo também foram facilmente identificados no material visualizado.

Outro grupo celular também foi corado pela técnica de Nissl, possivelmente as células amácrinas deslocadas, no entanto, a forma de marcação das células amácrinas difere a das células ganglionares no que diz respeito a não visualização dos elementos descritos anteriormente. Na Figura 9, se observa a marcação do corpo celular das células ganglionares em animal controle (TC050211J CTR) em montagem plana de retina, na seta escura, e na seta clara a marcação de uma célula amácrina deslocada.

O tamanho do corpo celular das células ganglionares varia de acordo com a região da retina, próximo ao nervo óptico (1 mm de excentricidade) se observa a presença de células com corpo celular pequeno e nas regiões mais periféricas (3 mm de excentricidade), o corpo destas células é maior, caracterizando pelo menos dois tipos distintos de células ganglionares (Figura 10).

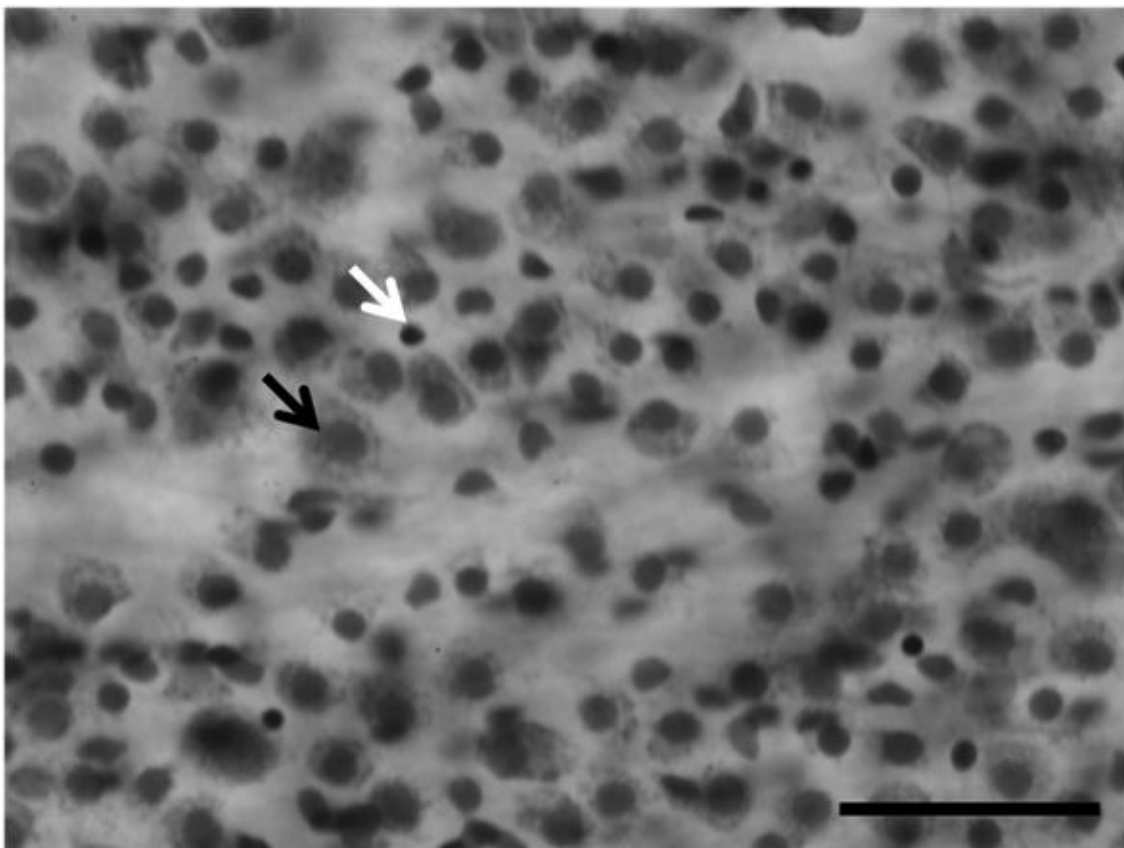


Figura 9: Montagem plana de retina de tucunaré controle (TC050211J CTR) marcada pela técnica de Nissl. Região retiniana central, 2mm dorsal ao nervo óptico. O plano de foco está na camada de células ganglionares, evidenciando a marcação do corpo celular (seta escura). Observa-se ainda a marcação de outro grupo celular, a célula amácrina deslocada (seta clara). Escala = 50 μ m

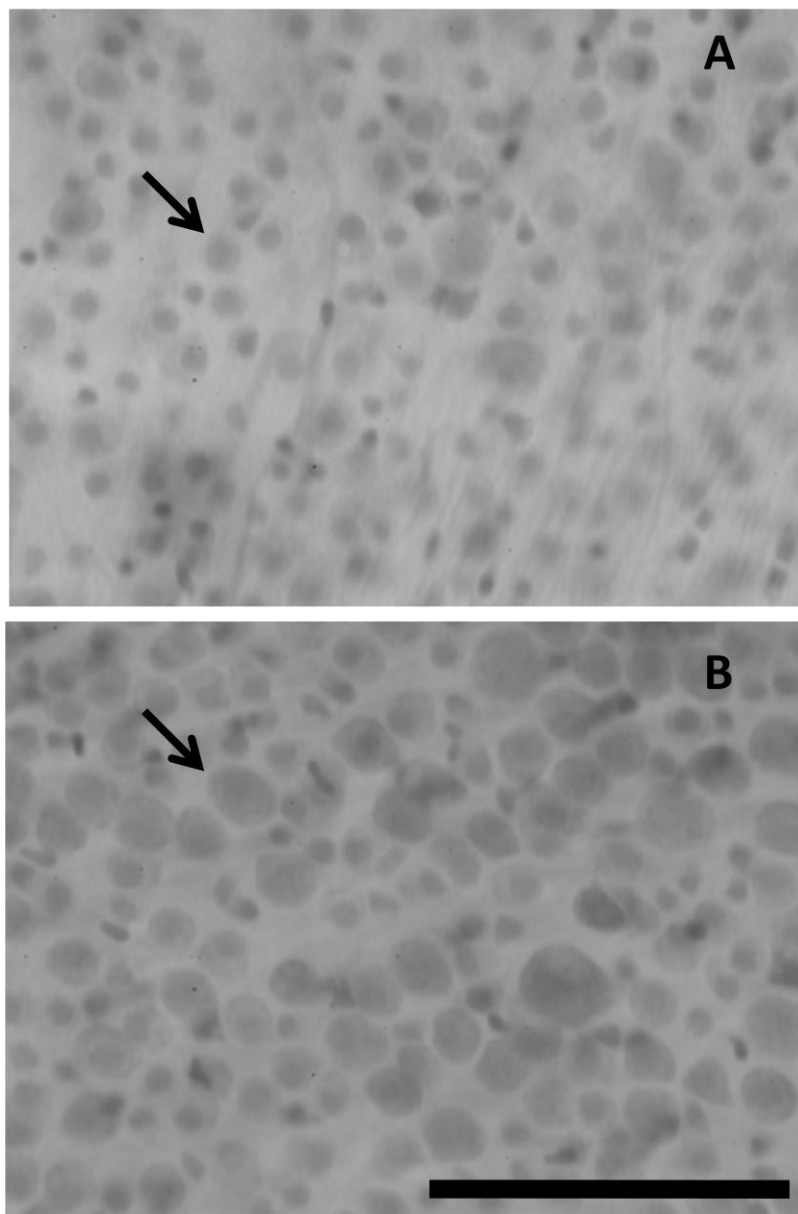


Figura 10: Montagem plana de retina de tucunaré controle (TC050211M CTR) marcada pela técnica de Nissl. O Plano de foco está na camada de células ganglionares, evidenciando a marcação do corpo celular (setas) na porção ventral da retina. (A) Região central a 1mm de excentricidade do nervo óptico. (B) Região periférica a 3 mm de excentricidade do nervo óptico. Escala = 50 μ m.

4.4 DENSIDADE DE CÉLULAS GANGLIONARES EM RETINA DE TUCUNARÉ

4.4.1 Número total de células ganglionares

O número total de células ganglionares foi estimada para cada retina pela soma das densidades em cada ponto da retina, para animais controle (CRT) e tratados com diferentes doses de MeHg (0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). O número total médio de células ganglionares encontradas no animal controle ($n=3$) foi de 203.964 ± 28.742 células; nos animais tratados com $0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ($n=3$) foi de 140.745 ± 26.670 células, onde se observou o menor valor de densidade encontrado; nos animais tratados com $1,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ($n=3$), o valor médio encontrado foi de 159.735 ± 45.998 células e nos animais tratados com dose de $2,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ($n=3$), o valor foi de 189.341 ± 24.002 células (Figura 11). O percentual de perda de células ganglionares em relação ao grupo controle foi de 31% no grupo de $0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$, 22% no grupo de $1,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$ e de 7% no grupo de $2,0 \mu\text{g}/\text{Kg}$. A análise estatística acusou uma diferença significativa entre os grupos ($\alpha < 0,001$). O pós-teste (teste de Tukey) indicou diferenças entre todos os grupos entre si e em relação ao controle.

4.4.2 Densidade média das células ganglionares

A densidade média de células ganglionares foi calculada baseada no número total de células em função da área da retina. A maior densidade média foi encontrada em um indivíduo controle (TC050211M O.E) com 5.565 ± 109 células/ mm^2 e a menor densidade encontrada foi em um animal tratado com $0,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tc050211N O.E) com 2.668 ± 904 células/ mm^2 . Na tabela 4 estão os valores de densidade média de cada retina.

4.4.3 Variação de densidade das células ganglionares

A variação foi observada a partir dos valores médios para cada grupo. Os valores encontrados variam a partir do nervo óptico. No meridiano naso-

temporal, inicialmente, os valores diminuem na região nasal a 2mm de excentricidade e depois aumentam gradativamente na periferia nos animais controle e tratados com as doses de 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, já nos animais tratados com a dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, embora estes valores diminuam a 2mm de excentricidade, eles se mantêm constantes na periferia. Na região temporal se observou um aumento de densidade a partir do nervo óptico em direção à periferia. Na região temporal foram encontradas as maiores densidades em todos os grupos. No grupo de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, o valor médio encontrado foi de 5.507 células/ mm^2 ; nos animais tratados com 1,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, o valor médio encontrado foi de 5.580 células/ mm^2 e no grupo de 2,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, o pico de densidade foi de 6.247 células/ mm^2 . No animal controle o pico de densidade foi de 8.445 células/ mm^2 (Figura 12).

No meridiano dorso-ventral, os valores médios aumentam a partir do nervo óptico em direção a periferia em todos os grupos, tanto na região dorsal com na região ventral. No grupo de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, entretanto, estes valores diminuíram na periferia a partir de 3 mm de excentricidade do nervo óptico, enquanto que nos outros grupos estes valores se mantiveram constantes. O pico de densidade do animal controle (8.016 células/ mm^2) e dos grupos de 0,5 (4.933 células/ mm^2) e 2,0 (5.466 células/ mm^2) $\mu\text{g}/\text{Kg}$ foi localizado na região na região ventral. No grupo de 1,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, este valor foi de 4.790 células/ mm^2 na região dorsal (Figura 13).

Na figura 14 se observa o perfil de distribuição de densidade de todos os grupos no meridiano naso-temporal e dorso-ventral. Esta distribuição foi montada baseada na média de todos os grupos. Os maiores valores de densidade encontrados em ambos os meridianos foram relativos ao grupo controle. O perfil de distribuição é semelhante em todos os grupos expostos ao MeHg.

A partir da densidade de células ganglionares foram gerados mapas de isodensidade. Em cada grupo, foi escolhida a melhor retina que representava dos resultados. No animal controle, TC050211MO.E (Figura 15) se observa um padrão de distribuição na região ventro-temporal e um pico de densidade na região dorsal. O pico de densidade celular encontrado no animal controle foi de 18.000 células/ mm^2 . Em todos os grupos tratados foi observado um padrão de

distribuição celular semelhante ao do controle na região ventro- temporal e um pico na região dorsal, com um pico de densidade semelhante para todos os grupos expostos de 6.000 células/mm². As figuras de 16 a 18, representam os animais de 0,5 µg/Kg (TC050211NO.D), 1,0 µg/Kg (TC050211RO.D) e 2,0 µg/Kg (TC050211SO.D) respectivamente.

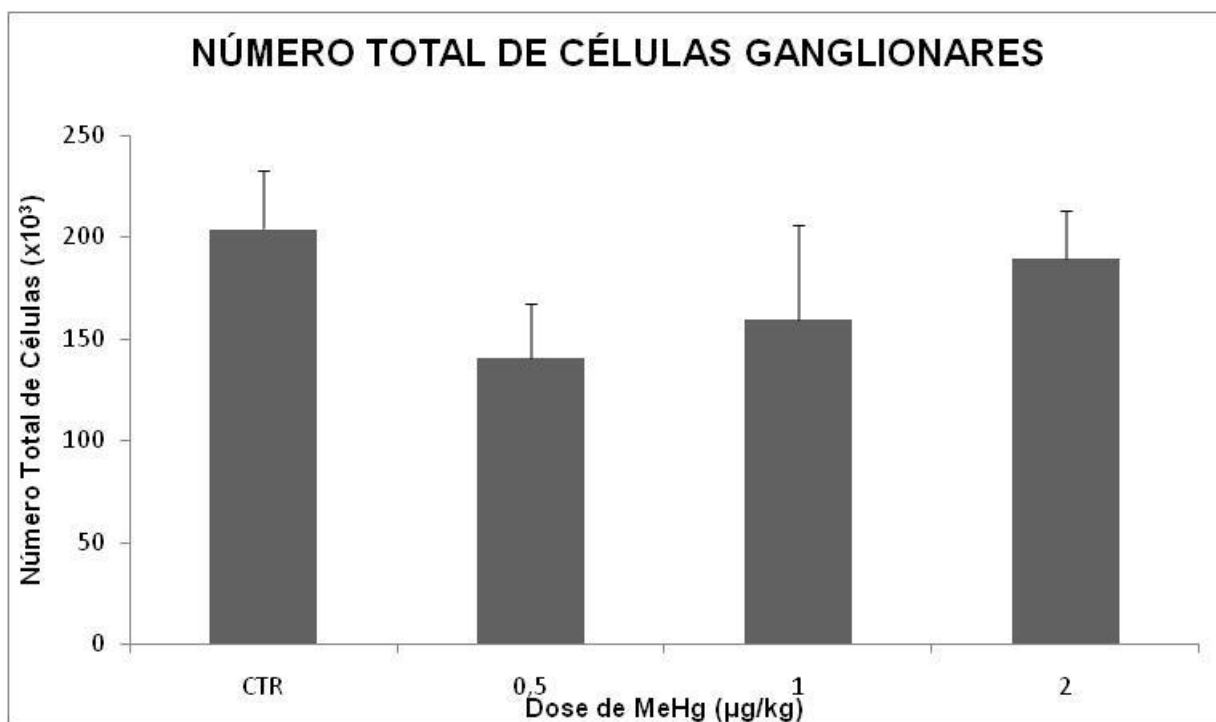


Figura 11: Número total células ganglionares em função das doses de MeHg administradas. Os valores encontrados foram obtidos a partir das médias em cada grupo. Nos grupos tratados, os valores obtidos demonstram ser menores que no grupo controle e entre os animais tratados, os expostos a dose de 0,5µg/Kg (n=3) apresentaram a menor densidade celular.

Tabela 4: Densidade média (células/mm²) em função do número total de células ganglionares (células/mm²) e área retiniana (mm²)

ANIMAL	DOSE MeHg UTILIZADA (µg/kg)	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS (células/mm ²)	ÁREA RETINIANA (mm ²)	DENSIDADE MÉDIA (células/mm ²)
TC050211J O.D*	CTR	224288	42	5340
TC050211M O.E**	CTR	183640	33	5565
TC090108E O.D	CTR	126192	38	3323
TC050204B O.E	0,5	171540	40	4288
TC050204C O.D	0,5	125284	45	2784
TC050211N O.D	0,5	125410	47	2668
TC050204H O.D	1,0	146395	45	3253
TC050211P O.D	1,0	210928	66	3195
TC050211R O.D	1,0	121881	55	2708
TC050204E O.E	2,0	213134	50	4262
TC050211S O.D	2,0	165135	49	3370
TC050204F O.D	2,0	189753	49	3872

*O.D: Olho direito

**O.E: Olho esquerdo

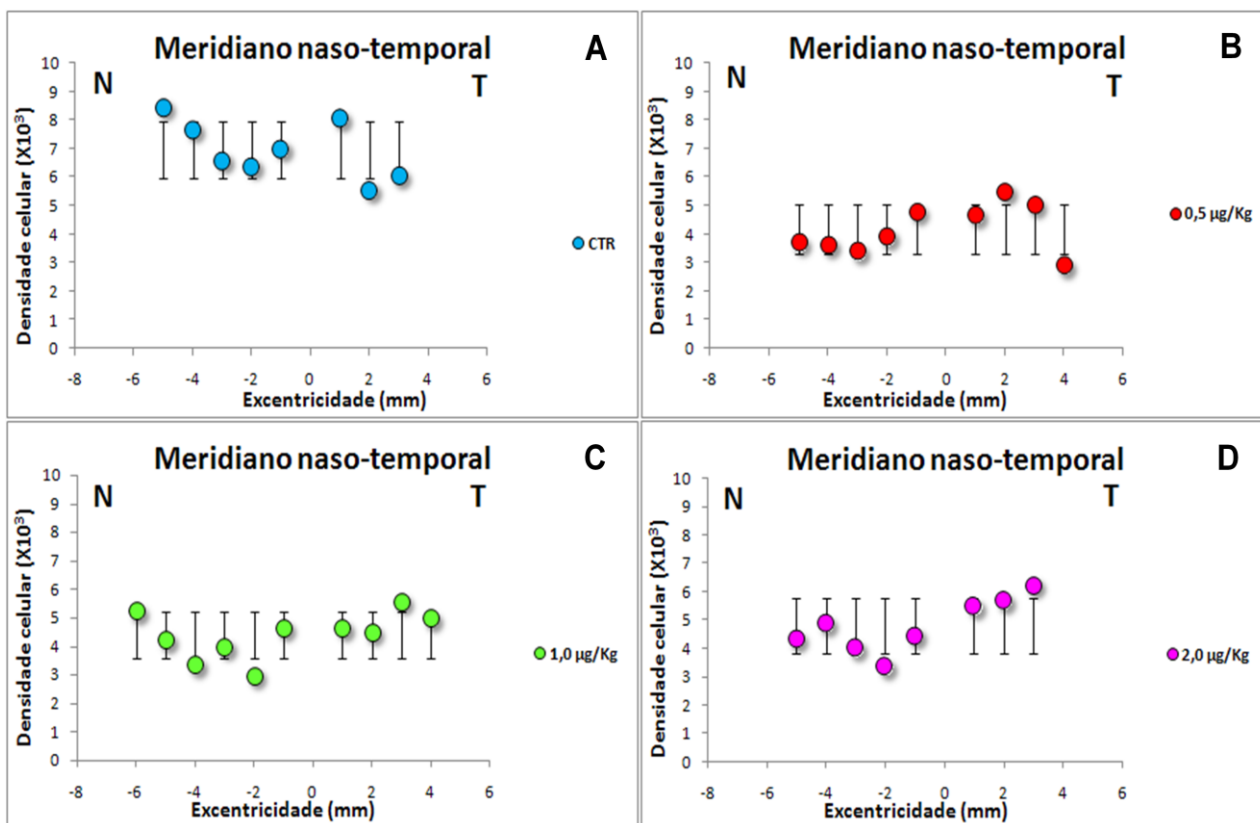


Figura 12: Densidade de células ganglionares em função da distância do nervo óptico (excentricidade) no meridiano naso-temporal, para os grupos controle e tratados com diferentes doses de MeHg em retina de tucunaré. Os valores encontrados foram obtidos a partir da média por grupo onde se observa que os valores variam a partir do nervo óptico aumentando na periferia. (A) Controle; (B) 0,5µg/kg; (C) 1,0µg/kg e (D) 2,0µg/kg.

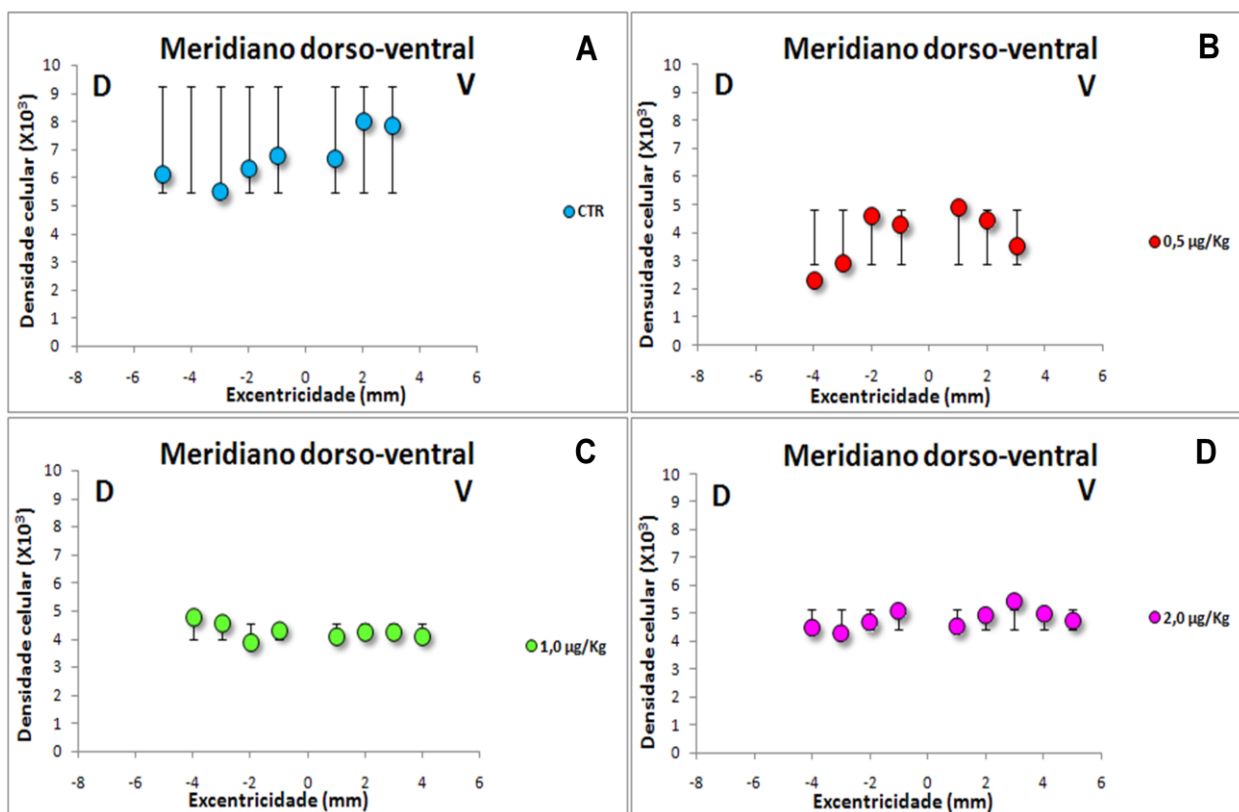


Figura 13: Densidade de células ganglionares em função da distância do nervo óptico (excentricidade) no meridiano dorso-ventral, para os grupos controle e tratados com diferentes doses de MeHg em retina de tucunaré. Os valores encontrados foram obtidos a partir da média por grupo onde se observa que os valores variam a partir do nervo óptico aumentando na periferia. (A) Controle; (B) 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (C) 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e (D) 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

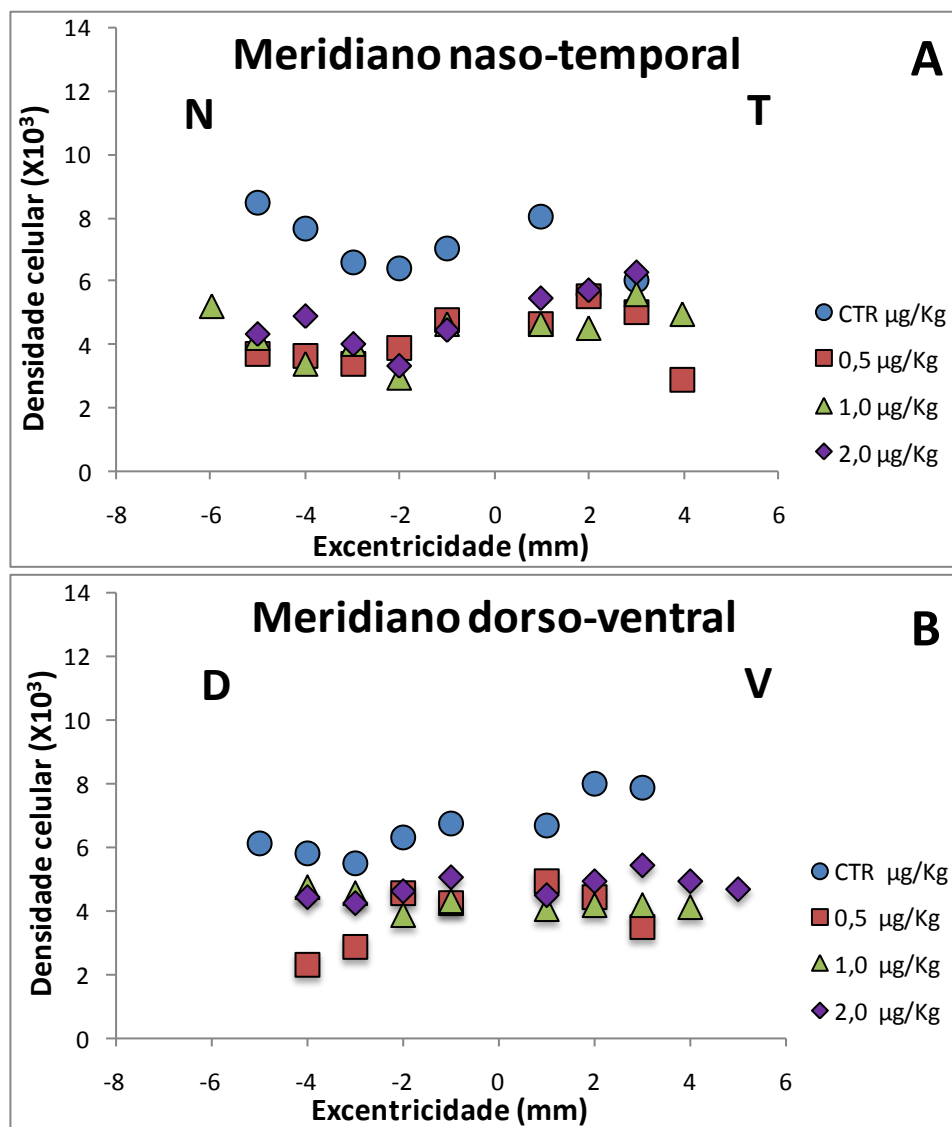


Figura 14: Perfil de distribuição de densidade de todos os grupos no meridiano naso-temporal (A) e dorso-ventral (B). Os valores foram obtidos a partir da média por grupo.

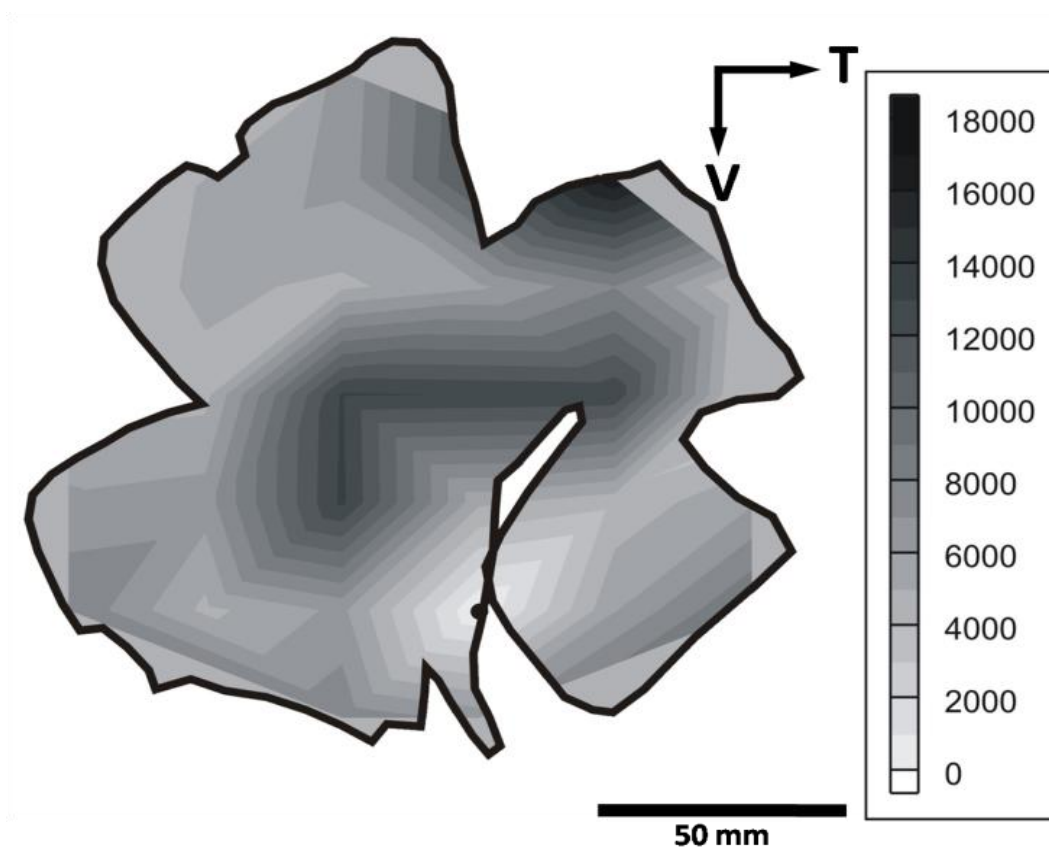


Figura 15: Mapa de isodensidade para células ganglionares na retina de tucunaré controle (TC050211MO.E). O mapa foi gerado a partir dos valores de densidade celular de células ganglionares onde se observa um padrão de distribuição na região ventro-temporal e um pico de densidade na região dorsal. Pico de densidade=18.000 células/mm². Número total de células ganglionares = 183.640 células. Área da retina = 42 mm². Escala 50mm.

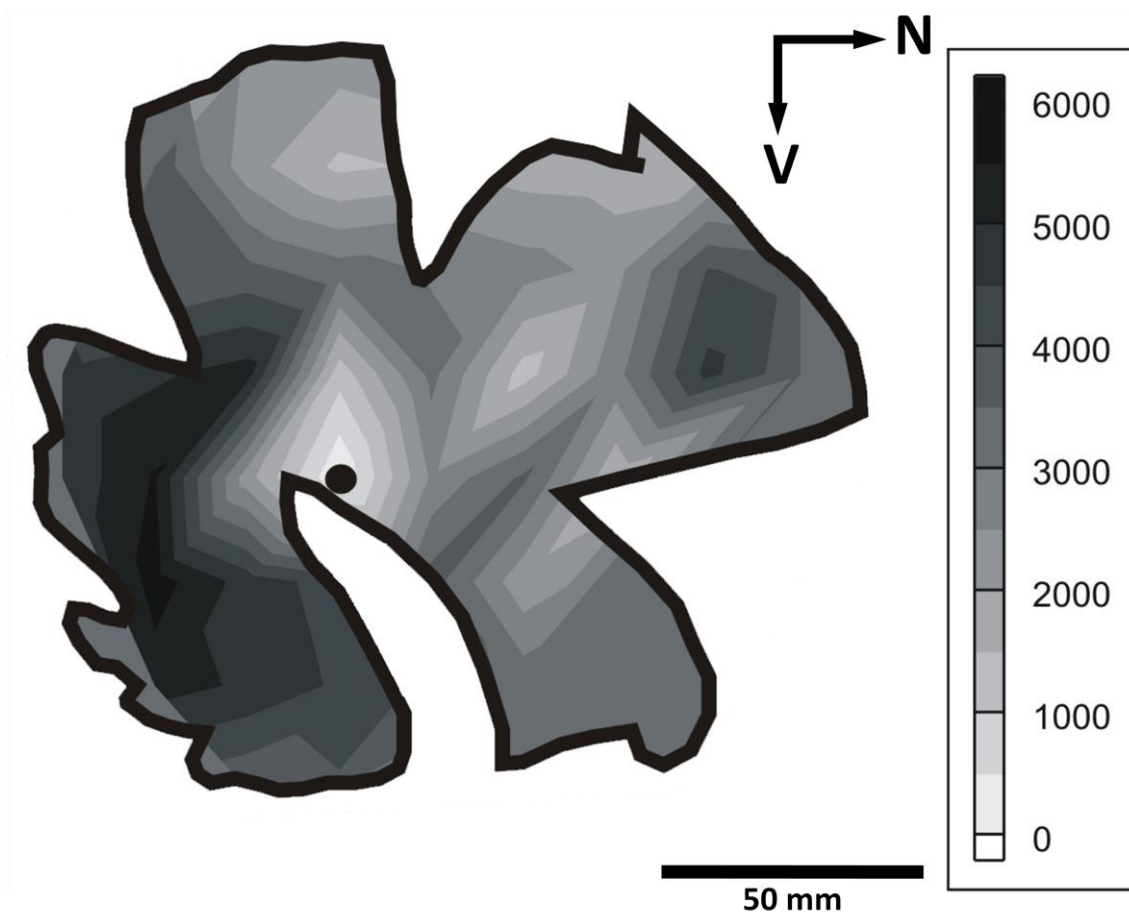


Figura 16: Mapa de isodensidade para células ganglionares na retina de tucunará tratado com dose de $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (TC050211NO.E). O mapa foi gerado a partir dos valores de densidade celular de células ganglionares onde se observa um padrão de distribuição na região ventro-temporal e um pico de densidade na região dorsal. Pico de densidade = $6.000 \text{ células}/\text{mm}^2$. Número total de células ganglionares = 125.410 células . Área da retina = 47 mm^2 . Escala 50mm.

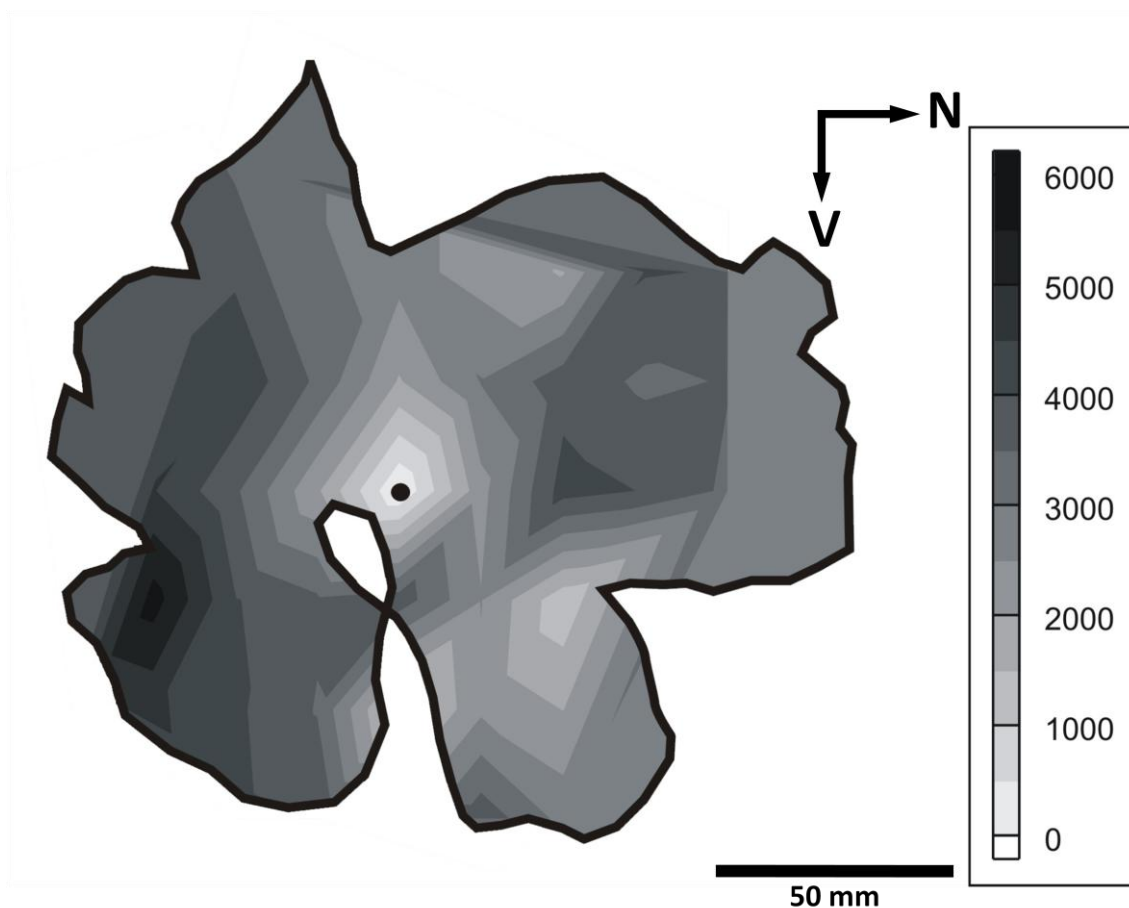


Figura 17: Mapa de isodensidade para células ganglionares na retina de tucunaré tratado com dose de $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ (TC050211RO.E). O mapa foi gerado a partir dos valores de densidade celular de células ganglionares onde se observa um padrão de distribuição na região ventro-temporal e um pico de densidade na região dorsal. Pico de densidade = $6.000 \text{ células}/\text{mm}^2$. Número total de células ganglionares = 121.881 células . Área da retina = 55 mm^2 . Escala 50mm.

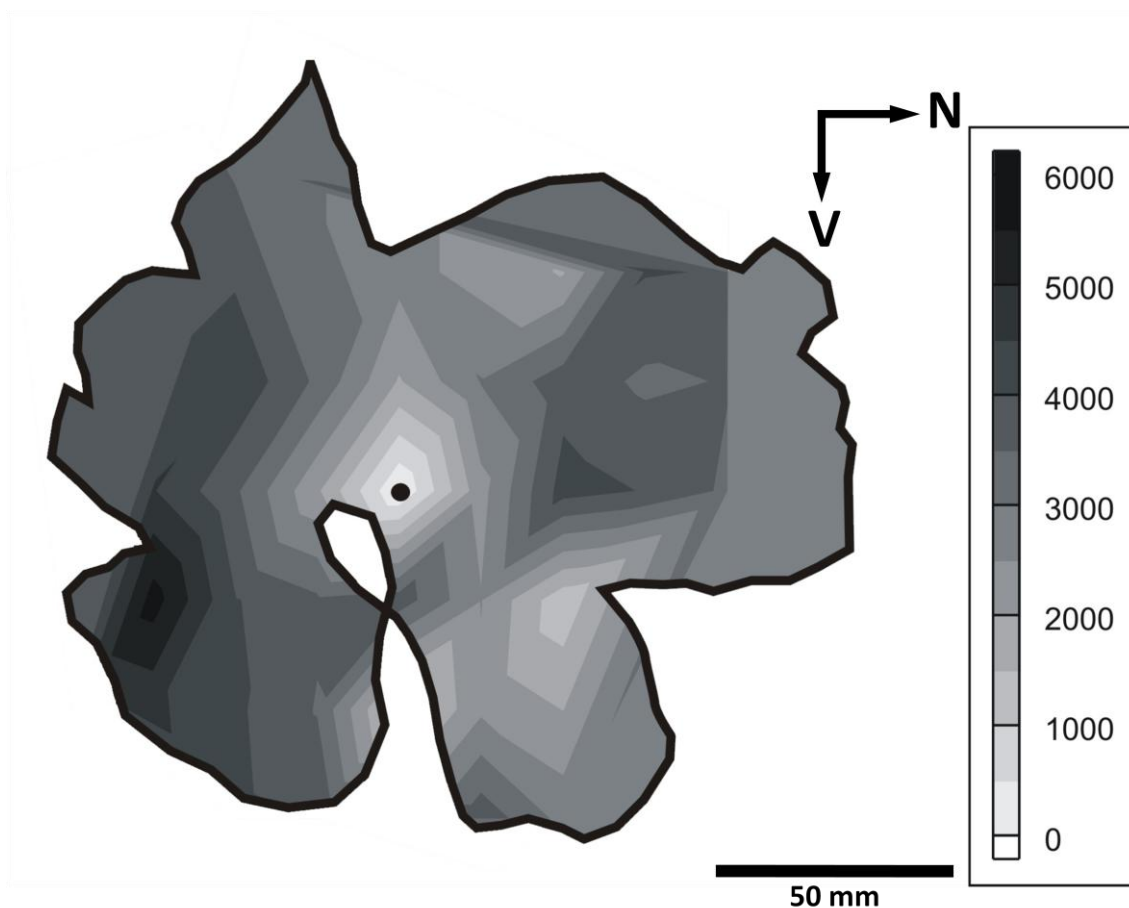


Figura 18: Mapa de isodensidade para células ganglionares na retina de tucunaré intoxicado com dose de 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TC050211SO.D). O mapa foi gerado a partir dos valores de densidade celular de células ganglionares onde se observa um padrão de distribuição na região ventro-temporal e um pico de densidade na região dorsal. Pico de densidade = 6.000 células/ mm^2 . Número total de células ganglionares = 165.135 células. Área da retina = 49 mm^2 . Escala 50mm.

4.5 CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL (HgT) EM TUCUNARÉ

4.5.1 Retina

A análise de Hg total (HgT) presente nas amostras de retina se realizou através espectrofotometria de absorção atômica com amalgamação em lâminas de ouro. Esta técnica, no entanto, foi bastante difícil de ser realizada em retina, já que o tecido não podia ser fixado, para não alterar o resultado, com isso a retina precisava ser congelada. Durante o descongelamento, uma boa parte do tecido se degradava, entretanto, ainda foi possível a análise em sete retinas descritas a seguir. Na tabela 5, encontra-se o resumo das retinas analisadas, dose do grupo, tempo de depuração e quantidade de HgT. Vale ressaltar o valor encontrado na retina TC050204DO.D, pois a quantidade de HgT medida foi tão elevada que os valores estão descritos em PPM (partes por milhão). Os resultados encontrados demonstram que a maior concentração de HgT foi nos animais sacrificados com quinze dias de depuração (Figura 19) para a dose de 0,5µg/kg. Os resultados não puderam ser analisados estatisticamente devido ao tamanho amostral ser baixo.

Tabela 5: Quantidade de HgT na retina em função da dose e tempo de depuração

ANIMAL	DOSE MeHg (µg/kg)	TEMPO DE DEPURAÇÃO (DIAS)	QUANTIDADE DE HgT (ppb)
TC050204J O.E	CTR	15	108
TC050211LO.E	CTR	22	106
TC050204AO.E	0,5	15	171
TC050211PO.D	0,5	22	115
TC050204GO.E	1,0	15	152
TC050211QO.E	1,0	22	43
TC050204DO.D	2,0	15	4,53 (ppm) *

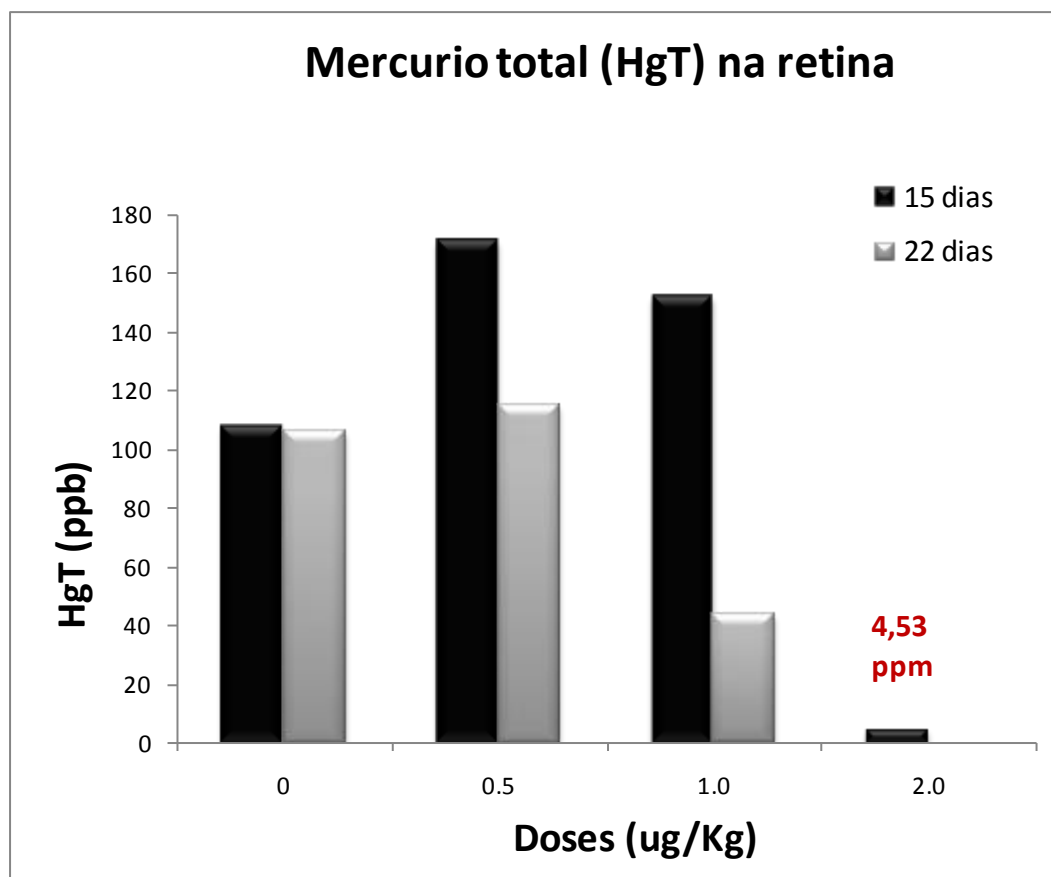


Figura 19: Quantidade de HgT encontrado na retina de tucunaré. Os maiores valores foram encontrados nos animais que apresentaram um tempo de depuração menor (15 dias). O maior valor encontrado foi no grupo intoxicado com dose de 2,0 µg/Kg. Em vermelho se encontra um valor acima dos encontrados no eixo y.

5 DISCUSSÃO

5.1 O ANIMAL EXPERIMENTAL

O animal utilizado como modelo experimental neste estudo foi o peixe amazônico tucunaré (*Cichla sp.*). Vários fatores contribuíram para escolha do mesmo, entre eles o fato do tucunaré ser um predador por excelência (Machado, 1983) o que contribui para a sua posição na cadeia trófica e o fato de usar a sua visão como um instrumento essencial no seu comportamento de predação (Zaret, 1980). Além disso, o animal apresenta carne muito saborosa tornando-se uma importante fonte para comercialização, servindo como alimento para a população ribeirinha (Ruffino e Isaac, 1995, Castilhos *et. al.*, 2001, Kehrig *et al.*, 2008).

O tucunaré também é considerado um bom indicador de mercúrio em estudos no ecossistema amazônico, principalmente por sua facilidade de obtenção e pelo fato de ser encontrado em áreas contaminadas por mercúrio (Kehring *et al.*, 2008). Porém, a obtenção de alevinos desta espécie é inviável na região, o que dificultou a realização deste trabalho, sendo necessária a aquisição dos alevinos em outra região, pois não ocorre nenhuma forma de reprodução em cativeiro, sendo a abundância encontrada de tucunarés relativa aos peixes nativos do ambiente.

A utilização de retinas de tucunaré como modelo de estudo demonstrou ser viável devido principalmente a facilidade de obtenção do tecido neural.

A retina de tucunaré possui um padrão semelhante aos descritos para outras espécies de peixes teleósteos (Collin e Pettigrew, 1988b; Collin *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998) com a presença do processo falciforme na porção ventro-temporal da retina que finaliza em um nervo óptico alongado na região central da retina.

A utilização da técnica de montagem plana nas retinas de tucunarés permitiu uma análise microscópica das células ganglionares da retina de forma eficiente apesar de ser uma técnica bastante antiga proposta inicialmente por Stone (1965) na descrição de células ganglionares da retina de gato.

5.2 ESPECIFICIDADE DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS GANGLIONARES CORADAS PELA TÉCNICA DE NISSL

A coloração de Nissl é uma técnica bastante aplicada em estudos morfológicos de investigação do sistema nervoso. Essa coloração é viabilizada graças à marcação por um corante básico de um material granular constituído por RNA ribossômico (corpúsculos de Nissl) encontrado em grande quantidade no citoplasma das células nervosas. Além dos corpúsculos de Nissl, a técnica cora seletivamente nucléolos e núcleos das células glia. Os axônios das células nervosas não são corados por esta técnica porque não são ricos em RNA ribossômico (Bittencourt e Elias, 2007; Xavier, 1999).

A coloração de Nissl não cora de forma específica as células ganglionares, outros grupos celulares são identificados no material analisado, como por exemplo, as células amácrinas deslocadas e células da glia, o que faz com que alguns autores utilizem outras técnicas de marcação, como marcação retrógrada com lisina-cobalto, concomitante a técnica de Nissl (Collin e Pettigrew, 1988c; Collin, 1988) na identificação das células ganglionares. Dräger e Olsen (1981) compararam a técnica de coloração de Nissl com a técnica da peroxidase de raiz forte (HRP) na marcação de células ganglionares e concluíram todas as células positivas para HRP eram também positivas na coloração de Nissl.

Segundo Farah (2006) existem três procedimentos que devem ser utilizados para distinguir células ganglionares de células amácrinas deslocadas como a marcação retrógrada do nervo óptico, a imunomarcação com marcadores específicos e a comparação do número de axônios no nervo óptico com os corpos celulares encontrados na camada de células ganglionares.

Na realização deste estudo, utilizamos apenas critérios morfológicos e citológicos baseados nos descritos na literatura (Stone, 1965; Hughes, 1977) para a separação dos grupos celulares, entretanto, o número e percentual de células amácrinas deslocadas não foi contabilizado e considerado neste trabalho. Apesar disto, foi possível distinguir de maneira eficaz as células ganglionares das células amácrinas deslocadas, sem que estas fossem inseridas na amostra do nosso trabalho.

A técnica de Nissl é utilizada no estudo de distribuição de células ganglionares na retina de peixes como descritos em uma série de trabalhos (Collin e Pettigrew, 1988a, 1988b, 1988c; Collin e Partridge, 1996; Collin, Hoskins e Partridge, 1997; Ito *et al.*, 1999; Bozzano e Collin, 2000; Mangrum e Dowling, 2002), já que cora de forma bastante evidente este grupo celular. No entanto, esta técnica restringe a uma análise quantitativa da distribuição topográfica das células, pois somente o corpo celular é visualizado, sem que o detalhamento celular de dendritos e axônios possa ser evidenciado.

Na retina de tucunaré, as células ganglionares que foram coradas pela técnica de Nissl se observou pelo menos duas populações distintas de células. Uma população se caracterizava por apresentar um corpo celular diminuto e era encontrada principalmente na região central da retina e a outra população de células ganglionares apresentava um corpo celular maior e localizava-se na região mais periférica de retina (ver Figura 10). Esse padrão de tamanho de corpo celular é semelhante ao descrito em outras espécies (Ito e Murakami, 1984, Collin, 1988 e Mangrum e Dowling, 2002).

Em *Sebasticus* e *Novadon*, Ito e Murakami (1984) utilizaram a marcação com peroxidase e encontraram seis diferentes tipos de células ganglionares diferentes. Mangrum e Dowling (2002) através da técnica de marcação retrógrada do nervo óptico por grânulos de Dil (*Dil C18*) identificaram onze tipos diferentes de células ganglionares em retina de *Danio rerio*. Em peixes cartilaginosos, como a raia (*Rhinobatos batillum*), Collin (1988), utilizando técnica de marcação retrógrada no nervo óptico com cobalto-lisina, identificou três tipos de células ganglionares, as células pequenas (20-50 μm^2), grandes (80-300 μm^2) e gigantes (> 300 μm^2). Os resultados encontrados no presente trabalho são muito semelhantes aqueles descritos por Collin (1988), apesar da utilização de diferentes metodologias.

Em virtude do descrito na literatura se torna necessário um estudo mais detalhado dos tipos de células ganglionares encontrados na retina de tucunaré com outro tipo de marcador celular, onde se evidencie de forma mais precisa características celulares que contribuam na identificação destas células, como por exemplo, largura do corpo celular, profundidade de estratificação na camada plexiforme interna, espessura da estratificação, largura total da árvore dendrítica e padrão de ramificação na árvore dendrítica.

5.3 CÉLULAS GANGLIONARES NA RETINA DE TUCUNARÉ

O conhecimento da topografia das células ganglionares contribui para estabelecer como um determinado animal se orienta visualmente no ambiente (Bozzano e Collin, 2000).

O número total médio de células ganglionares encontradas no animal controle (n=3) foi de 203.964 ± 28.742 células. Mednick e Springer (1988) estudando a distribuição de células ganglionares em retina de *Carassius auratus*, estimaram que o número total de células ganglionares neste animal era de 127.000 células para peixes com uma faixa de comprimento entre 9 e 11 centímetros. Este valor é inferior ao encontrado no presente trabalho embora a faixa de comprimento dos tucunarés esteja entre 6 e 9 centímetros. Essa diferença provavelmente esteja relacionada ao proposto pelos autores que sugerem que ocorra uma diminuição da população inicial de células ganglionares ao longo do crescimento do animal por um mecanismo não conhecido. Em *Sebastiscus marmoratus*, o número total de células ganglionares encontrado através da técnica de Nissl foi de 450.000 células e no *Navodon modestus* este valor foi de 870.000 células (Ito e Murakami, 1984) que são valores muito superiores aos descritos em nosso animal experimental, o que seria representativo das espécies estudadas.

A distribuição das células ganglionares na retina de tucunaré controle seguiu um padrão semelhante ao descrito para outros teleósteos com picos de densidade nas regiões ventral e temporal. O pico de densidade na região temporal foi de 8.445 células/mm² e o pico de densidade na região ventral foi de 8.016 células/mm². Schellart e Spekrijse (1973) estudando a distribuição de células ganglionares em retina de *Carassius auratus*, determinaram que a maior concentração destas células também está localizada em uma região vento-temporal. Os trabalhos de Kock e Reuter (1978) analisaram a distribuição de células ganglionares em retina de diferentes tamanhos de (pequena, média e grande) *Carassius auratus* e definiram que a área de maior densidade celular estaria localizada na região ventral.

O padrão de distribuição de células ganglionares também foi analisado em duas espécies de teleósteos (*Sebastiscus marmoratus* e *Navodon modestus*) por Ito e Murakami (1984). Em ambas as espécies, os autores

identificaram uma faixa de alta densidade celular localizada na região temporal da retina destes animais. Em *Sebastiscus*, pico de células ganglionares foi de 2.314 células/mm², enquanto que em *Navodon* o valor foi quase o dobro do valor encontrado em *Sebastiscus* com 4.598 células/mm², embora os valores de densidade total seja mais elevados nestes animais que os encontrados em tucunaré, quando se compara os valores relacionados a picos de densidades, observa-se que o tucunaré apresenta muito mais células nas áreas de alta densidade que essas duas espécies, o que pode também estar relacionado ao hábito do animal experimental.

O tucunaré apresenta uma distribuição de células ganglionares semelhante ao descrito para *Amblyglyphidodon curacao* por Collin e Pettigrew (1988a). A presença de uma região ventro-temporal (Figura 15) de alta densidade celular com um pico de células de 14.000 células/mm² está relacionada ao fato de ambas às espécies de peixes serem caracteristicamente sedentários, comumente encontrados em águas de curso lento, claras ou escuras, escondidos entre as raízes da vegetação e reentrâncias de relevo, a espera da presa que passa por elas. Este tipo de especialização também auxilia na capacidade que esses peixes possuem de fugir da presa rapidamente quando necessário. A única diferença entre elas reside no fato de o *Amblyglyphidodon curacao* ser um peixe de coral enquanto que o tucunaré é um peixe de hábitat dulcícola.

5.4 CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO TOTAL (HgT) EM TUCUNARÉ

A maior densidade média de células ganglionares na retina de tucunaré foi encontrada em um indivíduo controle (TC050211M O.E) com 5.565±109 células/mm². Nos animais expostos ao MeHg, houve diminuição da densidade média em todos o grupos. A menor densidade encontrada foi em um animal do grupo de 0,5 µg/Kg com 2.668±904 células/mm² (Tc050211N O.E). A densidade média do grupo de 0,5 µg/Kg foi de 3.247± 904 células/mm². No grupo de 1,0 µg/Kg, a densidade média ficou em torno de 3.052±299 células/mm², enquanto que no grupo de 2,0 µg/Kg, o valor médio encontrado foi de 3.835 ±447 células/mm²

Em um trabalho realizado em primatas, Warfvinge e Bruun (1996), estudaram o efeito do vapor de mercúrio sobre o olho desses animais e constataram que neurônios não mielinizados localizados no nervo óptico estavam com altas concentrações de mercúrio, assim como paredes de capilares, as células gliais, e o epitélio pigmentar, levando a um dano potencial à retina neural.

Na retina, não foi encontrado mercúrio na fóvea, entretanto, uma pequena quantidade de mercúrio foi encontrada na camada de células ganglionares corroborando com os resultados encontrados em tucunaré. Em outro estudo semelhante com primatas neonatos, Warfvinge e Bruun (2000), também observaram um acúmulo de mercúrio no nervo óptico, camada plexiforme interna e células ganglionares. A concentração de MeHg na camada de células ganglionares provavelmente leve a uma diminuição do número de células ganglionares o que foi observado na retina de tucunaré.

Um trabalho pioneiro em peixes foi realizado por Bonci *et al.* (2006) para observar o efeito do metilmercúrio em retinas de traíras (*Hoplias malabaricus*) expostas em laboratório a doses de 2 e 6 µg/g de MeHg por exposição aguda MeHg. Os resultados demonstram que ocorre diminuição da densidade de células amácrinas deslocadas, localizadas na camada de células ganglionares, assim como nas células bipolares de bastonetes, sugerindo que o MeHg possa estar influenciando no processamento retiniano da visão escotópica do animal. Em exposições subcrônica, neste mesmo trabalho, os autores observaram que a exposição a metilmercúrio causa morte celular por apoptose na dose de 0,075 µg/g observada nas células presentes na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares.

Neste trabalho, não foi possível determinar se o metilmercúrio tem afinidade específica por um tipo de células ganglionares ou se a diminuição do número de células ganglionares está associada a um processo de apoptose ou necrose, ou até mesmo por um comprometimento de marcação celular.

A diminuição da densidade das células ganglionares na retina de tucunaré foi maior no grupo de 0,5 µg/Kg quando comparado aos demais grupos expostos ao metilmercúrio (1,0 e 2,0 µg/Kg). As doses utilizadas neste trabalho são semelhantes ao descrito por Bonci *et al.* (2006) que realizaram a exposição aguda de traíras ao metilmercúrio por injeção intraperitoneal,

semelhante ao realizado no presente estudo, nas doses de 0,01/0,05/0,1/1/2 e 6µg/g, com tempo de depuração de 15 dias e observaram diminuição da quantidade de células retinianas. No entanto, o porquê da maior diminuição ocorrer no grupo de 0,5 µg/Kg não está claro, nenhum trabalho semelhante foi encontrado na literatura que pudesse ser relacionado a este resultado. Uma hipótese relacionada a este resultado poderia ser o fato de que a retina de peixes cresce continuamente ao longo da vida do animal, tanto por extensão do tecido quanto por adição de novas células (Nicol, 1989; Loew e Wahl, 1991; Fernald, 1993), provavelmente, doses mais elevadas de metilmercúrio induzam por algum mecanismo desconhecido uma maior proliferação celular nas zonas de crescimento.

Em um trabalho realizado por Hirooka *et al.* (2007), os autores identificaram que além de causar danos aos microvasos cerebrais de humanos, o MeHg, impede que ocorra o reparo de células endoteliais destes vasos, por uma inibição de proliferação celular, ou seja, a proliferação celular estaria relacionada a região do sistema nervoso.

Outra hipótese estaria relacionada com o proposto por Warfvinge e Bruun (1996) que relaciona a idade do animal com a eliminação do mercúrio, quanto mais jovem é o animal mais eficiente é o processo de eliminação do mercúrio da retina, possivelmente nas doses de 2,0 µg/Kg, uma maior quantidade de mercúrio tenha levado a uma eliminação mais rápida pelos tucunarés, já que todos os animais expostos eram classificados como alevinos e se encontravam na faixa de 7,8 a 8,2 centímetros de comprimento.

Embora ocorra diminuição da densidade de células ganglionares na retina de tucunaré nos grupos expostos ao metilmercúrio, vale a pena ressaltar que a distribuição topográfica dos animais expostos ao MeHg é semelhante ao dos animais controles (Figuras 14,16,17,18). O pico de densidade é o mesmo nas três doses utilizadas quando comparadas ao controle, sugerindo que ocorra mais perda celular na periferia da retina nos animais do grupo de 0,5 µg/Kg o que contribui para um menor valor de densidade total.

A análise de Hg total (HgT) na retina foi uma técnica bastante difícil de ser realizada, já que a problemática estava relacionada a fixação do tecido, pois o material a ser analisado não podia entrar em contato com nenhum tipo de fixador, que poderia interferir no resultado encontrado ou mesmo não chegar a

ser lido pelo equipamento, com isso, a retina era dissecada e precisava ser congelada imediatamente para diminuir o dano tecidual, só que ao ser descongelada, uma boa parte do tecido se degradava, apesar deste contratempo, ainda foi possível analisar o HgT em algumas retinas. Os maiores valores foram encontrados nos animais que apresentaram um tempo de depuração menor (15 dias), isto corrobora com os achados de Hawryshyn e Mackay (1979) que usaram metilmercúrio e cloreto de mercúrio em truta arco-íris e observaram que durante exposição subletal a uma concentração de 0,25 µg mercúrio/litro, ambas as formas de mercúrio primeiramente se depositam nos órgãos e lentamente vão se acumulando no tecido muscular, por esta razão, os valores de MeHg em retina de tucunaré foram menores com 22 dias de depuração.

Oliveira Ribeiro *et al.* (2000) em um estudo comparativo de bioacumulação e danos causados as brânquias dos peixes por conta do mercúrio inorgânico diluído na água, relataram que após noventa e seis horas da exposição, a concentração de mercúrio foi setenta vezes maior nos rins, dez vezes maior no fígado, intestino, pele e cérebro e três vezes maior nas brânquias, músculo e resto do corpo dos animais.

6 CONCLUSÕES

A técnica de Nissl é eficiente na marcação das células ganglionares da retina de tucunaré e pode ser utilizada na quantificação celular.

O animal controle apresenta uma faixa de alta densidade de células ganglionares localizada na região ventro – temporal compatível com animais que se escondem por entre a vegetação e ficam a espera de suas presas.

O número de células ganglionares diminui significativamente sobre o efeito do metilmercúrio para todas as doses testadas, sendo que na dose de 0,5 µg/Kg este efeito é mais significativo, representando 31% de perda celular.

O metilmercúrio ao entrar no organismo primeiramente se deposita nos órgãos e somente depois um de um determinado tempo tende a se acumular na musculatura.

O metilmercúrio compromete o funcionamento do sistema visual de tucunarés, pois afeta as células ganglionares, em detrimento a este fato o animal pode sair prejudicado em suas relações ecológicas, já que é um predador por excelência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria nº 685 de 27 de Agosto de 1998.

AHLBERT, I.B. The organization of cone cells in the retinae of four teleosts with different feeding habits. *Arch. Zoology*, v.22, p.445-481, 1968.

AKAGI, H., MALM, O., KINJO, Y., HARADA, M., BRANCHES, F. J. P., PFEIFFER, W. C., KATO, H. Methyl mercury pollution in the Amazon, Brazil. *The Science of Total Environment*, v. 175, p. 85-95, 1995.

ALI, M.A. The ocular structure, retinomotor and photo-behavioural responses of juvenile pacific salmon. *Canadian Journal of Zoology*, v.37, p. 965-96, 1959.

AZEVEDO, F.A. *Toxicologia do mercúrio*. Ed. Rima. São Paulo. 292 p, 2003.

BIDONE, E.D., CASTILHOS, Z.C., CID DE SOUZA, T.M., LACERDA, L.D. Fish contamination and human exposure to mercury in tapajos river basin, Para state: a screening approach. *Bull Environ. Contam Toxicol*, v. 59, p. 194-201, 1997.

BITTENCOURT, J.C.; ELIAS F.C. *Métodos em Neurociência*. Ed. Roca. São Paulo, 2007.

BONCI, D. M. O., LIMA, S.M.A., GRÖTZNER, S.R., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., HAMASSAKI, D.E., VENTURA, D.F. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive a protein kinase C bipolar cells caused by methylmercury chloride intoxication in the retina of the tropical fish *Hoplias malabaricus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p. 405-410, 2006.

BOZZANO, A., COLLIN, S.P. Retinal topography in elasmobranchs. *Brain, Behavior and Evolution*, v.55, p.191-208, 2000.

BRABO, E.S., SANTOS, E.D., JESÚS, I.M., MASCAREÑAS, A.F., FAIAL, K.F. Níveis de mercúrio em peixes consumidos pela comunidade indígena de Sai Cinza, Reserva Munduruku, Município de Jacareacanca, Estado do Pará, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 15, p. 325-331, 1999.

CAJAL, S.R. "La retina des vertebres" translated by Maguire, D and Rodieck, R.W. In R. W. Rodieck (Ed.), *The vertebrate retina*, *Freeman*, p. 775-904, 1983.

CANTO-PEREIRA, L. H. M., SIMÕES, A. L., LAGO, M., MOURA, A. L.A.,

CARPENTER, D.O. Effects of metal on the nervous system of humans and animals. *International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health*, v. 14, n.3, p.209-218, 2001.

CASTILHOS, Z.C., BIDONE, E.D., HARTZ, S.M. Bioaccumulation of mercury by Tucunare (*Cichla ocellaris*) from Tapajos river region, Brazilian amazon: A field dose-response approach. *Bolletín Of Environmental Contamination And Toxicology*, v. 66, n. 5, p. 631-637, 2001.

CASTOLDI, A. F.; COCCINI, T.; AND MANZO, L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Reviews on Environmental Health*, v.18, p.19–31, 2003.

CAVALLERI, A., BELOTTI, L., GOBBA, F., LUZZANA, G., ROSA, P. & SEGHIZZI, P. Colour vision loss in workers exposed to elemental mercury vapour. *Toxicology Letters*, v. 1-3, p.351-356.

CAVALLERI, A., GOBBA, F. Reversible color vision loss in occupational exposure to metallic mercury. *Environmental Research*, v. 77, p.173-177, 1998.

CHAMAN, W.N., TUCKER, J. The optical system of the goldfish eye. *Vision Research*, v.13, p.1-8, 1973.

COLLIN, S.P. The retina of the shovel-nosed ray, *Rhinobatos batillum* (Rhinobatidae): morphology and quantitative analysis of the ganglion, amacrine and bipolar cell populations. *The Journal of Experimental Biology*, v.47, p.195-207, 1988.

COLLIN, S.P., PARTRIDGE, J.C. Retinal specializations in the eyes of deep-sea teleosts. *Journal of Fish Biology*, v.49, p.157-174, 1996.

COLLIN, S.P., PETTIGREW J.D. Retinal topography in reef teleosts. I. Some species with well-developed areae but poorly-developed streaks. *Brain, Behavior and Evolution*, v.31 (5), p.269-282, 1988a.

COLLIN, S.P., PETTIGREW J.D. Retinal topography in reef teleosts. II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areae. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 31, p. 283-295, 1988b.

COLLIN, S.P., PETTIGREW J.D. Retinal ganglion cell topography in teleosts: a comparison between nissl-stained material and retrograde labeling from the optic nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 276, p. 112-122, 1988c.

- COLLIN, S.P., HOSKINS, R.V., PARTRIDGE, J.C. Tubular eyes of deep-sea fishes: A comparative study of retinal topography. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 50, p.335-357, 1997.
- COLLIN, S.P., HOSKINS, R.V., PARTRIDGE, J.C. Seven retinal specializations in the tubular eye of the deep-sea pearleye, *Scopelarchus michaelisarsis*: A case study in visual optimization. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 51, p. 291-314, 1998.
- COSTA, M. F., RODRIGUES A., SAITO, C., FARIA, M. A. M., SILVEIRA, L. C. L. & VENTURA D. F. Occupational exposure to Hg⁰ impairs visual functions in dentists and factory workers in Brazil. Proceedings of the 9th Meeting the International Neurotoxicology Association (INA), p 87, 2003.
- DAMIN, E. T. B. Alterações Psicofísicas do Sistema Visual Humano Relacionadas à Exposição ao Mercúrio. Tese de doutorado no Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Belém, 2000.
- DRÄG, U.C., OLSEN, J.F. Ganglion cell distribution in the retina of mouse. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci*, v. 20, p. 285-293, 1981.
- EASTER Jr., S.S. retinal specializations for aquatic vision: theory and facts. In: Vision in fishes. Editor: Ali, M.A. Plenum Press, London, 1975.
- EVANS, R.D., ADDISON, E.M., VILLENEUVE, J.Y., MACDONALD, K.S. & JOACHIM, D.G. Distribution of inorganic and methylmercury among tissues in mink (*Mustela vison*) and otter (*Lutra canadensis*). *Environmental Research*, v. 84, p. 133-139, 2000.
- FARAH, M.H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. *Brain Research Reviews*. V. 52, p. 264-274, 2006.
- FERNALD, R.D. Vision. In: The physiology of fishes. Ed.: Ewans, D. H. Marine Science Series, CRC Press, Florida, 1993.
- FERNÍCOLA, N. A. G. G. de; OLIVEIRA, S. de S. *Poluentes orgânicos persistentes POPs*. Salvador: CRA, 500 p., 2002.
- FERREIRA, E.J.G., ZUANON, J.A.S., SANTOS, G.M. *Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará*. IBAMA, 1998.
- GIBLIN, F.J. & MASSARO, E.J. (1973). Pharmacodynamics of methyl mercury in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): tissue uptake, distribution and excretion. *Toxicology and Applied pharmacology*, v.24, p.81-91, 1973.

- GUTHRIE, D.M. & MUNTZ, W.R.A. Role of vision in fish behavior, p 89-128 In: Pitcher, T.J. (ed) *Behavior of Teleost Fishes*, 2^a ed, Chapman & Hall, 1993.
- HAWRYSHYN, C.W. Vision. In: Evans D. H. (Ed.). *The Physiology of Fishes*. 2^oed., 1997.
- HAWRYSHYN, C.W., MACKAY, W.C. Toxicity and Tissue Uptake of Methylmercury Administered Intra-Peritoneally to Rainbow-Trout (*Salmo Gairdneri* Richardson). *Bulletin of Environment Contamination Toxicology*, v. 23, p. 79-86, 1979.
- HAWRYSHYN, C.W., MACKAY, W.C., NILSSON, T.H. Methyl Mercury Induced Visual Deficits in Rainbow-Trout. *Canadian Journal of Zoology*, v.60, p. 3127-3133, 1982.
- HIROOKA, T., FUJIWARA, Y., YAMAMOTO, C., YASUTAKE, A. & KAJI, T. Methylmercury Retards the Repair of Wounded Monolayer of Human Brain Microvascular Endothelial Cells by Inhibiting Their Proliferation without Nonspecific Cell Damage, *Journal of Health Science*, Vol. **53**, .450-456, 2007
- HUGHES, A. The topography of vision in mammals of contrasting life style: Comparative optics and retinal organization. In: *Handbook of Sensory Physiology*, v. VII/5, 1977.
- ITO, H.; MURAKAMI, T. Retinal ganglion cells in two teleost species, *Sebastiscus marmoratus* and *Novadon modestus*. *The Journal of Comparative Neurology*, v.229, p.80-96, 1984.
- ITO H, YOSHIMOTO M, ALBERT JS, YAMAMOTO N, SAWAI N: Retinal Projections and Retinal Ganglion Cell Distribution Patterns in a Sturgeon (*Acipenser transmontanus*), a Non-Teleost Actinopterygian Fish. *Brain Behaviour and Evolution*, v. 53, p.127-141, 1999.
- JOY, J.P., KIRUBAGARAN, R. Immunocytochemical study on the pituitary gonadotropic and thyrotropic cells in catfish, *Clarias batrachus* after mercury treatment. *Biol. Stru. Morphogen*, v. 2, p. 67-70, 1989.
- KEHRIG, H.A., HOWARD, B.M. & MALM, O.: Methylmercury in a predatory fish (*Cichla spp.*) inhabiting the Brazilian Amazon. *Environmental Pollution*, v.154, p. 68-76, 2008.

KOCK, J.H., REUTER, T.: Retinal ganglion cells in the crucian carp (*Carassius carassius*). I. Size and number of somata in eyes of different size. *Journal of Comparative Neurology*, 1978.

LAGO M. Sensibilidade ao contraste espacial de luminancia e cromático em pacientes intoxicados por vapor de mercúrio: evolução após dois anos. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. 2005.

LEBEL, J., MERGLER, D., LUCOTTE, M., AMORIM, M., DOLBEC, J., MIRANDA, D., ARANTES, G., RHEAULT, I. & PICHET, P. Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology*, v. 17(1), p. 157-167, 1996.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F. & DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazon basin. *Environmental Research*, v. 79(1), p. 20-32, 1998.

LOEW, E.R.; WAHL, C.M. A short-wavelength sensitive cone mechanism in juvenile perch, *Perca flavescens*. *Vision Research*, v.31(3), p.353-360, 1991.

LYTHGOE, J.N. The ecology of vision. *Clarendon Press*, Oxford, 1979.

MACHADO, F. A., Comportamento e hábitos alimentares de quatro espécies de Cichlidae (Teleostei) no Pantanal Matogrossense. Campinas, (Dissertação-Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Zoologia. 80 pp. 1983.

MALM, O., PFEIFFER, W.C., SOUZA, C.M.M. & REUTER, R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River basin, Brazil. *Ambio*. V. 19, p. 11-15, 1990.

MANALIS, R.S. & COOPER, G.P.: *Nature* 257, p. 690, 1975.

MANGRUM W.I.; DOWLING J.E., A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Visual Neuroscience*, v. 19, p. 767-779, 2002.

MEDNICK, A.S.; SPRINGER, A.D. Asymmetric distribution of retinal ganglion cells in goldfish. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 268, p. 49-59, 1988.

MERIGAN, W.H. Effects of toxicants on visual systems. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, v. 1, p. 15-22, 1979.

MIETTINEN, V., OHMOMO, Y., VALTONEN, M., BLANHSTEIN, E., RISSANEN, K., TILLANDER, M. & MIETTINEN, J.K. Fifth RIS (Radioactivity in

Scandinavia) Symposium, Department of Radioactivity, Univ. of Helsinki, 1970.

MUNK O. On the occurrence and significance of horizontal band-shaped retinal areas in teleosts . *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Khobenhavn*, v. 133, p. 85–120, 1970.

NAGASHIMA, K. A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol*, v. 25, p. 624-631, 1997.

NICOL, J.A.C. The eyes of fishes. *Clarendon Press*. Oxford, 1989.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., BELGER, L., PELLETIER, É & ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, V. 90, P. 217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., PELLETIER, E., PFEIFFER, W.C & ROULEAU, C. Coomparative uptake, bioaccumulation, anda gill damages of inorganic Mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Envirnmental Research*, v. 83, p. 286-292, 2000.

OLIVERO, J., NAVAS, V., PEREZ, A., SOLANO, B., ACOSTA, I., ARGUELLO, E., SALAS, R. Mercury levels in muscle of some fish species from Dique Chanel, Colômbia. *Bull. Environmental Toxicology*, v. 58, p. 865-870, 1997.

OLSON, K.R.; SQUIBB, K.S.; COUSINS, R.J. Tissue Uptake, Subcellular Distribution, and Metabolism of ^{14}C - CH_3HgCl and $^{203}\text{HgCl}$ by Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v.35(4), p. 381-390, 1978.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Editora Interciência, Rio de Janeiro. 382 p., 2002.

PORVARI, P. Mercury levels of fish in Tucurui hydroelectric reservoir and in River Moju in Amazonia, in the state of Para, Brazil. *The Science Of The Total Environment*, v.175(2) , p. 109-117, 1995.

RODIECK, R. W. *The Vertebrate Retina*. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

RODIECK, R.W. *The fist steps in seeing*. Sunderland, MA Sinauer Associates, 561 p., 1998.

RUFFINO, M.L., ISAAC, V.J. Life cycle and biological parameters of several Brazilian Amazon fish species. *NAGA, The ICLARM Quarterly*, v.18, p. 41-45, 1995.

SANDSTRÖM, A. Visual ecology of fish—a review with special reference to percids. *Fiskeriverket. Rapport*, v. 2, p. 45–80, 1999.

SANTOS, L. DO S.N., MULLER, R.C.S, SARKIS, J.E. DE S., NEVES, C.N., BRABO, E. DA S., SANTOS, E. DE O., BENTES, M.H. DA S. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós river basin, Pará, Brazil. *The science of the Total Environment*, v.261, p. 1-8, 2000.

SANTOS, E.C.O., JESUS, I.M., BRABO, E.S., LOUREIRO, E.C.B, MASCARENHAS, A.F.S., WEIRICH, J., CÂMARA, V.M., CLEARY, E. Mercury Exposures in riverside Amazon Communities in Para, Brazil. *Environmental Research Section*, v.84, p.100-107, 2000.

SANTANA, C. F. Reconstrução do espaço de cores de pacientes com discromatopsia adquirida: diabéticos tipo 2 e intoxicados por vapor de mercúrio. Dissertação de Mestrado em Psicologia Experimental - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. 2006.

SCHELLART, N.A., & SPEKREIJSE, H. Origin of the stochastic nature of ganglion cell activity in isolated goldfish retina. *Vision Research*, v. 13, p. 337-345, 1973.

SILVEIRA, L. C. L., DAMIN, E. T. B., PINHEIRO, M. C. N., RODRIGUES, A. R., MOURA, A. L.A. & MELLO, G. A. Visual dysfunction following mercury exposure by breathing mercury vapour or by eating mercury-contaminated food. In: J.D.Mollon, J.Pokorny, K.Knoblauch (Eds.). Normal and defective colour vision. Oxford: Oxford University Press, 2003.

SILVEIRA, L. C. L., VENTURA, D. F. & PINHEIRO, M. C. N. Toxicidade Mercurial -Avaliação do sistema visual em indivíduos expostos a níveis tóxicos de mercúrio. *Revista Ciência e Cultura*, v. 56(1), p. 36-38, 2004.

SIMÕES, A. L. A. C. Estudo das alterações visuais cromáticas em trabalhadores expostos ao vapor de mercúrio. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

STONE, J.: A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in cat's retina. *Journal of Comparative Neurology*, v.124, p: 337-352, 1965.

TANAN C.L.; VENTURA D.F.; DE SOUZA J.M.; GROTZNER S.R.; MELA M., GOUVEIA JR, A., OLIVEIRA-RIBEIRO C.A. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of thraira fish (*Hoplias malabaricus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39(7), p. 987-995, 2006.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure - Influence of preexposure to a PAH-like compound Volume 20, Issue 1, p. 92 – 99, 2002.

TRUMP, B.F. , JONES, R.T., SAHAPHONG, S. Cellular effects of mercury on the fish Kidney tubules, In: RIBELIN, W.E., MICAHI (EDS) *The pathology of fishes*, P. 585-612, 1975.

URBAN, P., GOBBA, F., NERUDOVA, J., LUKAS, E., CABELKOVA, Z. & CIKRT, M. Color discrimination impairment in workers exposed to mercury vapor. *Neurotoxicology*, v. 24(4-5), p. 711-716, 2003.

VENTURA, D. F., COSTA, M. T., COSTA, M. F., BEREZOVSKY, A., SALOMÃO, S. R., SIMÕES, A. L., LAGO, M., PEREIRA, L. H., FARIA, M. A., DE SOUZA, J. M. & SILVEIRA, L. C. L. Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Visual Neuroscience*, v. 21(3), p. 421-429, 2004.

VENTURA, D. F., SIMÕES, A. L., CANTO-PEREIRA, L. H. M., TOMAZ, S., LAGO, M., COSTA, M. T. V., COSTA, M. F., SOUZA, J. M., FARIA, M. A. M. & SILVEIRA, L. C. L. Color vision and contrast sensitivity losses of mercury contaminated industry workers in Brazil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 19(3): 523-529, 2005.

VENTURA, D. F., SIMÕES, A. L, COSTA, M. F., COSTA, M. T. V., DE SOUZA, J. M, CANTO-PEREIRA, L. H. M., LAGO, M., FARIA, M. A. M., & SILVEIRA, L.C. L. Hue and saturation discrimination and electroretinograms of mercury contaminated industry workers in Brazil. *Proceedings of the 9th Meeting of the International Neurotoxicology Association (INA)*, 2003a.

VENTURA, D. F., BEREZOVSKY, A., SALOMÃO, S. R., COSTA, M. T. V., SIMÕES, A. L., CANTO-PEREIRA, L. M., COSTA, M. F., DE SOUZA, J. M.,

LAGO, M., FARIA, M. A. M., & SILVEIRA, L. C. L. Multifocal electroretinograms (mfERGs) correlate with color vision losses in mercury contaminated workers. Proceedings of the 17th Symposium of the International Color Vision Society (ICVS). 172, 2003b.

VENTURA, D. F., SIMÕES, A. L., COSTA, M. T. V., COSTA, M. F., DE SOUZA, J. M., CANTO-PEREIRA, L. H. M., LAGO, M., FARIA, M. A. M., & SILVEIRA, L. C. L. Occupational mercury contamination produces loss of color-and contrast-vision but no effect in full field ERG. Annual Meeting Abstract www.arvo.org. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Abstract 4112, 2003c.

WAGNER, H.J.; FRÖHLICH, E.; NEGISHI, K.; COLLIN, S.P. The eye of deep-sea fish II. Functional Morphology of the retina. Progress in Retinal and Eye Research, v.17 (4), p. 637-685, 1998.

WARFVINGE K.; BRUUN A. Mercury accumulation in the squirrel monkey eye after mercury vapour exposure. Toxicology, v.107, p.189-20, 1996.

WARFVINGE K.; BRUUN A. Mercury distribution in the squirrel monkey retina after in utero exposure to mercury vapor. Environmental Research Section, v. A83, p. 102-109, 2000.

WEBBER, H. M.; HAINES, T. Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, p. 1556–1561, 2003.

WIENER, J.G.; SPRY, D.J. Toxicological significance of mercury in freshwater fish In: W.N. BEYER, G.H.; HEINZ A.W. Redmon-Norwood, Editors, *Environmental Contaminants in Wildlife Interpreting Tissue Concentrations*, CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 297–339, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), INTERNATIONAL PROGRAM IN CHEMICAL SAFETY (IPCS). *Environmental Health Criteria 101 Methylmercury*. Geneva: World Health Organization, 1990.

XAVIER, G.F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. *Plêiade*. 238p, 1999.

ZARET, T.M. life history and growth relationships of *Cichla ocellaris*, a predatory South America cichlid. *Biotropica*, v.12, p. 144-157, 1980.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)