



## **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS NEUROESFERAS HUMANAS NO DESENVOLVIMENTO NEURONAL E A AÇÃO DO NEUROTÓXICO METILMERCÚRIO**

*Juliane Hostert<sup>1</sup>, Mariana Rodrigues Davanso<sup>2</sup>, Clerverson A. F. Martins<sup>3</sup>.*

### **Resumo**

Como o cérebro em desenvolvimento é extremamente vulnerável a distúrbios químicos, testes de desenvolvimento a neurotoxicidade de uma substância é um aspecto importante da caracterização de sua toxicidade específica ao tecido. Essa revisão de literatura, teve como objetivo demonstrar o uso das neuroesferas humanas, que permitem uma triagem e minimizando assim o uso de animais, e o seu uso em testes neurotóxicos com metilmercúrio. Para a revisão de literatura, foi utilizada a metodologia de revisão de artigos publicados entre 2010 e 2020. Dentre os neurotóxicos, o metilmercúrio afeta o organismo em baixas concentrações e essas exposições pré-natais refletem durante a vida do indivíduo até a idade adulta ou mais avançada, podendo manifestar como doenças ou deficiências funcionais. O metilmercúrio que é comumente encontrado em peixes contaminados, que fazem parte da alimentação na dieta, por ser fonte de ômega 3 e consumido em grandes quantidades por gestantes. Estudos mostraram que a atividade das neuroesferas humanas, mostraram-se promissoras nos processos básicos do desenvolvimento neuronal, abrangendo proliferação, diferenciação, migração e apoptose e assim justificando o interesse nesse neurotóxico e na investigação das neuroesferas e seu uso como método alternativo, rápido e com menor custo.

**Palavras-chave:** Neurotoxicidade. Neurotoxicidade do desenvolvimento. DNT. HNPC's.

### **Abstract**

As the developing brain is extremely vulnerable to chemical disorders, developmental testing for the neurotoxicity of a substance is an important aspect of characterizing its specific tissue toxicity. This literature review aimed to demonstrate the use of human neurospheres, which allow for screening and thus minimize the use of animals, and their use in neurotoxic tests with methylmercury. For the literature review, the methodology for reviewing articles published between 2010 and 2020 was used. Among neurotoxic drugs, methylmercury affects the body in low concentrations and these prenatal exposures reflect during the individual's life until adulthood or more advanced and may manifest as diseases or functional deficiencies. Methylmercury, which is commonly found in contaminated fish, which are part of the diet, as it is a source of omega 3 and consumed in large quantities by pregnant women. Studies have shown that the activity of human neurospheres has shown promise in the basic processes of neuronal development, covering proliferation, differentiation, migration and apoptosis and thus justifying the interest in this neurotoxicant and in the investigation of neurospheres and their use as an alternative, fast and efficient method. lowest cost.

**Keywords:** Neurotoxicity. Developmental neurotoxicity. DNT. HNPC's and human neural progenitor cells.

### **1 Introdução**

A neurotoxicidade pode ser definida como “qualquer efeito adverso na química, estrutura ou função do sistema nervoso, durante o desenvolvimento ou na maturidade, induzido por influências

1 Acadêmica do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Endereço para correspondência: [jully.hostert@gmail.com](mailto:jully.hostert@gmail.com)

2 Docente do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Endereço para correspondência: [mariana.davanso@utp.br](mailto:mariana.davanso@utp.br)

3 Docente do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço para correspondência: [clerverson.afm@gmail.com](mailto:clerverson.afm@gmail.com)



químicas ou físicas”. Assim, a maioria das alterações morfológicas, como neuronopatia (perda de neurônios), axonopatia (degeneração do axônio neuronal), mielinopatia (perda das células gliais que circundam o axônio) ou outras gliopatias, seriam consideradas adversas, mesmo que estruturais e / ou alterações funcionais foram leves ou transitórias (Costa e Giordano, 2012, p.1).

A definição geral de neurotoxicidade também aponta para uma diferença de potencial entre o sistema nervoso em desenvolvimento e o maduro, para ressaltar o fato de que a neurotoxicidade no desenvolvimento (DNT) é um aspecto importante da neurotoxicologia. Muitos neurotóxicos humanos conhecidos são de fato neurotóxicos do desenvolvimento (GIORDANO e COSTA, 2012), a DNT estuda a toxicidade dos compostos quanto a capacidade e potencial de induzir alterações morfológicas e funcionais no sistema nervoso em desenvolvimento (GOLDMAN e KODURU, 2000).

Ao longo dos anos foram realizados experimentos em animais, principalmente camundongos em grande número, aumentando os custos e tendo principalmente a diferença de espécies, dificultando a avaliação dos riscos em humanos (HELLWIG *et al.*, 2018). E em consideração a isso, novos estudos e métodos vem surgindo, fazendo o uso de células humanas, facilitando a interpretação e os efeitos específicos na espécie. As neuroesferas humanas baseadas no progenitor neural humano (hNPCs) (BAUMANN, GASSMANN, MASJOSTHUSMANN, 2016), podem ser usadas em uma triagem *in vitro* e tem sido promissora na identificação de produtos químicos com potencial para interromper o desenvolvimento do cérebro de mamíferos (MOORS, CLINE, ABEL, 2007).

O objetivo dessa revisão foi demonstrar que neuroesferas humanas são capazes de serem moduladas por neurotóxicos do desenvolvimento e de espelhar processos básicos, como proliferação, diferenciação, migração e apoptose, com uma investigação dos efeitos do neurotóxico metilmercúrio (MeHg).

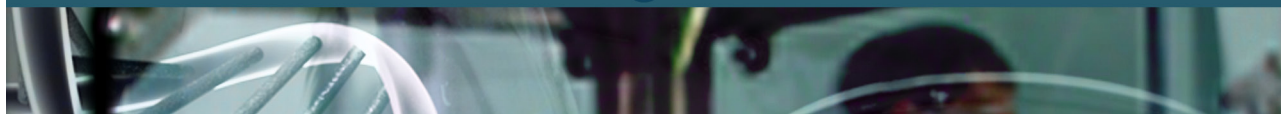
## 2 Metodologia

Esse trabalho foi elaborado a partir de uma revisão de literatura utilizando as bases de dados PUBMED, NCBI, Scielo, biblioteca Cochrane, Science Direct no período de agosto a dezembro de 2020, em artigos publicados entre 2010 a 2020, usando as seguintes palavras-chaves, neurotoxicidade, neurotoxicidade do desenvolvimento, DNT, neuroesferas humanas e metilmercúrio.

## 3 Discussão

### 3.1 Neurotoxicidade do Desenvolvimento

A neurotoxicidade do desenvolvimento (DNT) é uma série ameaça à saúde humana e durante as últimas três décadas, os resultados de coortes em perspectiva de nascimento sugerem que exposição a produtos químicos no início da vida, mesmo em baixas concentrações ambientais, pode ter consequências adversas para a saúde a longo prazo (EFSA, 2017). A DNT, descreve qualquer efeito adverso da nocividade exógena no sistema nervoso em desenvolvimento, levando



a alterações funcionais e morfológicas do cérebro (HAYESS *et al.*,2013; BAUMANN, BARENYS, GASMANN, FRITSCHÉ, 2014).

A neurotoxicidade do desenvolvimento causa danos cerebrais que são muitas vezes intratáveis e frequentemente permanentes. A consequência de tal dano cerebral é comprometimento do SNC em sua função que dura a vida inteira e pode resultar em redução de inteligência, expressa em termos de pontos de QI perdidos, ou perturbação do comportamento e abuso de substâncias ou produtos químicos. Um estudo recente comparou a perda estimada de QI das principais causas pediátricas e mostrou que a magnitude das perdas atribuíveis ao chumbo, pesticidas, mercúrio, metilmercúrio e outros neurotóxicos estavam na mesma faixa como, ou ainda maior do que, as perdas associadas a eventos médicos como nascimento prematuro, lesão cerebral traumática, cérebro tumores e doenças cardíacas congênita (GRANDJEAN, LANDRIGAN, 2014; e LI, SETTIVARI, LEBARON, MARTY, 2019).

### 3.2 Neuroesferas Humanas

Tendo em vista parte dos malefícios causados, a DNT tem sido considerada uma área que necessita de abordagens para melhor detectar e caracterizar produtos químico, com uma necessidade crítica de previsão *in vitro* com eficiência de tempo, custo e métodos de testes. Ensaio *in vitro* que avaliam o impacto desses produtos em processos celulares para o cérebro normal em desenvolvimento, incluindo: proliferação neural, diferenciação, migração, crescimento de neurônios, sinaptogênese e atividade neural (EFSA, 2015; e FRITSCHÉ, GASSMANN, SCHREIBER, 2011).

Experimentos com animais em ratos são usados para testes DNT, que são muito caros em termos de custo e tempo e usa um grande número de animais, e carrega o problema adicional de diferenças de espécies para extrapolação. Uma viável substituta, tem sido as neuroesferas humanas (BAUMANN, BARENYS, GASMANN, FRITSCHÉ, 2014; e FRITSCHÉ *et al.*,2018).

As hNPC's (células progenitoras neurais humanas) são cultivadas em cultura de suspensão no meio de proliferação de células, dentro de uma semana, neuroesferas de 0,2 a 0,3

de diâmetro são formadas e crescem em tamanho por cultivo na presença de fatores de crescimento. São cortadas em pequenos pedaços, sofrem regeneração e formam neuroesferas menores e regulares de tamanho uniforme em 1 ou 2 dias e desta forma, as neuroesferas podem ser expandidas e cultivadas por vários meses sem perder sua capacidade proliferativa (BAUMANN, BARENYS, GASMANN, FRITSCHÉ, 2014; e LI, SETTIVARI, LEBARON, MARTY, 2019).

#### 3.2.1 Neuroesferas Humanas e os Processos Básicos do Desenvolvimento Cerebral (Proliferação, Diferenciação, Migração e Apoptose)

Para avaliar os processos básicos do desenvolvimento cerebral, as neuroesferas podem ser cultivadas em condições de proliferação para posteriormente medir a proliferação por meio de



aumento de diâmetro, ou podem ser cultivadas em condições de diferenciação para finalmente avaliar a migração, diferenciação para astrócitos, neurônios e oligodendrócitos ou apoptose. Em ambas as condições, a viabilidade / citotoxicidade das neuroesferas é também avaliada para distinguir entre citotoxicidade geral e efeitos específicos em cada ponto final. (FRITSCHÉ *et al.*, 2018).

O ensaio de proliferação é realizado para determinar a capacidade da hNPC para dividir e gerar novas células ao longo do tempo. Uma maneira simples de avaliar a proliferação é medir o aumento do diâmetro das neuroesferas flutuantes. Alternativamente à medição do aumento do diâmetro, uma avaliação direta da proliferação pode ser realizada pela quantificação da síntese de DNA. BrdU é uma timidina análogo, que se incorpora ao DNA de células recém-geradas. Com base em uma reação quimioluminescente, este ensaio usa um anticorpo contra BrdU, que é conjugado com uma peroxidase. Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a peroxidase catalisa a oxidação do luminol para oxiluminol e a luz emitida são medidos (PRICE *et al.*, 2018).

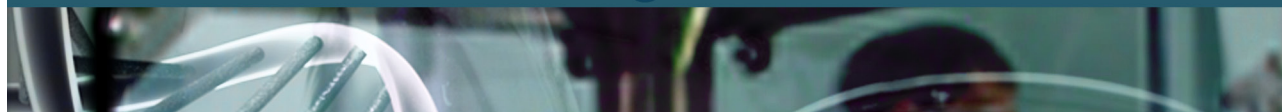
Já a migração, reflete a capacidade das hNPCs de deixar de proliferar para a posição final no cérebro. Ela é avaliada, medindo a distância percorrida sobre a superfície revestida em um determinado período de tempo (BAUMANN, BARENYS, GASMANN, FRITSCHÉ, 2014).

O termo diferenciação se refere ao processo de NPCs se desenvolvendo nos três principais tipos de células neurais: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Neste ensaio, neuroesferas são fixas e a porcentagem de células na área de migração, que são diferenciadas em cada um desses tipos de células é avaliado por meio de imunocitoquímica (ICC) usando  $\beta$ III-tubulina, anticorpos GFAP e O4, bem como Hoechst como uma coloração nuclear (FRITSCHÉ *et al.*, 2018).

Finalmente temos a avaliação da apoptose celular, que é visualizada no princípio da condensação nuclear em células apoptóticas, que é visualizada por coloração com Hoechst e iodeto de propídio. Hoechst entra em cada célula e intercala no DNA, enquanto o iodeto de propídio apenas entra nas células com integridade de membrana perturbada e intercala no DNA. Ao adicionar ambos os corantes às células vivas, todos os núcleos das células são corados por Hoechst, enquanto apenas núcleos celulares condensados apoptóticos tardios também são corados por iodeto de propídio. Os núcleos condensados e apoptóticos são então duplamente corados para Hoechst e iodeto de propídio e são contados como células apoptóticas (TERRON, SUSANNE, 2018).

### 3.3 Neurotóxico Metilmercúrio

O desenvolvimento do cérebro humano é excepcionalmente sensível a lesões causadas por produtos químicos tóxicos, vários processos de desenvolvimento têm se mostrado altamente vulneráveis à toxicidade química. Por exemplo, *in vitro* estudos sugerem que as células-tronco neurais são muito sensíveis a substâncias neurotóxicas, como metilmercúrio. Na fase inicial do desenvolvimento do cérebro, as exposições no início da vida a produtos químicos neurotóxicos podem causar uma ampla gama de efeitos adversos no desenvolvimento e na maturação do cérebro que podem se manifestar como deficiências funcionais ou doenças em qualquer ponto da



vida humana, desde a primeira infância até idade muito avançada (GRANDJEAN, P; LANDRIGAN, P, 2014 e WENDROFF,2014).

A toxicidade do desenvolvimento deste composto orgânico, tornou-se evidente na década de 1960 em Minamata, Japão, onde uma epidemia de espasticidade, cegueira e profundo retardo mental foi visto em bebês nascidos para mães que consumiram peixe de águas contaminadas. Depois de muitos anos de estudos clínicos e experimentais, a fonte provou ser compostos de mercúrio liberados em Minamata Bay por uma fábrica de plásticos. Metilmercúrio acumularam e atingiram altas concentrações em peixes do local. Mães expostas a esse neurotóxico foram menos afetadas ou não sofreram nada de efeito toxicológico, diferentemente das crianças que foram expostas no útero e sofreram envenenamento (WINNEKE, 2011).

Neurotoxicidade do desenvolvimento devido ao metilmercúrio ocorre em exposições muito mais baixas do que as concentrações que afetam a função cerebral do adulto. Deficiências aos 7 anos de idade que estavam ligados a exposições pré-natais de baixo nível a metilmercúrio ainda eram detectáveis aos 14 anos de idade. Alguns polimorfismos genéticos comuns parecem para aumentar a vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento à toxicidade do metilmercúrio. Varreduras de ressonância magnética funcionais de pessoas exposto no período pré-natal a quantidades excessivas de metilmercúrio mostrou ativação anormalmente expandida de regiões do cérebro em resposta à estimulação sensorial e tarefas motoras. Porque alguns efeitos adversos podem ser contrabalançados por ácidos graxos essenciais de frutos do mar, ajuste estatístico para dieta materna durante a gravidez resulta em efeitos mais fortes do metilmercúrio (GRANDJEAN, P; LANDRIGAN, P, 2014).

Peixe e marisco são componentes importantes na dieta para mulheres em idade fértil. O consumo do peixe é particularmente vantajoso para mulheres grávidas, pois contém altas concentrações de ômega 3 (3) ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e aminoácidos que são essenciais para o desenvolvimento do cérebro fetal. No entanto, uma dieta rica em peixes pode ser razoavelmente considerada como um principal via de exposição ao mercúrio, uma vez que a mãe é exposta e absorve o MeHg<sup>+</sup>, ele facilmente atravessa a placenta e atinge o cérebro fetal, onde a divisão e migração neuronal podem ser inibidas causando uma ruptura da estrutura cerebral (ROBLE *et al.*,2014 ; BRACHET *et al.*,2020).

Vários estudos transversais registraram associações significativas entre metilmercúrio exposição e comprometimento neurocomportamental em jovens crianças. A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos revisou estes estudos e concluiu que existem fortes evidências para neurotoxicidade fetal de metilmercúrio, mesmo em baixa exposições. Essas descobertas levaram às autoridades para emitir alertas dietéticos, e agências nacionais e internacionais (com coordenação da ONU Programa Ambiental) agora buscam controlar e restringir a liberação de mercúrio no meio ambiente. Substantial reduções já foram alcançadas no uso de mercúrio (GRANDJEAN, LANDRIGAN, 2014 e WENDROFF,2014).



## Conclusão

O atual modelo animal in vivo para avaliação de DNT consomem muitos recursos e pode não capturar todos os mecanismos que podem ser relevantes para DNT em humanos. Como resultado, há uma necessidade crescente de abordagens mais confiáveis, com eficiência de tempo e custo para a avaliação de neurotóxicos, as neuroesferas mostraram-se capazes de reproduzir os processos do desenvolvimento neuronal de proliferação, diferenciação e apoptose, oferecendo um novo método para identificação de perigos da DNT.

E como principal neurotóxico, pelo grande consumo na alimentação através de peixes e frutos do mar, testes com metilmercúrio, mostrando que os efeitos in vivo do metilmercúrio conseguem ser imitados in vitro.

No futuro, mais produtos químicos conhecidos por causar DNT poderão ser testados quanto ao seu potencial de interferir no desempenho da neuroesfera humana, a fim de desenvolver esse método em um processo de validação e torná-lo aplicável às necessidades de teste. Por fim, triagem de produtos químicos industriais presentes em exposições humanas para efeitos neurotóxicos para que substâncias perigosas possam ser identificadas para um controle mais rígido.

## Referências

- BAUMANN, J; BARENYS, M; GASMANN, K; FRITSCHKE, E. Comparative human and rat “neurosphere assay” for developmental neurotoxicity testing. *PubMed – National Library of Medicine*, v.59, p. 21- 24, Fev/2014.
- BAUMANN, J; GASSMANN, K; MASJOSTHUSMANN, S; Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events. *PubMed – National Library of Medicine*. v. 90, p. 1415-1427, Jun./2016.
- BRACHET, M. R. *et al.* Mercury contamination levels in the bioindicator piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana rivers: mapping for risk assessment. *PubMed – National Library of Medicine*, v.27, p. 3624 - 3636, Fev/2020.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Literature review on in vitro and alternative developmental neurotoxicity (DNT) testing methods, p. 1-186, Mar/2015.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Workshop report on integrate approach for testing and assessment of developmental neurotoxicity, p. 1 -19, Mar/2017.
- FRITSCHKE, E. *et al.* Development of the concept for stem cell-based developmental neurotoxicity evaluation. *PubMed – National Library of Medicine*, v.165, p. 14 – 20, Set/2018.
- FRITSCHKE, E; GASSMANN, K; SCHREIBER, T. Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing. *PubMed – National Library of Medicine*, v.758, p. 99 – 114, Set/2011.
- GIODARNO, G; COSTA G. L. Developmental Neurotoxicity: Some Old and News Issues. *Hindawi Publishing Corporation*. v. 2012, p. 1 – 13, Jun./2012.
- GOLDMAN, L. R; KODURU, S. Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy perspective. *Environmental Health Perspectives (NCBI)*. v. 108, Suppl. 3, p. 443-448, Jun./2000.



GRANDJEAN, P; LANDRIGAN, P. Neurobehavioural effects of developmental toxicity.

*PubMed – National Library of Medicine*, v. 13, p. 330 – 338, Mar/2014.

HAYESS, K. *et al.* The DNT-EST: A predictive embryonic stem cell-based assay for developmental neurotoxicity testing in vitro. *Science Direct*. v. 314, p. 135-147, Dez./2013.

HELLWIG, C. *et al.* Culture of human neurospheres in 3D scaffolds for developmental neurotoxicity testing. *Science Direct*. v. 52, p. 106-115, Out./2018.

LI, J; SETTIVARI, R; LEBARON, M; MARTY, S. M. An industry perspective: A streamlined screening strategy using alternative models for chemical assessment of developmental neurotoxicity. *Science Direct*. v. 73, p. 17-30, Jul./2019.

MOORS, M; CLINE, J. E; ABEL, J. ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Science Direct*. v. 221, p. 57-67, Mai./2017.

PRICE, B.A. *et al.* Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. *Science Direct*. v. 354, p. 7-18, Set./2018.

ROBLES, G. R. *et al.* Marine diet and tobacco exposure affects Mercury concentrations in pregnant women (I) from Baja California Sur, Mexico. *PubMed – National Library of Medicine*, v. 1, p. 1123 - 1132, Out/ 2014.

TERRON, A; SUSANNE, B.H. Towards a regulatory use of alternative developmental neurotoxicity testing (DNT). *Science Direct*. v. 354, p. 19-23, Set./2018.

WENDROFF, A. Neurodevelopmental toxicity: still more questions than answers. *The Lancet Neurology*. v.13, p. 646-647, Jul/2014.

WINNEKE, G. Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls. *PubMed – National Library of Medicine*, v.308, p. 9 – 15, set/2011.