

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Nathalia Ferrazzo Napolini

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO BUTANÓLICO DE
Ilex paraguariensis NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
PARAQUAT EM HIPOCAMPO DE RATOS PRÉ-PÚBERES**

Florianópolis
2016

Nathalia Ferrazzo Napolini

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO BUTANÓLICO DE
Ilex paraguariensis NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
PARAQUAT EM HIPOCAMPO DE RATOS PRÉ-PÚBERES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Florianópolis
2016

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

Naspolini, Nathalia Ferrazzo
EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO BUTANÓLICO DE *Ilex*
paraguariensis NA TOXICIDADE INDUZIDA POR PARAQUAT EM
HIPOCAMPO DE RATOS PRÉ-PÚBERES / Nathalia Ferrazzo Naspolini
; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza -
Florianópolis, SC, 2016.
122 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Bioquímica. 3. Paraquat . 4. *Ilex*
paraguariensis. 5. sistema glutamatérgico. I. Souza,
Ariane Zamoner Pacheco de. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III.
Título.

Nathalia Ferrazzo Naspolini

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO BUTANÓLICO DE
Ilex paraguariensis NA TOXICIDADE INDUZIDA POR
PARAQUAT EM HIPOCAMPO DE RATOS PRÉ-PÚBERES**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção de título de “mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

UFSC, de 17 de Fevereiro de 2016

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora- Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Júlia Dubois Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr.^a Ana Lucia Severo Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Eduardo Benedetti Parisotto
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta dissertação a
minha mãe Dirce Regina,
por me proporcionar uma
criação repleta de amor e
carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora *Profa* Ariane Zamoner Pacheco de Souza, por me inspirar quando iniciei meu curso de graduação, por me acolher alguns anos depois e me proporcionar esta pesquisa tão interessante. Muito obrigada pelos ensinamentos, orientação, pelas contribuições e por todo incentivo e carinho. Obrigada por ceder a infraestrutura de seu laboratório para a condução deste trabalho.

À equipe de trabalho (LaBioSignal) pela ajuda em diversas etapas desta pesquisa e pela amizade. Agradeço à Daiane Cattani, Patricia Cesconetto e Juliana Domingues pelos ensinamentos. À Carla Rieg, Vitória Haiduk, e Luiza Kasulke pela ajuda nos experimentos e pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Flávio Reginatto, a Prof.^a Angela Campos, e ao Carlos Henrique Blum da Silva, do Departamento de Ciências Farmacêuticas desta Universidade, pelo preparo e fornecimento dos extratos.

Gostaria de agradecer também à minha mãe, por todas as palavras de apoio nos momentos de dificuldade e por ser sempre tão compreensiva.

Às minhas irmãs, Bianca Napolini e Giovanna Napolini, por toda a preocupação, carinho e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – PPGBQA por ter oportunizado a realização deste trabalho. A CAPES pela bolsa concedida. Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

RESUMO

O paraquat (PQ) é um herbicida amplamente utilizado no Brasil, apesar de ser descrito como indutor da doença de Parkinson (DP) em modelo animal e em estudos epidemiológicos. A flora brasileira apresenta grande diversidade de plantas medicinais e inúmeros extratos de plantas são utilizados na medicina popular, demonstrando a relevância de investigar o potencial terapêutico de compostos naturais. Neste contexto, já foram descritas atividades antioxidante, antiparkinsoniana, antiobesogênica e anticarcinogênica para a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire). O presente estudo investigou as alterações bioquímicas induzidas pela exposição *in vivo* ao herbicida PQ em hipocampo de ratos de 27 dias de idade, assim como o efeito neuroprotetor da erva-mate. Os animais receberam 10 mg/Kg de peso de PQ via intraperitoneal por 5 dias consecutivos, o grupo controle recebeu solução salina durante o mesmo período. Para avaliar o efeito neuroprotetor do extrato butanólico (BuOH) de *I. paraguariensis*, os animais receberam 200 mg/kg de peso do extrato via gavagem, o grupo controle recebeu o mesmo volume de água, 1 dia antes e durante o tratamento com PQ. Foram determinados marcadores de dano oxidativo, da neurotransmissão glutamatérgica e do metabolismo energético em hipocampo dos animais. Os resultados obtidos mostraram: aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; diminuição da captação de ^{14}C -glutamato e da atividade da glutamina sintetase (GS); diminuição da captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose; aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH). Em relação as defesas antioxidantes, houve diminuição da atividade da gama glutamil transferase (GGT), da glicose-6-P desidrogenase (G6PD), aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e aumento da peroxidação lipídica causados pela exposição ao PQ. O tratamento com *I. paraguariensis* preveniu o efeito do paraquat na captação de glicose, na atividade da LDH e da ALT e na captação de glutamato, além de exercer efeito neuroprotetor nos mecanismos de defesa antioxidante avaliados, como na atividade da G6PD, SOD, GGT e conteúdo de glutatona (GSH). Os resultados obtidos neste estudo poderão sugerir o potencial terapêutico da erva-mate como protetor dos danos induzidos pela exposição a pesticidas.

Palavras chave: Paraquat; Estresse oxidativo; Neurotoxicidade; *Ilex paraguariensis*

ABSTRACT

Paraquat (PQ) is widely used in Brazil, despite being described as a Parkinson's disease (PD) inductor in animal models and in epidemiological studies. Considering that Brazilian flora has a great diversity of medicinal plants and many plant extracts are used in folk medicine, the investigation of the therapeutic potential of a natural compound is an important challenge to researchers. Considering that, several properties have been described such as antioxidant, anti-Parkinson, anti-obesity and anticarcinogenic for yerba mate (*I. paraguariensis* St. Hilaire). The present study investigated the biochemical changes induced by *in vivo* exposure to the herbicide PQ on hippocampus of 27 days old rats, as well as the neuroprotective effect of yerba mate. Animals received PQ (10 mg/kg body weight, i.p.) for 5 consecutive days, the control group received saline for the same period. In order to evaluate the neuroprotective effect of the butanolic (BuOH) extract of *I. paraguariensis*, rats received 200 mg/kg body weight by gavage) and the control group received the same amount of water, 1 day before and during PQ treatment. Biomarkers of oxidative damage, glutamatergic neurotransmission and energy metabolism were determined on hippocampus. The present study showed increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx associated with decreased glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activity. Moreover, glucose uptake was decreased while alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were increased. Regarding the antioxidant defenses, PQ leads to decreased gamma-glutamyl transferase (GGT) and glucose-6-P dehydrogenase (G6PD) activities, as well as increased superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, which were associated with increased lipid peroxidation all caused by PQ exposure. The co-treatment with *I. paraguariensis* prevented the effect of PQ on glucose uptake, LDH and ALT activities and glutamate uptake. Besides, *I. paraguariensis* exerted neuroprotective effect on antioxidant defense mechanisms evaluated in this study, such as G6PD, SOD, GGT and GSH levels. In conclusion, these findings suggested the therapeutic potential of yerba mate as damage protector induced by exposure to pesticides.

Keywords: Paraquat. Oxidative stress. Neurotoxicity. *Ilex paraguariensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.....	32
Figura 2: Estrutura química do paraquat.....	33
Figura 3: Vendas anuais de Paraquat e total de ingredientes ativos (IAs) no Brasil no período de 2009 a 2012.....	34
Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio por meio da ciclagem redox.....	35
Figura 5: Reação do Paraquat com o ferro e formação do radical hidroxil.....	36
Figura 6: Interação do PQ com elementos da cadeia transportadora de elétrons.....	37
Figura 7: Ilustração esquemática da orientação do hipocampo em ratos.....	40
Figura 8: Representação esquemática da síntese do glutamato.....	42
Figura 9: Representação esquemática do ciclo glutamato-glutamina....	45
Figura 10: Interação astrócitos-neurônios no metabolismo energético.	48
Figura 11: Representação esquemática da interação entre astrócito e neurônio na síntese da glutatona.....	54
Figura 12: Representação esquemática hipotetizando o mecanismo neuroprotetor de <i>Ilex paraguariensis</i> frente a toxicidade induzida por PQ em hipocampo de ratos pré-púberes.....	59
Figura 13: Cromatograma do extrato bruto de <i>I. paraguariensis</i> por CLUE/DAD com detecção em 280nm.....	71
Figura 14: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) no ganho de massa corpórea de ratos de 27 dias de idade.....	73
Figura 15: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) sobre a viabilidade celular em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.....	74
Figura 16: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.....	75
Figura 17: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) na captação de ^{14}C -2-Desoxi-D-Glicose em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.....	76
Figura 18: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) na atividade da enzima LDH em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.....	76

Figura 19: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) sobre a captação específica de ¹⁴ C-glutamato em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	77
Figura 20: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) sobre a atividade da enzima GS em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	78
Figura 21: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) na atividade das enzimas A) Aspartato aminotransferase e B) Alanina aminotrasferase em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	79
Figura 22: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) na quantidade de peroxidação lipídica em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	80
Figura 23: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) em relação ao dano a proteínas em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	80
Figura 24: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) em relação a atividade da enzima A) GGT B) G6PD e C) conteúdo de GSH em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	81
Figura 25: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) em relação a atividade da A) SOD e B) Catalase em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	83
Figura 26: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) em relação a atividade da A) GPx e B) GR em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	84
Figura 27: Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de <i>I. paraguariensis</i> (200 mg/kg) em relação a atividade da GST em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.	85
Figura 28: Aspectos neuroquímicos da neurotoxicidade induzida pelo PQ em hipocampo de ratos pré-púberes.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos biológicos atribuídos à erva-mate ou seus extratos....	57
Tabela 2: Teores de compostos fenólicos e cafeína nos extratos/frações (mg/g).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BuOH	Butanólico
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamiltransferase
Glu	Glutamato
GLUTs	Transportadores de glicose
Gln	Glutamina
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
IAS	Ingredientes ativos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDH	Lactato desidrogenase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malondialdeído
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MPV	Matéria-prima vegetal
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

	reduzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PQ	Paraquat
Prx	Peroxiredoxinas
PKC	Proteína cinase C
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agropecuária
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.1.1 <i>Objetivos Específicos</i>	27
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
3.1 AGROTÓXICOS E SUAS IMPLICAÇÕES SOCIOAMBIENTAIS	29
3.1.1 <i>O consumo de agrotóxicos no Brasil</i>	31
3.2 O HERBICIDA PARAQUAT	33
3.2.1 <i>Paraquat e o sistema nervoso central</i>	38
3.3 HIPOCAMPO	39
3.3.1 <i>Um breve esboço sobre a formação do hipocampo de ratos</i>	39
3.4 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO (SÍNTESE, RECEPTORES E TRANSPORTADORES).....	40
3.4.1 <i>Destino do glutamato e o ciclo glutamato-glutamina</i>	43
3.5 CA ²⁺ COMO UM MENSAGEIRO NO SNC	46
3.6 O METABOLISMO ENERGÉTICO NO CÉREBRO	47
3.7 ESTRESSE OXIDATIVO, DANO E O SNC.	49
3.7.1 <i>EROs e os mecanismos de defesa antioxidante no SNC.</i> 50	
3.8 ILEX PARAGUARIENSIS	55
4. HIPÓTESE	59
5. MATERIAL E MÉTODOS	61
5.1 MATERIAL.....	61
5.2 COLETA E BENEFICIAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (MPV).....	61
5.2.1 <i>Matéria-prima vegetal</i>	61
5.2.2 <i>Preparo e fracionamento do extrato bruto</i>	61
5.2.3 <i>Caracterização química do extrato e frações</i>	62
5.3 ANIMAIS	62
5.4 MONITORAMENTO DO GANHO DE MASSA CORPÓREA	63
5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	63
5.6 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	63
5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE ¹⁴ C-GLUTAMATO, ¹⁴ C-2-DESOXI-D-GLICOSE E ⁴⁵ Ca ²⁺	64
5.7.1 <i>Captação de [¹⁴C]-glutamato</i>	64
5.7.2 <i>Influxo de ⁴⁵Ca²⁺</i>	64

5.7.3	Captação de [¹⁴ C]-2-desoxi-D-glicose.....	65
5.8	DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	65
5.8.1	Lipoperoxidação tecidual – TBARS	65
5.8.2	Proteína Carbonilada.....	66
5.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	66
5.9.1	Glutamina Sintetase.....	66
5.9.2	Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase 67	
5.9.3	Gamma-glutamil transferase (GGT)	67
5.9.4	Lactato desidrogenase (LDH)	67
5.9.5	Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)	68
5.10	CONTEÚDO DE GSH.....	68
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	69
5.11.1	Glutationa redutase (GR).....	69
5.11.2	Glutationa peroxidase (GPx).....	69
5.11.3	Glutationa S-Transferase (GST).....	69
5.11.4	Catalase.....	70
5.11.5	Superóxido dismutase (SOD).....	70
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
6.	RESULTADOS	71
6.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E FRAÇÕES.....	71
6.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM PQ E COM EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> NO GANHO DE MASSA CORPÓREA DE RATOS COM 21 A 26 DIAS DE IDADE ..	72
6.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PARAQUAT NA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT	73
6.4	ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> EM HIPOCAMPO	74
6.5	ENVOLVIMENTO DA CAPTAÇÃO DE ¹⁴ C-2-DESOXI-D- GLICOSE E DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> EM HIPOCAMPO	75
6.6	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA TOXICIDADE INDUZIDA PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO	

OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> EM HIPOCAMPO	77
6.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO A LÍPIDOS E PROTEÍNAS EM HIPOCAMPO	79
6.8 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> EM PARÂMETROS RELACIONADOS ÀS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM HIPOCAMPO	81
6.9 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRADO BUOH DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM HIPOCAMPO	82
7. DISCUSSÃO	87
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
8. CONCLUSÃO	101
9. PERSPECTIVAS.....	103
REFERÊNCIAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

Os impactos na saúde pública devido ao uso intensivo de agrotóxicos são amplos uma vez que atingem vastos territórios e envolvem diferentes grupos populacionais, como trabalhadores em diversos ramos de atividades, e moradores de áreas pulverizadas, além dos indivíduos que consomem alimentos contaminados (Rigotto *et al.*, 2012). Somado ao uso intensivo, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), dos 50 agrotóxicos mais utilizados nas lavouras brasileiras, 22 são proibidos na União Européia, fazendo do Brasil o maior consumidor de agrotóxicos já banidos por outros países (ANVISA, 2012). Dentre eles, o herbicida paraquat (PQ), está em processo de revisão pela ANVISA desde 2008, mesmo sendo classificado, por esta agência, como pertencente a *Classe I* (extremamente tóxico). E ainda, teve recentemente o limite máximo de resíduos para a cultura de cana-de-açúcar alterado, de 0,05 mg/kg para 0,1 mg/kg (ANVISA, 2015). Tais evidências demonstram um risco crescente à população, principalmente devido ao aumento dos registros de venda nos últimos anos, que foi de 265,5% no período de 2009 a 2012 (IBAMA, 2013). Sabe-se que o uso crescente de agrotóxicos no país resulta em impactos ambientais e para a saúde pública, e principalmente, coloca em risco a segurança alimentar e nutricional da população (Rigotto *et al.*, 2012). O herbicida PQ é permeável à barreira hematoencefálica desencadeando efeitos tóxicos no sistema nervoso central (SNC) (Kim *et al.*, 2012), os quais já foram relacionados com doenças neurodegenerativas (Prakash *et al.*, 2014). O conhecimento do mecanismo de ação e do potencial de toxicidade deste herbicida precisa ser aprofundado e divulgado, para que medidas preventivas e/ou regulamentadoras possam ser promovidas. Estes dados reforçam a necessidade de estudos que visem minimizar os impactos da exposição a estes agrotóxicos na saúde de população.

Considerando-se que a flora brasileira apresenta grande diversidade de plantas medicinais e ainda, que inúmeros extratos de plantas são utilizados na medicina popular, a investigação do potencial terapêutico de compostos naturais representa grande relevância científica. Extratos de plantas ou compostos isolados demonstraram efeitos na atividade antioxidante celular e nos sistemas de reparo a danos (Forman, Davies e Ursini, 2014). A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma espécie cuja utilização popular na forma de infusão (chimarrão e chá-mate) ou macerada (tererê) é conhecida devido

a suas propriedades diuréticas, digestivas e estimulantes do SNC (Bastos *et al.*, 2007). Além destas propriedades ligadas ao uso popular, cabe destacar as diversas outras atividades farmacológicas já investigadas e descritas, como as atividades antioxidante (Bravo *et al.*, 2014), antiparkinsoniana (Gatto *et al.*, 2015), antiobesogênica (Andersen e Fogh, 2001), anti-inflamatória (Arçari *et al.*, 2011) e anticarcinogênica (Barg *et al.*, 2014). Diversos grupos de metabólitos secundários já foram descritos para a erva-mate, como as metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas (Heck e De Mejia, 2007). Dentre os grupos químicos com potencial antioxidante destacam-se os compostos fenólicos. Pretende-se, portanto, investigar as alterações provocadas pela exposição *in vivo* ao PQ em diferentes parâmetros bioquímicos e de dano oxidativo e possíveis efeitos neuroprotetores do extrato butanólico (BuOH) de *I. paraguariensis* em hipocampo de ratos pré-púberes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações neuroquímicas induzidas pela exposição *in vivo* ao PQ e avaliar o efeito neuroprotetor ocasionados pelo tratamento com o extrato BuOH de *Ilex paraguariensis* em hipocampo de ratos pré-púberes.

2.1.1 Objetivos Específicos

Verificar o efeito da exposição aguda ao PQ e o efeito neuroprotetor ocasionado pelo tratamento com o extrato BuOH de *Ilex paraguariensis* durante o estágio de neurodesenvolvimento em hipocampo de ratos pré-púberes de 27 dias de idade, em parâmetros bioquímicos, tais como:

- A captação ^{14}C -glicose e ^{14}C -glutamato, bem como o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$;
- A atividade das enzimas glutamina sintetase (GS), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-P desidrogenase (G6PD) e gama glutamil transferase (GGT);
- Marcadores de dano oxidativo como a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas;
- Atividade das enzimas envolvidas nos sistemas de defesa antioxidantes, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona-s-transferase (GST).
- Conteúdo do antioxidante glutathiona (GSH).

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 AGROTÓXICOS E SUAS IMPLICAÇÕES SOCIOAMBIENTAIS

A partir da década de 1960, deu-se início ao desenvolvimento do modelo atual de produção agrária no Brasil, caracterizado pelas práticas da mecanização, irrigação e fertilização do solo, bem como o uso de agroquímicos no combate de pragas e doenças. Este modelo hegemônico moderno teve como ponto determinante o século XVIII, a partir da Revolução Industrial, no qual destacam-se os processos de tecnificação e industrialização da agricultura. Mais tarde, todas estas transformações, aliadas às conquistas de pesquisas nas áreas químicas, mecânica e genética, bem como o fortalecimento do setor industrial voltado para a agricultura, culminaram, no final da década de 1960, início da década de 1970, em um novo processo de transformação completa da agricultura mundial, conhecido como Revolução Verde (Barros e Silva, 2010; Augusto *et al.*, 2012).

O modelo da chamada “Revolução Verde” tem como eixos: 1) a monocultura e a produção estável de alimentos, principalmente arroz, trigo, milho e soja; 2) e o desenvolvimento e combinação de tecnologias como: insumos químicos (fertilizantes, agrotóxicos), mecânicos (tratores e implementos), biológicos (sementes geneticamente melhoradas, para obtenção de alto rendimento) e irrigação (Albergoni e Pelaez, 2007).

No Brasil, o processo de modernização intensificou-se a partir dos anos 1970, quando houve, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), um aumento de mais de 1.000% no número de tratores utilizados, em relação à década de 1950, chegando este incremento a 6.512% na década de 1980 (Agra e Santos, 2001).

Em decorrência da produção intensificada de alimentos, houve o surgimento de distintos impactos de ordem ambiental e social. Os problemas mais frequentes provocados pelo modelo monocultor intensivo foram: a destruição das florestas e da biodiversidade, a erosão e a perda da fertilidade dos solos e a contaminação dos recursos naturais e dos alimentos. Os interesses dominantes do estilo de desenvolvimento adotado provocaram também impactos socioeconômicos, causados pelas transformações rápidas e complexas da produção agrícola (Balsan, 2006).

A intensificação do uso de agrotóxicos, fertilizantes e adubos inorgânicos na última década, trouxeram como consequência vários

tipos de contaminação química dos solos, dos corpos hídricos, dos animais silvestres e principalmente a exposição direta do homem do campo a estes compostos (Ehlers, 1999; Balsan, 2006). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) acrescenta que existe normalmente uma “deriva técnica” que acontece com os atuais equipamentos de pulverização aérea de agrotóxicos, que mesmo com calibração, temperatura e ventos ideais, a técnica de pulverização é capaz de reter nas plantas apenas 32% dos agrotóxicos pulverizados, enquanto que 19% são carregados pelo ar para outras áreas circunvizinhas e 49% vão para o solo. No solo, parte destas substâncias evapora, parte contamina o nível d’água e o restante sofre degradação (Nascimento Neto, 2006).

Além da contaminação dos recursos naturais, há o contato direto do agricultor e o contato indireto dos demais habitantes por meio da contaminação do meio ambiente e, principalmente, pela contaminação dos alimentos (Londres, 2011). Com o objetivo de avaliar continuamente as quantidades de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal, a ANVISA desenvolveu o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Dentre os alimentos avaliados em 2012, 25% apresentaram quantidades de agrotóxicos acima do permitido e sendo que dos 75% dos alimentos avaliados como satisfatórios, 42% apresentavam algum resíduo de pesticida (ANVISA, 2013).

O uso intensivo e inadequado dessas substâncias traz ainda um processo de resistência a pragas e plantas infestantes. Até 1958, eram conhecidas 193 pragas no Brasil; em 1976, o número total de pragas conhecidas na agricultura era 593 (Agra e Santos, 2001). Além disso, alguns estudos demonstram uma correlação importante entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de diversas doenças, como as doenças neurológicas.

Em um estudo realizado na Espanha, foi observado um aumento significativo na incidência de doença de Alzheimer (DA) (OR = 2.10; 95% CI, 1.96–2.25; $P < 0.001$), doença de Parkinson (DP) (OR = 1.30; 95% CI, 1.22–1.39; $P < 0.001$) e esclerose múltipla (OR = 1.23; 95% CI, 1.05–1.43; $P = 0.007$), assim como admissões hospitalares para transtornos de humor e tentativas de suicídio (OR = 1.87; 95% CI, 1.67–2.08; $P < 0.001$) em regiões com exposição mais intensa de pesticidas (Parrón *et al.*, 2011). Uma revisão sistemática e meta-análise indica que a exposição, principalmente ocupacional, a pesticidas (herbicidas e inseticidas) também aumenta o risco de desenvolver DP, RR (risco

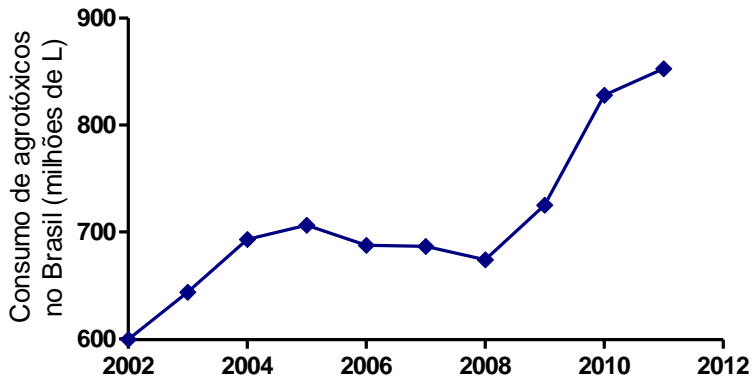
relativo) de 1.62 (95% CI: 1.40, 1.88) (Van Der Mark *et al.*, 2012). Em um estudo de caso-controle, o risco quase dobrou quando se avaliou o uso específico de PQ (OR = 2.5; 95% CI, 1.4–4.7) (Tanner *et al.*, 2011).

No Brasil, em um estudo ecológico que avaliou a taxa de suicídio no período de 1996 a 2010 em todas as microrregiões brasileiras, foi encontrada associação entre tal causa de morte e exposição a agrotóxicos. Esta associação foi encontrada em todas as análises feitas pelo estudo, como de exposição aos pesticidas, envenenamento, sexo, idade, regiões, dentre outros (Faria, Fassa e Meucci, 2014). Estes estudos reforçam a importância de se compreender melhor os mecanismos de neurotoxicidade associados à exposição a pesticidas.

3.1.1 O consumo de agrotóxicos no Brasil

Ao longo da última década, o consumo de agrotóxicos no mundo cresceu 93%, enquanto no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o aumento da venda destes produtos foi de 194,09% (IBAMA, 2013). Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos, ocupando, pelo sétimo ano consecutivo, o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos. Em 2010, o Brasil utilizou cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos por ano, número este que representa aproximadamente um consumo de 5,08 L de agrotóxicos por habitante (ANVISA, 2012).

A Figura 1, mostra o crescente consumo de agrotóxicos pela agricultura brasileira, do ano de 2002 a 2011. É importante ressaltar que este aumento não se relaciona a um aumento proporcional a área plantada. O consumo médio de agrotóxicos vem aumentando em relação à área plantada, passou de 10,5 litros por hectare, em 2002, para 12 litros por hectare em 2011. Tal aumento está relacionado à vários fatores, como a expansão do plantio da soja transgênica, que amplia o consumo de glifosato; a crescente resistência das ervas “daninhas”, dos fungos e dos insetos, que leva a um maior consumo de agrotóxicos e/ou o aumento de pragas nas lavouras (Carneiro *et al.*, 2012).

Figura 1: Consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.

Fonte: Adaptado de SINDAG (2009; 2011), IBGE (2013).

Cerca de 434 ingredientes ativos (IA) e 2.400 formulações de agrotóxicos estão registrados no Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA) e são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos em suas monografias. Porém, dos 50 mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 são proibidos na União Européia (Carneiro *et al.*, 2012). Desde 2008, estão em processo de revisão pela ANVISA 14 agrotóxicos: quatro deles já foram proibidos (cixexatina, tricloform, metamidofós, endossulfam), sendo que o metamidofós foi retirado do mercado em junho de 2012 e o endossulfam teve sua retirada programada do mercado brasileiro a partir de julho de 2010 (com um prazo de 3 anos). O fosmete e o acefato tiveram seus usos restringidos, apesar dos achados toxicológicos serem indicativos de banimento. Outros dois já concluíram a consulta pública de revisão em 2012 (forato e parationa metílica) e os demais tiveram suas notas técnicas de revisão concluídas, mas o processo ainda se encontra em andamento: lactofem, furano, tiram, PQ, glifosato e abamectina (ANVISA, 2008). Segundo a ANVISA, estes ingredientes ativos apresentam elevado grau de toxicidade aguda comprovada e causam problemas neurológicos, reprodutivos, de desregulação hormonal e até câncer (ANVISA, 2012). “Apesar de serem proibidos em vários locais do mundo, como União Européia e Estados Unidos, há pressões do setor agrícola para manter esses três produtos (endossulfam,

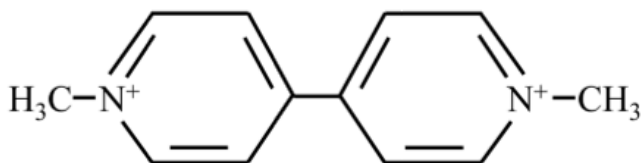
metamidofós e acefato) no Brasil, mesmo após serem retirados de forma voluntária em outros países (ANVISA, 2012).

Esse volume de agrotóxicos foi consumido por distintos cultivos. A soja utilizou 40% do volume total entre herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas e outros (adjuvantes, surfactantes e reguladores). Em seguida está o milho, com 15%, a cana e o algodão com 10%, depois as frutas cítricas com 7%, o café com 3%, o trigo (3%), o arroz (3%), o feijão (2%), a pastagem (1%), a batata (1%), o tomate (1%), a maçã (0,5%), a banana (0,2%). Os demais cultivos consumiram 3,3% do total de 852,8 milhões de litros de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras em 2011, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agropecuária (SINDAG) (2009; 2011) e projeção do MAPA.

3.2 O HERBICIDA PARAQUAT

Os herbicidas *bipiridil* PQ e diquat assim são classificados por conterem em sua estrutura dois anéis piridina, anéis aromáticos nos quais um átomo de carbono é substituído por um nitrogênio. No PQ, um grupo metil esta ligado a cada nitrogênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). Sua estrutura química na forma de dicloreto esta representada na Figura 2 que apresenta fórmula química com $C_{12}H_{14}N_2$, nomenclatura química de 1-1'-dimetil-4-4'-bipiridilo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Martins, 2013) e pertence ao grupo químico dos bipiridílios (Almeida *et al.*, 2007; Baltazar *et al.*, 2014).

Figura 2: Estrutura química do paraquat.



Fonte: Franco *et al.* (2010)

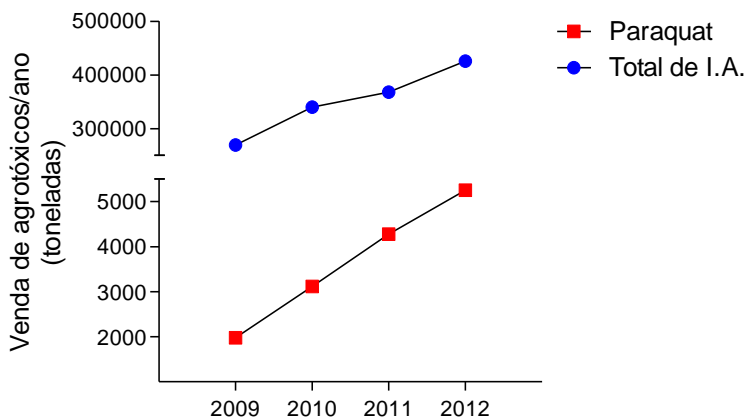
O PQ é um herbicida de contato não-seletivo, classificado pela ANVISA como pertencente a *Classe I* (extremamente tóxico). É usualmente sintetizado na forma de sal diclorídrico. Pelo seu baixo custo e ação rápida, é amplamente utilizado no mundo, desseca rapidamente

todo o tecido verde no qual entra em contato. Comercialmente é conhecido como Gramoxone®, Gramocil®, Agroquat®, Gramuron®, Paraquat®, Paraquol® e também em misturas com outros princípios ativos, como o Secamato®.

Apesar de banido em outros países, ainda é amplamente utilizado no Brasil, sendo seu uso mais frequente em cultivos de abacate, abacaxi, algodão, arroz, aspargo, banana, batata, beterraba, cacau, café, cana-de-açúcar, chás, coco, couve, feijão, maçã, milho, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, soja, sorgo, trigo e uva (Londres, 2011). As vendas anuais do PQ e do total de ingredientes ativos (IA) no Brasil que estão dispostas na Figura 3, são referentes ao período de 2009 a 2012. A venda de PQ teve um aumento de 265,5% enquanto que o total de IA aumentou em 158% (IBAMA, 2013).

O IBAMA divulga somente as informações de vendas de produtos formulados cujos ingredientes ativos tenham no mínimo três empresas detentoras de registro, ou seja, os IAs que não tenham no mínimo três empresas detentoras de registro, não foram incluídos no gráfico, subestimando assim, a venda total destas substâncias.

Figura 3: Vendas anuais de Paraquat e total de ingredientes ativos (IAs) no Brasil no período de 2009 a 2012.



Fonte: O autor, 2015 (Dados: IBAMA, 2013).

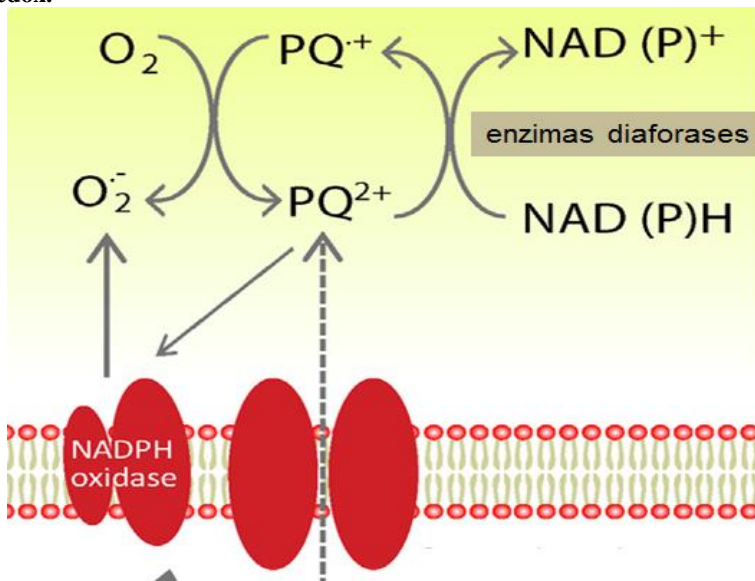
O PQ também tem sido usado como um gerador experimental de espécies reativas de oxigênio (EROs) para avaliar a lesão tecidual induzida por estas moléculas, como toxicidade pulmonar, renal e neural

(Podder, Song e Kim, 2014); e também como modelo experimental da DP, por mimetizar alterações moleculares compatíveis às observadas nesta doença (Przedborski e Ischiropoulos, 2005).

O mecanismo pelo qual o PQ levaria à produção de espécies reativas ocorre de maneira direta, por meio da ciclagem redox; e de forma indireta, através da mitocôndria (Przedborski e Ischiropoulos, 2005; Chen *et al.*, 2010; Baltazar *et al.*, 2014).

Pelo mecanismo de ciclagem redox, o PQ atua como acceptor de elétrons de diaforases (enzimas que transferem elétron de uma molécula de NADPH), formando-se assim uma molécula monocatiônica ($PQ^{\cdot+}$) e $NADP^+$. Inúmeras enzimas podem catalisar este processo, tais como a ubiquinona oxidoreductase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), NADPH-oxidases da família NOx e tioredoxina redutase. O $PQ^{\cdot+}$ é então rapidamente oxidado a sua forma dicatiônica e esta reação, na presença de oxigênio, ocorre junto a formação do radical superóxido. Uma descrição esquemática destas reações é apresentada na Figura 4.

Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio por meio da ciclagem redox.

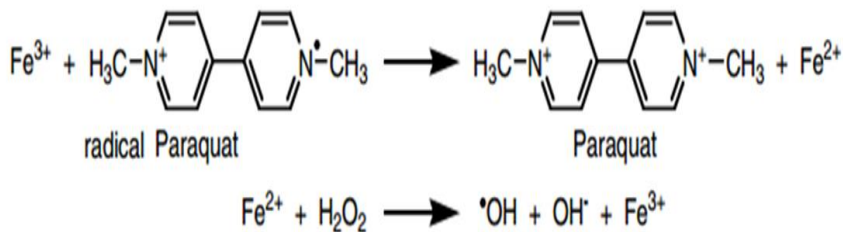


O PQ^{2+} reage com enzimas diaforases, atuando como agente redutor, transformando-se em sua forma monocatiônica. Na presença de O_2 , oxida-se rapidamente à sua forma original, produzindo radical superóxido.

Fonte: Adaptado de Baltazar *et al.* (2014).

O PQ não somente é um agente redutor capaz de reagir com oxigênio produzindo superóxido (Baltazar *et al.*, 2014), mas também pode reagir com metais de transição, tais como ferro. O PQ^{•+} pode facilmente reduzir o ferro (III) em ferro (II), que por sua vez pode catalisar a formação de radicais hidroxil através da reação de Fenton (Przedborski e Ischiropoulos, 2005). Uma descrição esquemática está apresentada na Figura 5.

Figura 5: Reação do Paraquat com o ferro e formação do radical hidroxil

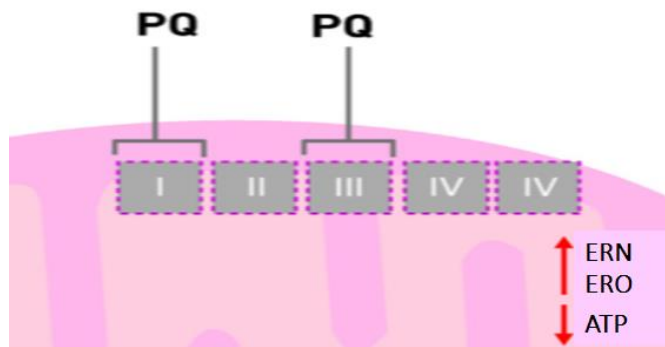


Fonte: Adaptado de (Przedborski e Ischiropoulos, 2005).

A modulação de algumas vias de sinalização estaria envolvida no processo de toxicidade, tais como proteína cinase C (PKC) ou ERK1/2, descritas previamente como ativadores transcricionais da enzima NADPH oxidase (Baltazar *et al.*, 2014).

Outro mecanismo pelo qual o PQ exerceria sua toxicidade seria por disfunção mitocondrial, pela inibição do complexo I (NADPH quinona oxidoreductase) da cadeia respiratória (Chen *et al.*, 2010). Outros autores também descrevem uma interação do PQ com o complexo III (Baltazar *et al.*, 2014). É importante notar que os agentes redox ativos podem interagir com diferentes receptores/doadores de elétrons, dependendo do potencial redox e se o ambiente se apresenta redutivo ou oxidativo. A interação deste agente tóxico com esses complexos pode levar a um comprometimento da função mitocondrial devido ao aumento na produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), levando à diminuição da síntese de ATP, à oxidação de proteínas da matriz e danos no DNA mitocondrial (Figura 6) (Cicchetti, Drouin-Ouellet e Gross, 2009; Baltazar *et al.*, 2014).

Figura 6: Interação do PQ com elementos da cadeia transportadora de elétrons.



A interação do PQ com complexos da mitocôndria pode levar a maior formação de ERO, ERN e ao comprometimento da síntese de ATP.

Fonte: Adaptado de Baltazar et al. (2014).

A exposição profissional ao herbicida pode resultar tanto em intoxicação aguda quanto crônica. A intoxicação aguda ocorre principalmente pelas vias aéreas, uma vez que a absorção pela pele e trato gastrointestinal é um processo mais lento. Após a absorção, independente da via de administração, o PQ acumula-se no pulmão e rins, nos quais exerce seus principais efeitos toxicológicos agudos (Franco *et al.*, 2010).

Nos anos de 1995-1996 acreditava-se que o PQ, por ser altamente polar, não atravessasse a barreira hematoencefálica. Aproximadamente 5 anos depois, Shimizu e colaboradores (2001) decreveram que o PQ provavelmente atravessa a barreira hematoencefálica por um sistema de transporte de aminoácidos neutros expressos nos capilares cerebrais e então seria transportado para o cérebro através das células do estriado (Shimizu *et al.*, 2001). No entanto, atualmente sabe-se que esta penetração é um fenômeno dependente da idade, no qual animais jovens (< 8 semanas de idade) seriam mais suscetíveis a entrada de PQ no cérebro (Berry, La Vecchia e Nicotera, 2010). Frente a estes achados, os efeitos do PQ no cérebro vêm sendo mais investigados na última década (Franco *et al.*, 2010). A exposição crônica ao herbicida tem sido descrita como fator causal de doenças neurodegenerativas como a DP em modelos animais e em estudos epidemiológicos (Cicchetti, Drouin-

Ouellet e Gross, 2009; Berry, La Vecchia e Nicotera, 2010; Baltazar *et al.*, 2014).

3.2.1 Paraquat e o sistema nervoso central

A entrada de PQ no cérebro através da barreira hematoencefálica via sistema de transporte de aminoácidos neutros ocorre de maneira semelhante em roedores, macaco-rhesus e em camundongos (Baltazar *et al.*, 2014). Inúmeros trabalhos vêm investigando efeitos deletérios do herbicida em algumas regiões do cérebro. Seu efeito neurotóxico foi descrito por Kuter e colaboradores (2007), os quais neurônios dopaminérgicos da *substancia nigra* de ratos expostos a doses subcrônicas de PQ (10 mg/kg por 5 dias consecutivos), sofreram diminuição em 22% (Kuter *et al.*, 2007). A morte neuronal por apoptose e/ou necrose, em determinadas regiões do cérebro pode resultar em declínio cognitivo, perturbações da memória e atenção, e danos à função motora (Parrón *et al.*, 2011).

O hipocampo é considerado uma região importante do cérebro para funções de aprendizagem e memória. Alguns mecanismos de neurotoxicidade induzida por PQ já foram descritos neste tecido por Chen e colaboradores (2010) dentre eles: 1) estresse oxidativo, pelo aumento da geração de radicais livres mitocondriais e peroxidação lipídica; a atividade da enzima SOD estaria inibida junto ao aumento das quantidades de MDA, sugerindo que o PQ poderia induzir a uma excessiva produção de EROS e reforçar a peroxidação lipídica, tendo como resultado um desequilíbrio no balanço de oxidação/redução; 2) disfunção mitocondrial, que também estaria relacionada ao aumento da produção de EROs e com a inibição dos complexos I e III da cadeia respiratória; e 3) pelo próprio metabolismo oxidativo da dopamina, que contribui para manter uma maior produção de EROs na *substancia nigra pars compacta* quando comparado com as outras regiões do cérebro (Chen *et al.*, 2010).

Além dos mecanismos descritos, a neurotoxicidade induzida por PQ também parece ocorrer via mecanismos de apoptose, autofagia e inibição do sistema ubiquitina-proteassoma. O PQ levaria à morte neuronal por apoptose por meio da liberação do citocromo c pela mitocôndria com consequente ativação de caspases, mais especificamente por ativação da caspase-9 e 3, devido a ativação da família Bcl-2 (Fei e Ethell, 2008).

Chen e colaboradores (2010) demonstraram, em um estudo com camundongos expostos ao PQ (2,67 e 8 mg/kg de peso) 1 vez ao dia por 28 dias consecutivos, aumento das concentrações de 8-hidroxi-desoxiguanosina, marcador de dano oxidativo das mitocôndrias. O dano oxidativo mitocondrial levaria a um comprometimento da produção de ATP na mitocôndria, como observado no estudo.

3.3 HIPOCAMPO

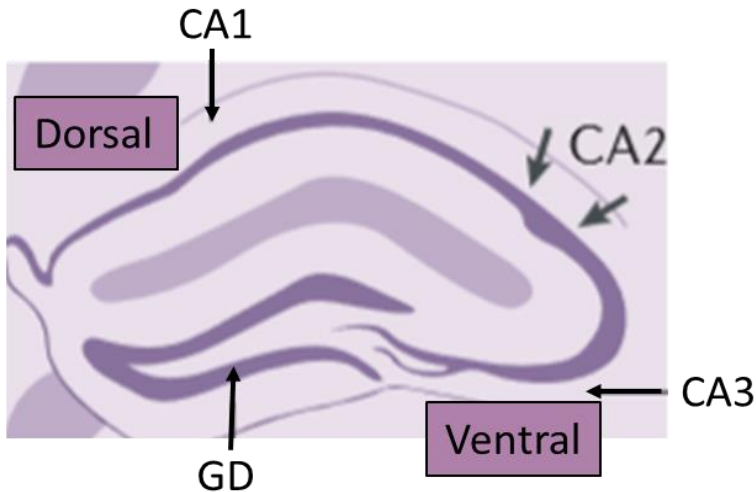
Estudos em animais e humanos têm mostrado que o hipocampo desempenha um papel crítico na organização da memória no tempo. Por exemplo, ao descrevermos uma sequência de ações que ocorreram no passado, precisamos lembrar a ordem na qual os eventos aconteceram. Este conceito compõe a ideia de que a memória é temporalmente organizada, como definido por Aristóteles, “dimensão organizadora fundamental da memória episódica”. A importância e o interesse nesta área se dá por este ser um dos mecanismos pelo qual ocorre as formas simples e complexas de aprendizagem associativa (Eichenbaum, 2014).

Há estudos que demonstram que os danos ao hipocampo prejudicam a memória da ordem temporal de eventos em seres humanos e animais, sendo que o hipocampo é que atua-se em seres humanos durante a codificação e recordação de uma sequência de eventos, confirmando a ideia de que o hipocampo contribui para a memória através da organização de elementos de uma experiência em um contexto espacial e temporal (Eichenbaum, 2014).

3.3.1 Um breve esboço sobre a formação do hipocampo de ratos

A formação do hipocampo inclui o próprio hipocampo e as áreas corticais adjacentes ao qual ele está ligado. O “cornu ammonis” (CA) é composto pelas sub-regiões: CA1, CA3 e CA2, sendo a última a sub-região menos estudada. A formação do hipocampo consiste em: o córtex entorrinal (dividida em córtices lateral e medial), giro denteado, CA1, CA2, CA3, subiculum, presubiculum e parasubiculum (Hartley *et al.*, 2014). Tais áreas estão envolvidas na regulação emocional (regiões mais ventrais) e processamento espacial (regiões dorsais) (Strange *et al.*, 2014). Veja a representação esquemática na Figura 7.

Figura 7: Ilustração esquemática da orientação do hipocampo em ratos.



Abreviações: GD, giro denteado; CA, “cornu amonis”.

Fonte: Adaptado de: Strange et al. (2014).

O hipocampo apresenta estrutura e função semelhantes em diferentes espécies (Hartley *et al.*, 2014) e o mais importante, a área de cognição espacial parece ser amplamente preservada entre as espécies, incluindo humanos (Strange *et al.*, 2014). A atividade total de neurotransmissão do tecido cerebral representa-se predominantemente pelo sistema glutamatérgico, sendo que no hipocampo, aproximadamente 80 a 90% das sinapses são também glutamatérgicas (Danbolt, 2001).

3.4 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO (SÍNTESE, RECEPTORES E TRANSPORTADORES).

O glutamato é o aminoácido livre mais abundante no cérebro e é uma unidade sinalizadora de várias vias metabólicas, sendo o principal mediador de sinais excitatórios, bem como da plasticidade do SNC. A manutenção das concentrações de glutamato no cérebro, tanto no meio intra quanto extracelular, depende de sincronismo e equilíbrio entre sua síntese e vias de utilização, que são modulados por sistemas de transporte e por reações enzimáticas. Ambos, um excesso de glutamato e pouco glutamato são prejudiciais. A ativação excessiva dos receptores

de glutamato pode excitar as células nervosas e levá-las à morte por meio de um processo referido como excitotoxicidade glutamatérgica (Erecińska e Silver, 1990; Zhou e Danbolt, 2014).

O glutamato não atravessa a barreira hemato-encefálica (BHE). Sendo assim, o glutamato da circulação periférica não interfere na concentração de glutamato no cérebro. Deste modo, sua síntese ocorre nas células neurais a partir de diferentes vias, dentre elas: 1) pela aminação redutiva do α -cetoglutarato. A amônia necessária para esta via pode ser obtida por meio de qualquer reação de desaminação, por exemplo, as reações da glutaminase dentro do próprio neurônio, ou pode ser obtida a partir da circulação sistêmica; 2) por transaminação de outros aminoácidos e 3) por clivagem hidrolítica da glutamina. Após a síntese, este é armazenado dentro de vesículas sinápticas em terminais nervosos de onde pode ser liberado por exocitose (Erecińska e Silver, 1990; Danbolt, 2001; Zhou e Danbolt, 2014). A Figura 8 demonstra esquematicamente as vias de síntese de glutamato no SNC.

Desde o momento da liberação em um terminal nervoso, o glutamato vai difundir-se na fenda sináptica e interagir com proteínas de ligação do glutamato (transportadores e receptores) ali presentes. A maior parte do glutamato liberado para o meio extracelular é proveniente da exocitose de vesículas sinápticas, porém este não é o único mecanismo capaz de fornecer glutamato ao fluido extracelular. Outro mecanismo de liberação é chamado de liberação de aminoácido excitatório mediado por transportador, sendo este, não vesicular. Tais transportadores medeiam a troca de glutamato com outros aminoácidos excitatórios (por exemplo, D-aspartato e L-aspartato) e existem também os transportadores de cistina, que trocam glutamato e cistina (Danbolt, 2001). O trocador de glutamato-cistina transporta cistina para dentro da célula em troca de glutamato do meio intracelular. O papel fisiológico deste transportador é atuar como um transportador de cistina que utiliza o gradiente transmembranar de glutamato como força de condução. Sendo assim, o glutamato extracelular inibe a captação de cistina e a captação de cistina provoca a liberação de glutamato (sistema xCT) (Bannai, 1986).

Há uma variedade de famílias de receptores os quais o glutamato pode interagir. Dois principais subtipos de receptores foram definidos: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os ionotrópicos são classificados como N-metil-D-aspartato (NMDA), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico) e receptores de cainato. Em contraste, os receptores metabotrópicos são aqueles

acoplados a proteína-G. A maioria das células do SNC expressam pelo menos um tipo destes receptores (López-Bayghen e Ortega, 2011; Zhou e Danbolt, 2014).

Figura 8: Representação esquemática da síntese do glutamato.

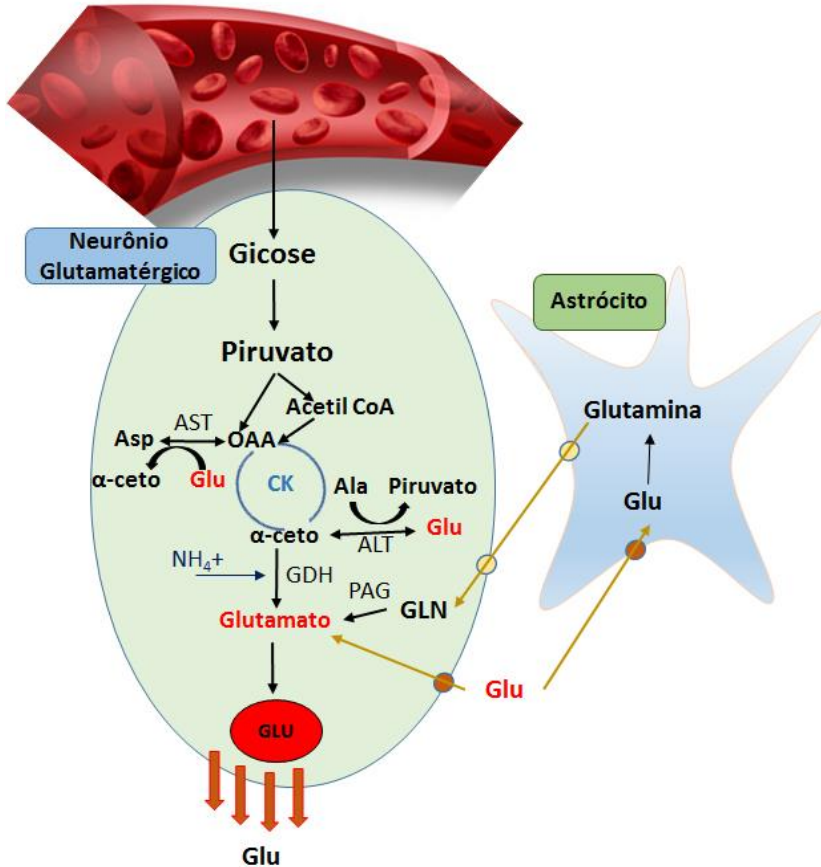


Diagrama simplificado da síntese do glutamato no neurônio. Abreviações: PAG, glutaminase ativada por fosfato; LDH, lactato desidrogenase; GDH, glutamato desidrogenase; CK, Ciclo de Krebs; GLN, glutamina; GLU, glutamato; Asp, Aspartato; OAA, oxalacetato; AST, Aspartato aminotransferase; ALT, Alanina aminotransferase; Ala, alanina; α-ceto, α-cetoglutarato.

Fonte: O autor, 2015.

Sob condições de repouso, os receptores NMDA estão bloqueados por íons de Mg^{2+} , porém, uma vez que a membrana neuronal é despolarizada, esse receptor pode ser ativado pela interação de duas moléculas de glutamato e duas moléculas de glicina ou serina, permitindo o aumento do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. A despolarização em si é mediada principalmente pelos receptores do tipo AMPA, mas também pelos de cainato, que estão localizados na espinha dendrítica. A ativação desses receptores pode ocorrer pela ligação do glutamato, permitindo assim o influxo de Na^+ para o meio intracelular, resultando na despolarização da membrana neuronal. A ativação dos receptores NMDA é considerada um marcador funcional para convergir de entrada excitatória e produzir excitação neuronal (Zigmond *et al.*, 1999; Sanacora *et al.*, 2008).

Após a liberação do glutamato na fenda sináptica, sua remoção deve ocorrer para que não haja um efeito prolongado de sua interação com os receptores. Como não existem enzimas extracelulares que podem degradá-lo, mesmo baixas concentrações extracelulares requerem captação celular. Esta captação é catalisada por uma família de proteínas transportadoras situadas na superfície de neurônios e astrócitos (Danbolt, 2001). Em humanos, cinco transportadores homólogos foram identificados e chamados de transportador de aminoácidos excitatórios (EAAT) 1-5. Todos os EAATs catalisam transporte de $1H^+$, $3Na^+$, e $1K^+$ acoplado com uma molécula de substrato. Estes transportadores são proteínas integrais de membrana que dependem do ambiente lipídico, sendo assim influenciados por ácidos graxos como o ácido araquidônico e por oxidação (López-Bayghen e Ortega, 2011).

3.4.1 Destino do glutamato e o ciclo glutamato-glutamina

O glutamato captado pelas células astrogliais pode ser convertido a α -cetogluturato (por meio de desaminação pela glutamato desidrogenase ou por transaminação pela aspartato aminotransfrase ou alanina aminotransferase), o α -cetogluturato pode então ser metabolizado no ciclo de Krebs. O glutamato pode também ser convertido a glutamina (Danbolt, 2001; Zhou e Danbolt, 2014). A conversão do glutamato a glutamina é catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS) por uma reação dependente de ATP. A glutamina é exportada dos astrócitos para o espaço extracelular, podendo entrar nos neurônios. A GS desempenha papéis importantes no cérebro, tais como

a síntese de glutamina e a remoção da amônia. Deficiência de GS pode levar ao acúmulo de glutamato extracelular e está associada com algumas formas de epilepsia em humanos (Eid *et al.*, 2004). Outro estudo com humanos relata a deficiência de GS levando a encefalopatia crônica e epilepsia (He *et al.*, 2010; Häberle *et al.*, 2011).

A glutamina sintetizada pode ser liberada pelo astrócito para o meio extracelular por transportadores de aminoácidos neutros dependentes de Na^+ (SNAT3 e SNAT5 - presentes na membrana astrocítica), esta seria uma forma de transportar glutamato até os neurônios sem ativar os receptores de glutamato. Uma vez captada pelo neurônio, a glutamina pode ser convertida em glutamato, pela enzima glutaminase ativada por fosfato (Zhou e Danbolt, 2014). Este tráfico de glutamato e glutamina entre astrócitos e neurônios tem sido proposto como sendo a principal via pela qual o neurotransmissor glutamato é reciclado. É geralmente referido como o ciclo glutamato-glutamina. Uma representação esquemática do ciclo glutamato-glutamina esta representado na Figura 9.

O ciclo glutamato-glutamina evita altas concentrações de glutamato no meio extracelular, tanto por promover a captação do glutamato na fenda sináptica quanto por reciclar o glutamato de volta ao neurônio, como glutamina, sem promover a ativação de seus receptores. Uma vez que o excesso de glutamato na fenda sináptica pode superativar os receptores de glutamato, podendo promover um aumento no influxo de Ca^{2+} . A ativação dos receptores de glutamato aumenta o consumo de energia e a produção de radicais livres. O aumento da produção de radicais livres pode, por sua vez, prejudicar a produção de energia e a própria captação de glutamato (Erecińska e Silver, 1990).

Figura 9: Representação esquemática do ciclo glutamato-glutamina.

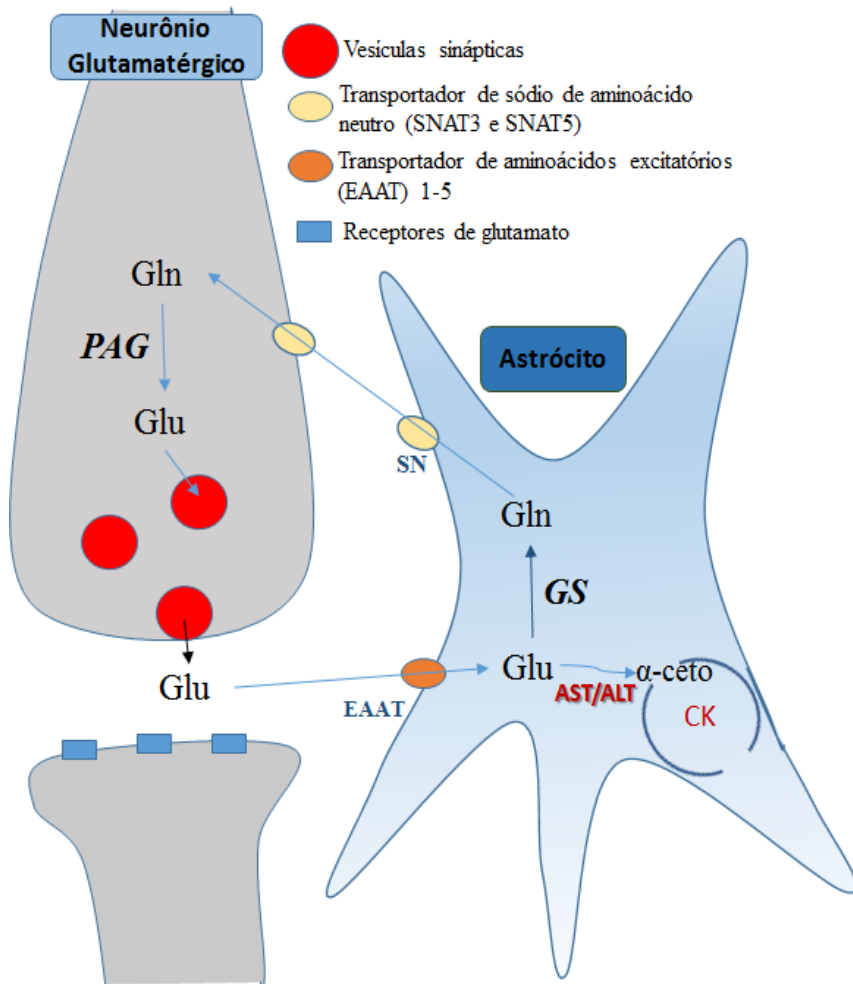


Diagrama simplificado do ciclo glutamato-glutamina. Abreviações: PAG, Glutaminase ativada por fosfato; GS, Glutamina Sintetase; GLN, glutamina; GLU, glutamato; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; CK, ciclo de Krebs; α -ceto, α -cetoglutarato.

Fonte: O autor (2015).

3.5 Ca^{2+} COMO UM MENSAGEIRO NO SNC

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro que controla uma ampla variedade de processos celulares. Um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} depende de canais de entrada presentes na membrana plasmática e da liberação por canais nas membranas das reservas internas, o retículo endoplasmático ou o retículo sarcoplasmático (Berridge, 2004). Uma simples avaliação da atividade celular pode ser determinada por meio da concentração intracelular de Ca^{2+} , que varia de 100 a 1000 nM do estado basal ao estado ativado, respectivamente. Esta elevação da quantidade de Ca^{2+} pode regular inúmeros processos, dentre eles a morte celular (Berridge, Lipp e Bootman, 2000).

O Ca^{2+} do meio extracelular é a principal fonte de Ca^{2+} para reações que ocorrem no meio intracelular e sua entrada é impulsionada pela presença de um gradiente electroquímico através da membrana plasmática. As células usam esta fonte externa de Ca^{2+} pela ativação de canais de entrada com propriedades amplamente diferentes. Como por exemplo os canais de Ca^{2+} dependente de voltagem (CCDV), encontrados em células excitáveis, promovem os fluxos rápidos de Ca^{2+} que controlam processos celulares rápidos, tais como a contração muscular ou a exocitose nas terminações sinápticas (Berridge, Bootman e Roderick, 2003). Entretanto há muitos outros canais de entrada Ca^{2+} que se abrem em resposta a diferentes sinais externos, tais como os canais operados por receptores (ROCs), por exemplo os receptores (NMDARs) que respondem ao glutamato (Berridge, Bootman e Roderick, 2003).

Os neurônios têm sistemas de sinalização de Ca^{2+} altamente controlados responsáveis pelo desenvolvimento do SNC e regulação das funções neurais, tais como ritmos cerebrais, processamento de informação, aprendizagem e memória. Estes eventos de desenvolvimento são movidos por oscilações da quantidade intracelular de Ca^{2+} . A oscilação do Ca^{2+} durante o desenvolvimento neuronal pode determinar o tipo de neurotransmissor expresso em diferentes tipos de células. Como por exemplo, a supressão de oscilações pode aumentar o número de neurônios que expressam transmissores excitatórios como o glutamato e acetilcolina, enquanto que o oposto acontece para transmissores inibitórios, o GABA e glicina (Berridge, 2014). Além disso, tem sido relacionados ao controle de processos associados ao neurodesenvolvimento, tal como crescimento axonal de neurônios

corticais e a migração de células neuronais (Berridge, Bootman e Roderick, 2003).

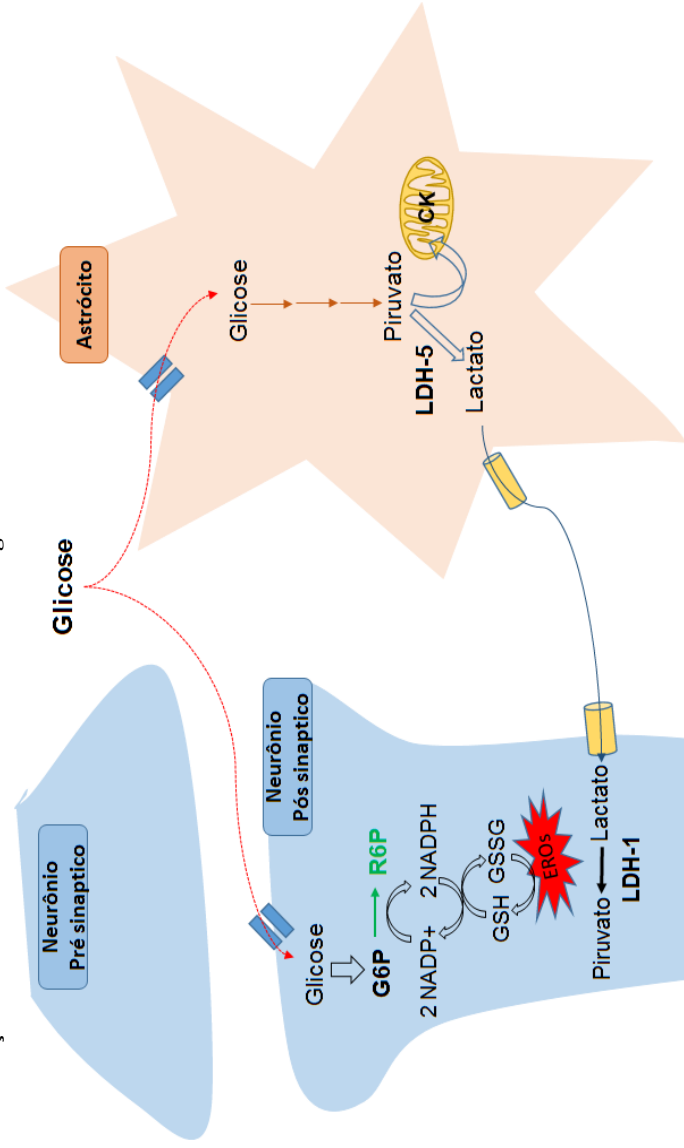
Por outro lado, alterações nestes mecanismos homeostáticos dependentes de Ca^{2+} criam respostas inadequadas levando à transcrição de genes, proliferação de células (Berridge, Bootman e Roderick, 2003) e morte celular. Tais processos podem ser a causa de muitas doenças importantes, como a DA (Berridge, 2014).

3.6 O METABOLISMO ENERGÉTICO NO CÉREBRO

O cérebro é um órgão complexo composto por uma variedade de células, cada uma tendo necessidades metabólicas diferentes. Os neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais dos capilares tem uma taxa elevada de metabolismo oxidativo. Cada célula do cérebro pode usar glicose, uma vez que todas elas possuem transportadores de glicose (GLUTs), enzimas glicolíticas e do ciclo de Krebs (Erecińska e Silver, 1990; Castro *et al.*, 2009). Uma limitação no fornecimento de glicose para o cérebro faz com que ocorra uma rápida diminuição do nível de ATP e do gradiente iônico, além da glicose ser um precursor importante para a síntese de neurotransmissores, como o glutamato (Erecińska e Silver, 1990). Por outro lado, há evidências de que o metabolismo oxidativo neuronal depende do lactato derivado dos astrócitos (a hipótese do *shuttle* de lactato astrócitos-neurônio) em vez de glicose durante a atividade de neurotransmissão (Castro *et al.*, 2009; Rodriguez-Rodriguez, Almeida e Bolaños, 2013; Sonnewald, 2014).

Normalmente, quando a taxa da glicólise excede a taxa de entrada de intermediários no ciclo de Krebs, o piruvato pode ser reduzido a lactato pela lactato desidrogenase (LDH). A interconversão de lactato e piruvato é catalisada pela LDH que é uma enzima tetramérica no qual duas subunidades distintas combinam-se para formar as cinco isoenzimas (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 e LDH-5). Tem sido demonstrado que os neurônios contêm predominantemente LDH-1 (principalmente produtora de piruvato), enquanto que os astrócitos expressam LDH-5 (associada com tecidos de alta produção de lactato) (Pellerin *et al.*, 1998). Os astrócitos liberam lactato a uma taxa maior do que os neurônios e o lactato é preferencialmente metabolizado em células neuronais (Castro *et al.*, 2009; Rodriguez-Rodriguez, Almeida e Bolaños, 2013). Uma representação esquemática da interação entre astrócitos e neurônios referente ao metabolismo energético está representada na Figura 10.

Figura 10: Interação astrócitos-neurônios no metabolismo energético.



Abreviações: G6P, glicose-6-fosfato; R6P, ribulose-5-fosfato; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; NADPH/NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido/oxidado; LDH, lactato desidrogenase; CK, ciclo de krebs.
Fonte: Adaptado de Rodriguez-Rodriguez, Almeida e Bolaños (2013).

Sob atividade sináptica glutamatérgica, a glicose fornecida pelo sangue é absorvida pelos astrócitos e oxidada predominantemente a lactato. Tem sido relatado que a captação de glutamato por estas células estimula o transporte de glicose mediado por GLUT1 e glicólise seguida pela liberação de lactato (Castro *et al.*, 2009). Considerando também que o transporte de glutamato é predominantemente dependente de Na^+ , a captação de glutamato pelos astrócitos é acoplada com a ativação da Na^+/K^+ -ATPase para remover o Na^+ do citoplasma, causando, assim, o consumo de ATP. Isso pode explicar o aumento compensatório na via glicolítica em astrócitos após a captação de glutamato (Rodríguez-Rodríguez, Almeida e Bolaños, 2013).

É importante notar que a glicose, depois de ser fosforilada pela hexoquinase formando glicose-6-fosfato (G6P), é metabolizada não somente através da glicólise, mas também através da via das pentoses-fosfato. Esta seria a principal via de oxidação da glicose-6-fosfato nos neurônios (Rodríguez-Rodríguez, Almeida e Bolaños, 2013). Uma das principais funções da via das pentoses é a obtenção de equivalentes redutores em forma de NADPH(H^+) a partir da oxidação da G6P, que é convertida em ribulose-5-fosfato (R5P), sendo a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) a enzima limitante da velocidade desta via. A produção constante de equivalentes redutores, como o NADPH, é necessária para manter as defesas antioxidantes e a homeostase redox das células.

Tendo em vista que uma proporção considerável de glicose é consumida através da via das pentoses-fosfato, as necessidades energéticas dos neurônios devem ser cumpridas pela oxidação de um substrato alternativo prontamente disponível, reforçando assim a colaboração dos astrócitos no fornecimento de lactato aos neurônios (Rodríguez-Rodríguez, Almeida e Bolaños, 2013).

3.7 ESTRESSE OXIDATIVO, DANO E O SNC.

O dano oxidativo acontece em todos os nossos tecidos o tempo todo, há sempre uma quantidade basal de dano oxidativo ao DNA, lípidos e proteínas. Assim, sistemas que reparam e substituem biomoléculas oxidadas são essenciais e falhas nestes sistemas contribuem para a neurodegeneração (Halliwell, 2006; Forman, Davies e Ursini, 2014).

Apesar de todos os tecidos corporais sofrerem dano oxidativo, o cérebro é comumente referido como sendo especialmente sensível

(Sayre, Smith e Perry, 2001; Uttara *et al.*, 2009). Uma razão, além do elevado teor de lípidos insaturados, é o seu elevado consumo de O_2 , que chega a aproximadamente 20% do consumo basal. Uma das principais razões para este alto consumo de O_2 é a grande quantidade de ATP necessária para manter a homeostase iônica neuronal uma vez que as aberturas e fechamentos de canais iônicos são essenciais à propagação dos potenciais de ação e neurosecreção. Assim, interromper a função mitocondrial dos neurônios devido a ação de toxinas (como o PQ) ou não fornecer substratos para produção de energia, produz danos rapidamente, como pode ocorrer com os canais de entrada de Ca^{2+} , que sob estresse oxidativo podem ser danificados, alterando assim a homeostase deste íon. O aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} pode interferir com a função mitocondrial, aumentando a formação mitocondrial de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Halliwell, 2006). Defeitos na mitocôndria já foram descritos em doenças neurodegenerativas comuns, como na DA e DP (Sayre, Smith e Perry, 2001).

Frequentemente o dano oxidativo se manifesta por meio do comprometimento da função de uma biomolécula. Proteínas são danificadas pela ação de espécies reativas ou por produtos da oxidação lipídica e/ou glicosidação e ainda, estas espécies podem causar dano oxidativo ao DNA (Sayre, Smith e Perry, 2001) e qualquer um destes eventos pode iniciar a morte celular neuronal (Halliwell, 2006).

Sugere-se que a química dos radicais livres desempenha um papel patogênico em todas estas condições neurodegenerativas, de uma forma ou de outra, sendo o fator causal principal que leva à lesão tecidual e consequente comprometimento da função vital das células, somado a uma falha no sistema de defesas antioxidantes (Sayre, Smith e Perry, 2001; Uttara *et al.*, 2009).

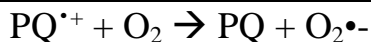
3.7.1 EROs e os mecanismos de defesa antioxidante no SNC

Espécies reativas de oxigênio é um termo utilizado para descrever um coletivo que inclui os radicais e também alguns derivados não-reativos do oxigênio, tal como o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell, 2006). A produção de EROs requer a ativação do oxigênio molecular. Como a utilização do O_2 é um pré-requisito para a maioria das formas de vida, todos os organismos aeróbicos produzem quantidades mínimas de EROs (Sayre, Smith e Perry, 2001; Barnham, Masters e Bush, 2004).

Em indivíduos saudáveis, há um equilíbrio entre a produção de várias espécies reativas (ER) e as defesas antioxidantes (Halliwell, 2006). Algumas ER participam diretamente na defesa contra a infecção e também são coordenadores importantes da resposta inflamatória. Mas muitas ER podem levar a lesão tecidual e, se isso acontecer muitas vezes, pode resultar em doenças crônicas, tais como doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006).

Um radical livre é definido como qualquer espécie capaz de existência independente (daí o termo "livre") que contém um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 2007). Mas quando um radical livre encontra um não-radical (inúmeros tipos de moléculas), se o radical é suficientemente reativo, ele ataca o não-radical, resultando em um novo radical e reações em cadeia podem ocorrer, como por exemplo, o mecanismo de toxicidade do PQ (Halliwell, 2006).

Um radical pode ser um agente redutor, doando um único elétron. Assim, por exemplo, a toxicidade do PQ ao cérebro e outros tecidos animais envolve a redução de um elétron para o radical PQ na sua forma catiônica ($PQ^{2+} \rightarrow PQ^{•+}$), por sistemas de transporte de elétrons celular (por exemplo, enzimas citosólicas, cadeia de transporte de elétrons da mitocôndrias e retículo endoplasmático) seguido pela reação do $PQ^{•+}$, na forma radicalar, reduzindo o O_2 a $O_2^{•-}$.



Assim, o PQ catalisa a formação de grandes quantidades de $O_2^{•-}$ a partir de O_2 , possivelmente causando danos às células (Przedborski e Ischiropoulos, 2005).

O $O_2^{•-}$ também é formado *in vivo* de várias maneiras. A principal fonte é a atividade das cadeias de transporte de elétrons no retículo endoplasmático e, especialmente na mitocôndria (Sayre, Smith e Perry, 2001; Halliwell, 2006).

O $O_2^{•-}$ pode causar dano por meio da inativação de enzimas importantes na produção de energia e metabolismo de aminoácidos. A inativação/degradação destas proteínas pode levar a liberação de ferro (das proteínas ferro-enxofre) que promove a reação de Fenton e a peroxidação lipídica (Forman, Ursini e Maiorino, 2014). O $O_2^{•-}$ pode reagir com óxido nítrico ($NO^{•}$) e dar origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), que reage muito rapidamente com outras moléculas. Peroxinitrito e as espécies reativas de nitrogênio são capazes de tanto causar oxidação quanto nitratação de aminoácidos como a tirosina e o triptofano,

resultando em uma condição conhecida como "estresse nitrosativo" (Sayre, Smith e Perry, 2001; Forman, Ursini e Maiorino, 2014). O peroxinitrito, assim como o H_2O_2 , também podem provocar liberação de ferro de proteínas (Halliwell, 2006).

Por outro lado, todas as partes do SNC contêm SODs, enzimas que removem o $O_2^{\bullet-}$ catalisando a sua dismutação a H_2O_2 e O_2 . SODs devem trabalhar em conjunto com enzimas que removem H_2O_2 , tais como a catalase e as peroxidases (glutationa peroxidase e peroxiredoxinas) (Sayre, Smith e Perry, 2001), uma vez que a quantidade de catalase é baixa na maioria das regiões do cérebro. As enzimas mais importantes na remoção de H_2O_2 no cérebro são a glutationa peroxidase (GPx) (Forman, Ursini e Maiorino, 2014), uma família de enzimas contendo selênio (Brigelius-Flohé, 1999), e as peroxiredoxinas (Prx).

A remoção de H_2O_2 pela GPx ocorre acoplada a GSH (um tripeptídeo que contém tiol - Glu-Cys-Gly) que atua como doadora de elétron para o H_2O_2 com sua consequente oxidação. O produto gerado, a glutationa oxidada (GSSG), consiste em duas GSHs ligadas por uma ponte dissulfeto, e pode ser regenerada a GSH pela ação da enzima glutationa redutase (GR) (Brigelius-Flohé, 1999; Halliwell, 2006).

Outro sistema importante na remoção de H_2O_2 em animais são as peroxiredoxinas (Prx) (Forman, Ursini e Maiorino, 2014). São homodímeros e não contêm grupos prostéticos, as reações redox são dependentes de cisteína nos sítios ativos. O $O_2^{\bullet-}$ oxida o grupo -SH da Prx a um ácido tiorênico, Cys-SOH. O produto gerado, oxidado, é então reduzido pela tiorredoxina redutase (TrxR), uma proteína pequena com dois grupos -SH.

As peroxirredoxinas parecem ser mais importantes sob concentrações fisiológicas de H_2O_2 . No entanto, quando a célula é exposta a maiores quantidades de H_2O_2 , as peroxirredoxinas são parcialmente inativadas para permitir a sinalização e respostas celulares (Forman, Ursini e Maiorino, 2014). A inativação excessiva da enzima, causada por concentrações ainda maiores de H_2O_2 , pode causar dano aos neurônios (Halliwell, 2006).

Acredita-se que o conteúdo de GSH neuronais são mais baixos do que os da glia, e que a glia fornece cisteinil-glicina (como um precursor GSH) eficientemente aos neurônios. Como demonstrado na Figura 11, os astrócitos podem liberar GSH, que é degradada pela enzima GGT, presente na superfície celular, gerando cisteinil-glicina, que os neurônios captam e clivam para obter cisteína para a utilização

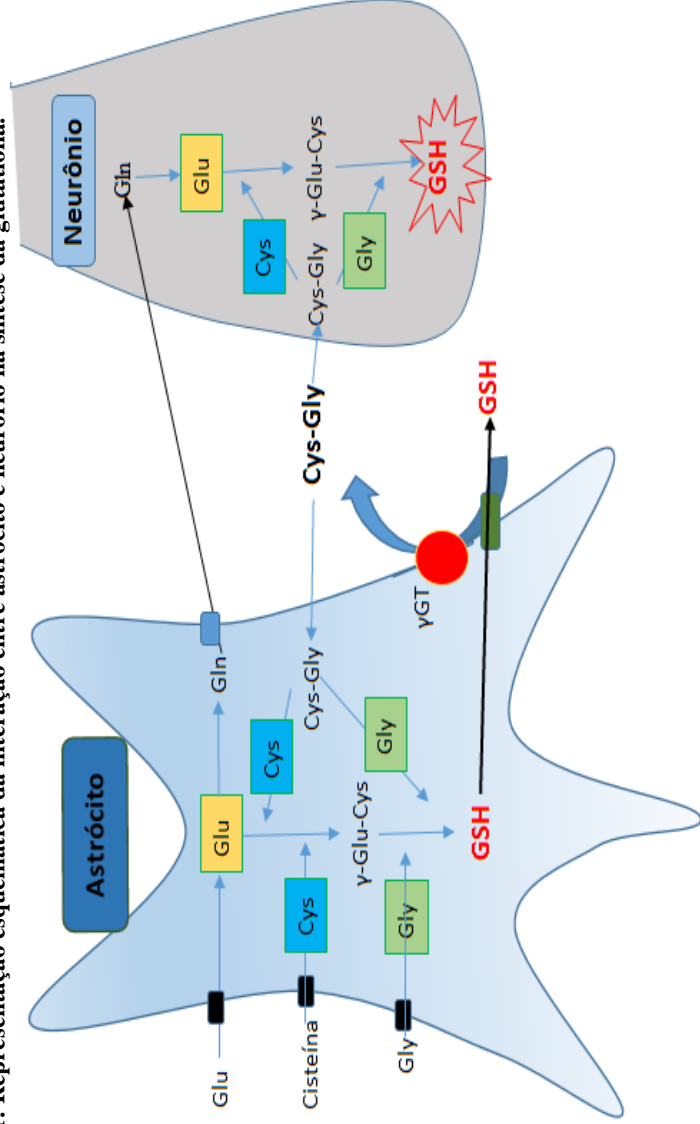
na síntese de GSH. Tal mecanismo deve-se ao fato que a GSH não pode ser captada pela maioria das células. Ela deve primeiro ser hidrolizada em seus aminoácidos constituintes, que então podem ser captados pelas proteínas de transporte de aminoácidos na membrana celular para a síntese no meio intracelular (Zigmond *et al.*, 1999; Halliwell, 2006).

Portanto, a GGT é considerada a enzima limitante na síntese *de novo* intracelular da GSH (Zhang e Forman, 2009; Forman, Ursini e Maiorino, 2014), por ser a única enzima que pode clivar a GSH intacta e seus conjugados, além de funcionar como parte de um mecanismo de retenção dos aminoácidos constitutivos da GSH no organismo, tal como a cisteína, considerada o aminoácido limitante na síntese da GSH.

Muitos compostos eletrofílicos são conjugados com a GSH para detoxificá-los. O fígado é o local mais ativo da conjugação da glutatona; no entanto, a natureza ubíqua da glutatona-S-transferase (GST) indica que a conjugação é um mecanismo de detoxificação amplamente empregue em diversos tecidos (Hanigan, 1998). A interação entre astrócitos e neurônios na síntese de glutatona está representada na Figura 11.

Alterações no conteúdo das enzimas antioxidantes provavelmente contribuem para a alteração da homeostase redox e consequentemente para a doença neurodegenerativa (Sayre, Smith e Perry, 2001). Muitos estudos demonstram que o estresse oxidativo é o principal mecanismo de toxicidade induzida por PQ sendo assim, terapias antioxidantes podem ser alternativas viáveis no tratamento e/ou na prevenção de doenças neurodegenerativas (Uttara *et al.*, 2009; Blanco-Ayala, Andérica-Romero e Pedraza-Chaverri, 2014).

Figura 11: Representação esquemática da interação entre astrócito e neurônio na síntese da glutatona.



Interações entre astrócito e neurônio na síntese da glutatona. Abreviações: GSH, glutatona; γGT, γ-glutamilttransferase; Cys, cisteína; Gln, glutamina; Glu, glutamato; Gly, glicina; Cys-Gly, cisteinil-glicina.

Fonte: Adaptado de Zigmund (1999).

3.8 ILEX PARAGUARIENSIS

O Brasil apresenta uma ampla variedade de plantas, muitas delas com propriedades terapêuticas já utilizadas na medicina popular há muitos anos; entretanto, poucos compostos naturais foram cientificamente investigados (Kwiecinski *et al.*, 2008). Os extratos de plantas podem conter uma grande variedade de moléculas que apresentam atividades biológicas distintas tais como os compostos fenólicos, compostos nitrogenados, vitaminas, terpenos e alguns outros metabólitos endógenos que desempenham atividade antioxidante (Uttara *et al.*, 2009).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) é uma planta originária da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Uruguai e Paraguai (Bastos *et al.*, 2007). Tradicionalmente, suas folhas podem ser consumidas de diferentes maneiras: como chimarrão ou mate - consumidos no sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai; na forma de tererê - consumido na região centro oeste do Brasil e Paraguai; e como chá mate - consumido na região sudeste do Brasil, Argentina e Uruguai. Ambos, chimarrão e tererê, são produzidos a partir das folhas verdes secas e trituradas da erva-mate (Bastos *et al.*, 2007).

Destas principais regiões onde a erva-mate é cultivada, o Brasil é o maior produtor, cultivando cerca de 860 mil toneladas de erva-mate (IBGE, 2013). A Argentina em segundo lugar, com 690 mil toneladas (INYM – Instituto Nacional de La Yerba Mate, 2013) e o Paraguai em terceiro, com 85 mil toneladas (MAG – Ministério da Agricultura e Pecuária, 2013). Segundo os dados da PAM (Pesquisa Agrícola Municipal), o principal estado brasileiro responsável pela produção da planta é o Rio Grande do Sul, com 265 mil toneladas ou 52% do total, em seguida está o Paraná com 195 mil toneladas ou 38%. Em terceiro lugar, o estado de Santa Catarina com 50.740 toneladas, equivalente a 10% da produção do país (IBGE – PAM, 2013).

A erva-mate tem sido utilizada há séculos por habitantes nativos (guaranis) tanto para o preparo de bebidas estimulantes, como também para terapias devido as suas propriedades farmacológicas (Bracesco *et al.*, 2011).

Além da medicina popular, estudos recentes relatam propriedades benéficas da erva em diversos sistemas, tais como no sistema cardiovascular (Schinella, Fantinelli e Mosca, 2005), no SNC (Branco *et*

al., 2013; Santos *et al.*, 2015), atividade hipocolesterolêmica (Bravo *et al.*, 2014), no trânsito intestinal e efeito colerético (Gorzalczany *et al.*, 2001). Estudos também relataram que a erva-mate possui propriedades antioxidantes (Bravo *et al.*, 2014), antiparkinsoniana (Gatto *et al.*, 2015), apresenta potencial para o tratamento da obesidade (Andersen e Fogh, 2001), atividade antiinflamatória (Arçari *et al.*, 2011) e anticarcinogênica (Barg *et al.*, 2014). A tabela 1 apresenta alguns dos efeitos biológicos atribuídos à erva-mate descritos em diferentes modelos experimentais.

Numerosos fitoquímicos foram identificados na erva-mate os quais podem ser responsáveis por tais benefícios à saúde, dentre eles, alcalóides (metilxantina, xantinas - como a cafeína e teobromina), polifenóis (ácido clorogênico e seus derivados, quercetina, kaempferol e rutina), taninos e numerosas saponinas triterpênicas derivadas do ácido ursólico, como as metasaponinas. Além de vitaminas (A, C, E e do complexo B) e minerais (P, Fe e Ca) (Heck e De Mejia, 2007; Coelho *et al.*, 2010; Bracesco *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2014).

Frente a alguns mecanismos de toxicidade descritos como sendo a causa da patogenicidade provocada pelo PQ, terapias antioxidantes podem ser uma ferramenta importante contra a toxicidade induzida pelo herbicida. Alguns fitoquímicos, tais como a naringenina (Chen *et al.*, 2013; Podder, Song e Kim, 2014) *Bathysa cuspidata* (Novaes *et al.*, 2012) já foram descritos como potenciais candidatos para o equilíbrio do processo oxidativo celular. Tais compostos podem contribuir para a diminuição/prevenção dos danos induzidos pelo PQ.

Considerando o que foi exposto, o presente estudo pretende demonstrar o potencial papel neuroprotetor de extratos de *I. paraguariensis* frente a toxicidade induzida por PQ em hipocampo de ratos pr-e-púberes. Os resultados obtidos poderão sugerir estratégias terapêuticas ou profiláticas em benefício dos indivíduos expostos a este importante neurotóxico.

Tabela 1: Efeitos biológicos atribuídos à erva-mate ou seus extratos.

Extrato utilizado	Modelo	Tratamento	Via de administração	Efeito	Autores
Extrato hidroetanólico	Camundongos Swiss com 3-4 meses de idade	21 dias; 1 vez/dia; de 100 a 600 mg/kg peso	Via oral	- Efeito tipo ansiolítico - Modulação do sistema colinérgico em hipocampo - Estimulante do SNC - Neuroprotetor	(Santos <i>et al.</i> , 2015)
Extrato aquoso padronizado	Ratos Wistar machos de 2 meses de idade	4 semanas; 2.31 g/kg/dia (estimado)	Via oral (água de beber)	- ↓ Tempo de imobilidade (efeito tipo antidepressivo)	(Reis <i>et al.</i> , 2014)
Mate instantâneo dissolvido em água, padronizado	Camundongos Swiss machos com 6 semanas de idade alimentados com dieta rica em gorduras por 16 semanas	8 semanas; 1.0 mg/kg peso	Gavagem	- ↓ Massa corpórea, ↓ glicemia, melhora da resistência a insulina; - Antiinflamatório (modulação dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-6 e iNOS)	(Arcani <i>et al.</i> , 2011)
Infusão (20 %) Ou Gel (5%, pp)	Ratos Wistar adultos expostos a radiação UV por 1 h/7 dias	0.70 g/kg	Gavagem	- Antioxidante (↓ conteúdo de proteína carbonilada e TBARs)	(Barg <i>et al.</i> , 2014)
Infusão (20%), padronizado	Ratos wistar induzidos a convulsão	15 dias; 1 vez/dia; 50 mg/kg peso	Gavagem	- Anticonvulsivante - Antioxidante (↓ conteúdo de proteína carbonilada, TBARs e tióis no cerebelo)	(Branco <i>et al.</i> , 2013)

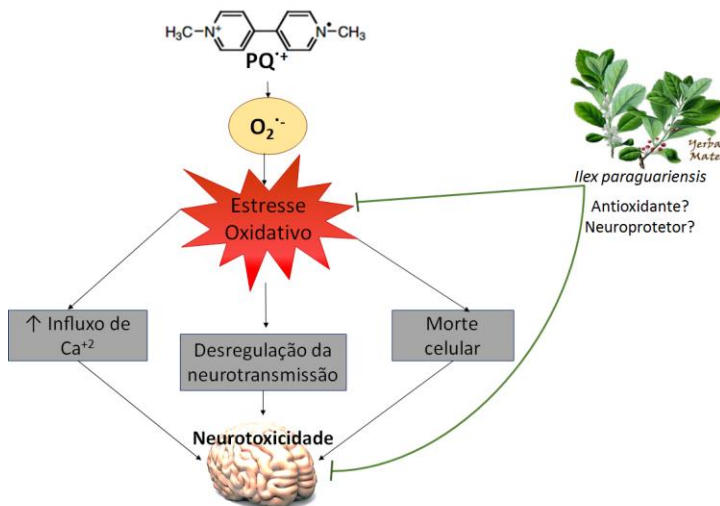
Infusão (85 g de erva em 70 mL água)	<i>In vitro</i> ; <i>Caenorhabditis elegans</i> expostos ao PQ		Meio de incubação	- ↑ Tempo de vida - ↓ Conteúdo de EROs	(Lima <i>et al.</i> , 2014)
Infusão (5%), padronizado	Ratos Wistar com 2 meses de idade alimentados com dieta rica em colesterol	-	Via oral (água de beber)	- Melhora no perfil lipídico, - Na capacidade antioxidante do plasma e - ↓ conteúdo de MDA sérico	(Bravo <i>et al.</i> , 2014)
Infusão (10%)	<i>In vitro</i> ; Coração de ratos Wistar	Concentração final de 30 µg/ml de <i>Ilex</i> na solução perfundida	Meio de incubação	- Cardioprotetor e ↓ conteúdo de TBARs	(Schinella, Fantinelli e Mosca, 2005)
Chimarrão	Estudo de caso- controle conduzido na Argentina	(litros/dia) OR: 0.64; 95% CI: 0.54-0.76; p=0.00001 (anos de consumo) OR: 0.83; 95% CI: 0.73-0.93; p=0.002	Via oral	- Associação inversa com a DP idiopática	(Gatto <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: O autor, 2016.

4. HIPÓTESE

Diante das diversas referências bibliográficas, as quais demonstra-se que o PQ aumenta a produção de radical superóxido induzindo estresse oxidativo, tal processo pode levar às alterações da homeostase do Ca^{2+} , da neurotransmissão e à morte celular. Considerando-se que *I. paraguariensis* vem sendo amplamente descrita devido suas propriedades benéficas, tal como antioxidante, e que pouco de seus efeitos foram estudados no cérebro, a hipótese do presente estudo é que o tratamento sub-crônico com extrato BuOH de *I. paraguariensis* apresenta atividade protetora frente o insulto causado por PQ em hipocampus de ratos pré-púberes. Para investigar esta hipótese, foram avaliados diferentes parâmetros bioquímicos: influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$, influxo de [^{14}C]-desoxiglicose e [^{14}C]-glutamato, atividade das aminotransferases (AST e ALT), da LDH e atividade das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, bem como concentração da GSH, TBARS e proteína carbonilada. A Figura 12 apresenta esquematicamente a hipótese do presente estudo.

Figura 12: Representação esquemática hipotetizando o mecanismo neuroprotetor de *Ilex paraguariensis* frente a toxicidade induzida por PQ em hipocampo de ratos pré-púberes.



Propõe-se que o PQ pode interferir na homeostase do Ca^{+2} , na neurotransmissão glutamatérgica e levar à morte celular devido à indução de estresse oxidativo. A

hipótese deste estudo é que *I. paraguariensis* pode atuar como um antioxidante e um agente capaz de prevenir os danos ocasionados pelo herbicida PQ.

Fonte: O autor (2015).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

As substâncias radioativas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (atividade específica 321 KBq/mg Ca^{2+}), [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose (^{14}C -DG), (atividade específica 9,25 GBq/mmol) e [^{14}C]-glutamato (atividade específica 1,85 MBq) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA). O líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). O PQ, os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo e para a caracterização química do extrato e frações foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A). Para leitura da absorbância na medição das atividades enzimáticas foi utilizado o leitor de placas Tecan Infinito® 200 PRO.

5.2 COLETA E BENEFICIAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (MPV).

As amostras utilizadas nos ensaios farmacológicos do presente trabalho foram fornecidas pelo doutorando Carlos Henrique Blum da Silva do PPGFar/UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto.

5.2.1 Matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal foi adquirida comercialmente na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina. A MPV foi submetida à tamisação sendo utilizadas somente as folhas para a preparação do extrato.

5.2.2 Preparo e fracionamento do extrato bruto

A extração da MPV foi realizada por turbulização utilizando como líquido extrator etanol 20° GL. Após a filtração, o etanol foi eliminado sob pressão reduzida e posteriormente dividido em duas partes. Uma parte foi congelada e submetida à liofilização para secagem completa, originando o extrato bruto (EB). A outra parte foi particionada com *n*-butanol, originando as frações butanólica (BuOH) e residual aquosa (RAq).

5.2.3 Caracterização química do extrato e frações

O perfil químico do extrato e frações foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), com detector de arranjo de diodos (PDA) em sistema Acquity™ (Waters, MA, USA), equipado com bomba quaternária, desgaseificador e injetor automático.

A identificação dos compostos foi realizada com base no perfil cromatográfico de amostras autênticas, por meio da comparação do tempo de retenção, espectro de absorção no ultravioleta (UV) e co-injeção da amostra com substâncias de referência.

Foram utilizadas amostras autênticas das metilxantinas cafeína e teobromina, dos ácidos fenólicos, ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogênico) e do flavonoide rutina.

Os compostos cafeína, ácido clorogênico e rutina foram quantificados e os resultados foram expressos em miligramas de composto por grama de extrato (mg composto/g extrato).

5.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar de 21 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada de 21 °C, ração e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição (CEUA/UFSC#PP00820).

Os animais foram randomizados em quatro grupos:

Grupo 1: Controle (água destilada via gavagem e solução salina via intraperitônio – i.p.)

Grupo 2: PQ (10 mg/kg de peso de PQ dissolvido em solução salina por 5 dias consecutivos, via i.p., e água via gavagem).

Grupo 3: *I. paraguariensis* (200 mg/kg de extrato BuOH de *I. paraguariensis* dissolvido em água destilada via gavagem, e solução salina via i.p.).

Grupo 4: *I. paraguariensis* (200 mg/kg de extrato BuOH de *I. paraguariensis* via gavagem) + PQ (10 mg/kg de peso de PQ via i.p.)

Os grupos 3 e 4 receberam um tratamento prévio com 200 mg/kg de extrato BuOH de *I. paraguariensis* via gavagem, 1 dia antes do início do tratamento com PQ.

O volume final injetado via i.p. ou administrado via gavagem foi de 100 µl em todos os tratamentos.

5.4 MONITORAMENTO DO GANHO DE MASSA CORPÓREA

O ganho de massa corpórea foi monitorado diariamente em todos os grupos experimentais durante todo o período de tratamento através da pesagem dos animais em balança eletrônica.

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para todos os protocolos experimentais, uma alíquota de 5 µL das amostras foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (Lowry *et al.*, 1951), utilizando uma curva padrão de albumina.

5.6 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A determinação da viabilidade celular foi feita por meio do teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina). As fatias de hipocampo foram incubadas com MTT, a uma concentração final de 0,5 mg/mL, em HBSS durante 30 minutos a 37°C em placa com agitação. Após a primeira incubação, foi removido completamente o meio contendo MTT e foi adicionado 200 µL de DMSO. Novamente a placa foi incubada sob agitação, até a fatia ficar esbranquiçada e então solubilizar-se completamente ao meio. A intensidade de coloração (azul escuro, que corresponde a quantidade de formazan) reflete o estado funcional da cadeia respiratória e é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 560 e 650 nm simultaneamente. Durante todo o procedimento a placa permaneceu protegida da luz. As fatias de hipocampo foram de 400 µm e o teste foi feito em duplicata.

5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE ^{14}C -GLUTAMATO, ^{14}C -2-DESOXI-D-GLICOSE E $^{45}\text{Ca}^{2+}$

5.7.1 Captação de ^{14}C -glutamato

A captação de glutamato foi determinada em fatias de hipocampo de ratos de 27 dias de idade. As fatias foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C , em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4) para estabilização do tecido. Para o início da captação, o meio foi trocado por HBSS contendo 0,2 μCi ^{14}C -glutamato, no qual as fatias permaneceram por 10 minutos. Para interromper a captação, o tecido foi lavado duas vezes com HBSS gelado. As fatias foram solubilizadas em 300 μL de solução de NaOH 0,1 M/ SDS 0,01%. Após a completa solubilização, alíquotas de 100 μL deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, MultiPorpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons de sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como nmol ^{14}C -glutamato/ μg proteína/min.

5.7.2 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

O influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi determinado em fatias de hipocampo de ratos de 27 dias de idade. As fatias foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C , em solução HBSS. Após, o meio foi trocado por HBSS fresco contendo 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido foi incubado durante 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. Posteriormente, os tecidos foram coletados e transportados para poços contendo solução de cloreto de lantânio gelado (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM, pH 7,0), o qual bloqueia a entrada de Ca^{2+} nas células, interrompendo assim o influxo de cálcio nas fatias. Após 10 min, as fatias foram lavadas em HBSS gelado e posteriormente homogeneizadas em 300 μL de NaOH 0,5 M. Após a completa solubilização, alíquotas de 100 μL deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida.

Os resultados foram expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína (Zamoner *et al.*, 2007).

5.7.3 Captação de [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose

Fatias de hipocampo de ratos de 27 dias de idade foram pré-incubadas em HBSS, durante 15 min para estabilização. O tecido foi incubado por 15, 30 e 45 min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose 0,2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado e o tecido lavado 2 vezes com HBSS gelado, e homogeneizado em solução NaOH 0,5 M. Alíquotas de 100 μL deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida. Os resultados foram expressos como pmol [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose/ mL/mg de proteína.

5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

5.8.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, reage com uma variedade de compostos que podem ser mensurados espectrofotometricamente. Um dos métodos mais empregados para sua determinação é sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), por ser este o produto majoritário, o qual produz uma base de Schiff de coloração rosa (Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1979; Bird e Draper, 1984). O conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medido em fatias de hipocampo, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 20 mM, 0,1% Triton e NaCl 150 mM, pH 7,4 (1:20, p:v), seguido por centrifugação a 5.000 x g durante 5 min. À uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi acrescentado 1 mL de TCA 12% (para precipitação das proteínas) e agitado em vórtex. Posteriormente, foi adicionado 900 μL de tampão Tris-HCl 0,06 M pH 7,4 e 1 mL TBA 0,73%, novamente agitado em vórtex e levado para aquecimento por 1 h a 100 °C. Após este período as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. A reação colorimétrica das amostras foi medida em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/g de proteína.

5.8.2 Proteína Carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado no homogeneizado de fatias de hipocampo pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Processos oxidativos levam a introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos de proteínas, e estas modificações podem ser detectadas por métodos específicos, um deles é a reação destes grupos com reagentes carbonil-específicos (Levine *et al.*, 1990). Inicialmente, foram adicionados 200 μL do homogeneizado em 600 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após este período foi adicionado 600 μL de ácido tricloroacético 12% (TCA 20%), seguido de agitação em vórtex e incubação em banho de gelo durante 10 min. Em seguida foi realizada uma centrifugação (5 min a 10.000 x g), no qual o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado três vezes consecutivas com 800 μL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). O excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 1 mL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH_2PO_4 20 mM, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min e centrifugação a 10.000 x g por 5 min, para então realizar a leitura do sobrenadante a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg de proteína.

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.9.1 Glutamina Sintetase

Fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 150 μL de Tampão de Lise (Imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8), em seguida as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. 50 μL deste sobrenadante foi adicionado em 100 μL de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl_2 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida com a adição de 200 μL de uma solução contendo FeCl_3 3,7 mM; TCA 1,2 M; HCl 10 M e água. O produto da reação, γ -glutamilhdroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a

quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína (Shapiro e Stadtman, 1970; Costa *et al.*, 2012).

5.9.2 Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase

Os hipocampus foram homogeneizados em 300 μ l de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4. As atividades das enzimas ALT e AST foram determinadas por meio de reações colorimétricas. Na reação, a alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra e é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

5.9.3 Gamma-glutamil transferase (GGT)

As fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. A atividade enzimática detectada por meio da seguinte reação: o grupo glutamil, da γ -glutamil-p-nitroanilida (substrato) é transferido pela GGT para a glicilglicina (aceptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorbância que pode ser medida a um comprimento de onda de 530 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

5.9.4 Lactato desidrogenase (LDH)

As fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática foi determinada por meio de uma mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopiridino nucleótido (NAD⁺), fenazina metosulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, utilizando a reação de lactato à piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na

reação enzimática. Os resultados da atividade da LDH foram expressos como U/L/ μ g proteína.

5.9.5 Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)

A atividade da G6PD foi determinada em fatias de hipocampo homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4. Uma alíquota do homogeneinato foi incubada na presença de NADP⁺ levando a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético a 570 nm durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o declínio da atividade enzimática do padrão de G6PD. Os resultados foram expressos como U/ μ g de proteína.

5.10 CONTEÚDO DE GSH

O conteúdo de GSH foi determinado segundo o método descrito por Beutler e colaboradores (Beutler, Duron e Kelly, 1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável a 412 nm. Para determinar o conteúdo de GSH, as fatias de hipocampo foram pesadas e posteriormente homogeneizadas em solução de TCA 12% na proporção de 1:10 (p/v). As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneinato a 5000 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota de 10 μ L deste sobrenadante foi adicionado em 190 μ L de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0. Posteriormente, 20 μ L de ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,525 mM (DTNB; Reagente Ellman) diluído em Citrato de Sódio 1% foram adicionados. Após cerca de 2 min obtém-se a máxima formação de TNB, que foi medido espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em μ mol.g⁻¹. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio.

5.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

5.11.1 Glutationa redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada pela taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da glutatona oxidada (GSSG), devido ação desta enzima presente na amostra (Carlberg e Mannervik, 1985). Um meio de reação contendo tampão fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,0, NADPH, água destilada, GSSG e DPTA 5 mM foi adicionado à amostra dando início a reação que foi monitorada durante 3 min., gerando uma curva descendente. Os valores da foram expressos em $\mu\text{mol/g/min}$.

5.11.2 Glutationa peroxidase (GPx)

Para a análise enzimática de GPx, a reação utilizada foi baseada na redução de tertbutilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e consequente regeneração da GSH pela GR, com oxidação de NADPH em 340 nm (Flohé e Günzler, 1984). Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade da GPx presente na amostra. Para a realização da técnica, 200 μL de um meio de reação contendo tampão fosfato de Potássio 0,1 M (pH 7,0), NADPH, ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM, água destilada, GSH e GR foi adicionado à amostra, seguido pela adição de 5 μL de t-BuOOH. A reação foi monitorada durante 3 min. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/g/min}$.

5.11.3 Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig (Habig, Pabst e Jakoby, 1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH ao substrato, formando uma substância mensurável a 340 nm, monitorada durante 3 minutos. À amostra foi adicionado um meio de reação contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), GSH 0,1 M e tampão fosfato de Potássio 0,1 M pH 7.0. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol/g/min}$.

5.11.4 Catalase

A atividade da catalase foi determinada baseando-se na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (Aebi, 1984). À uma alíquota da amostra foi adicionado 200 μL de uma solução de H_2O_2 30% (10 mM) preparada em tampão fosfato de Potássio 50 mM pH 7,0, seguida de leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em mmol/g/min.

5.11.5 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (Misra e Fridovich, 1972), modificado por Boveris e colaboradores (Boveris *et al.*, 1983). O método baseia-se na oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo rosa, o adrenocromo, o qual é mensurado a 480 nm. À uma alíquota da amostra, foi acrescentado q.s.p. para 200 μL tampão glicina 50 mM pH 10,2, em seguida, realizou-se uma leitura pontual. Após, foi adicionado solução com adrenalina 60 mM pH \sim 2,0, seguido por monitoramento da reação durante 10 min. A adição da amostra retarda a oxidação da adrenalina e consequentemente a produção de adrenocromo devido a enzima SOD presente na amostra. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (U/mL) foram expressos em termos de atividade da enzima, no qual uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. Os valores foram expressos em mmol/g/min.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em duplicatas em 3 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando necessário, utilizando-se o programa INSTAT versão 3.01. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0.05$.

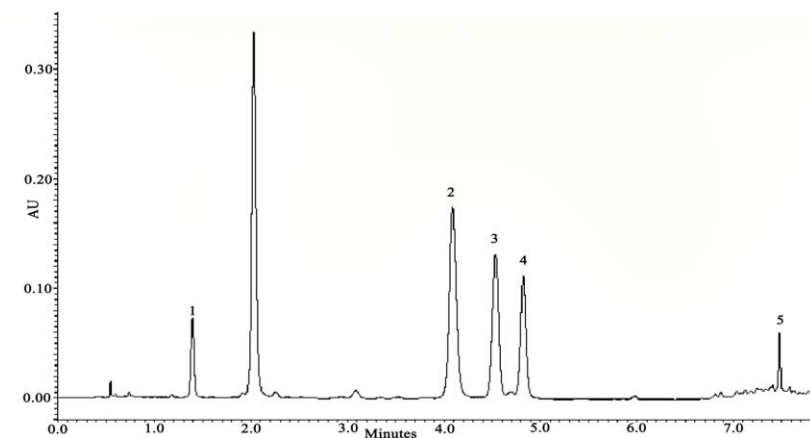
6. RESULTADOS

Neste trabalho foram utilizados modelos experimentais de tratamento *in vivo* com o herbicida PQ e com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas induzidas no hipocampo de ratos pré-púberes. Inicialmente foi verificado o possível efeito protetor do extrato bruto, etanólico e BuOH de *I. paraguariensis* frente a diminuição na captação de glutamato induzida por PQ. Os resultados mostraram que o extrato BuOH preveniu o efeito tóxico do PQ enquanto os demais extratos testados não alteraram este parâmetro (dados não mostrados). Sendo assim, o extrato BuOH foi utilizado nos experimentos posteriores.

6.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E FRAÇÕES

Inicialmente foi realizada a caracterização química do extrato e frações utilizados no presente estudo em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Flávio Reginatto. A Figura 13 mostra o cromatograma do extrato bruto de *I. paraguariensis*, com detecção em 280 nm.

Figura 13: Cromatograma do extrato bruto de *I. paraguariensis* por CLUE/DAD com detecção em 280nm.



1, teobromina; 2, ácido 5-O-cafeoilquínico; 3, cafeína; 4, ácido 4-O-cafeoilquínico; 5, rutina.

Os teores de cafeína e compostos fenólicos nos extratos/frações utilizados no presente estudo estão expostos na Tabela 2. Os resultados mostraram que o extrato BuOH apresenta maiores concentrações de cafeína, ácido clorogênico e rutina que o EB e o RAq.

Tabela 2: Teores de compostos fenólicos e cafeína nos extratos/frações (mg/g).

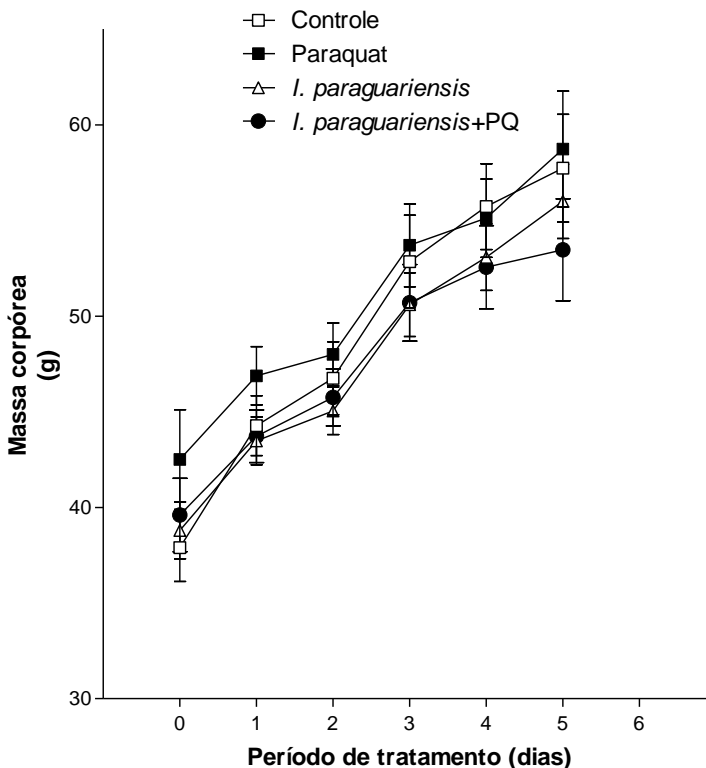
Amostra	Cafeína	Ácido	Rutina
		Clorogênico	
EB	29.3 ± 0.06 ^a	67.5 ± 0.3 ^a	12.4 ± 0.04 ^a
BuOH	101.7 ± 0.4 ^b	58.4 ± 0.1 ^b	42.0 ± 0.09 ^b
RAq	3.9 ± 0.02 ^c	68.3 ± 0.1 ^c	2.2 ± 0.01 ^c

Os resultados foram expressos como a média ± D.P. de 3 amostras de cada extrato ou fração. Letras diferentes indicam diferença significativa nos teores de cada composto entre as amostras. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey-Kramer, $p < 0.01$.

6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM PQ E COM EXTRATO BuOH DE *I. paraguariensis* NO GANHO DE MASSA CORPÓREA DE RATOS COM 21 A 26 DIAS DE IDADE

Para investigar as alterações no ganho de massa corporal dos animais expostos ao PQ e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* os animais foram pesados diariamente durante todo os tratamentos. Como demonstrado na Figura 14, a exposição ao PQ e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* não alterou o ganho de massa corpórea dos animais.

Figura 14: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) no ganho de massa corpórea de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via.

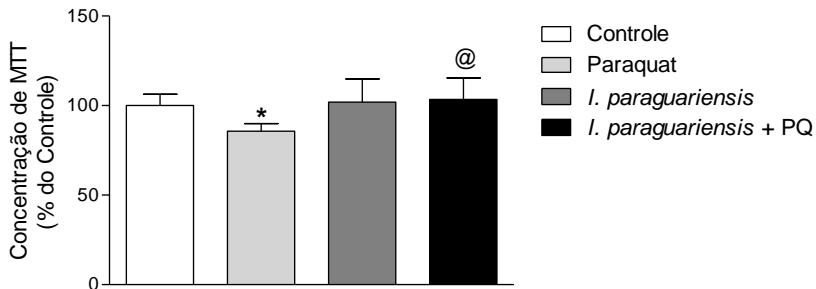
Fonte: O autor, 2015.

6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PARAQUAT NA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

Para avaliar a viabilidade das células hipocâmpais após tratamento com PQ e/ou extrato BuOH de *I. paraguariensis*, utilizou-se o método do MTT, o qual reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A Figura 16 demonstra diminuição na viabilidade de células hipocâmpais de animais do grupo exposto ao PQ, enquanto que tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* não alterou este

parâmetro. Por outro lado, o co-tratamento com *I. paraguariensis* preveniu a morte de células hipocâmpais induzida por PQ.

Figura 15: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) sobre a viabilidade celular em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle e @ $p < 0,01$, comparado ao grupo PQ.

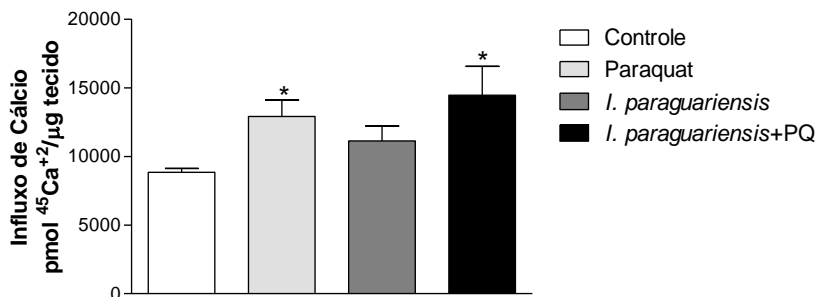
Fonte: O autor, 2015.

6.4 ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRATO BuOH DE *I. paraguariensis* EM HIPOCAMPO

Para investigar o efeito do PQ e o possível efeito protetor do extrato BuOH de *I. paraguariensis* sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fatias de hipocampo foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 45 minutos.

Conforme demonstrado na Figura 16 os resultados mostraram que a exposição ao PQ levou a um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo que este herbicida é capaz de induzir excitotoxicidade por meio do aumento das concentrações intracelulares deste íon. O tratamento com o extrato BuOH *I. paraguariensis* não provocou alterações na homeostase do íon assim como não preveniu o efeito provocado pelo PQ.

Figura 16: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

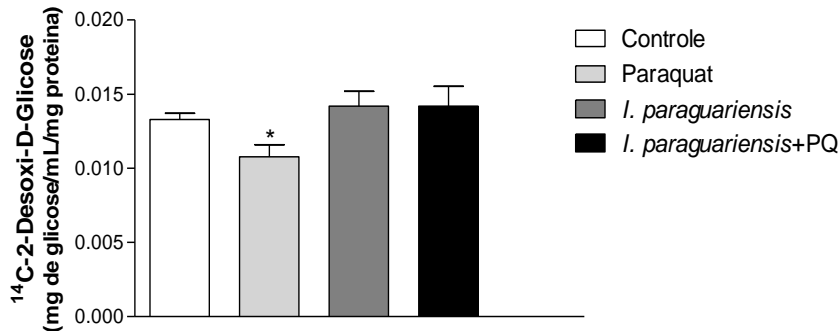
Fonte: O autor, 2015.

6.5 ENVOLVIMENTO DA CAPTAÇÃO DE ^{14}C -2-DESOXI-D-GLICOSE E DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRATO BUOH DE *I. paraguariensis* EM HIPOCAMPO

As células neurais apresentam taxas elevadas de metabolismo oxidativo, sendo a glicose o principal substrato energético para a síntese de ATP e de neurotransmissores, como o glutamato. Para a determinação da captação de glicose, fatias de hipocampus foram incubadas com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C -2-Desoxi-D-Glicose por 30 min. A exposição ao herbicida causou a diminuição da captação de glicose pelas células hipocâmpais e o tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* evitou parcialmente esta alteração (Figura 17).

A LDH é uma enzima chave do metabolismo energético no cérebro, cataliza a redução do piruvato a lactato. Tal atividade foi investigada devido a relevância desta enzima e de evidências de que o metabolismo oxidativo neuronal depende do lactato derivado dos astrócitos. A exposição ao PQ aumentou a atividade da LDH e o tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* preveniu esta alteração (Figura 18).

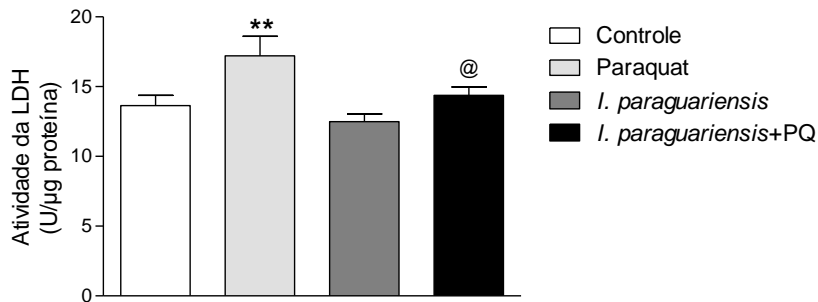
Figura 17: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) na captação de ^{14}C -2-Desoxi-D-Glicose em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 18: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) na atividade da enzima LDH em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



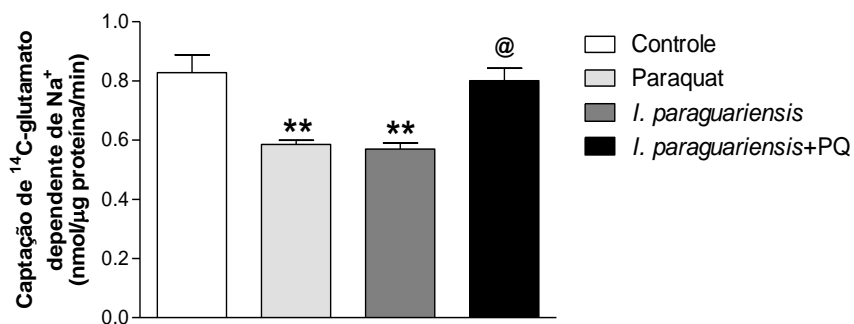
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, comparado com grupo controle e @ $p < 0,05$, comparado ao grupo PQ.

Fonte: O autor, 2015.

6.6 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA TOXICIDADE INDUZIDA PELO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCACIONADA PELO EXTRATO BuOH DE *I. paraguariensis* EM HIPOCAMPO

Para investigar o efeito do PQ e o possível efeito protetor do extrato BuOH de *I. paraguariensis* na captação de L-[^{14}C]-Glutamato, fatias de hipocampo foram incubadas com 0,2 μCi de L-[^{14}C]-glutamato durante 10 minutos. O efeito da exposição ao PQ e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* foi avaliado em relação a captação específica de ^{14}C -glutamato, dependente de Na^+ (Figura 19), a qual representa a principal forma de retirada do glutamato da fenda sináptica. Observou-se diminuição da captação de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ tanto no grupo exposto ao PQ quanto no grupo exposto ao extrato BuOH de *I. paraguariensis*. Quando realizado o co-tratamento com *I. paraguariensis*, a captação de ^{14}C -glutamato mostra-se normalizada, demonstrando um possível efeito protetor do extrato.

Figura 19: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) sobre a captação específica de ^{14}C -glutamato em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



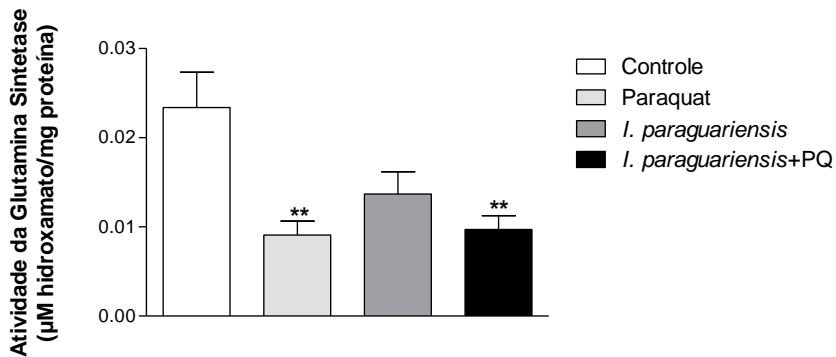
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, comparado com grupo controle e @ $p < 0,01$, comparado ao grupo PQ.

Fonte: O autor, 2015.

Sendo captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser convertido em glutamina, por ação da GS, sendo assim, também foi investigado a atividade desta enzima que esta envolvida no ciclo glutamato-glutamina,

com o intuito de investigar o destino do glutamado. A exposição ao PQ provocou uma inibição na atividade da GS e o co-tratamento com *I. paraguariensis* não preveniu esta alteração, sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* insuficiente para evitar o efeito causado pelo PQ neste parâmetro bioquímico (Figura 20).

Figura 20: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) sobre a atividade da enzima GS em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.

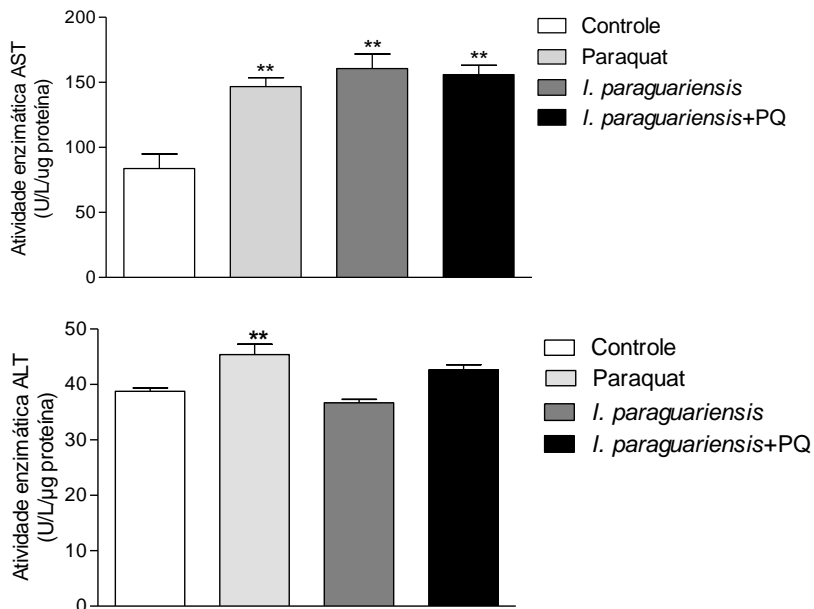


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

Ensaio enzimáticos das aminotransferases ALT e AST foram investigados pois tais enzimas promovem a transferência de grupos amino entre aminoácidos, favorecendo a formação de intermediários do ciclo de Krebs ou de glutamato e outros aminoácidos. Uma vez que a captação de glicose se apresenta comprometida, as reações para formação de intermediários do ciclo de Krebs, como o α -KG e o OAA, também podem estar alteradas. Tal achado pode ser observado na Figura 21, no qual a exposição ao PQ provocou aumento na atividade destas enzimas sendo o extrato BuOH de *I. paraguariensis* eficaz na prevenção parcial apenas da atividade da ALT.

Figura 21: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) na atividade das enzimas A) Aspartato aminotransferase e B) Alanina aminotransferase em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



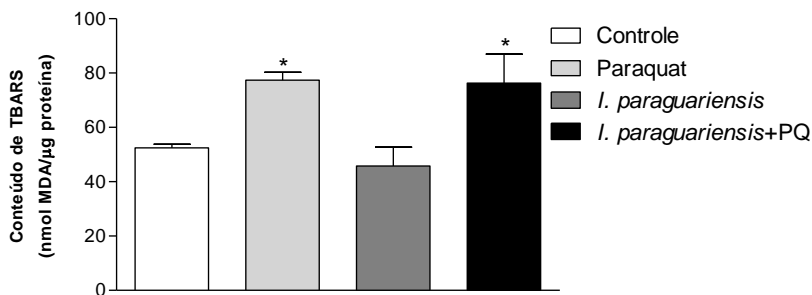
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

6.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCACIONADA PELO EXTRATO BuOH DE *I. paraguariensis* EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO A LÍPIDOS E PROTEÍNAS EM HIPOCAMPO

Para investigar parâmetros de dano oxidativo no hipocampo de ratos pré-púberes expostos *in vivo* ao PQ e o possível efeito protetor de dano do extrato BuOH de *I. paraguariensis* foi mensurada a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas. O grupo exposto ao PQ apresentou aumento na formação de TBARS enquanto que o tratamento com *I. paraguariensis* não foi eficaz na prevenção da peroxidação de lipídios (Figura 22).

Figura 22: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) na quantidade de peroxidação lipídica em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.

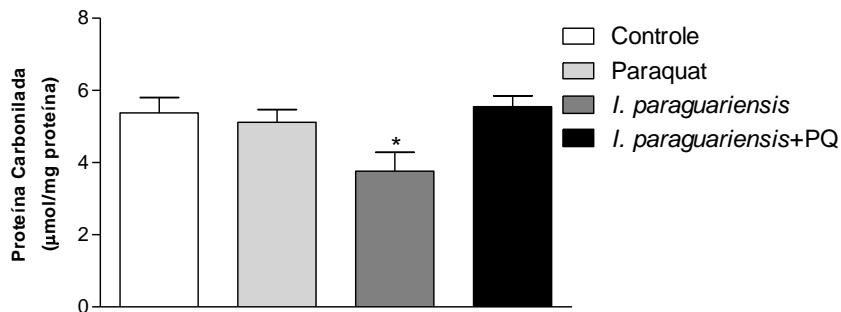


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação também foi determinado em todos os grupos experimentais, mostrando-se diminuído no grupo tratado com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* (Figura 23).

Figura 23: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) em relação ao dano a proteínas em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

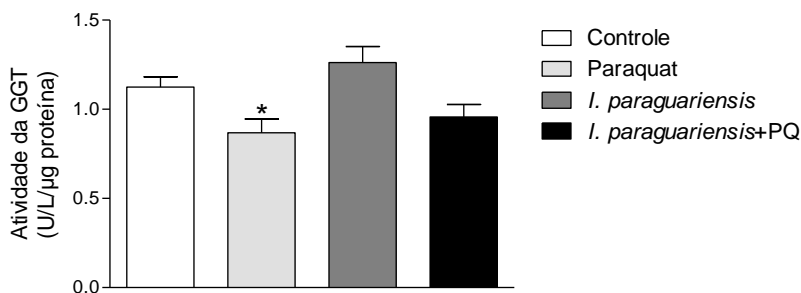
6.8 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCASIONADA PELO EXTRATO BuOH DE *I. paraguariensis* EM PARÂMETROS RELACIONADOS ÀS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM HIPOCAMPO

Para investigar parâmetros bioquímicos relacionados às defesas antioxidantes em hipocampo de ratos pré-púberes expostos *in vivo* ao PQ e o possível efeito protetor do extrato BuOH de *I. paraguariensis* foi determinada a atividade das enzimas GGT, G6PD e o conteúdo de GSH.

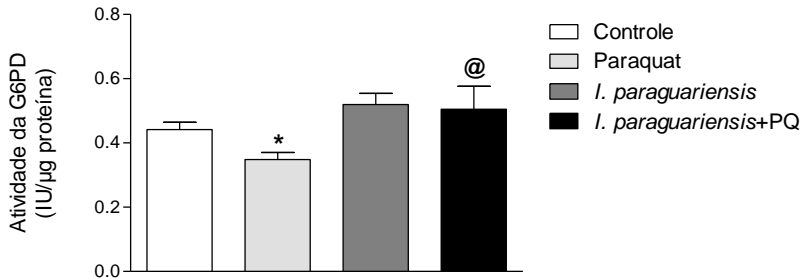
A GGT esta envolvida na síntese *de novo* da GSH e sua atividade apresentou-se diminuída no grupo exposto ao PQ, sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* eficaz na prevenção parcial deste achado (Figura 24A). O mesmo foi observado no grupo PQ em relação a atividade da G6PD, enzima limitante da via das pentoses-fosfato, a qual é importante na produção de equivalentes redutores como o NADPH(H⁺), sendo o tratamento com *I. paraguariensis* eficaz na prevenção deste efeito (Figura 24B). Em relação ao conteúdo de GSH, este apresentou-se aumentado no grupo exposto ao PQ, por outro lado, o grupo que recebeu o co-tratamento com *I. paraguariensis* apresentou este parâmetro restabelecido (Figura 24C). A GSH participa da remoção de peróxido de hidrogênio, junto a GPx, sendo um componente importante do sistema antioxidante.

Figura 24: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) em relação a atividade da enzima A) GGT B) G6PD e C) conteúdo de GSH em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.

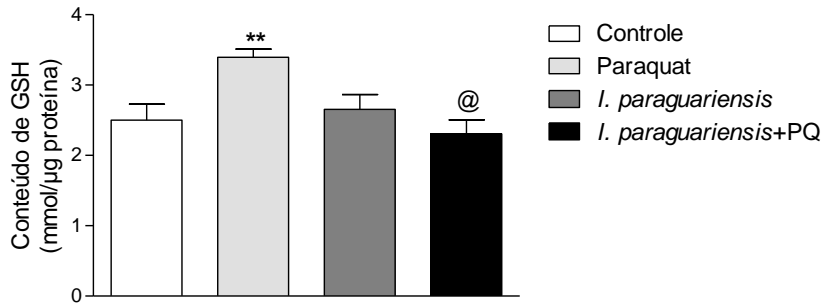
A)



B)



C)



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,01$ /** $p < 0,01$, comparado com grupo controle e @ $p < 0,05$, comparado ao grupo PQ.

Fonte: O autor, 2015.

6.9 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO PQ E NEUROPROTEÇÃO OCACIONADA PELO EXTRADO BuOH DE *I. paraguariensis* NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM HIPOCAMPO

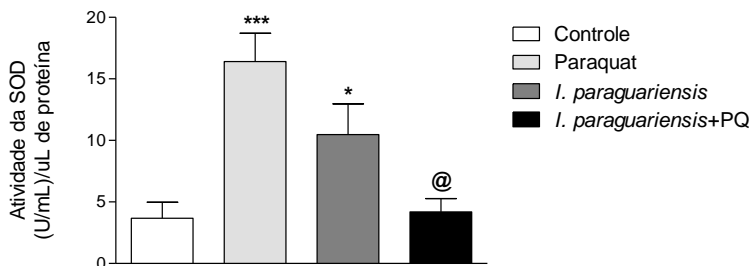
Para investigar parâmetros bioquímicos relacionados às enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos pré-púberes expostos *in vivo* ao PQ e o possível efeito protetor do extrado BuOH de *I. paraguariensis* foi determinada a atividade das enzimas SOD, catalase, GPx, GST e GR.

A enzima SOD está relacionada com a eliminação de radical superóxido, com a conseqüente formação de H_2O_2 e a eliminação de H_2O_2 pode ocorrer pela ação da enzima catalase. Ambas enzimas

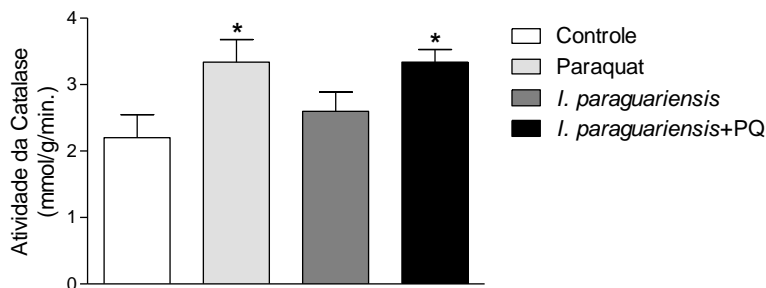
apresentaram sua atividade aumentada no grupo exposto ao PQ, sendo o extrato BuOH de *I. paraguariensis* eficaz para evitar a alteração apenas da SOD (Figura 25AeB).

Figura 25: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) em relação a atividade da A) SOD e B) Catalase em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.

A)



B)



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ /** $p < 0,001$ comparado com grupo controle e @ $p < 0,001$, comparado ao grupo PQ.

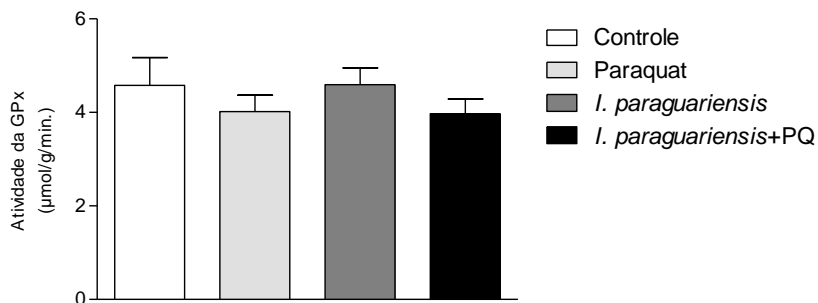
Fonte: O autor, 2015.

Outra enzima relacionada com a eliminação de H_2O_2 é a GPx, porém a reação catalítica ocorre às custas da oxidação da GSH, com formação de GSSG. Sendo a GR responsável pela manutenção da GSH. Não foram encontradas alterações na atividade da GPx em todos os grupos experimentais (Figura 26A), apenas a atividade da GR mostrou-

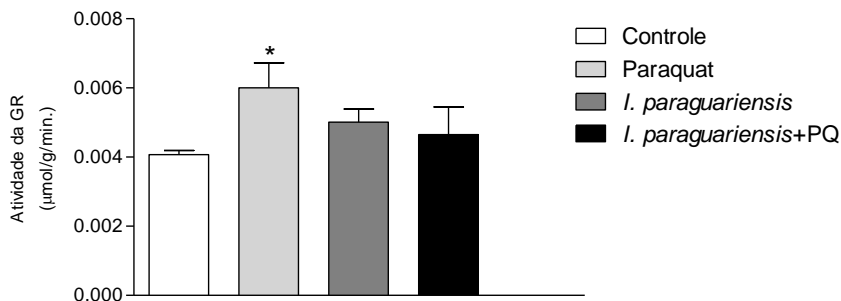
se aumentada (Figura 26B) no grupo exposto ao PQ. O co-tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* foi efetivo na prevenção parcial da alteração da atividade da GR.

Figura 26: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) em relação a atividade da A) GPx e B) GR em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.

A)



B)

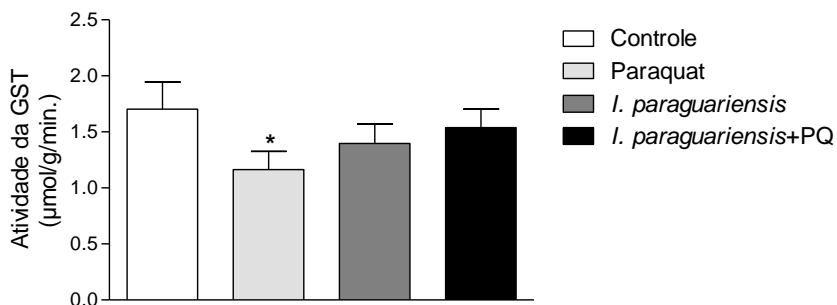


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

Muitos xenobióticos são conjugados com a GSH como um meio de detoxificá-los. A GST catalisa esta conjugação amplamente empregue em diversos tecidos. A exposição ao PQ diminuiu a atividade da enzima e o co-tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* preveniu parcialmente a alteração da atividade da GST (Figura 27).

Figura 27: Efeito da exposição *in vivo* ao PQ (10 mg/kg) e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* (200 mg/kg) em relação a atividade da GST em hipocampo de ratos de 27 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com grupo controle.

Fonte: O autor, 2015.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o extrato BuOH de *I. paraguariensis* foi capaz de proteger as células hipocâmpais da toxicidade induzida por PQ em diferentes parâmetros bioquímicos, mostrando-se como um composto promissor para fins terapêuticos/profiláticos em prol dos indivíduos expostos a neurotóxicos. Neste sentido, o extrato BuOH de *I. paraguariensis* apresentou efeito antioxidante e protetor frente a excitotoxicidade glutamatérgica e ao déficit energético promovido por PQ em hipocampo de ratos pré-púberes.

Observações em humanos mostram que os agrotóxicos podem ser responsáveis por diversos efeitos agudos e de longo prazo na saúde (Parrón *et al.*, 2011; Faria, Fassa e Meucci, 2014). Diversas evidências epidemiológicas correlacionam a exposição à pesticidas ao desenvolvimento de câncer, alterações do sistema reprodutor, doenças neurodegenerativas, como DA e DP e deficiências do desenvolvimento neurológico em crianças (Przedborski e Ischiropoulos, 2005; Parrón *et al.*, 2011; Tanner *et al.*, 2011; Van Der Mark *et al.*, 2012).

Um estudo de coorte realizado na França, com 1.507 idosos (65 anos ou mais) encontrou associação entre exposição ocupacional à pesticidas com diminuição da performance cognitiva, junto ao aumento do risco de desenvolvimento de DA ou DP (Baldi *et al.*, 2003). Um estudo epidemiológico realizado no Brasil por Koifman e colaboradores (2002) compara a venda total de pesticidas (toneladas) em 1985 com indicadores de desordens reprodutivas humanas observadas dez anos depois. Tal estudo encontrou de moderado a alto coeficiente de correlação para a mortalidade por câncer de mama ($r = 0.80$; 95% CI: 0.06-0.90; $r^2 = 0.64$), ovário ($r = 0.71$; 95% CI: -0.14-0.85; $r^2 = 0.51$), próstata ($r = 0.67$; 95% CI: -0.20-0.83; $r^2 = 0.45$), e hospitalização por câncer testicular no Rio Grande do Sul ($r = 6.4$), Paraná ($r = 2.4$) e Santa Catarina ($r = 1.9$) (Koifman, Koifman e Meyer, 2002).

Miranda Filho e colaboradores (2014) demonstraram recentemente uma tendência de aumento na mortalidade por câncer no cérebro entre adultos (20-79 anos de idade) que vivem em uma área agrícola no estado do Rio de Janeiro. Não somente, o risco relativo de mortalidade por câncer de cérebro foi quatro vezes maior entre os indivíduos nascidos entre 1980 e 1989, em comparação com os nascidos em 1945-1949, período no qual o uso de pesticidas era reduzido (Miranda Filho *et al.*, 2014).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que condições patológicas ocasionadas por PQ tem início devido a produção exacerbada de radicais livres, desregulação da mitocôndria e desequilíbrio dos mecanismos de defesa antioxidantes (Chen *et al.*, 2010). Sendo assim, terapias antioxidantes podem ser uma alternativa viável para a prevenção ocasionado pela exposição a pesticidas (Blanco-Ayala, Andérica-Romero e Pedraza-Chaverri, 2014).

Devido a estas evidências, o presente estudo investigou possíveis alterações neuroquímicas ocasionadas pela exposição subcrônica ao PQ em modelos animais *in vivo*, bem como o possível efeito neuroprotetor do extrato BuOH de *I. paraguariensis*. Neste estudo pioneiro pretendeu-se demonstrar um potencial efeito terapêutico e/ou profilático da erva-mate, largamente consumida na região Sul do Brasil, prevenindo os danos às células neurais causados pelo herbicida PQ.

Primeiramente, avaliou-se as consequências da exposição ao PQ na viabilidade de células hipocâmpais de ratos pré-púberes. Os resultados mostraram que o PQ diminui a viabilidade destas células, assim como o tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* preveniu a morte celular induzida pelo pesticida. Corroborando estes resultados, Bixby e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato aquoso de *I. paraguariensis* (diluição de 1/500) apresenta atividade citoprotetora em macrófagos e células epiteliais pelo aumento da taxa de sobrevivência celular após estresse nitrosativo.

Estudos anteriores também demonstraram que a exposição ao PQ diminui a viabilidade celular. Neste contexto, tanto a exposição a uma única dose de PQ (30 mg/kg) quanto o tratamento por 5 dias consecutivos (McCormack e Di Monte, 2003; Kuter *et al.*, 2007) ocasionaram a diminuição do número de neurônios da substância negra em camundongos (McCormack e Di Monte, 2003; Kuter *et al.*, 2007). A morte de neurônios dopaminérgicos também foi observada em camundongos expostos ao PQ (10 mg/kg) semanalmente por um período de 3 semanas (McCormack *et al.*, 2005). Kim e colaboradores (2012) demonstraram maior sobrevivência de animais tratados concomitantemente com selênio logo após tratamento com PQ (50 mg/kg) em relação aqueles tratados somente com PQ (Kim *et al.*, 2012).

Durante todo o tratamento, foi mensurado o ganho de massa corpórea dos animais. Não foi encontrada diferença estatística nos 4 grupos de tratamento. Por outro lado, estudos prévios relataram perda de peso de ratos expostos ao PQ (3.5 mg/kg) por 14 dias consecutivos (Malekinejad *et al.*, 2014). Costa e colaboradores (2014) também

observaram perda de peso em ratos tratados com PQ (10 mg/kg), 2 vezes/semana por 14 dias (Costa *et al.*, 2014; Malekinejad *et al.*, 2014). O resultado do presente estudo diverge do resultado encontrado pelos autores supracitados possivelmente por apresentar menor tempo de tratamento, o qual pode ter sido insuficiente para interferir na massa corpórea dos animais.

Os neurônios apresentam sistemas de sinalização de Ca^{2+} altamente desenvolvidos responsáveis pelo desenvolvimento do SNC e regulação das funções neurais (Berridge, 2014). Oscilações das concentrações intracelulares de Ca^{2+} durante o estágio de desenvolvimento neural podem acarretar em alteração dos processos celulares e conseqüentemente dos processos relacionados ao neurodesenvolvimento, tal como crescimento axonal de neurônios corticais e a migração de células neuronais (Berridge, Bootman e Roderick, 2003; Berridge, 2014). Frente a isso, avaliou-se o efeito do tratamento *in vivo* com PQ e com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos pré-púberes. Os resultados mostraram que o PQ induz aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo e o co-tratamento com *I. paraguariensis* não evitou esta alteração. Em trabalhos anteriores também foram descritas perturbações da homeostase do Ca^{+2} em miócitos ventriculares de ratos tratados com PQ (10 mg/kg) diariamente durante 3 semanas (Fahim *et al.*, 2013).

Receptores NMDA ativados permitem o influxo de Ca^{+2} , que em excesso pode ativar uma variedade de cascatas potencialmente destrutivas. Este evento pode ocorrer devido a excitotoxicidade causada pela estimulação prolongada do glutamato, uma vez que este apresenta sua captação diminuída no grupo PQ. Neste contexto, o glutamato em excesso na fenda sináptica (possivelmente por uma diminuição da captação - como observado neste trabalho, ou por estímulo de seu efluxo (Shimizu *et al.*, 2003), pode superativar seus receptores (principalmente os ionotrópicos, como o NMDA), promovendo um aumento no influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular (Danbolt, 2001).

A captação de glutamato do ambiente externo por meio dos transportadores deve ocorrer rapidamente para que o processo acima descrito seja evitado (Erecińska e Silver, 1990). No presente estudo demonstrou-se que a exposição sub-crônica (5 dias consecutivos) ao PQ causou diminuição da captação de ^{14}C -glutamato dependente de sódio com conseqüente aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Entretanto, o co-tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* mostrou-se eficaz em restaurar a captação de ^{14}C -glutamato estimulada por PQ, sem

interferir no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Salienta-se ainda que o extrato BuOH de *I. paraguariensis* apresentou efeito *per se* acarretando em diminuição da captação de glutamato sem interferir no influxo de Ca^{2+} . Novos experimentos são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais a associação entre PQ e extrato BuOH de *I. paraguariensis* restaura a captação de glutamato às concentrações basais.

Um estudo recente demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* (0.01 mg/kg, por via oral) apresenta efeito tipo-antidepressivo dependente da modulação de receptores NMDA (Ludka *et al.*, 2015), corroborando os resultados do presente estudo que sugere a participação do sistema glutamatérgico no efeito do extrato BuOH de *I. paraguariensis*. Nossos resultados também estão de acordo com outros grupos que demonstraram a morte de neurônios do grânulo cerebelar quando tratados com PQ (0.2 mM, 24h); porém, ao suplementar o meio de incubação com bloqueadores dos receptores ionotrópicos para glutamato as células apresentaram-se completamente protegidas do efeito tóxico deste herbicida. Tal achado mostra que a morte celular foi induzida pela ação do glutamato em seus receptores, os quais permitem um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , também demonstrado no mesmo estudo (Stelmashook, Isaev e Zorov, 2007).

Considerando estes dados, também se investigou o efeito da exposição ao PQ e ao extrato BuOH de *I. paraguariensis* isolados ou em associação na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo deste importante aminoácido excitatório, como a GS e as aminotransferases - ALT e AST.

A atividade da GS apresentou-se diminuída em todos os grupos quando comparada ao grupo controle. Esta enzima é exclusivamente astrocitária e faz a conversão de glutamato a glutamina, sendo importante no ciclo glutamato/glutamina. A diminuição de sua atividade pode ser decorrente da captação reduzida do neurotransmissor, ou seja, estando em menor quantidade no meio intracelular conseqüentemente haverá menos substrato para a enzima. A menor captação de glutamato ocorreu tanto no grupo PQ quanto no grupo *I. paraguariensis*, corroborando com a menor atividade da GS encontrada nestes grupos. A diminuição da atividade da GS também foi observada em ratos induzidos a epilepsia (Swamy *et al.*, 2011).

A exposição *in vivo* com PQ provocou aumento da atividade das aminotransferases (ALT e AST), sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* eficaz para prevenir parcialmente o efeito do PQ na atividade da ALT. Por outro lado, nosso grupo de pesquisa encontrou

diminuição da atividade destas enzimas após tratamento *in vitro* com outra classe de herbicida, o glifosato-Roundup®, também em hipocampo de ratos imaturos (Cattani *et al.*, 2014). Além disso, o grupo também demonstrou recentemente que a exposição materna ao etanol acarreta em indução da atividade da AST no hipocampo da prole (Cesconetto *et al.*, 2016). Neste contexto, sugere-se que diferentes compostos neurotóxicos, incluindo herbicidas e etanol, podem afetar o metabolismo do glutamato em células hipocampais de ratos. Alterações da atividade das aminotransferases podem implicar em desbalanço da produção de intermediários do ciclo de Krebs e na síntese de neurotransmissores, como o glutamato.

A glicólise e o ciclo de Krebs funcionam como a via central na produção de energia; entretanto, este último também está relacionado com vias de biossínteses, como a síntese do glutamato e outros neurotransmissores. As reações de reposição (anaplerose) e de utilização (cataplerose) dos intermediários do ciclo de Krebs devem ocorrer de maneira homeostática e diversas enzimas participam deste processo, tais como a ALT, AST, piruvato carboxilase, enzima málica, glutamato desidrogenase, dentre outras (Sonnewald, 2014).

O aumento da atividade da ALT, a qual em neurônios glutamatérgicos esta mais envolvida na síntese do glutamato (Zigmond *et al.*, 1999), pode implicar no aumento da disponibilidade de glutamato nas células neurais. Por outro lado, sua atividade aumentada em astrócitos, os quais caracterizam-se por serem mais responsáveis pelas reações anapleróticas, quando comparados aos neurônios (Sonnewald, 2014) pode estar ocorrendo como uma tentativa de reabastecer o ciclo de Krebs para aumentar a produção de energia, uma vez que esta está diminuída após exposição ao PQ (ver adiante).

A enzima AST, faz a interconversão de oxalacetato e glutamato a aspartato e α -cetoglutarato, apresenta K_m igual tanto para o oxalacetato quanto para o glutamato, por outro lado, o K_m para α -cetoglutarato é maior do que para aspartado, o que pode explicar sua atividade ser favorecida para a formação de aspartado. Devido a estas propriedades cinéticas, a AST está mais relacionada ao metabolismo energético do que ao metabolismo dos neurotransmissores (Erecińska e Silver, 1990). O aumento de sua atividade, encontrado no hipocampo dos animais expostos ao PQ, pode ser um mecanismo compensatório frente a baixa captação de glicose observada neste tecido.

A captação de glicose apresentou-se diminuída no grupo PQ tendo o tratamento com *I. paraguariensis* participado parcialmente da

prevenção deste efeito. Shibata e colaboradores (2010) também observaram diminuição da captação de glicose em cultura de adipócitos tratados com PQ (10 mM; 3 h) (Shibata *et al.*, 2010). Tais células apresentam transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT4), os quais são diferentes dos transportadores presentes no SNC (GLUT1 e GLUT3). Porém, a indução de estresse oxidativo causada pelo PQ poderia interferir também com estas outras isoformas de transportadores de glicose. Em um modelo de camundongos obesos com síndrome metabólica, o extrato aquoso de *I. paraguariensis* (100 mg/kg) também foi eficaz para melhorar a captação de glicose celular (Hussein *et al.*, 2011).

O fornecimento constante de glicose para o cérebro é importante não somente para a produção de energia mas também para a síntese de neurotransmissores, como o glutamato e para a manutenção do gradiente iônico (Erecińska e Silver, 1990). A diminuição da captação de glicose pode indicar um déficit no metabolismo basal das células neurais.

Há evidências de que o metabolismo oxidativo neuronal depende do lactato derivado dos astrócitos (Sonnewald, 2014). Frente a isso, foi investigada a atividade da LDH, enzima responsável interconversão de lactato e piruvato. A atividade desta enzima mostrou-se aumentada apenas no grupo exposto ao PQ, sendo a *I. paraguariensis* eficaz na prevenção deste efeito.

Sabe-se que os astrócitos e neurônios apresentam isoformas diferentes de LDH, os neurônios contêm predominantemente LDH-1 (principalmente produtora de piruvato), enquanto que os astrócitos expressam LDH-5 (associada à tecidos de alta produção de lactato) (Pellerin *et al.*, 1998). Apesar de não ter sido investigada a atividade específica destas isoformas, sugere-se que o aumento da atividade da LDH no grupo PQ é também um mecanismo compensatório ao deficit energético decorrente da captação de glicose diminuída neste grupo. Portanto, sugere-se que a atividade aumentada desta enzima no hipocampo esteja favorecendo a formação de lactato nos astrócitos, que pode ser lançado ao meio extracelular, uma vez captado pelos neurônios, pode ser convertido a piruvato.

A neurotoxicidade induzida por pesticidas, etanol, doenças neurodegenerativas, bem como por outras situações patológicas, está geralmente associada a excitotoxicidade glutamatérgica, alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge,

John, 2007; Zamoner e Pessoa-Pureur, 2011; Cattani *et al.*, 2013; Cattani *et al.*, 2014; Cesconetto *et al.*, 2016).

Sendo a produção exacerbada de radicais livres o principal mecanismo de patogenicidade do herbicida PQ, este trabalho investigou a presença de dano oxidativo à proteínas e lipídios por meio da quantificação de proteínas carboniladas e lipoperoxidação. Foi observado aumento da peroxidação lipídica no grupo PQ, sem proteção no grupo que recebeu co-tratamento com *I. paraguariensis*. O aumento da peroxidação lipídica já foi demonstrado previamente em animais expostos ao PQ (dose única de 50 mg/kg/30 mg/kg e 20 mg/kg, via intraperitoneal, respectivamente) (Kim *et al.*, 2012; Novaes *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Por outro lado, outros estudos demonstraram efeito protetor de *I. paraguariensis* frente insultos pró oxidativos em outros tecidos de animais. Barg e colaboradores (2014) demonstraram menor formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na pele de ratos expostos a radiação UV por 30 min após receberam tratamento tanto oral quanto tópico de extrato aquoso de *I. paraguariensis* (0.70 g/kg e 1g de gel - 5%, p:p) (Barg *et al.*, 2014). A menor concentração de TBARs em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos induzidos a ataques convulsivos também foi observada quando os animais foram pré-tratados com extrato aquoso de *I. paraguariensis* (50mg/kg) durante 15 dias (Branco *et al.*, 2013). Tais trabalhos diferem em alguns aspectos do presente estudo, ambos utilizaram extrato bruto/aquoso de *I. paraguariensis*, enquanto o presente estudo utilizou o extrato BuOH, tais extratos apresentam composições químicas diferentes, assim como o tempo de tratamento também foi diferente. Os mesmos autores relatados acima encontraram menor carbonilação de proteínas, o que, por sua vez, corrobora com os resultados do presente estudo – o qual apresentou menor quantidade de proteínas carboniladas no grupo que recebeu *I. paraguariensis* quando comparado às concentrações basais. O tratamento sub-crônico com PQ não induziu a formação de proteínas carboniladas no hipocampo, diferente do que foi observado por Novaes e colaboradores (2012) em tecido pulmonar de ratos expostos a uma única dose de PQ (30 mg/kg, intraperitoneal).

O dano oxidativo pode levar a lesão tecidual e, pode resultar em doenças crônicas, tais como doenças neurodegenerativas. Assim, sistemas que repararam e substituem biomoléculas oxidadas são essenciais. Falhas nestes sistemas de defesa contribuem para a neurodegeneração (Halliwell, 2006). Diversas enzimas contribuem para

a manutenção da homeostase redox celular, assim como há uma cooperação mediada por astrócitos para a neuroproteção. Frente a isso, o presente estudo buscou investigar possíveis alterações na atividade de enzimas antioxidantes, tal como a SOD, catalase, GPx, GR, GST, bem como concentrações do antioxidante não enzimático GSH. Além disso, foram determinadas as atividades de enzimas envolvidas indiretamente com o processo de neutralização das EROs, tais como a G6PD e a GGT.

As enzimas SOD e catalase apresentaram atividade aumentada no grupo exposto ao PQ, sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* eficaz para prevenir o efeito do herbicida na atividade da SOD. Sugere-se que atividade elevada de enzimas antioxidantes pode ser importante para detoxificar as EROs geradas durante a ciclagem redox de PQ e quando este interage com a cadeia de transporte de elétrons, indicando que o PQ poderia desencadear respostas adaptativas. Fahim e colaboradores (2013) também demonstraram aumento na atividade da SOD e da catalase em tecido cardíaco de ratos expostos diariamente ao PQ (30 mg/kg) por 3 semanas e quando co-tratados com vitamina E a atividade das enzimas permaneceu aumentada (Fahim *et al.*, 2013).

A indução da atividade da SOD também foi observada no presente estudo no grupo de animais tratados apenas com *I. paraguariensis*, tal achado foi previamente demonstrado por Branco e colaboradores (2013) em córtex cerebral e nenhuma diferença foi encontrada em hipocampo de ratos tratados com infusão de erva-mate (50mg/kg) por 15 dias. A erva-mate é uma planta rica em polifenóis (Bixby *et al.*, 2005; Heck e De Mejia, 2007; Branco *et al.*, 2013), que são antioxidantes naturais importantes. Os compostos fenólicos podem evitar a geração de EROs por quelar oligoelementos envolvidos na produção de radicais livres, neutralizar as espécies reativas e/ou regular as defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Nenhum efeito foi observado na atividade da GPx em todos os grupos de tratamento, o que pode ser explicado pelo aumento da atividade da catalase no grupo PQ e no grupo que recebeu co-tratamento com *I. paraguariensis*. Ambas enzimas coincidem pelo mesmo substrato, porém apresentam características cinéticas distintas, sendo a catalase mais importante sob altas concentrações de H₂O₂ devido a sua baixa afinidade pelo H₂O₂ (Km = 25 mM) contra Km = 6 µM da GPx, a qual é mais importante sob baixas concentrações de peróxido (Halliwell e Gutteridge, 1999). Frente a isso, sugere-se que a alta atividade da catalase induzida por PQ no presente estudo seja decorrente da alta formação de superóxido e, conseqüentemente, peróxido de hidrogênio.

Baud e colaboradores (2004) descreveram uma cooperação existente entre a GPx e a catalase em oligodentrócitos, no qual, sob elevadas concentrações de H₂O₂ a catalase é dependente da atividade da GPx para prevenir sua inativação, que pode ocorrer sob estas condições (Baud *et al.*, 2004). Tal achado pode explicar a manutenção da atividade da GPx observada no grupo PQ, o qual serviria como mecanismo de resistência ao ambiente pró oxidativo ocasionado pelo PQ.

A atividade da GR mostrou-se aumentada no grupo PQ e o co-tratamento com *I. paraguariensis* preveniu parcialmente a atividade desta enzima. Alguns estudos anteriores demonstram diminuição da atividade da enzima GR em tecido nigroestriatal, pulmão e fígado de ratos expostos ao PQ (Kumar *et al.*, 2010). Associados à indução na atividade da GR pelo PQ, os resultados do presente estudo demonstraram aumento nas concentrações de GSH. Corroborando os resultados obtidos, estudos prévios demonstraram aumento compensatório nas concentrações de GSH alguns dias após a exposição a efluentes industriais em peixes (Lima *et al.*, 2006; Grinevicius *et al.*, 2009).

Foi observada diminuição da atividade da enzima GST no grupo exposto ao PQ e o co-tratamento com *I. paraguariensis* reestabeleceu parcialmente esta alteração. O mesmo achado foi descrito por Costa e colaboradores (2013) em tecido hepático de ratos expostos a uma única dose de PQ (15 mg/kg) (Costa *et al.*, 2013). A enzima GST cataliza a detoxificação de xenobióticos por meio da conjugação destes compostos com biomoléculas endógenas, tais como a GSH. Neste contexto, a diminuição da atividade desta enzima pode ter contribuído também para o aumento no conteúdo de GSH. A inibição desta enzima induzida por PQ poderia implicar no acúmulo deste composto. Os resultados do presente estudo mostram que o extrato BuOH de *I. paraguariensis* não altera a atividade da GST, o que está de acordo com estudo prévio no qual a atividade desta enzima permaneceu inalterada após tratamento com extrato aquoso de *I. paraguariensis* em aorta de coelhos alimentados com colesterol. No referido estudo, o grupo demonstrou o efeito benéfico do extrato de *I. paraguariensis* atenuando a progressão da aterosclerose nesses animais (Mosimann, Wilhelm-Filho e Da Silva, 2006).

A homeostase das concentrações neuronais de GSH é dependente do fornecimento de seus aminoácidos constituintes pelos astrócitos, tal cooperativismo entre astrócitos e neurônios é dependente da atividade da enzima GGT, a única enzima que pode clivar a glutatona intacta (Rathinam *et al.*, 2012). A atividade desta enzima

apresentou-se diminuída no grupo exposto ao PQ, sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* eficaz na prevenção parcial desta alteração. A inibição na atividade da GGT associada à neurotoxicidade foi demonstrada previamente pelo nosso grupo de pesquisa após exposição materna ao etanol (Cesconetto *et al.*, 2016) e ao herbicida glifosato-Roundup® (Cattani *et al.*, 2014).

A G6PD é a enzima limitante da velocidade da via das pentoses-fosfato, a principal via de fornecimento de NADPH, necessário em vias antioxidantes. Sua atividade mostrou-se diminuída no grupo exposto ao PQ sendo o co-tratamento com *I. paraguariensis* eficaz para reestabelecer este marcador, o qual tem sido referido como integrante do sistema de defesa antioxidante.

A modulação da expressão e da atividade da G6PD já foi previamente relacionada ao mecanismo de toxicidade do PQ e ao estresse oxidativo (Lei *et al.*, 2014). Em trabalhos anteriores, tal atividade enzimática mostrou-se aumentada em glândula digestiva de mexilhão *Perna perna* expostos ao PQ (10 ppm; 48h) (Dafre *et al.*, 2004), em cultura de células de neuroblastoma humano (Lei *et al.*, 2014) assim como em tecido pulmonar de ratos (Ali, Diwakar e Pawa, 2000). A expressão da mesma enzima também se mostrou aumentada em neurônios dopaminérgicos tratados com PQ (0.5 mM; 24h) (Lei *et al.*, 2014). Alterações nesta via podem comprometer a reciclagem de NADP⁺ a NADPH e, conseqüentemente, a homeostase redox das células.

Frente aos diversos parâmetros investigados neste estudo, todos eles relacionados, de maneira direta ou indireta, com o estado redutor/oxidativo da célula, o extrato BuOH de *I. paraguariensis* pareceu exercer efeito protetor total ou parcial em mais de 60% do total de parâmetros analisados, considerando 100% os parâmetros avaliados nos quais o PQ provocou alterações.

Alguns autores defendem que quando compostos fenólicos, os quais estão presentes na fração do extrato estudado, são oxidados por reações com radicais livres, o resultado é a formação de quinonas eletrofílicas que estão envolvidas em vias de transdução de sinais. Tais vias ativam o sistema antioxidante celular e os sistemas de reparo a danos (Forman, Davies e Ursini, 2014). Tal mecanismo pode explicar o efeito protetor observado no grupo de animais que recebeu co-tratamento com *I. paraguariensis*. Mais do que um efeito antioxidante, o qual, por definição, limita-se a eliminação de radicais livres, o extrato BuOH de *I. paraguariensis* parece enquadrar-se melhor na definição de

um composto nutracêutico. Tal termo foi designado por Stephen DeFelice em 1989 (Kalra, 2003), para definir um grupo de compostos extraídos de alimentos ou plantas que fornecem benefícios médicos ou para a saúde. Tais compostos exercem atividade antioxidante *in vivo* por modularem as defesas antioxidantes endógenas, como as enzimas antioxidantes (Forman, Davies e Ursini, 2014).

Além das propriedades benéficas de *I. paraguariensis* encontradas neste estudo, grande parte dos parâmetros avaliados mostraram-se alterados com a exposição aguda ao PQ, os quais podem induzir danos ao hipocampo causados provavelmente pela promoção de estresse oxidativo. Os efeitos dos agroquímicos devem ser estudados com intuito de conhecer seu real risco à saúde humana, além de estabelecer quantidades seguras de modo a minimizar estes riscos.

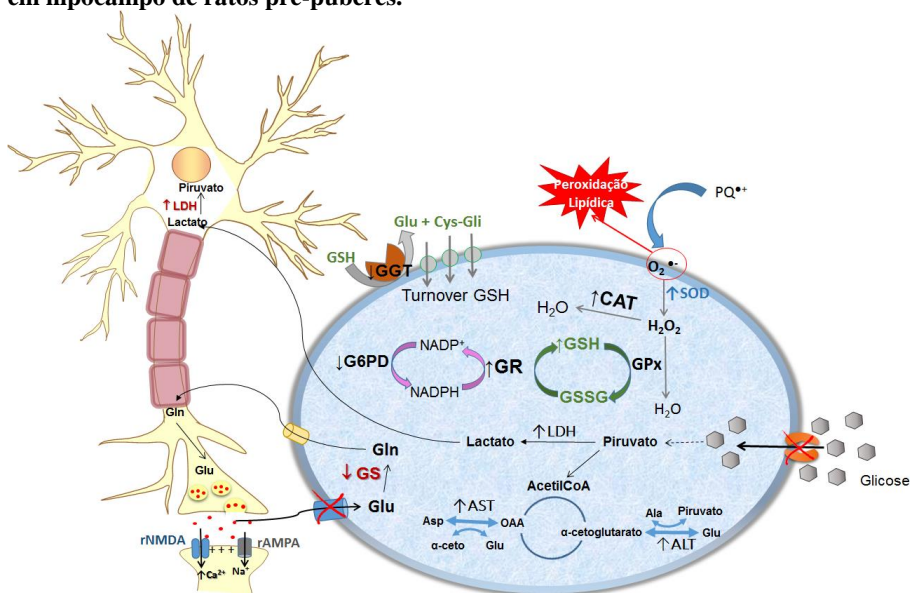
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando os resultados apresentados, sugerimos que o extrato BuOH de *I. paraguariensis* atua como agente neuroprotetor, total ou parcial, frente ao estresse oxidativo induzido pelo herbicida PQ. Este estudo demonstrou que os efeitos decorrentes da exposição sub-crônica ao PQ, em hipocampo de ratos pré-puberes, envolvem a diminuição da captação de glutamato, com consequente aumento no influxo de Ca^{2+} , fenômeno conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica que pode resultar em comprometimento nos processos de aprendizagem e memória.

Uma vez captado pelos astrócitos, o glutamato pode seguir diversas rotas. Nos animais expostos ao PQ observou-se uma diminuição na atividade da GS, o que pode indicar comprometimento do ciclo glutamato-glutamina. Observou-se também aumento da atividade das aminotransferases ALT e AST, que dependendo de onde estão localizadas (neurônios ou astrócitos) participam da formação de glutamato ou das reações de anaplerose, que reabastecem o ciclo de Krebs para aumentar a produção de energia, uma vez que esta estaria diminuída após exposição ao PQ. O aumento da atividade destas enzimas pode indicar comprometimento do metabolismo energético e/ou maior formação do neurotransmissor glutamato, uma vez que este não está sendo adequadamente captado pelas células da glia e, conseqüentemente, o ciclo glutamato-glutamina pode estar comprometido.

A exposição ao PQ levou também à diminuição na captação de glicose pelas células neurais, o que pode gerar déficit energético acarretando em possível utilização do neurotransmissor glutamato como substrato para intermediários do ciclo de Krebs. Além disso, observa-se que a exposição ao PQ induz ao aumento na atividade da enzima LDH. Este pode ser considerado um mecanismo compensatório para gerar mais lactato nos astrócitos e mais piruvato nos neurônios, numa tentativa de reestabelecer o metabolismo energético. Além das alterações no sistema glutamatérgico e no metabolismo energético, foram encontradas indução de estresse oxidativo com alteração da atividade das enzimas antioxidantes e consequente dano oxidativo a lipídeos, conforme apresentado esquematicamente na Figura 28.

Figura 28: Aspectos neuroquímicos da neurotoxicidade induzida pelo PQ em hipocampo de ratos pré-púberes.



Possíveis efeitos neuroquímicos da exposição *in vivo* ao PQ em hipocampo de ratos pré-púberes. O mecanismo de toxicidade do PQ, por meio da ciclagem redox, envolve a produção de radical ânion superóxido, que leva à peroxidação lipídica; e induz a atividade das enzimas SOD e catalase – responsáveis por sua detoxificação. O aumento das concentrações de GSH pode ser compensatório ao insulto sub-crônico e decorrente da indução da atividade da GR, mesmo com a inibição da GGT. A exposição *in vivo* ao PQ também resulta na diminuição do transporte de glicose para as células neurais associado a um aumento

compensatório na atividade da LDH e das aminotransferases, numa tentativa de reestabelecer a homeostase energética. Os efeitos neurotóxicos do PQ também envolvem a diminuição da captação de glutamato pelos astrócitos, aumentando as concentrações do neurotransmissor na fenda sináptica, o que resulta no aumento do influxo de Ca^{+2} . A inibição da GS é, provavelmente, decorrente da captação de glutamato diminuída, o que pode levar a um comprometimento do ciclo glutamato-glutamina. Desregulação do sistema glutamatérgico e do metabolismo energético pode levar a um comprometimento da neurotransmissão glutamatérgica, déficit energético e estresse oxidativo.

Fonte: O autor, 2015.

Frente às alterações neuroquímicas induzidas pelo PQ, o extrato BuOH de *I. paraguariensis* mostrou-se atuar como agente neuroprotetor, de forma total ou parcial, em parâmetros do metabolismo energético (captação de glicose, atividade da LDH e da ALT) na captação de glutamato, além de restaurar os sistemas de defesa antioxidante afetados pelo PQ, como a prevenção da alteração da atividade da G6PD, SOD, GGT e concentração de GSH.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos ao longo desta pesquisa, conclui-se que a exposição sub-crônica ao PQ durante o estágio de neurodesenvolvimento induz a diversas alterações neuroquímicas no hipocampo de ratos pré-púberes. Tais alterações incluem desregulação no metabolismo do glutamato, comprometimento do metabolismo energético e estresse oxidativo. O co-tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis* exerceu efeito neuroprotetor, total ou parcial, em 60% dos parâmetros analisados.

A indução de modificações no metabolismo energético, na neurotransmissão e a indução de estresse oxidativo hipocampal pela exposição ao herbicida PQ, sugere que esta é uma neurotoxina importante que pode comprometer os processos de aprendizado e memória. O estudo da toxicidade deste agroquímico é de fundamental importância para se conhecer quantidades seguras durante a exposição ocupacional assim como a quantidade de resíduo nos alimentos que não ofereça riscos à saúde da população. A investigação do potencial terapêutico de compostos naturais como a erva-mate, a qual é culturalmente consumida pela população da região Sul do Brasil, é de grande relevância científica.

Considerando-se que no Brasil as regiões de maior consumo de erva-mate coincidem com as áreas de maior produtividade agrícola e consumo de agroquímicos, investigar o potencial terapêutico dessa planta, amplamente utilizada na cultura popular, representa relevância científica. Apoiado nos resultados do presente estudo, sugere-se que o alto consumo de erva-mate (chimarrão, chá, tererê) possa estar minimizando os danos potencialmente causados por agroquímicos na população do Sul e Centro-Oeste brasileiro.

9. PERSPECTIVAS

Dando continuidade a este estudo pretende-se melhor entender as alterações induzidas pelo PQ, bem como o efeito neuroprotetor ocasionado pelo co-tratamento com o extrato BuOH de *I. paraguariensis*, investigando-se os seguintes parâmetros:

- ✓ Marcadores bioquímicos no sangue periférico dos animais, como a glicemia, marcadores de dano hepático e marcadores de dano renal;
- ✓ Atividade de enzimas envolvidas nos processos digestivos como as dissacaridases, aminopeptidases e GGT;
- ✓ Marcadores inflamatórios, como o conteúdo de citocinas como as interleucinas, fator de necrose tumoral-alfa e interferon gama.
- ✓ Alterações comportamentais induzidas pela exposição ao PQ no período pré-púbere quando os animais atingirem a idade adulta.

Pretende-se também esclarecer os mecanismos/vias de sinalização pelos quais o extrato BuOH de *I. paraguariensis* restaura a captação de glutamato a concentrações basais, assim como seu efeito *per se* que levou à diminuição da captação de glutamato e ao aumento da atividade da AST. Além disso, será investigado o envolvimento do fator de transcrição Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor-2*) na neuroproteção ocasionada por *I. paraguariensis*.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Resolução RDC n. 10 de 22 de fevereiro de 2008. Que estabelece a reavaliação toxicológica de 14 agrotóxicos. Brasília, DOU de 28/02/2008.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2012. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 16 de maio de 2015.

ANVISA. 2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação, 11/04/2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>, acessado em 10/06/2015.

ANVISA. Histórico de Alterações de Monografias, atualizado em 24/09/2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>, acessado em 02/12/2015.

IBAMA. Boletins Anuais. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>, acessado em 16/06/2015.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas; *Anais do Workshop*: Mercado Brasileiro de Fitossanitários; Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de Agrotóxicos. Brasília: 2009.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Dados de produção e consumo de agrotóxicos. Disponível em www.sindag.com.br acessado em 20/06/2011.

IBGE, Produção Agrícola Municipal, 2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=44 Acesso em 07 ago. 2015.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

AGRA, N. G.; SANTOS, R. F. **Agricultura Brasileira: Situação atual e perspectivas de desenvolvimento**. Recife, PE: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural 2001.

ALBERGONI, L.; PELAEZ, V. **Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas?** Revista de Economia. Curitiba: Editora UFPR. 33: 31-53 p. 2007.

ALI, S.; DIWAKAR, G.; PAWA, S. Paraquat induces different pulmonary biochemical responses in Wistar rats and Swiss mice. **Chem Biol Interact**, v. 125, n. 2, p. 79-91, Mar 2000. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699569> >.

ALMEIDA, G. L. et al. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1506-1512, 2007.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J Hum Nutr Diet**, v. 14, n. 3, p. 243-50, Jun 2001. ISSN 0952-3871. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424516> >.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 335, n. 2, p. 110-5, Mar 2011. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238540> >.

AUGUSTO, L. G. S. et al. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade**. Rio de Janeiro: ABRASCO: 140 p. 2012.

BALDI, I. et al. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 5, p. 409-14, Mar 2003. ISSN 0002-9262. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615605> >.

BALSAN, R. IMPACTOS DECORRENTES DA MODERNIZAÇÃO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Revista de geografia agrária**, v. 1, n. 2, p. 123-151, 2006.

BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. **Toxicol Lett**, v. 230, n. 2, p. 85-103, Oct 2014. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503016> >.

BANNAI, S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 261, n. 5, p. 2256-63, Feb 1986. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2868011> >.

BARG, M. et al. Evaluation of the protective effect of Ilex paraguariensis and Camellia sinensis extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 1, p. 195-201, Jan 2014. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361697> >.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 3, p. 205-14, Mar 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031734> >.

BARROS, J. D. D. S.; SILVA, M. D. F. P. D. PRÁTICAS AGRÍCOLAS SUSTENTÁVEIS COMO ALTERNATIVAS AO MODELO HEGEMÔNICO DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA. **SOCIEDADE E DESENVOLVIMENTO RURAL**, v. 4, n. 2, p. 89-103, 2010.

BASTOS, D. H. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (Ilex paraguariensis) and green tea (Camellia sinensis)

extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-32, 2007. ISSN 1420-3049.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851401> >.

BAUD, O. et al. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. **J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1531-40, Feb 2004. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973232> >.

BERRIDGE, M. J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1742, n. 1-3, p. 3-7, Dec 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590051> >.

BERRIDGE, M. J. Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. **J Physiol**, v. 592, n. Pt 2, p. 281-93, Jan 2014. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23753528> >.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 517-29, Jul 2003. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838335> >.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2000. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413485> >.

BERRY, C.; LA VECCHIA, C.; NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 7, p. 1115-25, Jul 2010. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094060> >.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-8, May 1963. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13967893> >.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727668> >.

BIXBY, M. et al. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 345-58, Jun 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878361> >.

BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A. C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radic Res**, v. 48, n. 6, p. 623-40, Jun 2014. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24593876> >.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534-41, Dec 1983. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320728> >.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 378-84, Jul 2011. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599603> >.

BRANCO, C. O. S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Res Bull**, v. 92, p. 60-8, Mar 2013. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270878> >.

BRAVO, L. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (Ilex paraguariensis) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219-29, Jan 2014. ISSN 1873-6971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291756> >.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 951-

65, Nov 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569628> >.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985. ISSN 0076-6879. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003504> >.

CARNEIRO, F. F. et al. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.** Rio de Janeiro: 88 p. 2012.

CASTRO, M. A. et al. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. **J Neurochem**, v. 110, n. 2, p. 423-40, Jul 2009. ISSN 1471-4159. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457103> >.

CATTANI, D. et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, JUN 5 2014 2014. ISSN 0300-483X.

CATTANI, D. et al. **Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats.** Molecular and Cellular Endocrinology: Elsevier. 375: 14-26 p. 2013.

CESCONETTO, P. A. et al. Maternal Exposure to Ethanol During Pregnancy and Lactation Affects Glutamatergic System and Induces Oxidative Stress in Offspring Hippocampus. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 1, p. 52-61, Jan 2016. ISSN 1530-0277. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727523> >.

CHEN, Q. et al. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: involvement of oxidative stress. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 3, p. 310-6, Jun 2010. ISSN 1872-9711. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211647> >.

CHEN, Y. et al. Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. **Food Chem Toxicol**,

v. 58, p. 133-40, Aug 2013. ISSN 1873-6351. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603004>>.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E.
Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned
from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacol Sci**, v. 30,
n. 9, p. 475-83, Sep 2009. ISSN 1873-3735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729209>>.

COELHO, G. C. et al. Quantification of saponins in extractive solution
of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **J Med Food**, v. 13, n. 2,
p. 439-43, Apr 2010. ISSN 1557-7600. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170360>>.

COSTA, A. P. et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the
okadaic acid-induced model of dementia. **Behav Brain Res**, v. 226, n.
2, p. 420-7, Jan 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982813>>.

COSTA, K. M. et al. Pharmacological inhibition of CXCR2 chemokine
receptors modulates paraquat-induced intoxication in rats. **PLoS One**, v.
9, n. 8, p. e105740, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153082>>.

COSTA, M. D. et al. Diphenyl diselenide prevents hepatic alterations
induced by paraquat in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 3, p.
750-8, Nov 2013. ISSN 1872-7077. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958967>>.

DAFRE, A. L. et al. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in
the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and
paraquat. **Chem Biol Interact**, v. 149, n. 2-3, p. 97-105, Oct 2004.
ISSN 0009-2797. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501432>>.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-
105, Sep 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436>>.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma**. Guaíba, RS: Livraria e Editora Agropecuária: 157 p. 1999.

EICHENBAUM, H. Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 732-44, Nov 2014. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25269553> >.

EID, T. et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. **Lancet**, v. 363, n. 9402, p. 28-37, Jan 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723991> >.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v. 35, n. 4, p. 245-96, 1990. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1980745> >.

FAHIM, M. A. et al. Vitamin E ameliorates the decremental effect of paraquat on cardiomyocyte contractility in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57651, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526948> >.

FARIA, N. M.; FASSA, A. G.; MEUCCI, R. D. Association between pesticide exposure and suicide rates in Brazil. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 355-62, Dec 2014. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875485> >.

FEI, Q.; ETHELL, D. W. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members. **J Neurochem**, v. 105, n. 6, p. 2091-7, Jun 2008. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266926> >.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659> >.

FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J.; URSINI, F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 24-35, Jan 2014. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747930> >.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. **J Mol Cell Cardiol**, v. 73, p. 2-9, Aug 2014. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512843> >.

FRANCO, R. et al. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 289-300, Nov 2010. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542017> >.

GATTO, E. M. et al. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. **J Neurol Sci**, v. 356, n. 1-2, p. 163-7, Sep 2015. ISSN 1878-5883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26148934> >.

GORZALCZANY, S. et al. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **J Ethnopharmacol**, v. 75, n. 2-3, p. 291-4, May 2001. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297866> >.

GRINEVICIUS, V. M. et al. Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 57, n. 2, p. 307-14, Aug 2009. ISSN 1432-0703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052797> >.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Arch Biochem Biophys**, v. 175, n. 2, p. 710-6, Aug 1976. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/958327> >.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805774> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Antioxidant defence enzymes: the glutathione peroxidase family**. 3. Oxford, UK: Oxford, UP, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 2007. 888 ISBN 019856869X.

HANIGAN, M. H. gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. **Chem Biol Interact**, v. 111-112, p. 333-42, Apr 1998. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679564> >.

HARTLEY, T. et al. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1635, p. 20120510, Feb 2014. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366125> >.

HE, Y. et al. Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death. **Glia**, v. 58, n. 6, p. 741-54, Apr 2010. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140959> >.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, v. 72, n. 9, p. R138-51, Nov 2007. ISSN 1750-3841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034743> >.

HUSSEIN, G. M. et al. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 88-97, Dec 2011. ISSN 1618-095X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018902> >.

HÄBERLE, J. et al. Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. **Mol Genet Metab**, v. 103, n. 1, p. 89-91, May 2011. ISSN 1096-7206. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353613> >.

KALRA, E. K. Nutraceutical--definition and introduction. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 3, p. E25, 2003. ISSN 1522-1059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14621960> >.

KIM, K. S. et al. Antioxidant effects of selenium on lung injury in paraquat intoxicated rats. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 50, n. 8, p. 749-53, Sep 2012. ISSN 1556-9519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924652> >.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 2, p. 435-45, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923885> >.

KUMAR, A. et al. Effect of zinc and paraquat co-exposure on neurodegeneration: Modulation of oxidative stress and expression of metallothioneins, toxicant responsive and transporter genes in rats. **Free Radic Res**, v. 44, n. 8, p. 950-65, Aug 2010. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553223> >.

KUTER, K. et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. **Brain Res**, v. 1155, p. 196-207, Jun 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493592> >.

KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 117, n. 1, p. 69-75, Apr 2008. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342465> >.

LEI, S. et al. Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: a specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. **ACS Chem Biol**, v. 9, n. 9, p. 2032-48, Sep 2014. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937102> >.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-78, 1990. ISSN

0076-6879. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978225>>.

LIMA, M. E. et al. Ilex paraguariensis Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10091-104, 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264684>>.

LIMA, P. L. et al. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 50, n. 1, p. 23-30, Jan 2006. ISSN 0090-4341. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247568>>.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA - Assessoria de Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>.

LUDKA, F. K. et al. Ilex paraguariensis hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. **Behav Pharmacol**, Dec 2015. ISSN 1473-5849. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26703367>>.

LÓPEZ-BAYGHEN, E.; ORTEGA, A. Glial glutamate transporters: new actors in brain signaling. **IUBMB Life**, v. 63, n. 10, p. 816-23, Oct 2011. ISSN 1521-6551. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901813>>.

MALEKINEJAD, H. et al. Atorvastatin attenuates the paraquat-induced pulmonary inflammation via PPAR γ receptors: a new indication for atorvastatin. **Pestic Biochem Physiol**, v. 114, p. 79-89, Sep 2014. ISSN 1095-9939. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175654>>.

MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MCCORMACK, A. L. et al. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **J Neurochem**, v. 93, n. 4, p. 1030-7, May 2005. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857406> >.

MCCORMACK, A. L.; DI MONTE, D. A. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. **J Neurochem**, v. 85, n. 1, p. 82-6, Apr 2003. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641729> >.

MIRANDA FILHO, A. L. et al. Brain cancer mortality in an agricultural and a metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil: a population-based, age-period-cohort study, 1996-2010. **BMC Cancer**, v. 14, p. 320, 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24884498> >.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 1972. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623845> >.

MOSIMANN, A. L.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006. ISSN 0951-6433. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614483> >.

NASCIMENTO NETO, F. D. **Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar**. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica: 67-80 p. 2006.

NOVAES, R. D. et al. Bark extract of *Bathysa cuspidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces

mortality in rats. **Int J Exp Pathol**, v. 93, n. 3, p. 225-33, Jun 2012. ISSN 1365-2613. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429505>>.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>>.

PARRÓN, T. et al. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 379-85, Nov 2011. ISSN 1096-0333. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601587>>.

PELLERIN, L. et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Dev Neurosci**, v. 20, n. 4-5, p. 291-9, 1998. ISSN 0378-5866. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778565>>.

PODDER, B.; SONG, H. Y.; KIM, Y. S. Naringenin exerts cytoprotective effect against paraquat-induced toxicity in human bronchial epithelial BEAS-2B cells through NRF2 activation. **J Microbiol Biotechnol**, v. 24, n. 5, p. 605-13, May 2014. ISSN 1738-8872. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561720>>.

PRAKASH, J. et al. Withania somnifera alleviates parkinsonian phenotypes by inhibiting apoptotic pathways in dopaminergic neurons. **Neurochem Res**, v. 39, n. 12, p. 2527-36, Dec 2014. ISSN 1573-6903. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403619>>.

PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 685-93, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890013>>.

RATHINAM, M. L. et al. Astrocyte mediated protection of fetal cerebral cortical neurons from rotenone and paraquat. **Environ Toxicol**

Pharmacol, v. 33, n. 2, p. 353-60, Mar 2012. ISSN 1872-7077.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301167> >.

REIS, E. E. M. et al. Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 958209, 2014. ISSN 2314-6141.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895633> >.

RIGOTTO, R. et al. **Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Parte 3 - Agrotóxicos, conhecimento científico e popular: construindo a Ecologia de Saberes.** Porto Alegre. 3: 244 p. 2012.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P. Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 750-6, Apr 2013. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416042> >.

SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-37, May 2008. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425072> >.

SANTOS, E. C. et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, Apr 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681522> >.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 7, p. 721-38, Jun 2001. ISSN 0929-8673.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375746> >.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clin Nutr**, v. 24, n. 3, p. 360-6, Jun 2005. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869828> >.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annu Rev Microbiol**, v. 24, p. 501-24, 1970. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4927139> >.

SHIBATA, M. et al. Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 27, p. 20915-25, Jul 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430890> >.

SHIMIZU, K. et al. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. **Brain Res**, v. 976, n. 2, p. 243-52, Jun 2003. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763259> >.

SHIMIZU, K. et al. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Res**, v. 906, n. 1-2, p. 135-42, Jul 2001. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430870> >.

SONNEWALD, U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - where do all the carbons go? **J Neurochem**, v. 131, n. 4, p. 399-406, Nov 2014. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989463> >.

STELMASHOOK, E. V.; ISAEV, N. K.; ZOROV, D. B. Paraquat potentiates glutamate toxicity in immature cultures of cerebellar granule neurons. **Toxicol Lett**, v. 174, n. 1-3, p. 82-8, Nov 2007. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919854> >.

STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 655-69, Oct 2014. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234264> >.

SWAMY, M. et al. Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. **J Physiol Biochem**, v. 67, n. 1, p.

105-13, Mar 2011. ISSN 1877-8755. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960085>>.

TANNER, C. M. et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 866-72, Jun 2011. ISSN 1552-9924. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269927>>.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, Mar 2009. ISSN 1570-159X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721819>>.

VAN DER MARK, M. et al. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 3, p. 340-7, Mar 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389202> >.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R. **Nongenomic Actions of Thyroid Hormones: Every why has a Wherefore. Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**: Bentham Science. 11: 165-178 p. 2011.

ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on 45Ca^{2+} uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 98-103, Jan 2007. ISSN 0168-0102. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067709>>.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 41, n. 5, p. 509-15, Nov 2009. ISSN 1535-4989. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684307>>.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm**, v. 121, n. 8, p. 799-817, Aug 2014. ISSN 1435-1463. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24578174>>.

ZIGMOND, M. J. et al. **Brain Energy Metabolism. In: Fundamental Neuroscience.** 1999.