



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**O SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA COMO ALVO
MOLECULAR NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR MERCÚRIO:
EFEITOS PROTETORES DE COMPOSTOS NATURAIS**

Jeferson Luis Franco

Orientador: Dr. Marcelo Farina

Co-orientador: Dr. Alcir L. Dafré

Florianópolis, Fevereiro de 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**O SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA COMO ALVO
MOLECULAR NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR MERCÚRIO:
EFEITOS PROTETORES DE COMPOSTOS NATURAIS**

Jeferson Luis Franco

Orientador: Dr. Marcelo Farina

Co-orientador: Dr. Alcir L. Dafré

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Florianópolis, Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes últimos quatro anos, muitas pessoas cruzaram meu caminho e tornaram minha vida mais suave e feliz. Deste modo, gostaria de agradecer...

A minha família, minhas duas mães, meus dois pais, minhas irmãs e irmão, meu sobrinho, por todo o amor, carinho, apoio e confiança. Por acreditarem que seria possível ir além do esperado. Querida mãe, isto tudo também é seu.

Ao Professor Alcir, meu orientador e amigo, obrigado pelo exemplo, confiança e ensinamentos. Por ter aberto as portas do laboratório de defesas celulares e me dado a primeira oportunidade. Por abrir mãos da minha orientação no mestrado para que eu pudesse fazer a mudança de nível para o doutorado, minha segunda oportunidade. Conte comigo sempre.

Ao Professor Marcelo, meu orientador e amigo, pela orientação, amizade, confiança e acima de tudo, o exemplo de garra e dedicação. Por ter me dado a liberdade de fazer aquilo que julguei o correto. Muito obrigado.

Ao Professor João, pela orientação durante iniciação científica em Santa Maria, além da amizade, ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à ciência. Agradeço também a Professora Maria Beatriz pela orientação durante este período.

Ao Professor Peter Dunkley pela orientação, apoio e amizade durante meu estágio na Austrália. Obrigado pelos valiosos ensinamentos. Por mostrar que a carreira acadêmica pode ser muito interessante e gratificante.

Ao Professor Phil Dickson pelos ensinamentos sobre tirosina hidroxilase. Pelo grande apoio com os experimentos de HPLC.

Às Doutoradas Larisa Bobrovskaia e Sarah Gordon pelos ensinamentos sobre cultura de células.

Ao Doutor Rick Thorne pelos valiosos ensinamentos sobre citometria de fluxo.

Ao Professor Richard Rodnight pelo exemplo de perseverança e dedicação a ciência.

Aos Professores Rodrigo, Nelson, Carla, Rui, Afonso, Riso, Reinaldo e Calixto, pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, amizade e inúmeras colaborações.

Ao Professor Adair, pela amizade, ensinamentos e incentivo.

Aos professores das disciplinas do Mestrado e Doutorado que colaboraram enormemente para minha formação. Em especial à Professora Mariana pelo exemplo em didática.

Aos colegas Patrícia, Flávia, Rodrigo, Pablo, Vinícius, Manuella, Tiago, Helena, Juliana, às meninas do Lab fosforil, às meninas do Lab do Prof. Marcelo, aos amigos da Fisiologia, aos colegas em Newcastle, e todos aqueles que foram meus companheiros nesta jornada de estudos e trabalho e que não tenho espaço para citar aqui. Muito obrigado.

Aos alunos de iniciação científica, em especial ao Trevisan, Hugo e Marcela, obrigado pela amizade e por permitirem que eu os orientasse.

Aos amigos em Newcastle, em especial Natan e Meggie, Ramatis e Fernanda, Luciana e Andrés. Sem a amizade de vocês a vida do outro lado do mundo teria sido muito menos feliz.

Ao secretário Nivaldo pela paciência e dedicação quanto às questões burocráticas.

Aos membros da banca por terem aceitado avaliar meu trabalho neste período de férias.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPESC pelas bolsas de estudo no Brasil e exterior e o auxílio financeiro.

Sobretudo, não posso deixar de agradecer a Thaís, pelo amor, carinho, amizade e por ter estado ao meu lado em todos os momentos. Você é muito especial.

*Quisera um dia cantar com o povo
Um canto simples de amor e verdade
Que não falasse em misérias nem guerras
Nem precisasse clamar liberdade
Cenair Maicá*

RESUMO

O mercúrio, em suas formas orgânicas e inorgânicas, é um toxicante ambiental capaz de provocar déficits neurológicos severos em animais e humanos. O sistema nervoso em desenvolvimento apresenta uma maior suscetibilidade aos efeitos deletérios induzidos por mercuriais. Neste contexto, exposições durante o período pré-natal e lactacional representam importantes questões do ponto de vista toxicológico. De fato, pouco se conhece a respeito da contribuição lactacional para o desenvolvimento de neurotoxicidade frente a intoxicações com mercuriais. Além disso, não existem tratamentos efetivos capazes de reverter completamente os efeitos tóxicos do mercúrio. No presente estudo, foi demonstrado que a exposição exclusivamente lactacional de camundongos jovens ao metilmercúrio, uma forma orgânica de mercúrio, causou déficits motores que foram correlacionados com um desequilíbrio no estado tiólico cerebelar. Observamos também, que o mercúrio inorgânico causou neurotoxicidade em camundongos expostos a este metal através do leite materno. O cerebelo de animais jovens expostos ao mercúrio inorgânico apresentou uma atividade glutatona redutase aumentada, um efeito que pode estar relacionado a uma resposta de defesa celular frente à ação pró-oxidativa do mercúrio sobre tióis endógenos. Em contrapartida, os camundongos jovens expostos ao metilmercúrio não demonstraram esta resposta, o que aponta para mecanismos moleculares de resposta distintos para as diferentes formas de mercúrio, sendo este fenômeno importante do ponto de vista toxicológico.

O tratamento de animais adultos com metilmercúrio por via oral causou uma diminuição significativa na atividade glutatona peroxidase cerebral, uma enzima primária no processo de detoxificação de peróxidos produzidos endógenamente. Este efeito ocorreu em paralelo a um aumento na proteólise da enzima poli(ADP ribose) polimerase, um índice de apoptose. Em estudos *in vitro*, nossos dados demonstraram uma participação importante do peróxido de hidrogênio como mediador da neurotoxicidade induzida por mercuriais e este fato foi acompanhado por uma marcante inibição da enzima antioxidante glutatona peroxidase mitocondrial. O bloqueio da atividade desta enzima com ácido mercaptosuccínico aumentou o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial induzida pelos mercuriais *in vitro*. A incubação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y com metilmercúrio causou uma diminuição significativa na atividade glutatona peroxidase destas células. Este efeito tornou as células menos eficientes em degradar peróxido de hidrogênio e ocasionou um aumento na expressão de marcadores de dano oxidativo. Além disso, a inibição da glutatona peroxidase com ácido mercaptosuccínico potencializou a perda de viabilidade celular e aumentou significativamente a expressão de marcadores de apoptose.

O tratamento de animais adultos com extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* preveniu os efeitos comportamentais e relacionados ao estresse oxidativo induzidos pelo tratamento com metilmercúrio administrado por via oral. Este efeito se deu provavelmente devido à ação antioxidante do extrato. Em estudos *in vitro*, demonstramos a participação do flavonóide quercetina como um importante mediador da neuroproteção induzida pelo extrato de *Polygala* frente aos efeitos tóxicos do metilmercúrio. Além disso, o flavonóide miricetina também apresentou efeito benéfico contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por metilmercúrio *in vitro*.

Em conclusão, nossos dados apontam para o sistema antioxidante da glutatona como um importante alvo molecular na neurotoxicidade induzida por mercuriais, onde distúrbios no sistema antioxidante, causados por estes agentes, levam a um quadro de estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial e aumentam a expressão de marcadores de morte celular. O extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata*, bem como os flavonóides quercetina e miricetina, representam potenciais agentes neuroprotetores contra a toxicidade induzida por mercuriais.

ABSTRACT

Mercury, in its organic and inorganic forms, is a potent environmental toxicant able to induce neurological deficits in both animals and humans. The developing central nervous system is particularly susceptible to the deleterious effects of mercury compounds. In this regard, mercury exposures during the pre-natal and lactational periods are main factors from a toxicological point of view. In fact, little is known about the exclusive contribution of the lactational exposure to mercury and its relationship with neurotoxicity. In addition, there are no available treatments able to totally block mercurials-induced toxicity. In the present study, we demonstrate that the exposure of young mice to methylmercury, an organic form of mercury, exclusively via maternal milk induces motor deficits associated with disturbs in the cerebellar thiol homeostasis. We also show that inorganic mercury caused neurotoxicity by exposure of young mice exclusively through the lactational route. The pups exposed to inorganic mercury presented an increased activity of the antioxidant enzyme glutathione reductase in the cerebellum. This effect appears to be related to an antioxidant response against the well known pro-oxidative actions of mercury towards endogenous thiols. On the other hand, pups exposed to methylmercury through maternal milk did not show such adaptative response, pointing to different molecular mechanisms of action of the distinct forms of mercury. From a toxicological point of view, this is an important finding.

Treatment of adult mice with methylmercury via oral route caused a significant decrease on the glutathione peroxidase activity in the brain. This enzyme is a main antioxidant defence against the deleterious effects of endogenous peroxides. This phenomenon was concomitant with an increase in poly(ADP ribose) polymerase proteolysis, an index of apoptosis. During *in vitro* studies, our data shows the central role of hydrogen peroxide as an important contributor to the neurotoxicity induced by mercuric compounds. We also show the inhibitory effect of methylmercury on mitochondrial glutathione peroxidase. The blockade of this enzyme with mercaptosuccinic acid caused an increase of oxidative stress markers and mitochondrial dysfunction induced by mercurials *in vitro*. The incubation of human neuroblastoma cells SH-SY5Y with methylmercury caused a significant decrease on glutathione peroxidase activity. This effect resulted in a decreased ability of cells to remove hydrogen peroxide from the culture medium, causing an increase in the endogenous formation of peroxides. In addition, the inhibition of glutathione peroxidase improved the methylmercury-induced anti-viability effect and potentiated apoptosis.

Treatment of adult animals with *Polygala paniculata* extract prevented the effects of methylmercury in inducing motor deficits and oxidative stress. This effect is probably related to the antioxidant actions of the extract. During *in vitro* studies, we demonstrated the participation of the flavonoid quercetin as an important mediator on the neuroprotection induced by Polygala extract. In addition, the flavonoid myricetin also displayed beneficial effects against methylmercury induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress *in vitro*.

In summary, our data point to the glutathione antioxidant system as an important molecular target for mercury-induced neurotoxicity. Disturbances in this cellular defence system can induce oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis. The *Polygala paniculata* extract, as well as the flavonoids quercetin and myricetin, may be potential therapeutic agents against mercury induced neurotoxicity.

Sumário

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>O mercúrio no ambiente e sua utilização pelo homem</i>	1
Figura 1.....	2
Figura 2.....	4
1.2. <i>Contaminação ambiental por mercúrio</i>	5
1.3. <i>Efeitos clínicos e toxicológicos do mercúrio</i>	6
1.3.1. <i>Mercúrio inorgânico</i>	6
1.3.2. <i>Mercúrio orgânico</i>	7
1.3.3. <i>Exposições em adultos:</i>	8
1.3.4. <i>Exposição pré-natal:</i>	8
1.3.5. <i>Exposição lactacional:</i>	9
1.4. <i>Mecanismos de neurotoxicidade do mercúrio</i>	10
1.4.1. <i>Ações do mercúrio sobre a homeostase do cálcio e glutamato</i>	11
1.4.2. <i>O mercúrio como indutor de estresse oxidativo</i>	13
1.5. <i>O sistema antioxidante da glutatona</i>	15
Figura 3.....	17
Figura 4.....	20
1.6. <i>Ações protetoras de compostos naturais</i>	21
Figura 5.....	23
Figura 6.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. <i>Reagentes</i>	28
3.2. <i>Animais</i>	28
3.3. <i>Tratamentos</i>	29
3.4. <i>Preparação do extrato de planta e isolamento de compostos</i>	30
3.5. <i>Testes comportamentais</i>	31
3.6. <i>Preparação de amostras de tecido cerebral</i>	31
3.7. <i>Preparações de frações enriquecidas em mitocôndrias</i>	32
3.8. <i>Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y</i>	32
3.9. <i>Viabilidade celular e função mitocondrial</i>	33
3.10. <i>Medida de marcadores pró-apoptóticos</i>	34
3.11. <i>Determinações bioquímicas</i>	35

3.12. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Exposição lactacional ao MeHg	36
Tabela 1.....	38
Tabela 2.....	38
Tabela 3.....	38
Figura 7.....	39
Figura 8.....	40
Figura 9.....	41
Figura 10.....	42
4.2. Exposição lactacional ao HgCl ₂	43
Tabela 4:.....	44
Figura 11.....	45
Figura 12.....	46
Figura 13.....	47
Tabela 5:.....	48
4.3. A neurotoxicidade do MeHg está associada à inibição da enzima antioxidante GPx	49
Figura 14.....	52
Figura 15.....	53
Figura 16.....	54
Figura 17.....	55
Figura 18.....	56
Figura 19.....	57
4.4. Estudo dos efeitos protetores do extrato de Polygala em animais tratados por via oral com MeHg.....	58
Tabela 6.....	59
Tabela 7.....	59
Tabela 8.....	60
Figura 20.....	61
4.5. Efeito neuroprotetor de compostos isolados de Polygala sobre a disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo em preparações cerebrais expostas a mercuriais.....	62
Figura 21.....	64
Figura 22.....	65
Figura 23.....	66
Figura 24.....	67
Figura 25.....	68
Figura 26.....	69
Figura 27.....	70
Figura 28.....	71
Figura 29.....	72
Tabela 9.....	73
4.6. Efeito protetor de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzido pelo MeHg.....	74
Figura 30.....	76
Figura 31.....	77

Figura 32.....	78
Figura 33.....	79
Figura 34.....	80
Figura 35.....	81
Tabela 10.....	82
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. <i>Exposição lactacional ao MeHg</i>	83
5.2. <i>Exposição lactacional ao HgCl₂</i>	87
5.3. <i>A neurotoxicidade do MeHg está associada à inibição da enzima antioxidante GPx</i>	91
5.4. <i>Estudo dos efeitos protetores do extrato de Polygala em animais tratados com MeHg por via oral</i>	95
5.5. <i>Efeito neuroprotetor de compostos isolados de Polygala sobre a disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo em preparações cerebrais expostas a mercuriais in vitro.</i>	98
5.6. <i>Efeito protetor de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzido pelo MeHg</i>	103
6. CONCLUSÕES.....	107
7. PUBLICAÇÕES.....	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato
ADP: adenosina difosfato
Akt/PKB: proteína quinase B
BCNU: 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (carmustina)
CAT: catalase
DTNB: 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato
DCF: 2',7'-diclorofluorescina
DCFDA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
ERK: proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs: espécies reativas de oxigênio
GPx: glutationa peroxidase
GR: glutationa redutase
GST: glutationa S-transferase
GSH: glutationa reduzida
GSSG: glutationa oxidada
HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico
Hg: mercúrio
Hg²⁺: cátion de mercúrio
HgCl₂: cloreto de mercúrio
i.p.: intraperitoneal
JNK: proteína quinase c-Jun NH₂-terminal
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MeHg: metilmercúrio
MS: ácido mercaptosuccínico
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nrf2: fator nuclear eritróide 2
PARP: poli(ADP ribose) polimerase
PBS: tampão fosfato-salina
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase
PKC: proteína quinase C
Pi: fosfato inorgânico
SNC: sistema nervoso central
TBOOH: terc-butil hidroperóxido ou hidroperóxido de terc-butila
U: unidade de atividade enzimática

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mercúrio no ambiente e sua utilização pelo homem

O mercúrio (Hg) é um metal classificado na tabela periódica como o elemento de número atômico oitenta (80) e massa atômica 200,59 Da. Este elemento pode ser liberado a partir da crosta terrestre e de erupções vulcânicas. Uma vez na atmosfera, pode precipitar e atingir as águas pluviais e oceânicas (Nriagu e Pacyna 1988), desta forma, podendo atingir a cadeia trófica e ser incorporado aos organismos aquáticos através de um processo de bioacumulação (Lindstrom et al., 1991). No meio ambiente, este metal existe em diferentes formas: mercúrio elementar, sais inorgânicos de mercúrio [Hg (I) e Hg (II)] e compostos orgânicos de mercúrio, sendo todas estas formas potencialmente importantes na exposição e intoxicação humana (Clarkson, 1997). O mercúrio elementar, à temperatura ambiente, apresenta-se sob a forma de metal líquido de coloração prateada. Ao entrar em contato com metais como ouro e prata, forma ligas metálicas ou amálgamas com estes elementos, sendo assim amplamente utilizado no processo de extração destes metais preciosos a partir de seus respectivos minérios. Sob temperaturas elevadas, o mercúrio metálico passa à forma de vapor, tornando-se altamente tóxico e corrosivo. O mercúrio ocorre também sob a forma de sais inorgânicos como o cloreto de mercúrio (HgCl_2) e formas orgânicas como o metilmercúrio (MeHg) e dimetilmercúrio. Conforme citado anteriormente, o Hg precipitado junto com as chuvas atinge os ambientes aquáticos onde será metabolizado por microorganismos que produzirão as formas orgânicas de Hg (Clarkson et al., 2003). As formas orgânicas de Hg também são produzidas pelo homem na indústria química. Estima-se que a quantidade de Hg lançada ao meio ambiente como consequência da atividade humana seja algo em torno de 4000 toneladas/ano (Ebinghaus et al., 1999). A Figura 1 ilustra o ciclo do mercúrio no meio ambiente e sua bioacumulação em peixes e organismos aquáticos, entrando assim na cadeia trófica.

Figura 1.

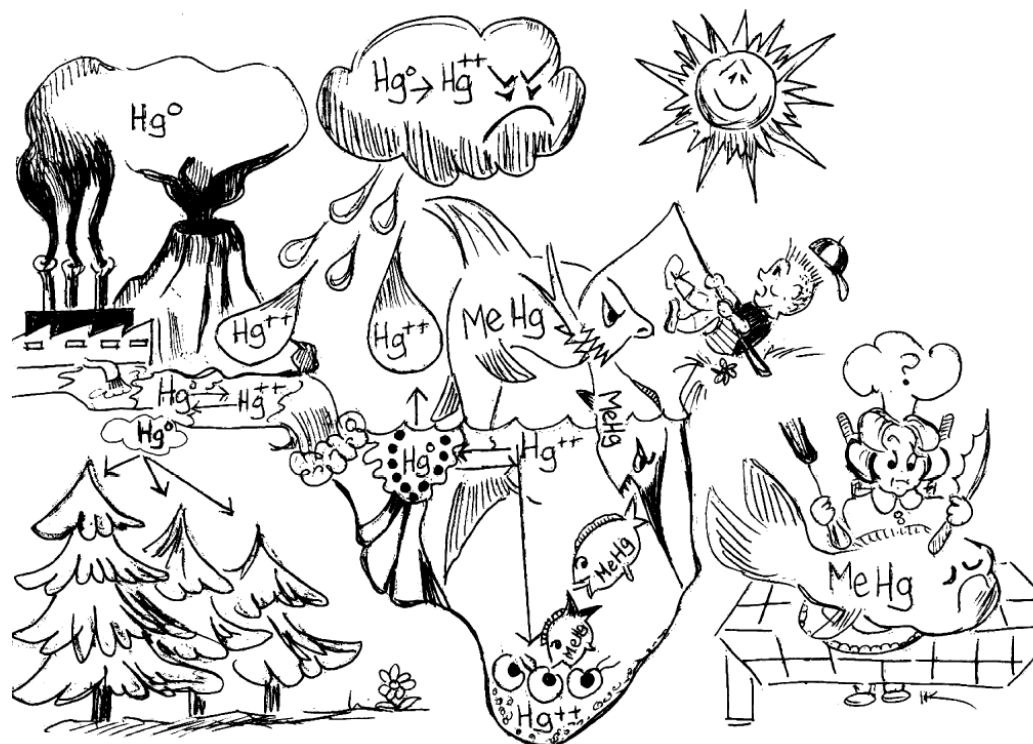


Figura 1. Ciclo global do mercúrio, sua metilação em sedimentos aquáticos, a bioacumulação do metilmercúrio na cadeia trófica e a potencial exposição humana através da dieta (modificado de Clarkson e Magos, 2006)

A utilização do Hg pela humanidade (Figura 2) data desde os primórdios da civilização (Goldwater, 1972). As formas de uso eram as mais variadas possíveis e há relatos do uso do Hg por parte de muitas civilizações antigas, como gregos, egípcios e chineses. Por exemplo, por volta de 1000 a.C., os chineses utilizavam o Hg como componente da tinta vermelha usada para escrita, os europeus passaram a usar o mercúrio na forma de cremes para o tratamento da sífilis. O uso indiscriminado destes cremes causou grande número de óbitos. Durante as grandes navegações no século 16, as caravelas eram carregadas com grandes quantidades de Hg usado na extração de ouro e prata nas colônias americanas e, a partir do século 19, o Hg passou a ser usado como componente de amálgamas para o tratamento dentário (Clarkson et al., 2003; Clarkson e Magos, 2006). Atualmente, a utilização do mercúrio pelo homem se dá principalmente através das atividades industriais, agrícolas e de mineração. Na indústria, compostos de Hg são aplicados na produção de componentes eletrônicos, lâmpadas fluorescentes, baterias entre outros inúmeros produtos. Também são usados como catalisadores na indústria química como, por exemplo, na produção de plásticos. Na agricultura, muitos inseticidas e fungicidas são à base de compostos de Hg. Em países como o Brasil, principalmente na região amazônica, onde a atividade de extração mineral representa uma importante atividade econômica, o uso de compostos de Hg para a extração de ouro e a contaminação dos trabalhadores neste processo representa um importante problema de saúde pública (Malm et al., 1998; Myers et al., 2007).

Figura 2.

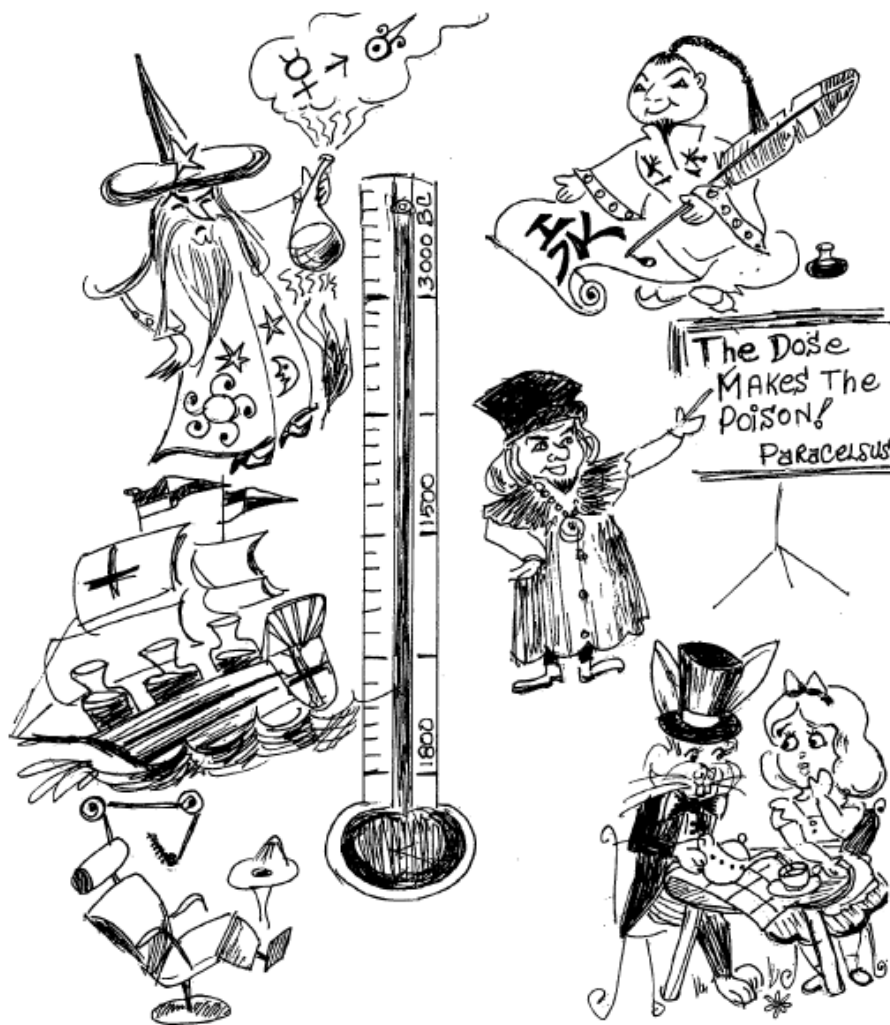


Figura 2. As formas ancestrais de utilização do mercúrio. Uma ilustração de algumas das formas de utilização do Hg por nossos antepassados. Uma das formas mais antigas de uso do Hg foi como pigmento em tintas vermelhas e por alquimistas. Na Idade Média era usado como medicamento para o tratamento da sífilis, o que frequentemente causava óbitos devido ao uso excessivo. Durante as grandes navegações, grandes quantidades eram enviadas para as Américas para o uso na extração de ouro e prata. Também era utilizado na fabricação de cartolas. As amálgamas de mercúrio passaram a ser utilizadas a partir do século 19 (modificado de Clarkson e Magos, 2006).

1.2. Contaminação ambiental por mercúrio

A exposição humana e ambiental ao Hg ocorre principalmente devido a ações antrópicas. Nas décadas de 1950, em Minamata no Japão e, em 1970 no Iraque, foram documentados dois dos maiores incidentes ambientais envolvendo o Hg. A intoxicação aguda por Hg durante estes acontecimentos causou danos neurológicos severos a milhares de habitantes daquelas localidades (Harada, 1995; Johansson et al., 2007). Acidentes ambientais da magnitude destes ocorridos no Japão e no Iraque não têm sido relatados nas últimas décadas. No entanto, a exposição humana e ambiental ao Hg ainda representa um importante problema de saúde pública e ocorre devido a atividades industriais, agrícolas e de mineração (Malm et al., 1998; Myers et al., 2007). Além disso, o processo de bioacumulação do Hg em peixes e outros organismos aquáticos, importantes na nutrição humana e animal, tem sido apontado como uma das principais fontes de intoxicação por mercuriais (Clarkson et al., 2002). O metilmercúrio produzido por processo de biometilação nos sedimentos aquáticos e também liberado pela atividade humana passa por um processo de magnificação biológica, sendo acumulado em altas concentrações em peixes e mamíferos aquáticos predatórios. Em oceanos não poluídos, peixes herbívoros apresentam concentrações de MeHg na ordem de 0,01 ppm, enquanto que os níveis podem atingir quatro ppm em tubarões. A concentração de MeHg no oceano é de um pg/ml, desta forma, a bioacumulação pode chegar a um bilhão de vezes conforme o metal ascende na cadeia trófica (Clarkson e Magos, 2006). Em ambientes contaminados, como em certas áreas da região amazônica onde a atividade de garimpo é constante, estes níveis aumentam ainda mais. Particularmente, no caso do incidente ambiental em Minamata, Japão, a concentração de Hg encontrada em peixes consumidos pela população local era da ordem de 5 a 20 ppm (Cossa, 1995). Nessas concentrações, seres humanos podem ser intoxicados por Hg através do consumo destes peixes. Desta forma, a atividade humana eleva de maneira significativa as possibilidades de intoxicações com mercúrio.

1.3. Efeitos clínicos e toxicológicos do mercúrio

1.3.1. Mercúrio inorgânico

Conforme descrito anteriormente, as formas inorgânicas de mercúrio incluem o mercúrio líquido metálico, o vapor de mercúrio, sais inorgânicos de mercúrio e amalgamas. A ingestão de mercúrio metálico aparentemente não apresenta efeitos tóxicos. Os riscos à saúde produzidos pelo mercúrio líquido estão relacionados a uma potencial liberação de vapor de mercúrio, que pode ser inalado e apresentar então efeitos tóxicos (Clarkson et al., 2003; Clarkson e Magos, 2006). As outras formas de mercúrio inorgânico podem levar ao dano renal, produzindo em alguns casos, a síndrome nefrótica. O vapor de mercúrio também pode causar dano ao sistema nervoso central (SNC) devido a sua habilidade em atravessar a barreira hemato-encefálica. O cátion de mercúrio Hg^{2+} é considerado o causador da doença conhecida como acrodínia ou “doença rosa”, consequência da intoxicação de crianças com este metal.

A alta mobilidade do vapor de mercúrio inalado no corpo se dá por suas propriedades físicas, que por se tratar de um gás monoatômico de carga neutra, pode facilmente difundir-se através das camadas lipídicas das membranas celulares. Os mecanismos de transporte dos cátions de Hg ainda não foram esclarecidos. Após a metabolização pelas células do fígado, o Hg^{2+} pode ser excretado na forma complexada com a glutathiona reduzida (GSH) na bile (Ballatori e Clarkson, 1985). Os cátions de Hg apresentam uma reduzida capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e a barreira placentária, no entanto acumula-se de forma significativa nos rins (Clarkson e Magos, 2006).

O Hg^{2+} , na sua forma de sal solúvel em água (HgCl_2), é considerado um veneno altamente potente (Magos e Clarkson, 2006). A ingestão de algo em torno de 1 g pode ser fatal. Tal dose de cloreto de mercúrio leva a vítima ao choque acompanhado de um colapso total na função renal. É também altamente corrosivo ao trato gastrointestinal. Doses mais baixas causam dano seletivo aos rins, sendo os túbulos proximais os principais alvos. Humanos, após doses repetidas, podem apresentar resistência, provavelmente devido à indução de metalotioneínas. A ação seletiva do HgCl_2

é confirmada pelos altos níveis de acumulação deste composto nos rins, no entanto os mecanismos bioquímicos de toxicidade renal ainda não são completamente conhecidos.

Além dos rins, o Hg^{2+} pode causar dano ao trato gastrointestinal. Casos de contaminação ocupacional têm sido relatados por causarem dano pulmonar e o uso de Hg^{2+} como anti-séptico em fraldas para uso infantil foi relacionado com a acrodínia (Warkany e Hubbard, 1953). Também existem estudos que associam a contaminação com Hg^{2+} e o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Pollard e Hultman, 1997).

1.3.2. Mercúrio orgânico

Os compostos metil e etilmercúrio apresentam propriedades químicas similares e o alvo primário destes agentes é o SNC. Os compostos contendo o radical etil diferem de seus compostos relacionados na forma metilada pelo fato de serem mais rapidamente convertidos ao mercúrio inorgânico no organismo e produzirem então dano renal. O metilmercúrio (MeHg) aparentemente afeta principalmente o SNC, ao menos em primatas (Clarkson e Magos, 2006). Outras formas orgânicas de Hg, como os compostos fenilmercúrio e metoxi-etilmercúrio, são rapidamente convertidos ao mercúrio inorgânico, desta forma agindo no organismo de forma similar ao Hg^{2+} . Entretanto, estes compostos são geralmente absorvidos mais facilmente pelo organismo do que o mercúrio inorgânico.

A alta mobilidade do MeHg no organismo se dá pela formação de um complexo com o aminoácido cisteína. A estrutura deste complexo imita a do aminoácido neutro metionina, e desta forma entra na célula a partir da atividade dos transportadores de aminoácidos neutros. O MeHg é excretado da célula na forma conjugada com GSH a partir da atividade de sistemas de transporte específicos para este tripeptídeo (Ballatori e Clarkson, 1985; Ballatori et al., 1995).

Os efeitos tóxicos do MeHg variam em exposições pré-natais ou em adultos. As diferenças estão ligadas ao tipo de dano cerebral e também à dose mínima causadora de toxicidade. Desta forma, as exposições em adultos e indivíduos em desenvolvimento são tratadas diferentemente.

1.3.3. Exposições em adultos:

Os efeitos prejudiciais de compostos de MeHg ao SNC foram demonstrados logo após as primeiras sínteses de dimetilmercúrio em um laboratório químico em Londres na década de 1860 (Hunter, 1969). A exposição de dois trabalhadores a este agente causou danos neurológicos severos que resultaram em morte. Os sintomas iniciais foram amortecimento de pés e mãos seguidos de uma deterioração rápida do quadro clínico, acompanhado por perda de visão e audição, falta de coordenação motora e outros sintomas correlacionados a um dano cerebral severo. Pelo menos outros dois acidentes ocupacionais fatais chamaram a atenção para os efeitos neurotóxicos de compostos orgânicos de mercúrio. Os acidentes ambientais no Iraque e no Japão também contribuíram com inúmeros dados para a melhor compreensão dos efeitos neurotóxicos do MeHg em jovens e adultos.

De maneira geral, os efeitos em adultos se dão por causa do dano causado em regiões focais do cérebro, normalmente envolvendo áreas relacionadas a funções sensoriais e de coordenação motora, em especial o cerebelo e também áreas do córtex visual. Os danos são irreversíveis devido à severa morte neuronal. O aparecimento de sinais ou sintomas de intoxicação pode ser precedido por um período de latência que perdura entre semanas ou mesmo meses. Estudos em primatas não humanos apontam que doses acima de um nível crítico de 1000 µg Hg/L levam a um aumento abrupto nos níveis de Hg no cérebro, causando danos neuronais que podem ser evidenciados por análises histológicas. Evidências oriundas de estudos em animais sugerem que o próprio MeHg intacto (e não o mercúrio inorgânico liberado a partir do MeHg no cérebro) é o responsável pelo dano neuronal (Clarkson e Magos, 2006).

1.3.4. Exposição pré-natal:

O cérebro fetal é mais suscetível ao dano induzido por mercúrio em comparação ao encéfalo adulto. O MeHg altera a divisão e migração de células neuronais e desregula a citoarquitetura do cérebro em desenvolvimento (Choi et al., 1978). Crianças com dano cerebral severo nasceram de

mães minimamente afetadas pelo MeHg após os incidentes ambientais no Japão e Iraque (Eto et al., 1992). Estudos em animais corroboram com estas observações e apontam para uma maior sensibilidade do cérebro em desenvolvimento frente aos efeitos deletérios do MeHg (Spyker et al., 1972a; Spyker et al., 1972b). Dados obtidos das exposições pré-natais a partir dos eventos ocorridos no Japão e Iraque e em casos graves de envenenamento revelam que o cérebro inteiro foi afetado, enquanto que em adultos apenas lesões focais foram encontradas (Eto et al., 1992). Neste estudo, notou-se que as camadas corticais uniformes características do cérebro jovem normal encontraram-se completamente distorcidas, além do aparecimento de neurônios ectópicos que não atingiram seus alvos anatômicos, indicando uma inibição no crescimento e migração neuronal. Este efeito pode estar relacionado ao fato de que o MeHg pode ligar-se aos grupos sulfidríla presentes nas moléculas de tubulina, desta forma prejudicando a formação de microtúbulos, essenciais para o crescimento axonal (Kerper et al., 1992; Castoldi et al., 2001). Em altas doses, o dano severo aos neurônios em várias áreas do cérebro pode causar efeitos diversos, incluindo reflexos hiperativos, cegueira, surdez, paralisia cerebral e retardo mental (Amin-Zaki et al., 1974; Bakir et al., 1973). A exposição a doses baixas pode causar efeitos mais sutis ao desenvolvimento neural e incluir déficits de linguagem, aprendizado e atenção, e em alguns casos problemas no controle motor e organização visual-espacial (Counter e Buchanan, 2004).

1.3.5. Exposição lactacional:

A imaturidade dos tecidos durante o período neonatal pode aumentar os efeitos tóxicos de agentes como o mercúrio. De certa forma, isto se torna relevante do ponto de vista toxicológico. O SNC em desenvolvimento é mais sensível a ação de agentes neurotóxicos do que o cérebro adulto (Rodier, 1994). Foi demonstrado que a exposição de mulheres grávidas ao MeHg pode levar a intoxicação indireta de suas crianças (Harada, 1995; Weihe et al., 2002). Dados obtidos de um estudo realizado nas ilhas Faroe, onde a população local consome grandes quantidades de peixes marinhos, indicaram que a exposição intra-uterina ao MeHg causa disfunções neuropsicológicas em crianças (Grandjean et al., 1997). Por outro lado, o mercúrio é encontrado no leite materno após a exposição

ao MeHg (Amin-Zaki *et al.*, 1976; Skerfving, 1988; Oskarsson *et al.*, 1996). Conforme já citado anteriormente, o mercúrio afeta a proliferação e migração de neurônios no SNC e este processo não é completo antes dos cinco meses após o nascimento, além de que os neurônios continuam a proliferar durante o primeiro ano de vida (Rodier, 1994; 1995). Desta forma, além do período gestacional, o período lactacional também apresenta importância do ponto de vista neurotoxicológico, e a exposição a agentes neurotóxicos, como o MeHg, deve ser minimizada durante este período.

Apesar de sabermos que a exposição *in utero* ao MeHg causa prejuízos neurológicos em animais e humanos (Sakamoto *et al.*, 2002; Grandjean *et al.*, 1997), evidências da contribuição exclusiva da exposição lactacional a compostos de mercúrio é escassa. De fato, estudos correlacionando a exposição de mães ao MeHg com efeitos neurotóxicos na prole (Sakamoto *et al.*, 2002) geralmente não discriminam estas duas fases importantes da exposição indireta (transplacentária e através do leite materno), tornando difícil o entendimento da real contribuição de ambas as vias de exposição para o desenvolvimento da neurotoxicidade.

1.4. Mecanismos de neurotoxicidade do mercúrio

Atualmente, apesar dos esforços na busca de novas estratégias terapêuticas para combater a toxicidade induzida pelo Hg, não estão disponíveis tratamentos efetivos capazes de abolir completamente os efeitos tóxicos dos mercuriais. Em casos de intoxicação, além de suporte para a manutenção das funções vitais, o uso de agentes quelantes auxilia no processo de eliminação do mercúrio dos tecidos. Entretanto, estas drogas são de uso limitado devido à suas ações adversas, como por exemplo, toxicidade renal, redistribuição do metal nos tecidos, depleção de metais essenciais, erupções cutâneas, náuseas entre outros (Aposhian *et al.*, 1995; Grandjean *et al.*, 1991; Tchounwou *et al.*, 2003). A melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na

neurotoxicidade de mercuriais contribuirá para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas voltadas ao tratamento dos casos de intoxicação por tais compostos.

Dentre os principais mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg, alterações na homeostase do cálcio (Sirois & Atchison, 2000), glutamato (Aschner et al., 2000; Farina et al 2003; Manfroi et al., 2004; Fonfria et al., 2005) e o estresse oxidativo (Ou et al., 1999, Yin et al., 2007) têm sido documentadas. Além destes, outros possíveis alvos do MeHg têm sido relatados e incluem a fragilização da barreira hemato-encefálica, disfunção no transporte axonal, alterações na produção, liberação, captação e metabolismo de neurotransmissores, sinalização celular, síntese de proteínas, DNA e RNA, além danos ao sistema respiratório e de regeneração de energia (Castoldi et al., 2001).

1.4.1. Ações do mercúrio sobre a homeostase do cálcio e glutamato

O cálcio é um elemento essencial para várias funções celulares, por exemplo, a excitação, contração muscular, ativação de enzimas, entre outras. Porém, quando em excesso, pode ser citotóxico. Desta forma, as células dispõem de vários mecanismos para manter a homeostase deste metal. As bombas de cálcio e o armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático e na mitocôndria podem ser citados como importantes reguladores dos níveis fisiológicos deste íon nas células (Berridge et al., 1998). Os canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis a voltagem possuem papel central em incontáveis funções celulares, entre elas, a transmissão sináptica, contração muscular e regulação da expressão gênica (Catterall, 1998). Diversos subtipos de canais de Ca^{2+} operados por voltagem têm sido identificados (L, N, P/Q e R) baseando-se em suas propriedades biofísicas e farmacológicas (Tsien et al., 1995). Os canais de Ca^{2+} são afetados por uma variedade de agentes tóxicos (Kiss e Osipenko, 1994; Sirois e Atchison, 1996). Levando-se em conta os importantes papéis que estas proteínas representam na função celular, a ação de agentes tóxicos sobre estas proteínas

pode apresentar conseqüências significativas para o desempenho das funções celulares (Audesirk et al., 2001).

Foi demonstrado que a exposição ao MeHg induz um aumento intracelular de Ca^{2+} e parte deste aumento se dá pela entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular (Denny et al., 1993; Hare et al., 1993). Em culturas celulares cerebelares o uso de nifedipina, um bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo L, retarda o início do influxo de Ca^{2+} promovido pelo MeHg (Hare e Atchison 1995; Marty e Atchison 1997). Além disso, o uso deste bloqueador protege parcialmente contra a neurotoxicidade induzida por MeHg (Sakamoto et al., 1996). Estas observações sugerem que as ações do MeHg são em parte mediadas por canais de Ca^{2+} do tipo L, ou alternativamente, que o MeHg pode transpor as membranas neuronais através destes canais. O MeHg também afeta a regulação intracelular de cálcio por organelas, como o retículo endoplasmático e mitocôndrias (Limke et al., 2004).

Os efeitos do MeHg sobre a homeostase do glutamato se dão principalmente pela ação inibitória deste metal sobre os transportadores de glutamato presentes em astrócitos (Aschner et al., 2007). Ao bloquear a atividade destes transportadores, o MeHg causa um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica, fazendo com que este neurotransmissor permaneça por mais tempo na região de encontro entre os neurônios. Assim, o glutamato extracelular em excesso pode causar uma exacerbação na transmissão glutamatérgica após atingir seus receptores pós-sinápticos, culminando em um fenômeno conhecido como excitotoxicidade (Allen et al., 2001a; Allen et al., 2001b; Brookes e Kristt, 1989; Aschner et al., 1993; Dave et al., 1994). Corroborando com esta idéia, foi demonstrado que a co-administração de doses subtóxicas de MeHg com glutamato, resulta em lesões típicas de um estímulo excitotóxico (Matyja e Albrecht, 1993). O MeHg também causa ativação da enzima citosólica fosfolipase A2, levando a liberação de ácido araquidônico que, subseqüentemente, inibe o transporte de glutamato, levando ao surgimento de um ciclo excitotóxico (Shanker et al., 2002). A excitotoxicidade causada pela intoxicação com MeHg pode estar relacionada a uma intensa atividade dos receptores ionotrópicos de glutamato do tipo N-metil-*D*-aspartato (NMDA). Isto pode ser observado pelo fato de que o uso de antagonistas para este receptor diminuiu

o dano ao DNA causado pelo MeHg no córtex cerebral de ratos (Juárez et al., 2005). Desta forma, baseando-se nestas evidências, pode-se sugerir uma correlação entre as alterações na homeostase do glutamato e cálcio como mecanismos de neurotoxicidade do MeHg, tendo os receptores NMDA um papel central neste fenômeno.

1.4.2. O mercúrio como indutor de estresse oxidativo

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1999), o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis de moléculas pró-oxidantes e antioxidantes. Os agentes pró-oxidantes são conhecidos como espécies reativas, que podem ser radicais livres ou espécies não radicalares. Um radical livre é definido como uma molécula com um ou mais elétrons não pareados na camada de valência mais externa em seu átomo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem os radicais livres derivados do O_2 , como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), bem como os derivados não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de EROs é comum em um ambiente aeróbico. A produção de superóxido se dá a partir da respiração mitocondrial, através da redução do O_2 molecular pela ubiquinona. A célula possui uma maquinaria de detoxificação de EROs específica, que ajuda a manter os níveis fisiológicos destas espécies reativas. Dentre as mais conhecidas, podemos citar as superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), que atuam na remoção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), além da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), que atuam na remoção de H_2O_2 .

O estresse oxidativo é um mediador central na morte celular induzida por toxinas ambientais (Franco et al., 2008). Além disso, o estresse oxidativo apresenta efeitos diversos sobre vias de sinalização celular, em particular as cascatas de sinalização mediadas por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Torres e Forman, 2003; Blanc et al., 2003; Ueda et al., 2002). Alterações no

estado redox das células podem resultar na ativação de cascatas de sinalização pró-apoptóticas (Schroeter et al., 2002; Davis et al., 2000, Owuor e Kong, 2002).

O estresse oxidativo induzido pelo Hg está aparentemente relacionado com sua ação direta sobre tióis endógenos (Shanker et al., 2005) e também com o seu efeito sobre enzimas antioxidantes (Farina et al., 2004). O Hg apresenta uma alta afinidade por grupos tióis (Hughes, 1957) e muitos estudos mostram que o MeHg é capaz de reduzir os níveis intracelulares de GSH (Miura e Clarkson, 1993; Sarafian et al., 1994; Gatti et al., 2004) e de levar a um aumento na produção de EROs (Ali et al., 1992; Yee e Choi, 1996, Sanfeliu et al., 2003; Shanker et al., 2003). Uma vez na célula, o Hg liga-se covalentemente aos grupos -SH de biomoléculas, entre elas a GSH, causando assim estresse oxidativo (Franco et al., 2008). A diminuição dos níveis de GSH tem sido apontada como um importante mecanismo envolvido na morte celular causada pela exposição a mercuriais (Kaur et al., 2006).

Estudos têm demonstrado uma produção excessiva de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após a exposição a mercuriais em tecidos renal (Lund et al., 1993) e cerebral (Franco et al., 2007), evidenciando as propriedades pró-oxidantes do mercúrio. O peróxido de hidrogênio é produzido constantemente nas células dos organismos vivos (Sies, 1997). Apesar de esta molécula ser considerada uma ERO com reatividade relativamente baixa, comparando com os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Halliwell e Gutteridge, 1999), altas concentrações de H_2O_2 podem causar, de maneira direta ou indireta, dano oxidativo a biomoléculas fundamentais à função celular (Mattson et al., 1998; Halliwell e Gutteridge, 1999). Entretanto, o H_2O_2 não participa apenas dos processos causadores de dano, mas também é um importante sinalizador celular. De fato, estudos têm demonstrado a capacidade do H_2O_2 em modular de maneira positiva ou negativa vias de sinalização “redox-sensíveis” (Rao e Berk, 1992; Sundaresan et al., 1995; Adachi et al., 2005; Pinton et al., 2007). Além disso, é bem conhecido o papel do H_2O_2 na morte celular apoptótica dependente das mitocôndrias (Li et al., 2006; Hajnoczky e Hoek, 2007).

A produção de H_2O_2 , bem como de outras espécies reativa de oxigênio, pode ocorrer de diversas maneiras. No entanto, podemos citar a mitocôndria como uma fonte geradora primária de espécies reativas. Inúmeras substâncias são conhecidas por causarem inchaço nas mitocôndrias, um fenômeno denominado de permeabilidade transitória mitocondrial (mPT). Por exemplo, foi demonstrado que o influxo de íons cálcio é capaz de induzir mPT (Haworth e Hunter, 1979). Uma das principais conseqüências da indução do mPT é a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), o que leva ao desacoplamento da produção de ATP e aumento na produção de EROs (Votyakova e Reynolds, 2005; Norenberg e Rao, 2007). A indução de mPT possui papel fundamental na apoptose, pois com o inchaço mitocondrial ocorre a liberação de fatores pró-apoptóticos no citoplasma, iniciando assim uma série de eventos bioquímicos culminando na morte celular (Liu et al., 1996; Jemmerson et al., 2005; Brustovetsky et al., 2005). A importância da mitocôndria na toxicidade induzida por MeHg tem sido demonstrada (Dreiem et al., 2005; Mori et al., 2007). O MeHg pode ser acumulado no interior da mitocôndria e causar a ruptura do $\Delta\psi_m$ (Insug et al., 1997; Shenker et al., 1999; Araragi et al., 2003), iniciando então a ativação de cascatas de sinalização pro-apoptóticas, desencadeando a neurotoxicidade (Nishioku et al., 2000; Dare et al., 2001). Baseando-se nestas evidências, a mitocôndria aparenta ser um alvo importante na toxicidade induzida por mercúrio entrelaçando os mecanismos de ação deletéria deste metal envolvendo a quebra na homeostase do cálcio e glutamato e a indução de estresse oxidativo.

1.5. O sistema antioxidante da glutatona

A glutatona (GSH), um tripeptídeo formado pelos resíduos gama-glutamil, cisteinil e glicina (Figura 3), está presente em todas as células animais e normalmente atinge concentrações milimolares. A GSH possui um importante papel no armazenamento e transporte de cisteína, além de agir como uma molécula de defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, atuando também em conjunto com as enzimas glutatona peroxidase e glutatona-S-transferase. Além destas

funções, a GSH também participa da modulação da transdução de sinal, regulação da proliferação celular, regulação da resposta imune (Sem et al., 1997), metabolismo de leucotrienos e prostaglandinas (Hall, 1999), entre outras.

A concentração total de GSH no cérebro é de aproximadamente 2 mM, sendo que a maior parte está na forma reduzida (GSH) e apenas algo em torno de 1 % está na forma oxidada (GSSG) (Cooper et al., 1980). Em tecidos como o fígado a razão GSSG/GSH gira em torno de 1/100, porém no cérebro, este valor diminui ainda mais. Em dados não publicados por nosso grupo de pesquisa, encontramos uma razão de aproximadamente 1/500. No sistema nervoso central, a GSH é liberada dos astrócitos por via de um mecanismo mediado por carreadores ou a partir de um compartimento neuronal em resposta a um estímulo despolarizante. Além disso, a GSH é transportada do plasma para o fluido cerebrospinal via células epiteliais do plexo coróide, assim, a GSH além de sua função antioxidante, também pode estar agindo como um neurotransmissor ou neuromodulador (Sagara et al., 1996).

Figura 3.

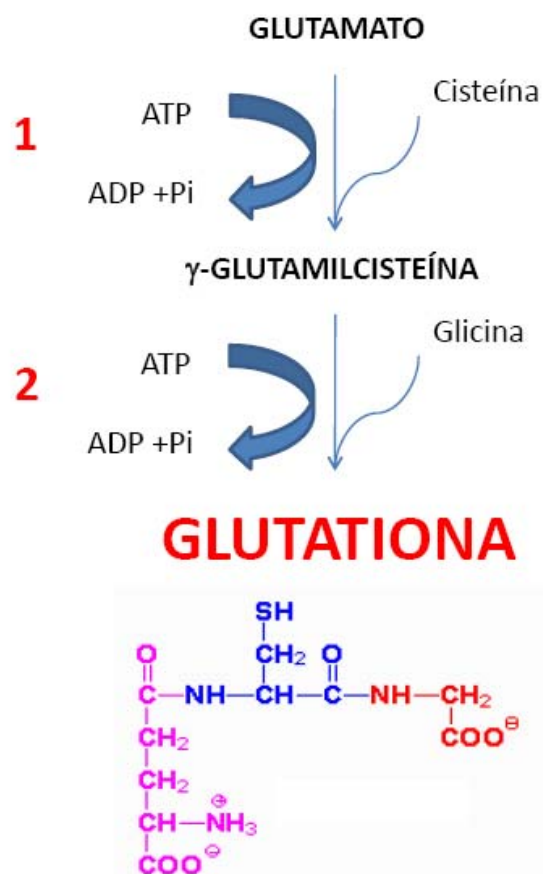


Figura 3. Síntese de GSH. A glutathiona é sintetizada em duas etapas consecutivas (Meister, 1974). A γ -glutamil cisteína sintetase ou glutamato cisteína ligase (EC 6.3.2.2) utiliza o glutamato e cisteína como substrato formando o dipeptídeo γ -GluCys na qual se combina com a glicina numa reação catalisada pela glutathiona sintetase (EC 6.3.2.3) para a geração de GSH. Adenosina trifosfato (ATP) é um co-substrato para ambas as enzimas. O nível intracelular de GSH é regulado por retroalimentação negativa, sendo a atividade da γ -glutamil cisteína sintetase inibida pelo seu produto final GSH (Meister, 1974; Misra e Griffith, 1998). Assim, a síntese e o consumo de GSH são balanceados.

Durante a detoxificação de EROs, a glutatona está envolvida em dois processos básicos: (i) GSH reage de forma não-enzimática com EROs e (ii) GSH atua como um doador de elétrons para reduzir os peróxidos na reação catalisada pela GPx (Singh et al., 1996).

As células de mamíferos expressam cinco isoformas de GPx dependente de selênio: a GPx citosólica (GPx1), também encontrada nas mitocôndrias, a GPx gastrointestinal (GPx2), a GPx do plasma (GPx3), GPx de membrana (GPx4), responsável pela degradação de peróxidos fosfolipídicos e em humanos, a GPx6 é expressa apenas no sistema olfatório (Brigellius-Flohé, 2006). A GPx1, também denominada citosólica ou GPx celular, é a isoforma mais predominante e é capaz de reduzir H_2O_2 e uma gama de peróxidos orgânicos, incluindo peróxidos de ácidos graxos de cadeia longa usando GSH como doador de elétrons (Arthur, 2000). Apesar de degradar uma ampla variedade de peróxidos, a GPx1 é bastante específica para a GSH como substrato redutor (Arthur, 2000).

Estudos em animais transgênicos trouxeram um grande avanço no conhecimento sobre o papel das GPx na função celular. Foi demonstrado pelo uso de animais “knockout” que a GPx1 apresenta um importante papel protetor, sendo a falta desta enzima responsável por uma maior suscetibilidade destes animais ao estresse oxidativo (Yoshida et al., 1997; Fu et al., 1999). Por outro lado, foi demonstrado em modelos animais (Yoshida et al., 1996; Cheng et al., 1998; Baliga et al., 2007) e de cultura de células (Kelner, 1995; Weiss et al., 2001) que a super-expressão de GPx1 leva a uma maior resistência frente a condições pró-oxidativas. Estudos com animais transgênicos e estudos de privação de selênio demonstraram que a GPx celular é indispensável na proteção contra o estresse oxidativo. No entanto, estudos demonstraram que animais com expressão aumentada de GPx1 desenvolveram obesidade e diabetes tipo 2 (McLung et al., 2004). Isto pode estar associado a um bloqueio na inibição de proteínas tirosina fosfatases mediada por H_2O_2 , importante na sinalização celular mediada por insulina. Além disso, a super-expressão de GPx pode tornar mais rápido o crescimento de tumores (Lu et al., 1997; Li et al., 2000), possivelmente por abolir a indução de apoptose mediada por EROs, acelerando a proliferação destas células. Em conjunto, estes dados apontam para a GPx celular como um real aparato antioxidante celular. A GPx atua em conjunto com

a flavoenzima glutationa redutase (GR - EC 1.8.1.7), que converte a GSSG formada pela GPx na reação de redução de peróxidos, utilizando nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como equivalente redutor. A GR possui um papel fundamental na manutenção dos níveis de GSH em sua forma reduzida (Mize e Langdon, 1962). Este sistema cooperado entre GSH, GPx e GR é considerado um sistema antioxidante primário no SNC (Dringen et al., 2000, 2005). Isto pode estar relacionado ao fato de que o cérebro consome altas concentrações de O_2 , o que leva a uma elevada produção de ROS durante o metabolismo aeróbico. Desta forma, é imprescindível o bom funcionamento de um sistema antioxidante atuando na manutenção dos níveis fisiológicos de EROs no SNC. A Figura 4 ilustra a ação combinada do sistema antioxidante da GSH na redução de peróxido de hidrogênio originado a partir da atividade mitocondrial.

Figura 4.

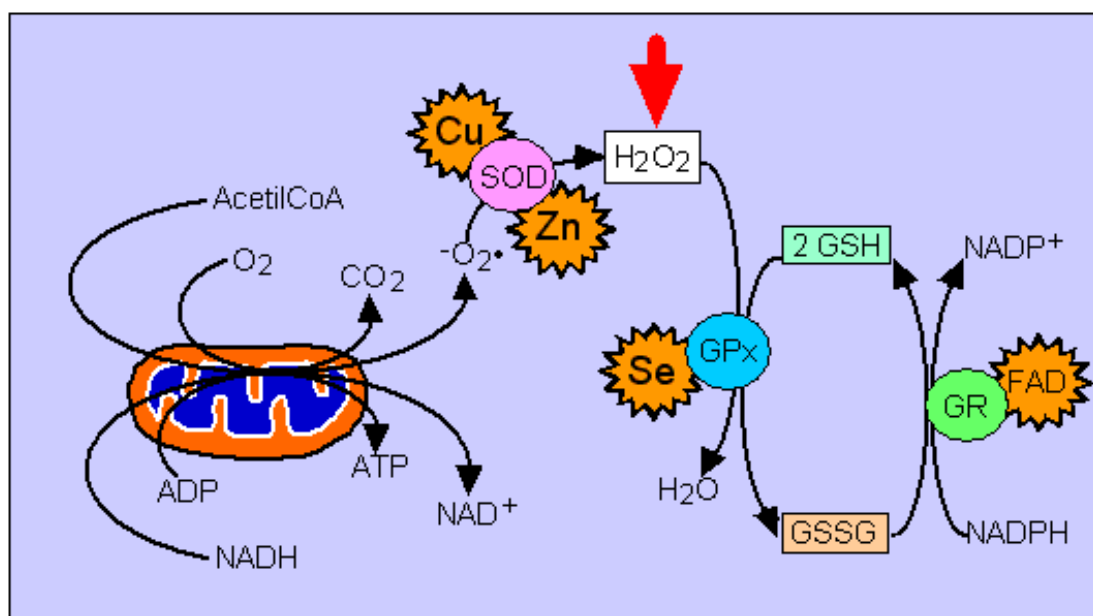


Figura 4. O sistema antioxidante da GSH. A atividade mitocondrial normal resulta na produção de radical ânion superóxido. Cerca de 1-2% do oxigênio molecular consumido no cérebro é transformado em $O_2^{\cdot-}$, que por sua vez é convertido em H_2O_2 pela enzima antioxidante SOD (Fridovich, 1995; Inoue et al., 2003). O sistema antioxidante da GSH atua de forma cooperativa na remoção do H_2O_2 , através da redução desta molécula em H_2O utilizando os elétrons providos pela GSH. A GSSG originada a partir desta reação será reduzida pela ação da GR, que por sua vez necessita dos equivalentes redutores do NADPH. Em uma extensão deste processo cooperativo, podemos ainda citar a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49), que atua como provedor de NADPH a partir da via metabólica das pentoses-fosfato (Minich et al., 2003). Desta forma, um desequilíbrio na produção de NADPH pode de forma indireta afetar a ação do sistema antioxidante da GSH.

Uma redução na atividade GPx torna as células mais sensíveis ao estresse oxidativo. A GPx pode ser inibida por uma variedade de agentes químicos, como o óxido nítrico (Asahi et al., 1995), homocisteína (Durmaz et al., 2007) e mercaptanas (Chaudiere et al., 1984). Particularmente, nosso grupo de pesquisa tem documentado a inibição da atividade GPx por compostos de mercúrio *in vivo* (Carvalho et al., 2007; Stringari et al., 2008). Outros grupos também têm relatado a ação inibitória do Hg sobre esta enzima (Mori et al., 2007), no entanto, estudos detalhados sobre este fenômeno ainda não foram conduzidos. Considerando que a GPx é uma enzima importante na maquinaria celular de degradação de peróxidos e proteção contra estresse oxidativo e que o Hg é conhecido por causar um aumento na produção de peróxidos pelas células, nos interessamos em estudar o papel da GPx na neurotoxicidade induzida por MeHg utilizando protocolos *in vivo* e *in vitro*.

1.6. Ações protetoras de compostos naturais

Tendo em vista que a produção de H₂O₂ representa um importante mecanismo de ação tóxica do Hg, o estudo de compostos com ação antioxidante, capazes de remover o peróxido produzido pela exposição ao Hg, desta forma bloqueando os efeitos oxidativos deste metal, representa um importante passo na busca de novas estratégias terapêuticas contra os efeitos tóxicos causados por mercuriais, podendo ser utilizadas em conjunto com as terapias existentes atualmente.

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos protetores de plantas e seus compostos isolados em diversas condições neuropatológicas (Scalbert e Williamson, 2000; Walle, 2004). Dietas ricas em frutas e vegetais contribuem de forma positiva em doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Particularmente, os flavonóides apresentam efeito benéfico em uma ampla variedade de doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurodegenerativas (Williams et al., 2004). Os mecanismos precisos pelos quais os flavonóides exercem seus efeitos biológicos ainda não estão esclarecidos. Muitas das ações biológicas dos flavonóides têm sido atribuídas as suas propriedades antioxidantes que potencialmente influenciam o estado redox intracelular (Rice-Evans

et al., 1996). No entanto, estudos recentes têm especulado que a clássica ação antioxidante destes compostos não é a única explicação para os seus efeitos biológicos (Spencer et al., 2001; Schroeter et al., 2001). A natureza antioxidante dos flavonóides se dá principalmente por características em sua estrutura química que atribuem a estes compostos uma importante capacidade redutora. Estas características podem ser mais bem visualizadas na Figura 5, onde o flavonóide quercetina é exemplificado. A presença de um grupo catecol (anel-B dihidroxilado) torna o composto um potente doador de hidrogênio (elétrons), o que é importante para a estabilização de espécies reativas (Rice-Evans et al., 1996; Bors e Michel, 1999; Bors et al., 2001). Outras características importantes que contribuem para a ação antioxidante destes compostos são a presença de uma insaturação conjugada com uma função 4-oxo no anel-C da molécula e a presença de grupos funcionais capazes de ligar metais como ferro e cobre (Rice-Evans et al., 1996).

Figura 5.

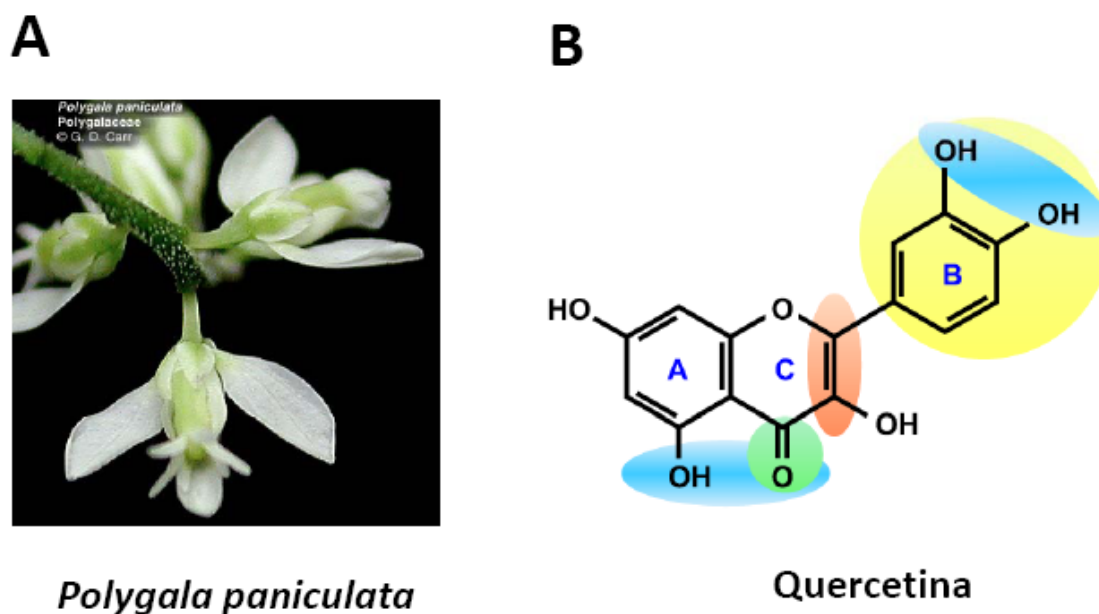


Figura 5. (A) *Polygala paniculata* (Polygalaceae), conhecida como barba-de-São-João, barba-de-bode ou vassourinha branca, é utilizada na medicina popular para o tratamento de algumas doenças por possuir propriedades antibleorrágicas, purgativa, diurética, entre outras. Estudos farmacológicos com o extrato desta planta mostraram atividade antifúngica e moluscicida (Lorenzi e Matos, 2002). No presente estudo, a planta total (exceto raízes) foi utilizada para a preparação do extrato hidroalcoólico. (B) Estrutura do flavonóide quercetina mostrando características importantes para sua ação antioxidante. A mais importante é a presença de do grupo catecol ou anel-B dihidroxilado (sombreado em amarelo). Outras características importantes são a presença de insaturação (sombreado em vermelho) e um grupo funcional 4-oxo (sombreado em verde) no anel-C. A presença de grupos hidroxila vicinais pode conferir a habilidade em quelar metais (sombreado em azul) (Modificado de Williams et al., 2004).

Os flavonóides podem exercer efeitos modulatórios nas células independentemente de suas ações antioxidantes, através de ações específicas sobre diferentes componentes celulares incluindo receptores de neurotransmissores (Medina et al., 1997; Dekermendjian et al., 1999) e proteínas quinases como a fosfatidil inositol 3 quinase (Pi3K), Akt/PkB, proteínas quinase C (Pkc), tirosina quinases e proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), afetando assim sistemas de transdução de sinal (Schroeter et al., 2001; Kong et al., 2000; Vlahos et al., 1994; Agullo et al., 1997). A ação inibitória ou ativadora dos flavonóides pode apresentar inúmeros efeitos na função celular (Figura 6). Por exemplo, uma ação inibitória sobre a sinalização de ERK e Akt/PkB poderia desencadear a morte neuronal, já a inibição das vias de sinalização moduladas por JNK podem apresentar efeito neuroprotetor (Williams et al., 2004).

Figura 6.

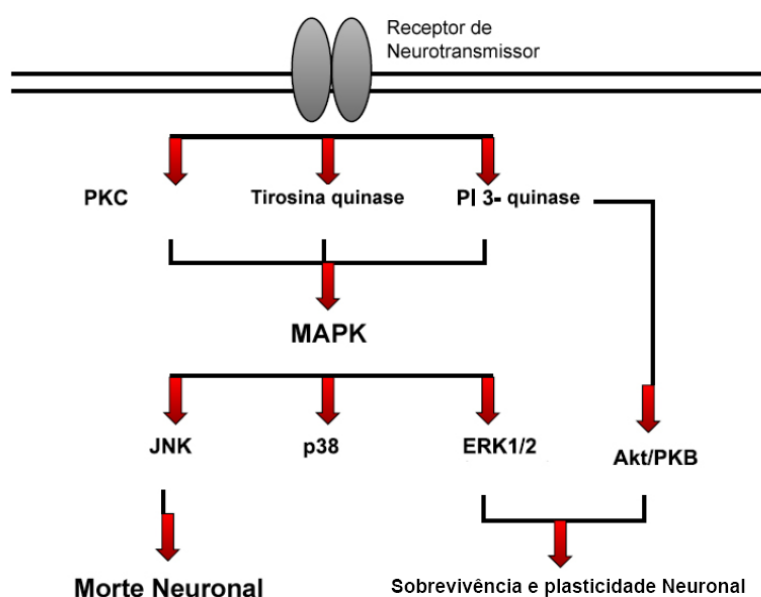


Figura 6. A ação modulatória dos flavonóides sobre receptores de neurotransmissores e vias de sinalização celular pode culminar na morte neuronal ou sobrevivência e plasticidade (modificado de Williams et al., 2004).

Em estudo recente, o flavonóide miricetina apresentou efeitos protetores contra insulto oxidativo com 2-desoxi-d-ribose em linhagens de osteoblastos (Lee e Choi, 2008). Em outro estudo realizado em ratos Wistar, o flavonóide quercetina reverteu o dano induzido por cádmio, um metal pesado (Vicente-Sánchez et al., 2008). Também foi observado o efeito protetor da quercetina e canferol contra insultos excitotóxicos induzidos por cainato e N-metil-d-aspartato em tecidos neuronais (Silva et al., 2008). Além disso, em estudo realizado em ratos Sprague Dawley foi demonstrado o efeito protetor do flavonóide lespeflan contra a toxicidade renal induzida por mercúrio (Nikolic e Sokolovic, 2004). Neste contexto, plantas do gênero *Polygala* (que possuem flavonóides em sua composição) têm sido investigadas devido ao seu potencial efeito neuroprotetor em modelos de neurodegeneração e excitotoxicidade (Lee et al., 2004; Park et al., 2006). Os efeitos protetores de compostos naturais isolados de plantas têm sido atribuídos principalmente à suas propriedades antioxidantes. Isto se deve ao fato de tais compostos apresentarem uma alta capacidade redutora e também por seus efeitos moduladores em sistemas antioxidantes celulares (Williams et al., 2004).

Considerando a importante participação de EROs na toxicidade induzida por mercuriais e a conhecida capacidade antioxidante de compostos isolados de plantas, inclusive os flavonóides, um dos nossos objetivos foi investigar os possíveis efeitos neuroprotetores do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* bem como de compostos isolados como a quercetina e outros flavonóides contra a toxicidade induzida por mercuriais em camundongos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo podem ser separados em dois grandes focos: primeiramente, buscamos contribuir com a literatura científica quanto aos mecanismos de neurotoxicidade induzida por Hg, avaliando os efeitos da exposição de camundongos a compostos orgânicos e inorgânicos de Hg sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, especificamente relacionados a alterações no sistema antioxidante da glutathiona. Para isto, utilizamos dois modelos de exposição *in vivo* a mercuriais: via lactacional e via oral. Também utilizamos dois modelos de estudo *in vitro*, usando mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos e culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Em um segundo momento, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* e de compostos isolados de plantas contra a neurotoxicidade e o estresse oxidativo induzido por mercuriais em modelos de exposição *in vivo* e *in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos da exposição lactacional ao MeHg (forma orgânica de Hg) sobre parâmetros relacionados ao sistema antioxidante da glutathione e atividade locomotora de camundongos;
- II. Avaliar os efeitos da exposição lactacional ao HgCl₂ (forma inorgânica de Hg) sobre parâmetros relacionados ao sistema antioxidante da glutathione, peroxidação lipídica e atividade locomotora de camundongos;
- III. Estudar o papel da enzima antioxidante glutathione peroxidase sobre a neurotoxicidade induzida por MeHg em modelo de mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos e culturas de células SH-SY5Y;
- IV. Avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores do extrato de *Polygala paniculata* sobre as alterações no sistema antioxidante da glutathione, estresse oxidativo e atividade locomotora induzidos pela exposição ao MeHg em camundongos;
- V. Estudar os possíveis efeitos protetores de compostos isolados de plantas do gênero *Polygala* sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por MeHg e HgCl₂ em modelo de mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos;
- VI. Estudar os possíveis efeitos protetores de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por MeHg em modelo de mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Cloreto de metilmercúrio (II), glutatona reduzida, b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato, glutatona redutase de levedura, ácido mercaptosuccínico (MS), 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), anticorpo primário contra β -actina, terc-butilhidroperóxido (TBOOH), xilenol orange, Triton X-100, glutatona oxidada (GSSG) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O reagente Ampliflu Red™ foi adquirido da Fluka (Steinheim, Suécia). Os reagentes para eletroforese foram obtidos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Marcadores de peso molecular, membranas de nitrocelulose (Hybond ECL), reagente para quimiluminescência amplificado (ECL-PLUS), anticorpo secundário conjugado a peroxidase foram adquiridos de GE Health Care (Little Chalfont, Reino Unido). Anticorpo primário contra PARP foi adquirido de Santa Cruz Biotechnologies (USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Animais

Camundongos Swiss (machos e fêmeas) com aproximadamente 90 dias de idade foram mantidos a temperatura de 22 ± 2 °C em ciclo claro-escuro com intervalo de 12 horas e acesso livre a água e ração especial para roedores (Nuvital, PR, Brasil). Para os estudos de exposição lactacional, as fêmeas foram acasaladas e durante o período de gestação, estas foram separadas em caixas plásticas opacas, mantendo-se uma fêmea por caixa.

3.3. Tratamentos

Todos os procedimentos envolvendo animais utilizados neste estudo foram executados de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em Julho de 1989. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal de Santa Catarina (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

Exposição lactacional ao MeHg: No primeiro dia após o parto (dia pós-natal 1), 14 fêmeas foram selecionadas e separadas em dois grupos (controle e MeHg), contendo 7 animais cada grupo. Os filhotes (oito por ninhada) foram mantidos com suas mães, as quais foram imediatamente expostas ao MeHg através da água ingerida. As fêmeas do grupo MeHg receberam uma solução de MeHg (10 mg/L) diluída na água de beber. Esta solução de MeHg foi a única fonte de líquido que os animais receberam. A dose de MeHg foi baseada em um trabalho previamente publicado por nosso grupo de pesquisa (Farina et al., 2003). As mães do grupo controle receberam água potável à vontade. A rota de exposição ao MeHg dos filhotes foi exclusivamente através do leite materno. A ingestão líquida e sólida das fêmeas foi monitorada diariamente.

Exposição lactacional ao mercúrio inorgânico: No primeiro dia após o parto (dia pós-natal 1), 12 fêmeas foram selecionadas e separadas em três grupos (controle, Hg dose baixa (L) e Hg dose alta (H)), contendo 4 animais cada grupo. Os filhotes (oito por ninhada) foram mantidos com suas mães, as quais foram imediatamente expostas ao HgCl₂ através de injeções intraperitoneais (i.p.). As fêmeas do grupo L e H receberam injeções i.p. de HgCl₂ (0,5 e 1,5 mg/Kg, respectivamente), uma vez por dia durante o período lactacional. As doses de Hg foram baseadas no estudo de Sundberg et al. (1999). As fêmeas do grupo controle receberam injeções i.p. de solução fisiológica (NaCl 150 mM). A

rota de exposição ao HgCl_2 dos filhotes foi exclusivamente através do leite materno. A ingestão líquida e sólida das fêmeas foi monitorada diariamente.

Exposição de animais adultos ao MeHg e extrato de *Polygala paniculata*: Camundongos Swiss machos adultos foram separados em quatro grupos experimentais contendo sete animais em cada grupo (Controle; MeHg; PE e MeHg+PE). O grupo controle recebeu água *ad libitum* e uma solução salina (150 mM NaCl) administrada por gavagem duas vezes por dia. Os grupos MeHg e MeHg+PE foram tratados com MeHg (40 mg L^{-1}) de acordo com trabalho previamente realizado por nosso grupo de pesquisa (Farina et al., 2003). Os grupos PE e MeHg+PE receberam a solução de extrato de *Polygala paniculata* (100 mg Kg^{-1}) em solução salina (10 ml Kg^{-1}) por gavagem duas vezes por dia. Os tratamentos foram realizados por duas semanas.

3.4. Preparação do extrato de planta e isolamento de compostos

A planta *Polygala paniculata* foi coletada no município de Rancho Queimado, SC e classificada pelo Dr. Olavo de Araújo Guimarães (UFSC, Florianópolis, SC). A planta total (exceto raízes) seca (500 g) foi homogeneizada em 50% etanol-água (1:3) e mantida nesta solução a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{ C}$) por 14 dias. O extrato foi dissolvido em solução salina para a concentração desejada logo antes dos experimentos. Estudos fitoquímicos realizados por nosso grupo de pesquisa com o extrato de *Polygala paniculata* (PE) demonstraram a presença de diversas classes de constituintes. Dentre os compostos identificados, foram encontrados xantonas, flavonóides e fitoesteróis (Cristiano et al., 2003). Os compostos isolados foram identificados pela comparação de suas propriedades físicas e espectrais (IV, ^1H e ^{13}C RMN) com amostras autenticadas.

3.5. Testes comportamentais

Após o dia pós-natal 21, os camundongos jovens foram selecionados e submetidos a testes comportamentais/funcionais que avaliam a atividade locomotora (campo aberto) e a coordenação (rotarod). Os testes no campo aberto foram realizados em sala apropriada livre de interferências como ruídos/barulhos e atividade humana. A atividade locomotora foi monitorada durante seis minutos em uma caixa de campo aberto medindo 56 cm de comprimento por 42 cm de largura e 40 cm de altura. O assoalho da caixa foi dividido em 12 quadrantes. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi usado como valor absoluto para a análise estatística.

Após o teste do campo aberto, os filhotes foram submetidos à tarefa do rotarod, que foi baseado no estudo de Duhan e Miya (1957). Com pequenas modificações. O aparato consistiu de uma barra com diâmetro de 2,5 cm, subdividida em quatro compartimentos separados por discos de 25 cm de diâmetro. A rotação da barra foi a uma velocidade constante de 17 rotações por minuto e o tempo (segundos) que o animal permanecia equilibrado sobre a barra foi registrado. Cada filhote foi submetido a três tentativas no aparelho e a média destas três tentativas foi utilizada como valor absoluto para a análise estatística.

3.6. Preparação de amostras de tecido cerebral

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados e os tecidos cerebrais homogeneizados em tampão HEPES 25 mM pH 7,4. Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 20,000 g (4° C) por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para as dosagens de parâmetros bioquímicos. Os níveis de Hg foram dosados de acordo com o estudo de Moretto et al. (2004).

3.7. Preparações de frações enriquecidas em mitocôndrias

O encéfalo (menos cerebelo e tronco cerebral) dos animais foi homogeneizado em 10 volumes de solução de isolamento contendo HEPES 10 mM pH 7,0, manitol 220 mM, sacarose 68 mM, KCl 10 mM e albumina do soro bovino 1%. O homogenato foi centrifugado a 1000 g (4° C) por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 17500 g (4° C) por 10 minutos, resultando em um sobrenadante rico em mielina e um pellet (P2) enriquecido em mitocôndrias e sinaptossomas. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso em tampão de isolamento, porém sem albumina. As frações mitocondriais obtidas foram mantidas no gelo e utilizadas para os experimentos entre 10-15 minutos após sua preparação.

Para os experimentos *in vitro*, o P2 (aproximadamente 2 mg/proteína) foi incubado com concentrações crescentes de MeHg ou HgCl₂ (0, 10, 30 e 100 µM) e/ou compostos naturais (compostos isolados de *Polygala* e flavonóides) nas concentrações de 0, 30 100 e 300 µM em meio contendo 10 mM HEPES pH 7,0, 220 mM manitol, 68 mM sacarose, 10 mM KCl. As incubações perduraram por 15 minutos para a detecção de ROS, 30 minutos para a determinação da viabilidade mitocondrial e dosagem de GSH e 60 minutos para a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos. Experimentos em paralelo foram conduzidos na presença de catalase (200 U), TBOOH (100 µM), MS (300 µM), GSH (100 µM) ou GPx (5 U) + GSH 100 µM, com o intuito de investigar possíveis mecanismos moleculares de neurotoxicidade. Para os experimentos relatados no item 4.3 (Resultados) as frações mitocondriais não foram incubadas em condições *in vitro* com MeHg e sim, isoladas de animais previamente tratados por 21 dias com MeHg (40 mg/l na água de beber). Para estes experimentos, as amostras controle foram isolados de animais não tratados com MeHg.

3.8. Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

As linhagens de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CRL-2266) foram obtidas da companhia American Type Tissue Culture - ATTC (<http://www.atcc.org>). As células foram crescidas em garrafas contendo meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10 %, L-glutamina 4 mmol/l e HEPES 15

mmol/L pH 7,4. As células foram mantidas em atmosfera umedecida contendo CO₂ 5 % e temperatura de 37° C em meio completo, que foi trocado a cada 3-4 dias. Em seguida as células foram resuspensas e semeadas nas densidades de 4 × 10⁴ células/poço (em placas de 96 poços), 40 × 10⁴ células/poço (em placas de 12 poços) ou 80 × 10⁴ células/poço (em placas de 6 poços) e cultivadas 48 horas até o início dos tratamentos. O meio completo foi trocado por meio sem soro 1,5 horas antes dos tratamentos. Após este período as células foram expostas por 24 horas a concentrações de MeHg solubilizado em tampão fosfato-salina (PBS; 0.1 mM-150 mM) estéril. Os compostos MS e BCNU (inibidores de GPx e GR, respectivamente) foram adicionados ao meio de cultura onde as células foram mantidas 24 horas antes do tratamento com MeHg. Neste caso, as células foram lavadas 5 vezes com PBS, coletadas e preparadas para as análises bioquímicas. As concentrações de MS (500 mM) e BCNU (10 mM) não afetaram a viabilidade celular (dados não mostrados).

3.9. Viabilidade celular e função mitocondrial

A viabilidade das células SH-SY5Y foi determinada usando-se o kit de viabilidade celular CellTiter-Blue®. O método usa o indicador resazurin para medir a capacidade metabólica das células, o que está correlacionado com a viabilidade celular. Células viáveis são capazes de reduzir o resazurin em resorufin, um composto fluorescente. Células não viáveis possuem uma menor capacidade em reduzir o indicador, produzindo menos sinal fluorescente. As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços e submetidas aos diferentes tratamentos. Na seqüência, uma alíquota de CellTiter-Blue® foi adicionada às células de acordo com as instruções do fabricante. Após 1 hora, a fluorescência foi registrada usando um leitor de placas (544nm_{exc}/590nm_{em}).

A função mitocondrial foi avaliada através do ensaio da redução do MTT, que é convertido a um sal de formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais, sendo esta reação uma medida da capacidade metabólica das frações mitocondriais. Quanto menor a capacidade metabólica, menor será a viabilidade mitocondrial (Denizot et al., 1986).

3.10. Medida de marcadores pró-apoptóticos

Clivagem de PARP: após os tratamentos, as amostras foram solubilizadas em tampão Tris 50 mM pH 6.8 contendo SDS 2%, EDTA 2mM, DTT 1%, glicerol 10 mM. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-polyacilamida (SDS-PAGE) 10 % e eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram lavadas em tampão Tris-salina (TBST) pH 7,5 contendo Tris-HCl 100 mmol/l, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% e incubadas “overnight” (4° C) com anticorpo primário para a proteína PARP-1 (Santa Cruz Biotech). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário específico ligado a peroxidase. Os imunoblots foram visualizados com o sistema de foto detecção Fuji LAS 3000 usando-se reagentes de quimiluminescência amplificada (ECL). A presença de uma banda com peso molecular aparente de 89 kDa, indicando a proteólise de PARP (117 kDa), foi considerada como marcador de apoptose. Como controle positivo para clivagem de PARP utilizamos preparações de células tratadas por 24 horas com estaurosporina 1 μ M. Os controles de conteúdo de proteína nos imunoblots foram determinados pela análise do imunoc conteúdo da proteína β -actina.

Marcação de núcleos apoptóticos com iodeto de propídeo: os núcleos apoptóticos foram detectados de acordo com o método descrito por Nicoletti et al. (1991). Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e coletadas em tubos de poli-estireno em centrifugadas a 200 g por 15 minutos. Em seguida, uma solução hipotônica (iodeto de propídeo 50 μ g/ml, citrato de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1%) foi adicionada ao pellet celular. Os tubos foram mantidos no escuro por 12 horas (4° C) previamente à análise por citometria de fluxo. A fluorescência dos núcleos individuais marcados com iodeto de propídeo foi registrada usando-se um escâner de citômetro de fluxo (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Pelo menos 10⁴ células foram analisadas em cada amostra. Os núcleos apoptóticos apareceram como picos de DNA hipodiplóide, que eram distintos dos picos hiperdiploides dos núcleos das células controle. Como controle positivo para a detecção de núcleos apoptóticos utilizamos preparações de células tratadas por 24 horas com estaurosporina 1 μ M.

3.11. Determinações bioquímicas

A atividade das enzimas GR, GPx e CAT foram realizadas de acordo com os estudos de Carlberg e Mannervick (1985), Wendel (1981) e Aebi (1984), respectivamente. Os níveis de GSH foram medidos como tióis não protéicos baseando-se no estudo de Ellman (1959). A peroxidação lipídica foi avaliada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme previamente descrito (Ohkawa et al., 1979). Para a detecção da produção de hidroperóxidos utilizamos o ensaio espectrofotométrico usando o reagente xylenol orange (560 nm) descrito por Nourooz-Zadeh et al., (1994) e modificado por Franco et al. (2007). Para a detecção de ROS, utilizamos a sonda 2', 7' diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) (Ali et al., 1992). Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados usando o reagente Ampliflu Red™ (Fluka), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteínas foi dosada pelo método de Bradford (1976) e também utilizando o kit BCA (Pierce), usando-se a albumina do soro bovino como padrão.

3.12. Análise estatística

Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, dependendo da condição experimental, seguido pelo teste de Duncan, quando apropriado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Exposição lactacional ao MeHg

Apesar de os efeitos deletérios do MeHg ao cérebro jovem ser um fenômeno amplamente conhecido, estudos relacionados aos efeitos da exposição lactacional a mercuriais são escassos. Desta forma, objetivamos avaliar os efeitos do MeHg sobre o sistema antioxidante da GSH em camundongos neonatos expostos a este mercurial orgânico exclusivamente através do leite materno. Para este fim, desenvolvemos um protocolo de exposição onde fêmeas selecionadas passaram a ingerir uma solução contendo MeHg (10 mg/L diluído na água de beber) a partir do primeiro dia pós-parto. Considerando que o MeHg pode ser excretado no leite materno (Manfroi et al., 2004; Franco et al., 2006; Sundberg et al., 1998), a única fonte de exposição ao metal dos animais neonatos se deu através da via lactacional. Os detalhes deste modelo de estudo foram descritos na seção dos materiais e métodos.

A ingestão líquida e sólida das fêmeas e da prole foi acompanhada durante o tratamento com MeHg, no entanto não observamos alterações significativas no consumo de água e alimento pelos animais (Tabela 1). Após o término do tratamento com MeHg, os níveis cerebelares de mercúrio foram dosados nas fêmeas e na prole. Conforme demonstrado na Tabela 2, houve um aumento de aproximadamente nove vezes no conteúdo de mercúrio no cerebelo das fêmeas tratadas com MeHg, comparando com os animais controle. Na prole, foi possível observar um aumento de 4,5 vezes em relação ao controle nos níveis de mercúrio cerebelar dos animais lactantes mantidos com as fêmeas tratadas com MeHg. O nível cerebelar de Hg dosados na prole das fêmeas tratadas com MeHg foi bastante similar aos níveis encontrados no cérebro de crianças que viveram nas Ilhas Seychelles (Myers et al., 1995), demonstrando que o protocolo de exposição apresentado possui significativa relevância em relação à exposição humana ao Hg.

O conteúdo de GSH foi significativamente maior no cerebelo das fêmeas tratadas com MeHg em comparação com os animais controle (Figura 7). Um efeito oposto foi observado na prole, sendo

o conteúdo de GSH cerebelar substancialmente reduzido nos filhotes expostos lactacionalmente ao MeHg (Figura 7). A atividade da enzima GR foi aumentada no cerebelo das fêmeas expostas ao MeHg em relação aos animais controle (Figura 8). No entanto, a atividade desta enzima não foi alterada no cerebelo da prole exposta ao MeHg e controle (Figura 8). De forma interessante, observamos uma correlação positiva (coeficiente de Pearson = 0,889; $p < 0.01$) entre os níveis de GSH e atividade GR no cerebelo das mães tratadas com MeHg (Figura 9). A atividade da enzima antioxidante GPx foi maior nas fêmeas controle em relação à sua respectiva prole, no entanto, a exposição ao MeHg não afetou a atividade GPx (Figura 10).

A prole exposta lactacionalmente ao MeHg demonstrou uma reduzida atividade locomotora na tarefa do rotarod (Tabela 3). A atividade locomotora no campo aberto também foi reduzida, no entanto, não obtivemos valores significativos (Tabela 3).

Tabela 1.**Ingestão líquida e sólida das fêmeas durante o período do tratamento com MeHg (21 dias).**

	Ingestão Líquida (ml/dia)	Ingestão Sólida (g/dia)
Controle (água potável)	32,7 ± 1,7	19,5 ± 1,2
MeHg (10 mg/L)	30,2 ± 1,1	16,2 ± 1,9

Dados são representados como média ± erro padrão da média (n=7).

Tabela 2.**Níveis de mercúrio no cerebelo de camundongos expostos ao MeHg.**

	Mães	Filhotes
Controle (água potável)	291,8 ± 69,3	88,1 ± 7,4
MeHg (10 mg/L)	2602,0 ± 135,1 ^a	394,5 ± 52,9 ^a

Dois animais (filhotes) foram selecionados de cada ninhada (4 ou 5 por grupo) e os valores médios da concentração de mercúrio foi usada para a análise estatística. O conteúdo de mercúrio foi expresso em nanogramas/grama de tecido úmido e representado como média ± erro padrão da média.

^a estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 3.**Perfil locomotor dos animais expostos lactacionalmente ao MeHg.**

	Rotarod (s)	Campo aberto (quadrantes cruzados)
Controle (água potável)	43,0 ± 3,8	32,9 ± 10,1
MeHg (10 mg/L)	27,2 ± 3,2 ^a	24,0 ± 10,0

Os animais foram submetidos aos testes do rotarod e campo aberto para avaliação do desempenho motor e atividade locomotora, respectivamente. Os dados são representados como média ± erro padrão da média do tempo de permanência no aparelho (rotarod) em segundos e do número de quadrantes cruzados com as quatro patas (campo aberto). ^a estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 7.

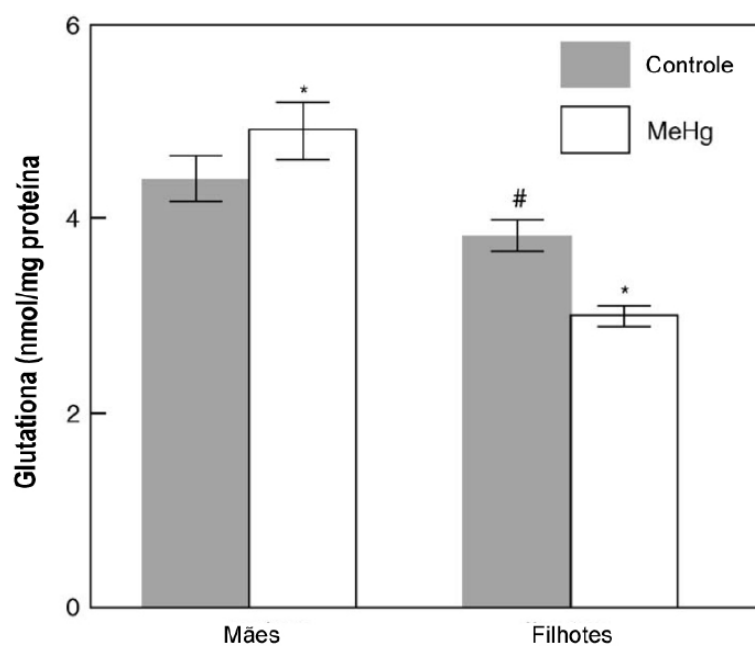


Figura 7. Conteúdo de glutatona no cerebelo de animais expostos ao MeHg por via oral (mães) ou lactacional (filhotes). Os dados são representados como média \pm erro padrão da média do conteúdo de tióis não protéicos (nmol/mg proteína). * diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos (efeitos da exposição ao MeHg). # diferença estatística ($p < 0,05$) entre as mães controle e a prole controle. Mães ($n=7$ por grupo), prole ($n=7$ por grupo; dois filhotes por ninhada).

Figura 8.

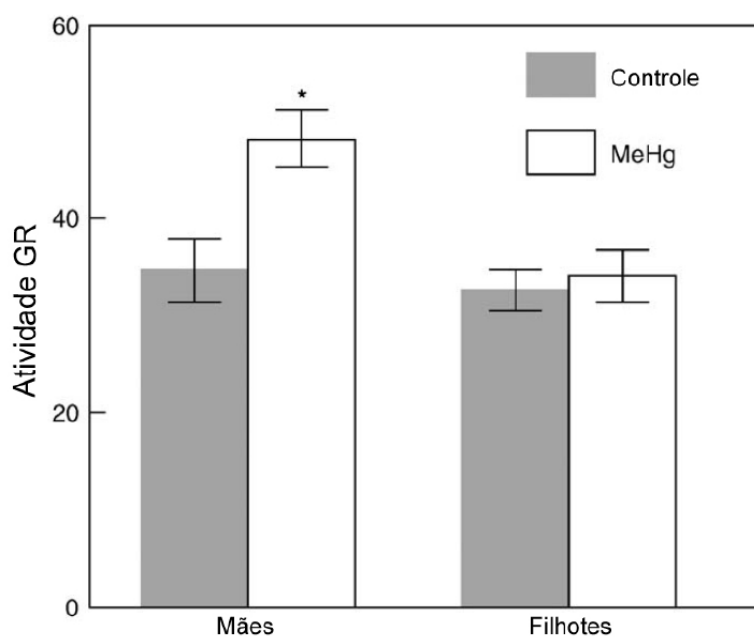


Figura 8. Atividade glutationa redutase (GR) no cerebelo de animais expostos ao MeHg por via oral (mães) ou lactacional (filhotes). Os dados são representados como média \pm erro padrão da média da atividade enzimática (mU/mg proteína). * diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos (efeitos da exposição ao MeHg). Mães (n=7 por grupo), prole (n=7 por grupo; dois filhotes por ninhada).

Figura 9.

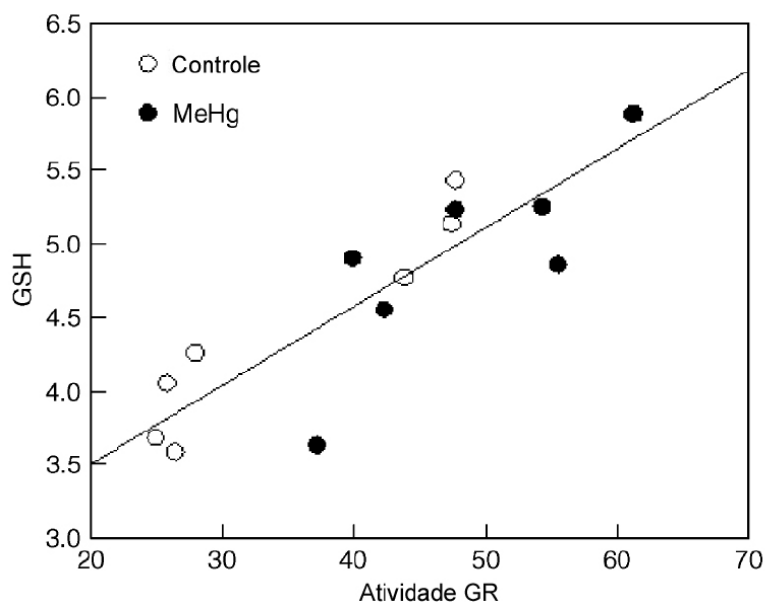


Figura 9. Correlação entre o conteúdo de GSH e atividade glutatona redutase (GR) no cerebelo das mães expostas ao MeHg. Os dados no gráfico foram obtidos das Figuras 8 e 9. Coeficiente de Pearson = 0,889; $p < 0,001$.

Figura 10.

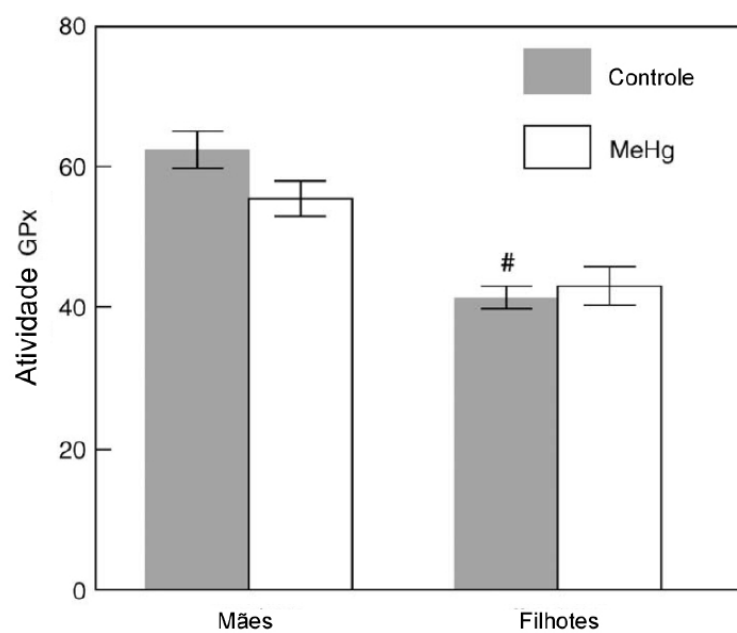


Figura 10. Atividade glutathione peroxidase (GPx) no cerebelo de animais expostos ao MeHg por via oral (mães) ou lactacional (filhotes). Os dados são representados como média \pm erro padrão da média da atividade enzimática (mU/mg proteína). # diferença estatística ($p < 0,05$) entre as mães controle e a prole controle. Mães (n=7 por grupo), prole (n=7 por grupo; dois filhotes por ninhada).

4.2. Exposição lactacional ao $HgCl_2$

É conhecido que formas orgânicas e inorgânicas podem ser excretadas no leite materno (Manfroi et al., 2004; Franco et al., 2006; Sundberg et al., 1998). Também é fato que o mercúrio inorgânico atinge maiores concentrações no leite materno comparado ao mercúrio orgânico (Sundberg et al., 1998). Além disso, contrário ao observado para o MeHg, não existem estudos relacionados aos efeitos da exposição lactacional ao $HgCl_2$ sobre o sistema nervoso central. Desta forma, objetivamos avaliar os efeitos neurotóxico do $HgCl_2$ em camundongos neonatos expostos pela via lactacional.

Após o tratamento das fêmeas com mercúrio inorgânico e a exposição lactacional da prole a este composto, não foi possível observar alterações significativas no peso corporal e ingestão líquida e sólida (Tabela 4). A atividade locomotora dos filhotes expostos ao $HgCl_2$ através do leite materno foi significativamente diminuída como observado na Figura 11. O número de quadrantes percorridos pelos animais no campo aberto foi diminuído na prole cujas mães receberam a dose de 1,5 mg/Kg de $HgCl_2$ (Figura 11A). De maneira similar, o desempenho motor dos animais na tarefa do rotarod foi significativamente reduzido na prole exposta à dose mais alta de mercúrio (Figura 11B).

Os níveis de GSH e a atividade GPx não foram alterados no cerebelo dos filhotes expostos ao mercúrio inorgânico (Figura 12A e 12D). Entretanto, foi possível observar um aumento significativo nos níveis de TBARS nos animais expostos à dose mais elevada de mercúrio (Figura 12B). Além disso, a atividade GR foi significativamente aumentada nos filhotes cujas mães foram tratadas com 0,5 e 1,5 mg/Kg de $HgCl_2$ (Figura 12C). Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados no tecido cerebelar das fêmeas expostas às concentrações de 0,5 e 1,5 mg/Kg de $HgCl_2$, (Figura 13 A-D). Os níveis de mercúrio total no tecido cerebelar dos filhotes expostos ao mercúrio inorgânico através do leite materno nas doses de 0,5 e 1,5 mg/Kg de $HgCl_2$ foram $1,4 \pm 0,3$ e $2,9 \pm 0,7$ ppm, respectivamente.

Um resumo das alterações motoras, mudanças relacionadas ao sistema antioxidante da GSH, e níveis de mercúrio cerebelar causadas pela exposição lactacional ao mercúrio orgânico e inorgânico são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4:

Tabela 4. Peso corporal (mães e filhotes), ingestão líquida e sólida (mães) ao final do tratamento com HgCl₂ por via intraperitoneal (mães) e lactacional (filhotes).

Grupos	Peso corporal		Ingestão líquida	Ingestão sólida
	(g)		(ml/dia)	(g/dia)
	Mães	Filhotes	Mães	Filhotes
Controle	35,5 ± 2,4	8,5 ± 0,3	25,6 ± 5,9	28,5 ± 2,3
HgCl ₂ 0.5 mg/Kg	36,0 ± 2,1	8,9 ± 0,3	25,3 ± 6,1	27,6 ± 1,9
HgCl ₂ 1.5 mg/Kg	32,5 ± 3,3	5,1 ± 0,1*	26,7 ± 7,8	26,9 ± 3,3

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Mães (n = 4 por grupo). Filhotes (n = 4 ninhadas por grupo; oito filhotes por ninhada). * p<0.05, diferente do grupo controle. O protocolo de exposição ao mercúrio usado neste estudo não causou mortalidade nos filhotes intoxicados pela via lactacional.

Figura 11.

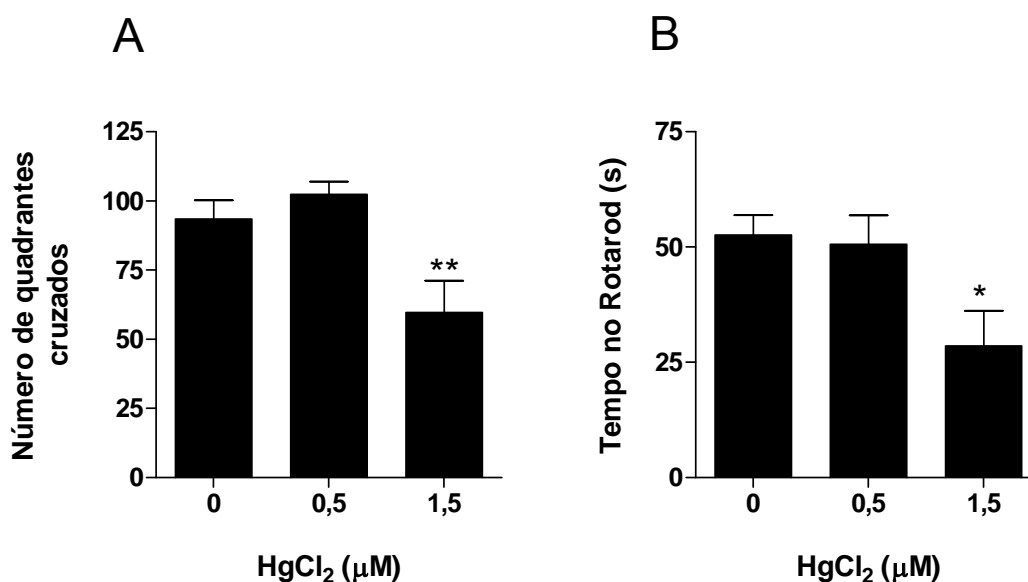


Figura 11. Atividade locomotora e desempenho motor de camundongos lactantes nos testes do campo aberto e rotarod após a exposição lactacional ao mercúrio inorgânico. Dois camundongos lactantes foram escolhidos aleatoriamente de suas respectivas mães (4 mães por grupo = 8 filhotes por grupo). No teste do campo aberto (A), o número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi utilizado para medir a atividade locomotora. No teste do rotarod (B), cada filhote foi submetido ao aparelho em três diferentes ensaios e a média da latência de queda foi usada para a análise estatística. O tempo máximo de permanência no aparelho foi de 60 segundos. A latência foi expressa em segundos. * p<0,05 e ** p<0,01 (ANOVA de uma via).

Figura 12.

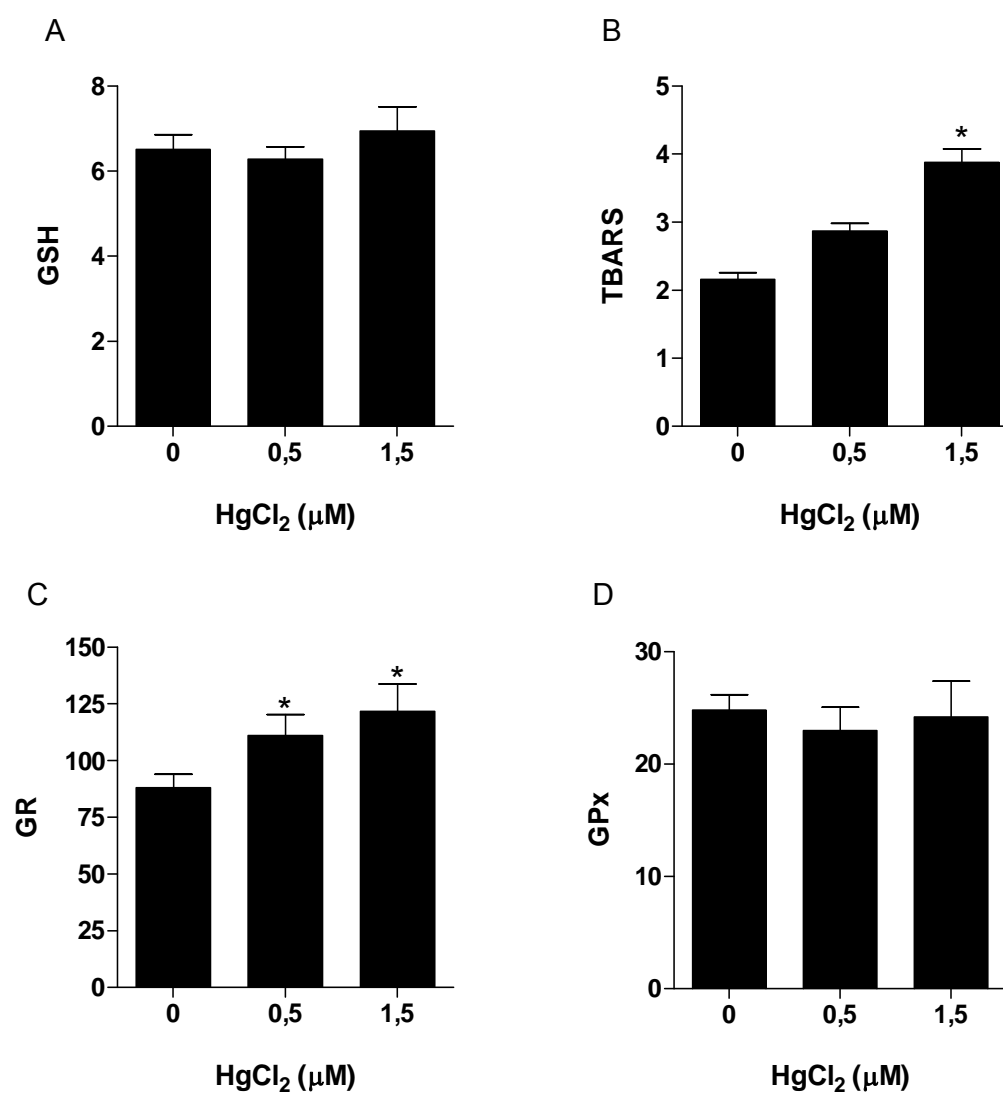


Figura 12. Níveis de GSH, atividade GR e GPx e peroxidação lipídica no cerebelo dos filhotes expostos ao mercúrio inorgânico por via lactacional. Conteúdo de GSH (A), TBARS (B), atividade GR (C) e GPx (D). Os dados foram expressos como nmol/mg proteína para GSH, nmol de malondialdeído/mg proteína para TBARS e mU/mg proteína para as atividades GR e GPx (média ± erro padrão). * p<0.05 entre os grupos (ANOVA).

Figura 13.

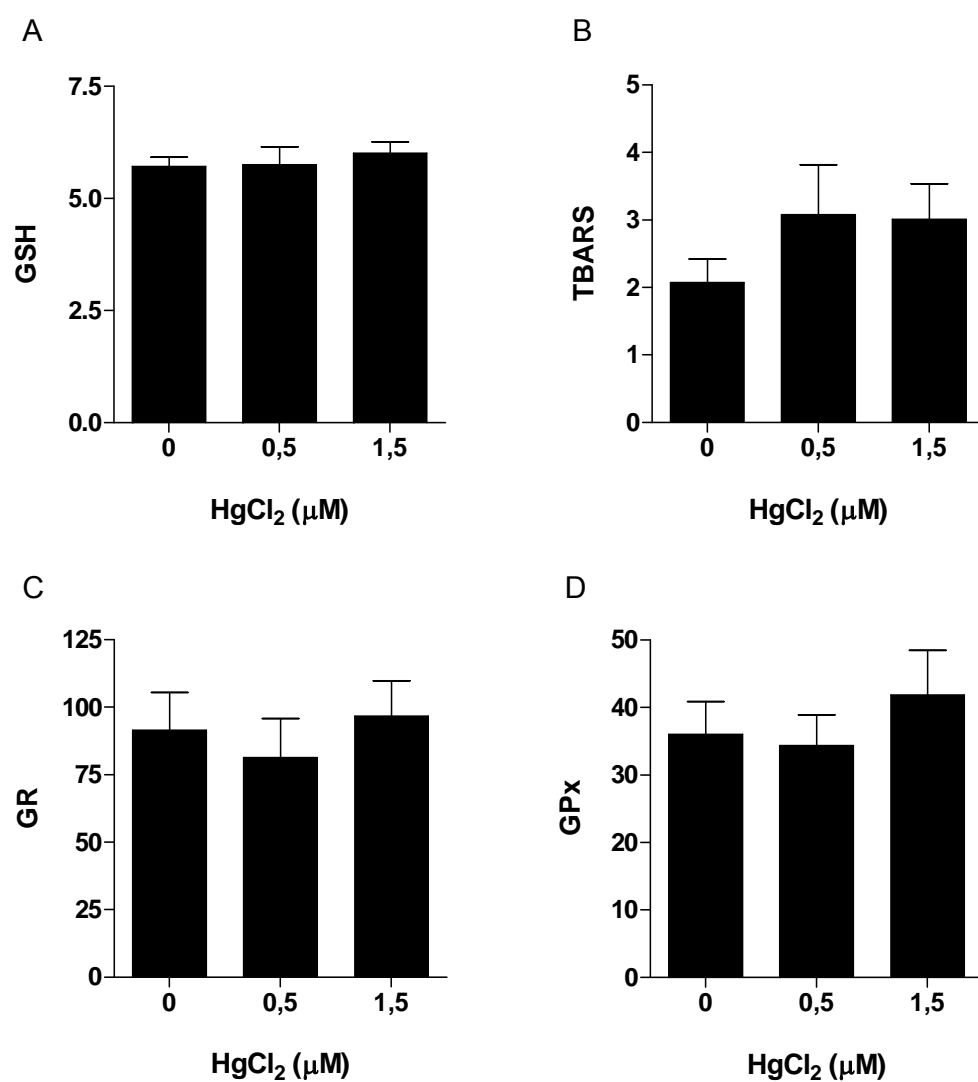


Figura 13. Níveis de GSH, atividade GR e GPx e peroxidação lipídica no cerebelo das mães expostos ao mercúrio inorgânico por via intraperitoneal. Conteúdo de GSH (A), TBARS (B), atividade GR (C) e GPx (D). Os dados foram expressos como nmol/mg proteína para GSH, nmol de malondialdeído/mg proteína para TBARS e mU/mg proteína para as atividades GR e GPx (média ± erro padrão).

Tabela 5:

Efeitos da exposição lactacional ao MeHg e mercúrio inorgânico sobre parâmetros comportamentais e parâmetros bioquímicos no cerebelo de camundongos lactantes.

	Exposição lactacional ao MeHg	Exposição lactacional ao mercúrio inorgânico
Níveis cerebelares de Hg	↑↑ *	↑↑
Atividade locomotora (campo aberto)	Não alterado *	↓↓
Desempenho motor (Rotarod)	↓↓	↓↓
Níveis cerebelares de GSH	↓↓ *	Não alterado
Atividade GR cerebelar	Não alterado *	↑↑
Atividade GPx cerebelar	Não alterado *	Não alterado
Peroxidação lipídica no cerebelo	NA	↑↑
Níveis de peróxidos no cerebelo	↑↑	NA

Alguns dos dados relacionados à exposição lactacional ao MeHg foram baseados em trabalho previamente publicado por nosso grupo (Manfroi et al., 2004^{*}).

↑↑: aumentado quando comparado aos controles;

↓↓: diminuído quando comparado aos controles;

NA = não avaliado.

4.3. A neurotoxicidade do MeHg está associada à inibição da enzima antioxidante GPx

Considerando que, em estudos anteriores do nosso grupo, demonstrou-se que a exposição prolongada a doses elevadas de MeHg leva a uma diminuição da atividade GPx no cérebro de camundongos, nosso objetivo com o seguinte estudo foi investigar o papel desta enzima na neurotoxicidade induzida por MeHg. Para isto, utilizamos três modelos distintos: (a) camundongos machos adultos expostos a uma dose de 40 mg/L (diluído na água de beber); (b) mitocôndrias isoladas do cérebro de animais previamente expostos ao MeHg; (c) culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas por 24 horas a diferentes concentrações de MeHg.

O tratamento com MeHg por via oral (40 mg/L) por 21 dias causou uma diminuição significativa na atividade GPx do cérebro (encéfalo + cerebelo) dos animais (Figura 14A). Este efeito foi correlacionado com um observado aumento na proteólise da enzima poli(ADP) ribose polimerase (PARP) no tecido cerebral dos animais (Figura 14B).

Nas mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos tratados com MeHg, foi observada uma diminuição significativa na atividade GPx mitocondrial (Figura 15A). Este efeito foi acompanhado por uma diminuição na viabilidade, medida através do ensaio da redução do MTT (Figura 15B). A incubação de mitocôndrias isoladas dos animais controle com mercaptosuccinato (MS), um inibidor da GPx, causou uma pequena, porém significativa redução na viabilidade mitocondrial (Figura 15B). A incubação de mitocôndrias isoladas dos animais tratados com MeHg e com o inibidor da GPx aumentou significativamente o efeito do MeHg sobre a viabilidade mitocondrial (Figura 15B).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi monitorada com o uso do indicador 2'7'diclorofluoresceína diacetato, que ao reagir com EROs produz um composto fluorescente. A produção de EROs foi aumentada nas mitocôndrias isoladas dos animais tratados com MeHg e também dos animais controles, porém incubados com MS (Figura 15C). A incubação das amostras provenientes dos animais pré-tratados com MeHg com MS aumentou substancialmente a produção de EROs que obteve valores significativamente diferentes dos grupos controle e controle + MS

(Figura 15C). De forma similar, a produção de peróxidos totais (H_2O_2 + peróxidos orgânicos) foi significativamente aumentada nas amostras isoladas de animais tratados com MeHg e após a incubação das amostras controle com MS. Este efeito foi potencializado quando as mitocôndrias isoladas de animais tratados com MeHg foram incubadas por 60 minutos com MS (Figura 15D).

Tendo em vista o papel central da GPx na proteção contra a peroxidação lipídica, as mitocôndrias foram incubadas na presença ou ausência de MS e/ou TBOOH, sendo este último um peróxido orgânico degradado principalmente pela GPx. A incubação com MS, TBOOH ou a combinação dos dois compostos causou um aumento significativo na peroxidação lipídica, sendo que a combinação de MS e TBOOH causaram um efeito superior aumentando os níveis de TBARS (Figura 15E). Este efeito foi exacerbado nas mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos expostos ao MeHg (Figura 15E). A incubação das amostras com os antioxidantes GSH e catalase (CAT) bloqueou parcialmente a peroxidação lipídica induzida por MeHg. Em contrapartida, a incubação das amostras com GPx bloqueou completamente o aumento nos níveis de TBARS causado pela exposição ao MeHg (Figura 15F).

A incubação de células SH-SY5Y com concentrações crescentes de MeHg levou a uma redução na atividade GPx destas células, conforme pode ser visualizado na Figura 16A. Esta queda na atividade GPx obteve níveis estatisticamente significativos a partir de concentrações equivalentes a $1\mu M$ de MeHg (Figura 16A). A incubação das células com MeHg $1\mu M$ levou a uma diminuição na capacidade das células em degradar peróxido de hidrogênio adicionado exogenamente no meio de cultura (Figura 16B). Este fenômeno foi acompanhado por uma elevada produção de peróxidos totais em células expostas ao MeHg $1\mu M$ (Figura 16C), indicando que a redução na atividade GPx induzida pela exposição ao MeHg está levando a uma queda na capacidade antioxidante e um aumento na produção de EROs.

O estresse oxidativo induzido por MeHg em células SH-SY5Y foi acompanhado por uma diminuição significativa na viabilidade celular. Conforme demonstrado na Figura 16A, a incubação das células por 24 horas com concentrações crescentes de MeHg resultou em uma diminuição na

viabilidade metabólica destas células. Este fenômeno foi dependente de concentração e atingiu níveis estatisticamente significativos a partir de concentrações de MeHg equivalentes a 0,5 μM (Figura 17A). A incubação das células com MS exacerbou a queda na viabilidade celular induzida por MeHg na concentração de 1 μM (Figura 17B). O mesmo não foi observado quando as células foram incubadas com o inibidor da enzima antioxidante GR, BCNU, sendo que este composto não afetou o efeito do MeHg 1 μM sobre a viabilidade celular (Figura 17C).

A exposição das células ao MeHg levou a um aumento na morte celular apoptótica. Para demonstrar este fenômeno, utilizamos dois ensaios distintos como indicadores de apoptose: Primeiro a marcação de núcleos apoptóticos com o uso do agente iodeto de propídeo através de citometria de fluxo; e segundo a partir da imunodeteção de clivagem proteolítica da proteína PARP. A incubação de células SH-SY5Y com MeHg causou um aumento no número de células apoptóticas de maneira dependente de concentração (Figura 18A). Este efeito corrobora com o aumento dependente de concentração na clivagem de PARP, demonstrado na Figura 19A. A incubação das células com MS potencializou o efeito do MeHg em aumentar o número de células apoptóticas (Figura 16B). Isto foi confirmado pelo aumento na clivagem de PARP nas células incubadas com MeHg e MS, em comparação com as células controle ou incubadas somente com MS ou MeHg (Figura 19B). As alterações na viabilidade celular (Figura 17C), bem como na morte celular por apoptose (dados não mostrados) induzida por MeHg em células SH-SY5Y, não foram alteradas pela incubação com o inibidor da enzima antioxidante GR.

Figura 14.

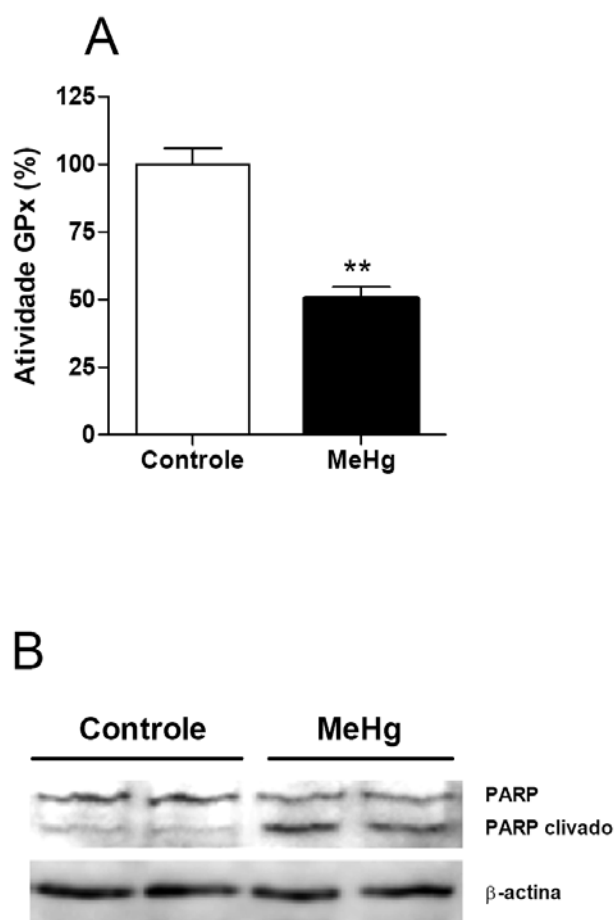


Figura 14. Efeitos da exposição oral ao MeHg sobre a atividade GPx a apoptose no cérebro de camundongos adultos. Os animais foram tratados oralmente com MeHg (40 mg/L na água de beber) por 21 dias. (A) Ao término do tratamento, a atividade GPx foi dosada no extrato citosólico do cérebro dos animais. A atividade foi expressa como % do controle (água sem MeHg). Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=6). ** p<0,01. (B) As alterações pró-apoptóticas foram medidas pela proteólise de poli(ADP-ribose) polimerase. A clivagem de PARP pode ser observada no grupo tratado com MeHg. A imagem representa um imunoblot de dois experimentos independentes (n = 4). β -actina foi utilizada como controle para os níveis de proteína.

Figura 15.

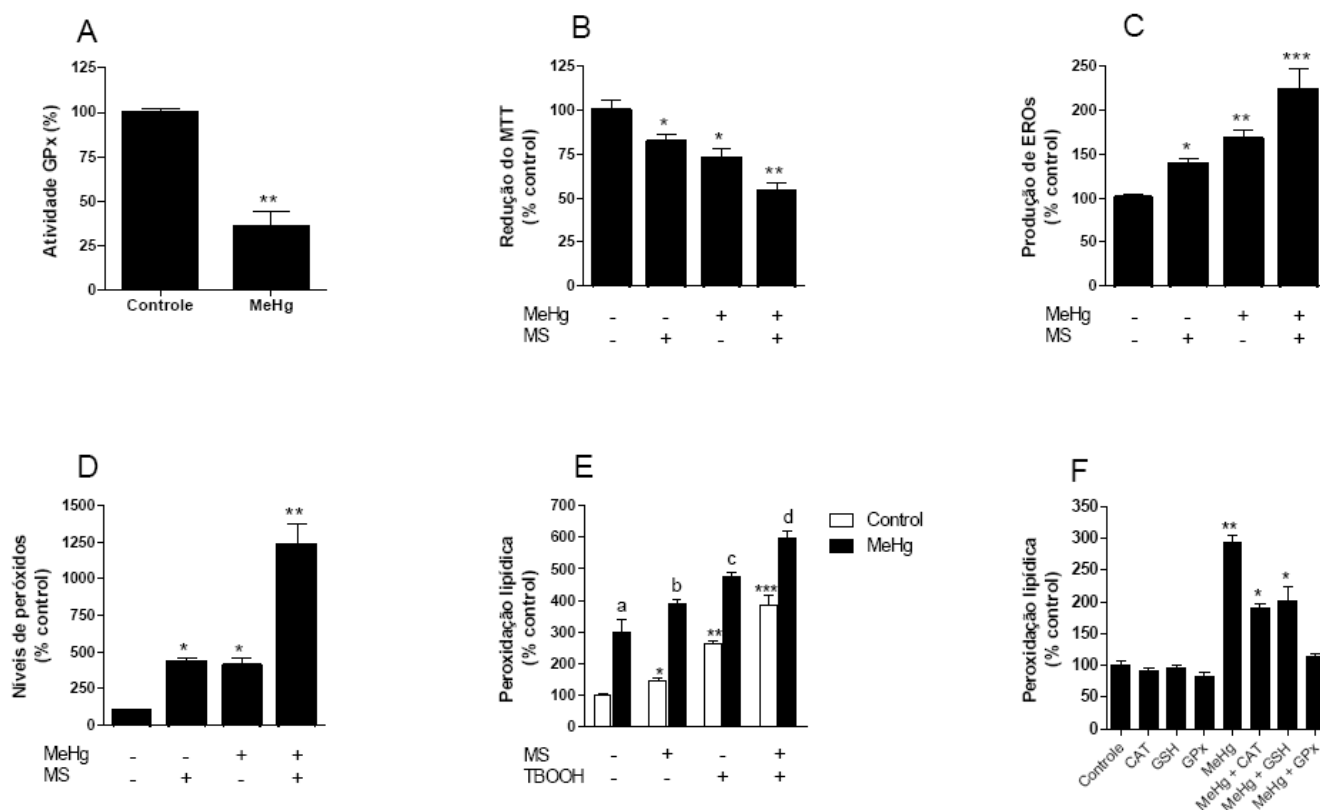


Figura 15. O MeHg induz estresse oxidativo em mitocôndrias do cérebro de camundongos. Os animais foram tratados por via oral com MeHg (40 mg/L na água de beber) por 21 dias e após 24 horas do fim do tratamento, frações enriquecidas em mitocôndrias foram isoladas do cérebro destes animais. Amostras controle foram preparadas a partir do cérebro de animais que receberam água potável (sem MeHg). Os resultados são demonstrados em porcentagem do controle (considerado 100 %) e expressos como média \pm erro padrão da média (n=6). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre todos os grupos. (A) Atividade GPx mitocondrial. (B) viabilidade mitocondrial. (C) Produção de ROS. (D) formação de peróxidos totais. (E) (F) peroxidação lipídica (TBARS). MS – ácido mercaptosuccinico (inibidor da GPx); TBOOH – terc-butilhidroperóxido (100 μ M); GSH – glutathiona (100 μ M); CAT – catalase (200 U); GPx – glutathiona peroxidase purificada (5 U + GSH 100 μ M)

Figura 16.

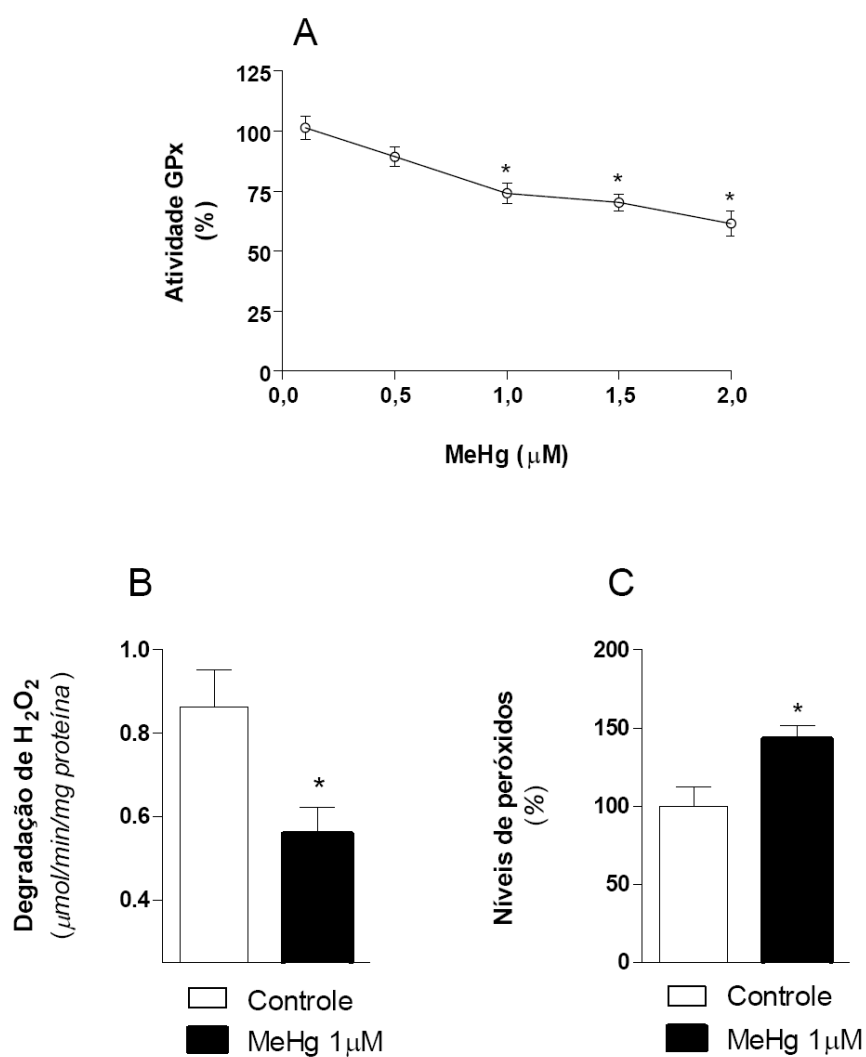


Figura 16. Estresse oxidativo induzido por MeHg em células SH-SY5Y. As células foram incubadas com concentrações crescentes de MeHg por 24 horas. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4). * p<0,05. (A) Efeito dependente de concentração do MeHg sobre a atividade GPx de células SH-SY5Y (% controle). (B) taxa de degradação de H₂O₂ em células tratadas com MeHg 1 μM por 24 horas. (C) produção de peróxidos totais em células tratadas com MeHg 1 μM por 24 horas.

Figura 17.

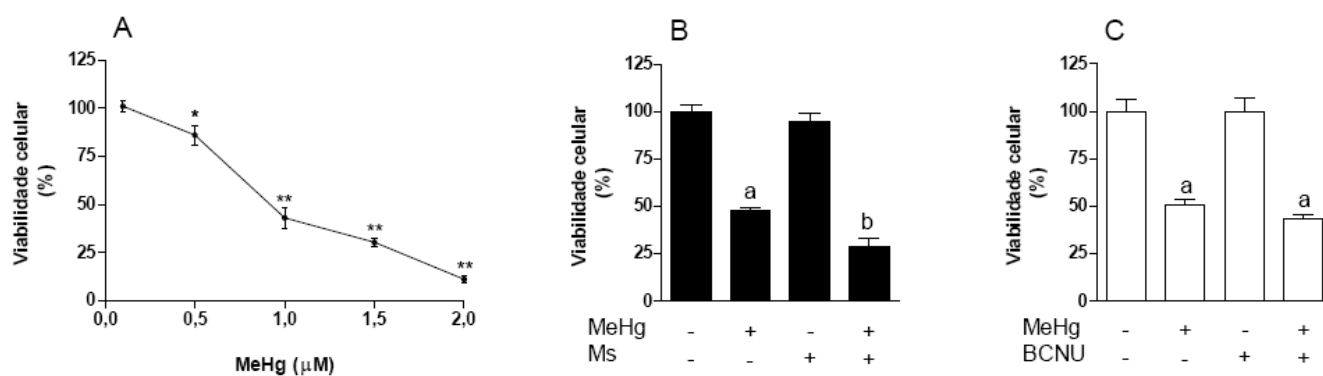


Figura 17. Alterações na viabilidade celular após o tratamento de células SH-SY5Y com MeHg por 24 horas. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média ($n=4$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle. Letras representam $p<0,05$ entre os grupos. (A) MeHg causa uma perda de viabilidade celular dependente de concentração. (B) a inibição da GPx com MS aumenta o efeito do MeHg 1 μM por 24 horas sobre a viabilidade celular. (C) a inibição da GR com BCNU não afeta o efeito do MeHg 1 μM por 24 horas sobre a viabilidade celular.

Figura 18.

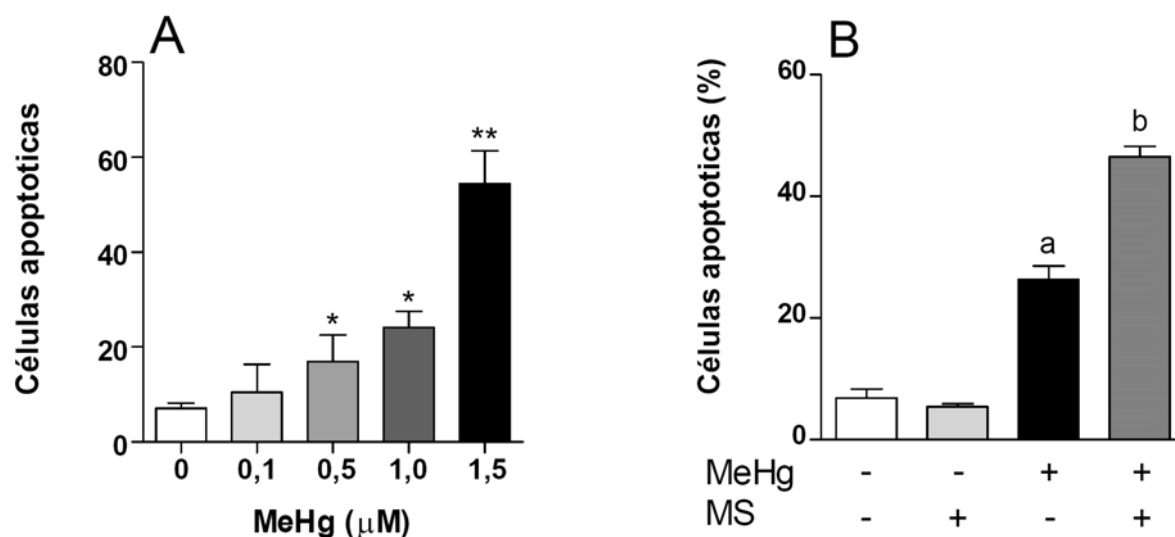


Figura 18. Apoptose induzida por MeHg em células SH-SY5Y. Após a incubação das células com MeHg por 24 horas, estas foram coletadas e processadas para análise de apoptose através de citometria de fluxo usando a marcação de núcleos apoptóticos com iodeto de propídeo. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle. Letras representam $p < 0,05$ entre os grupos. (A) MeHg causa um aumento dependente de concentração no número de células apoptóticas. (B) A inibição da GPx potencializou a indução de apoptose causada por MeHg (1 μM) em células SH-SY5Y.

Figura 19.

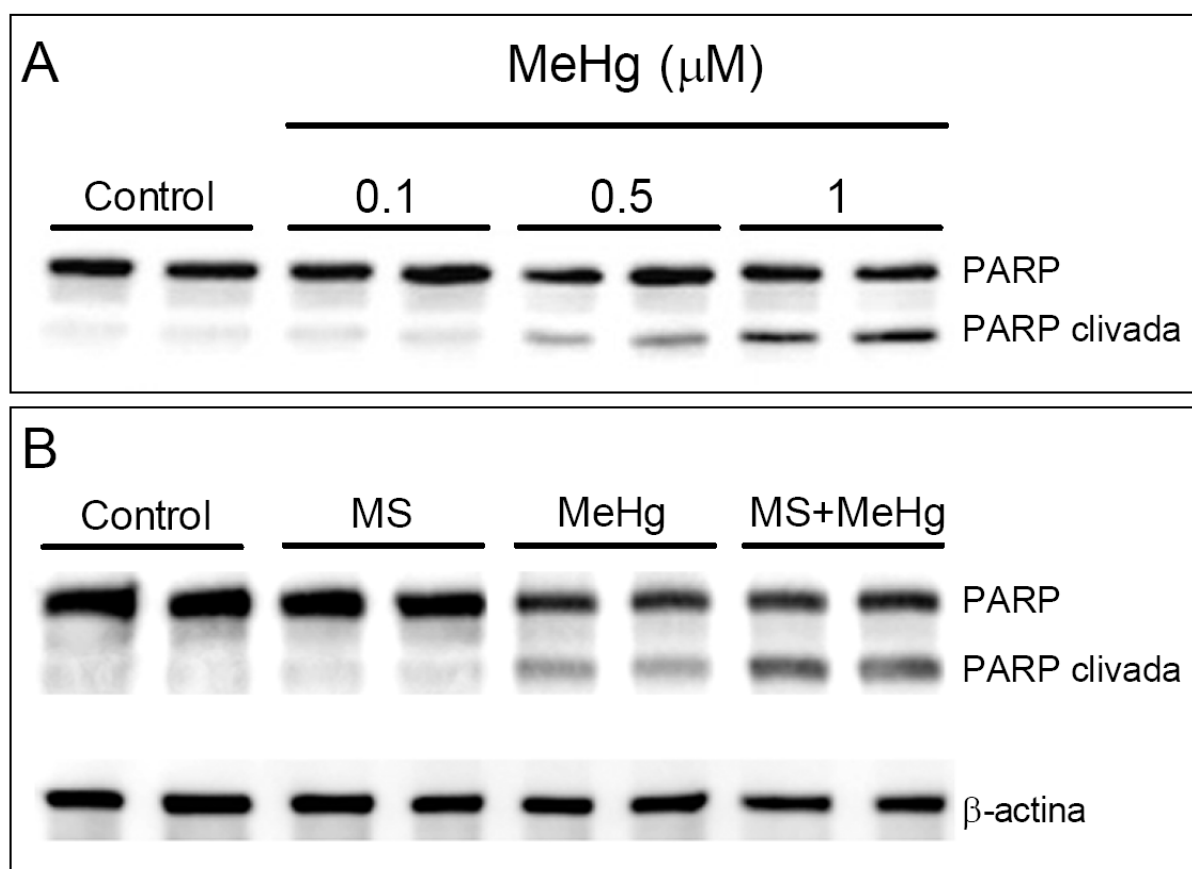


Figura 19. Clivagem de PARP como marcador de apoptose induzida por MeHg em células SH-SY5Y. Após a incubação das células com MeHg por 24 horas, estas foram coletadas e processadas para análise de apoptose através de imuno-deteção da clivagem de PARP usando anticorpo primário específico. Imagens são representativas de imunoblots obtidos em 3 experimentos separados (n=6). (A) MeHg causa um aumento dependente de concentração na clivagem de PARP. (B) A inibição da GPx aumentou a indução de apoptose (clivagem de PARP) causada por MeHg (0,5 μM) em células SH-SY5Y.

4.4. Estudo dos efeitos protetores do extrato de *Polygala* em animais tratados por via oral com MeHg

O tratamento dos animais com MeHg causou uma redução significativa na atividade da enzima antioxidante GPx (Tabela 6) no córtex cerebral e cerebelo. O tratamento com o extrato de *Polygala* bloqueou parcialmente a inibição da GPx no cerebelo dos camundongos e preveniu totalmente o efeito inibitório do MeHg sobre a GPx no córtex cerebral (Tabela 6). Em contrapartida, observamos um aumento na atividade da enzima antioxidante GR nas duas estruturas cerebrais estudadas (Tabela 6). Este efeito foi bloqueado pelo tratamento com extrato de *Polygala* no cerebelo. Entretanto, houve um pequeno, porém significativo, aumento na atividade GR no córtex cerebral após o co-tratamento dos animais com MeHg (40 mg/L) e extrato de *Polygala paniculata* (100 mg/Kg) (Tabela 6).

Este efeito foi acompanhado por um aumento significativo nos níveis de substâncias reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um índice de peroxidação lipídica, no córtex cerebral e cerebelo destes animais (Figura 20). A co-administração de extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* preveniu a peroxidação lipídica induzida pelo tratamento com MeHg a níveis do controle tanto no córtex cerebral como no cerebelo (Figuras 20A e 20B). O tratamento dos animais com MeHg causou uma redução significativa na atividade locomotora no aparelho rotarod (Tabela 7). Este fenômeno foi bloqueado pela co-administração do extrato de *Polygala* (Tabela 7).

Com o objetivo de descartar um possível efeito quelante do extrato de *Polygala paniculata* sobre o MeHg, concentrações conhecidas de GSH foram incubadas a temperatura ambiente na presença ou ausência de MeHg e/ou extrato de *Polygala*. Considerando a forte afinidade do mercúrio por grupos tióis, caso o extrato de *Polygala paniculata* interagisse com o MeHg, isto afetaria a depleção de GSH induzida por MeHg. No entanto, conforme demonstrado na Tabela 8, a presença de extrato de *Polygala paniculata* no meio de incubação não afetou a diminuição no conteúdo de GSH presente no tubo de ensaio, evidenciando que o extrato não apresenta efeito quelante sobre o MeHg.

Tabela 6.

Tabela 6. Efeitos do tratamento oral com MeHg e extrato de *Polygala paniculata* (PE) sobre a atividade das enzimas glutaciona peroxidase e glutaciona redutase no córtex cerebral e cerebelo de camundongos.

Atividade enzimática	Controle	MeHg	PE	MeHg + PE
Glutaciona Peroxidase				
Córtex cerebral	23,5 ± 1,3 ^a	14,9 ± 0,7 ^b	24,7 ± 2,2 ^a	22,6 ± 0,9 ^a
Cerebelo	31,0 ± 2,6 ^a	21,4 ± 1,9 ^b	27,8 ± 3,9 ^{a,b}	27,3 ± 2,5 ^{a,b}
Glutaciona Redutase				
Córtex cerebral	33,5 ± 1,4 ^a	41,5 ± 1,4 ^{b,c}	38,9 ± 3,5 ^{a,b}	46,0 ± 1,9 ^c
Cerebelo	72,3 ± 1,6 ^a	99,8 ± 9,8 ^b	83,1 ± 4,1 ^a	77,1 ± 2,4 ^a

Dados foram expressos como média ± erro padrão da média (n=7) da atividade enzimática (mU/mg proteína). Valores que não compartilham a mesma letra foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 7.

Tabela 7. Efeitos do tratamento oral com MeHg e extrato de *Polygala paniculata* (PE) sobre o desempenho motor dos animais no rotarod.

Tarefa	Tempo no rotarod (s)			
	Controle	MeHg	PE	MeHg + PE
Fase 1	51,1 ± 5,4	60 ± 0,0	55,8 ± 4,1	53,4 ± 4,3
Fase 2	60 ± 0,0	32,3 ± 8,0*	60 ± 0,0	50,0 ± 6,7

Fase 1 e Fase 2 representa o desempenho dos animais no aparelho antes e depois do início dos tratamentos, respectivamente. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média (n=7) do tempo que os animais permaneceram no aparelho (segundos). O tempo máximo que os animais foram submetidos ao rotarod foi de 60 segundos. * significativamente diferente do controle ($p < 0.05$).

Tabela 8.

Tabela 8. Efeitos do extrato de *Polygala paniculata* (PE) sobre a oxidação de GSH induzida por MeHg *in vitro*.

MeHg (nmol/ml)	Sem PE	Com PE
0	50,0 ± 3,0	49,6 ± 3,5
10	43,6 ± 5,2	42,4 ± 2,3
25	27,8 ± 2,9	26,8 ± 2,9
50	0,38 ± 0,3	0,50 ± 0,1
100	0,34 ± 0,5	0,25 ± 0,2

Dados foram expressos como média±erro padrão da média (n=7) do conteúdo de GSH (nmol) remanescente. O extrato de *Polygala paniculata* foi adicionado a uma concentração equivalente a 50 µM de MeHg. A análise de variância não indicou diferenças significativas entre as condições com e sem PE.

Figura 20.

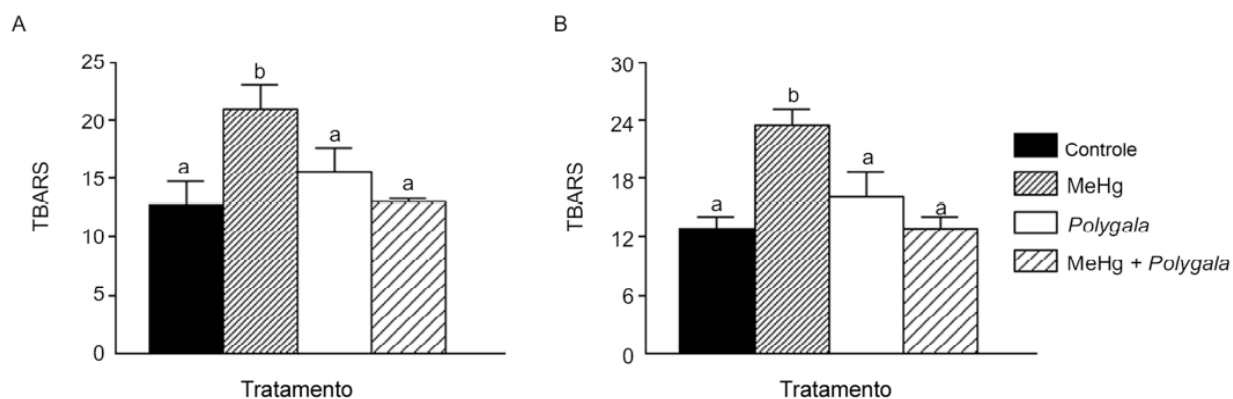


Figura 20. Efeitos do tratamento por via oral com MeHg e extrato de *Polygala paniculata* sobre os níveis de TBARS no córtex cerebral (A) e cerebelo de camundongos (B). Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n=7). Valores que não compartilham a mesma letra foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.5. Efeito neuroprotetor de compostos isolados de *Polygala* sobre a disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo em preparações cerebrais expostas a mercuriais

Considerando o observado efeito protetor do extrato contra os efeitos deletérios do MeHg em camundongos, nesta etapa, objetivamos identificar possíveis componentes presentes no extrato como os agentes responsáveis pelo observado efeito protetor do extrato. Desta forma, foram feitas incubações de preparações de cérebro de camundongos (fração rica em mitocôndrias) com MeHg ou HgCl₂ na presença ou ausência de 3 diferentes compostos (7-preniloxi-6-metoxicumarina, 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona e quercetina) encontrados no extrato de *Polygala*. As estruturas químicas destes compostos são apresentadas na Figura 21.

A incubação das frações ricas em mitocôndrias (mitocôndrias) com MeHg ou HgCl₂ causou uma diminuição na viabilidade mitocondrial de maneira dependente de concentração (Figura 22A e 22B). Também foi possível observar uma diminuição nos níveis de GSH após a incubação com os mercuriais (Figura 23A e 23B). Observamos uma correlação positiva entre a viabilidade mitocondrial e os níveis de GSH para o MeHg (coeficiente de Pearson = 0,933, p<0,01) e HgCl₂ (coeficiente de Pearson = 0,854, p<0,01).

A incubação das mitocôndrias com quercetina (100 e 300 µM), um flavonóide isolado do extrato de *Polygala*, bloqueou a diminuição na viabilidade mitocondrial induzida pelo MeHg (Figura 24A). Os compostos 7-preniloxi-6-metoxicumarina e 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona não foram capazes de reverter o efeito dos mercuriais sobre a viabilidade mitocondrial (Figura 24B e 24C). Resultados similares foram obtidos nas amostras incubadas com HgCl₂ (Figura 25). A incubação das mitocôndrias com quercetina também bloqueou a oxidação de GSH induzida pelos mercuriais (Figura 26).

No estudo realizado por Lund e colaboradores (1993), foi demonstrado que a incubação de mitocôndrias isoladas do rim de camundongos causa um aumento na produção de H₂O₂, sendo este agente apontado como um potencial causador da toxicidade induzida por mercúrio naquele modelo

de estudo. Considerando que nosso modelo de estudo também se baseou em preparações mitocondriais, porém isoladas do cérebro de camundongos, a potencial participação do H_2O_2 como agente causador da toxicidade induzida pelos mercuriais em mitocôndrias do cérebro de camundongos foi hipotetizada. Para elucidar esta possibilidade, incubamos as mitocôndrias com mercuriais na presença ou ausência de catalase, uma enzima antioxidante envolvida exclusivamente na degradação de H_2O_2 . A presença de catalase no meio de incubação preveniu totalmente a queda na viabilidade induzida pelo MeHg e parcialmente a queda na viabilidade induzida pelo $HgCl_2$ (Figura 27). Para validar este dado, realizamos a dosagem dos níveis de peróxidos induzidos pela exposição de mitocôndrias aos mercuriais. A Figura 28A mostra um aumento significativo nos níveis de peróxidos nas amostras incubadas com MeHg. A co-incubação com catalase diminuiu este efeito e a co-incubação com quercetina, o único composto isolado do extrato de *Polygala* a apresentar efeito protetor em nosso modelo de estudo, bloqueou completamente a produção de peróxidos induzida pelo MeHg (Figura 28A). Resultados similares foram obtidos nas amostras incubadas com $HgCl_2$ (Figura 28B). Estes dados confirmam a produção de H_2O_2 como um importante mecanismo envolvido na perda de viabilidade mitocondrial induzida pelo MeHg em preparações cerebrais. Considerando que o H_2O_2 consiste em um potente iniciador da cascata de oxidação-redução que resulta na peroxidação de lipídeos de membrana, efetuamos a dosagem dos níveis de TBARS, um índice de peroxidação lipídica. Conforme demonstrado na Figura 29A, a incubação das mitocôndrias com MeHg causou um aumento significativo nos níveis de TBARS, sendo este efeito completamente bloqueado pela co-incubação com catalase ou quercetina. Resultados similares foram observados para o $HgCl_2$ (Figura 29B).

De maneira similar ao estudo previamente descrito, a incubação de concentrações de GSH com quercetina não alterou o efeito do MeHg e $HgCl_2$ sobre a depleção do conteúdo de GSH presente no tubo de ensaio (Tabela 9).

Figura 21.

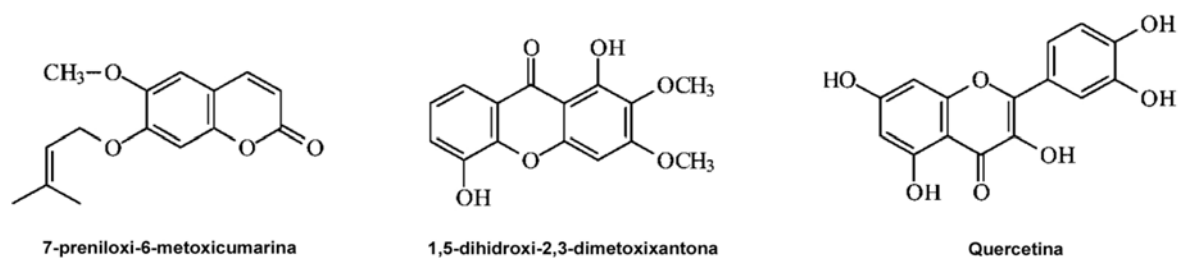


Figura 21. Estrutura química dos compostos isolados de Polygala.

Figura 22.

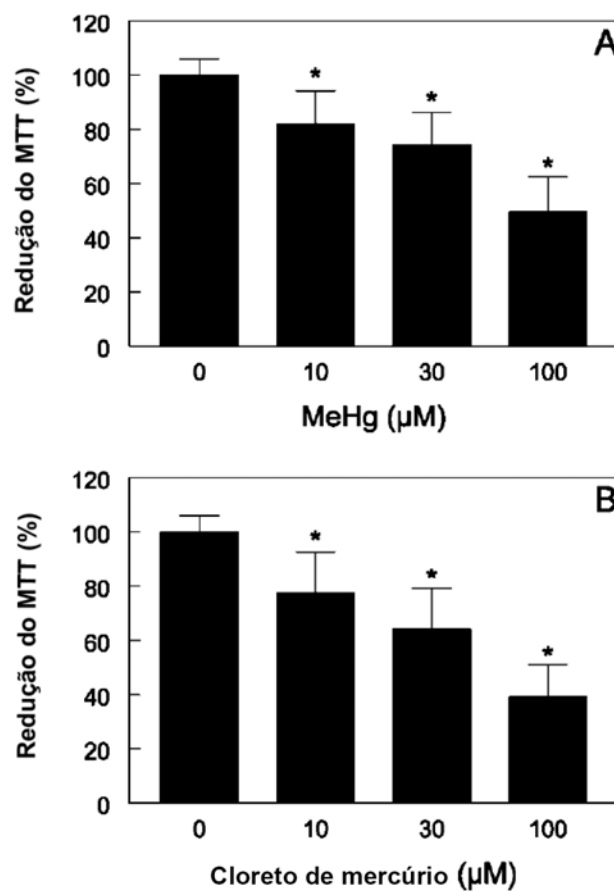


Figura 22. Efeitos do tratamento *in vitro* com MeHg or HgCl₂ sobre a função mitocondrial. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com concentrações crescentes (0, 10, 30, 100 μM) de (A) MeHg ou (B) HgCl₂. Após esta incubação (30 minutos a temperatura ambiente), a atividade mitocondrial foi determinada pelo método da redução do MTT (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * p<0,05 estatisticamente diferente do controle.

Figura 23.

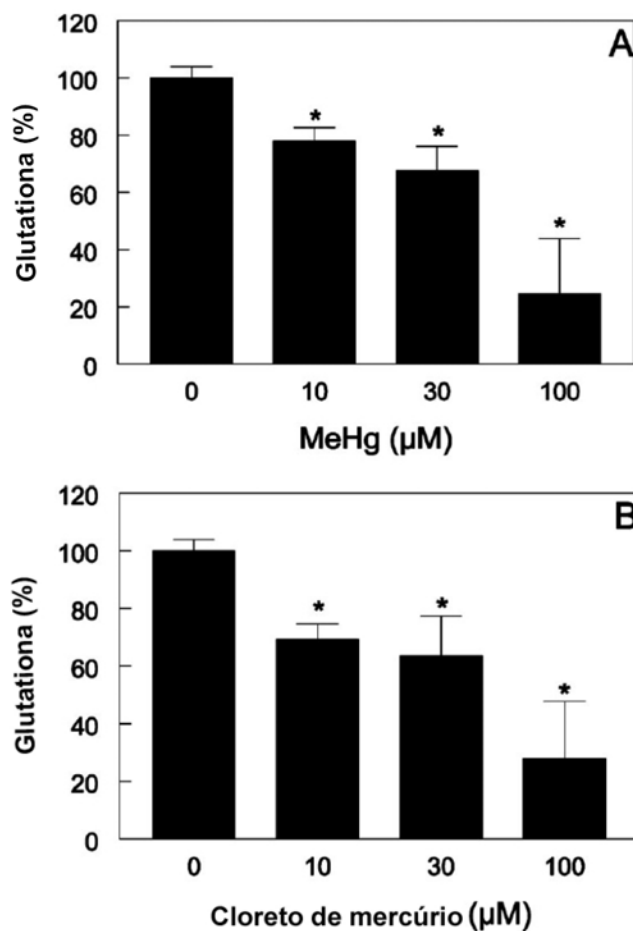


Figura 23. Efeitos do tratamento *in vitro* MeHg or HgCl₂ sobre o conteúdo de GSH mitocondrial. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com concentrações crescentes (0, 10, 30, 100 μM) de (A) MeHg ou (B) HgCl₂. Após esta incubação (30 minutos a temperatura ambiente), os níveis de GSH foram determinados usando o composto DTNB (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * p<0,05 estatisticamente diferente do controle. O conteúdo de glutathiona basal foi 1,0 ± 0,04 nmol/mg proteína.

Figura 24.

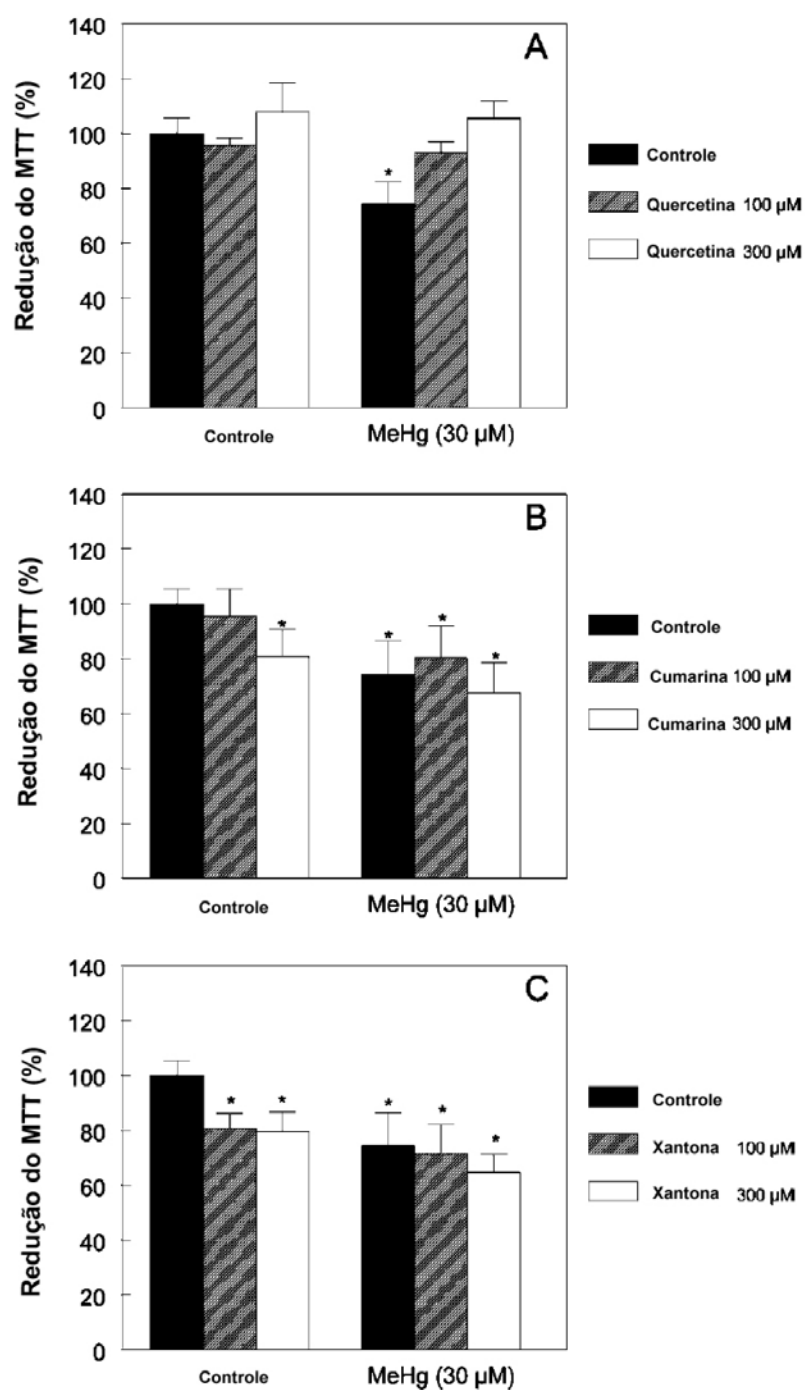


Figura 24. Efeitos dos compostos isolados de *Polygala* sobre a disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento *in vitro* MeHg. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (30 µM) e/ou (A) quercetina, (B) 7-preniloxi-6-metoxicoumarina, ou (C) 1,5-dihidroxi- 2,3-dimetoxi xantona (0, 100, e 300 µM). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), a atividade mitocondrial foi determinada pelo método da redução do MTT (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * p<0,05 estatisticamente diferente do controle.

Figura 25.

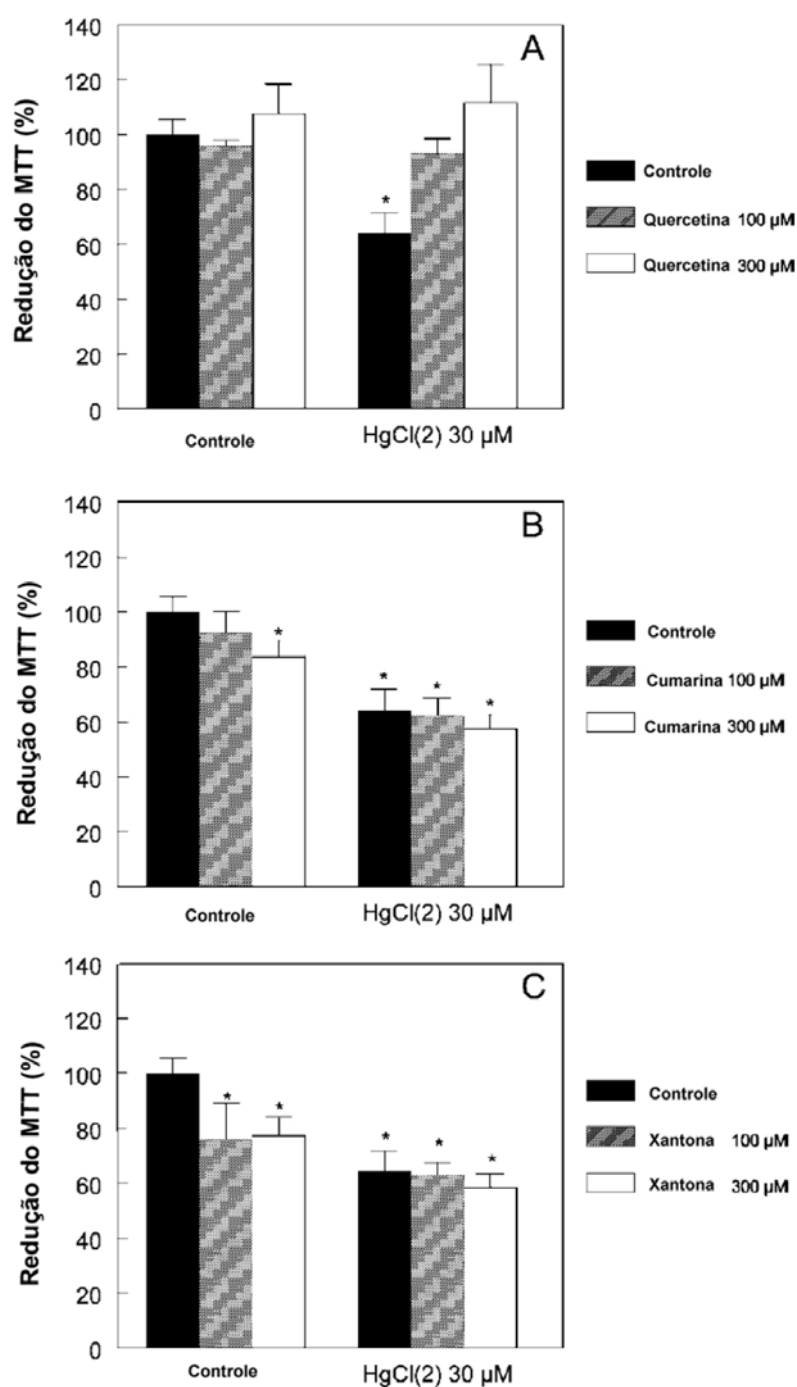


Figura 25. Efeitos dos compostos isolados de *Polygala* sobre a disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento *in vitro* HgCl₂. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com HgCl₂ (30 µM) e/ou (A) quercetina, (B) 7-preniloxi-6-metoxicoumarina, ou (C) 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona (0, 100, e 300 µM). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), a atividade mitocondrial foi determinada pelo método da redução do MTT (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * p<0,05 estatisticamente diferente do controle.

Figura 26.

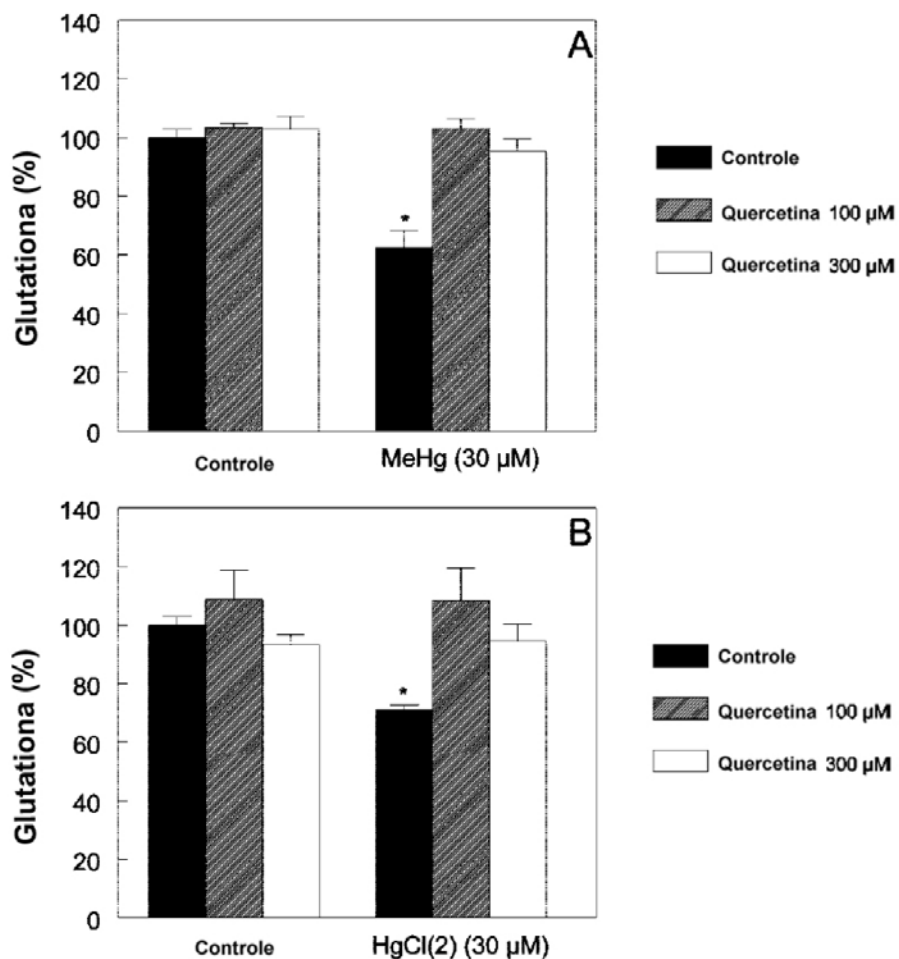


Figura 26. Efeitos da quercetina sobre a oxidação de GSH mitocondrial induzida pelo tratamento *in vitro* com mercuriais. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com (A) MeHg ou (B) HgCl₂ (30 μM) e/ou quercetina (0, 100, e 300 μM). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), os níveis de GSH foram determinados usando o composto DTNB (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle. O conteúdo de glutatona basal foi $1,0 \pm 0,028$ nmol/mg proteína.

Figura 27.

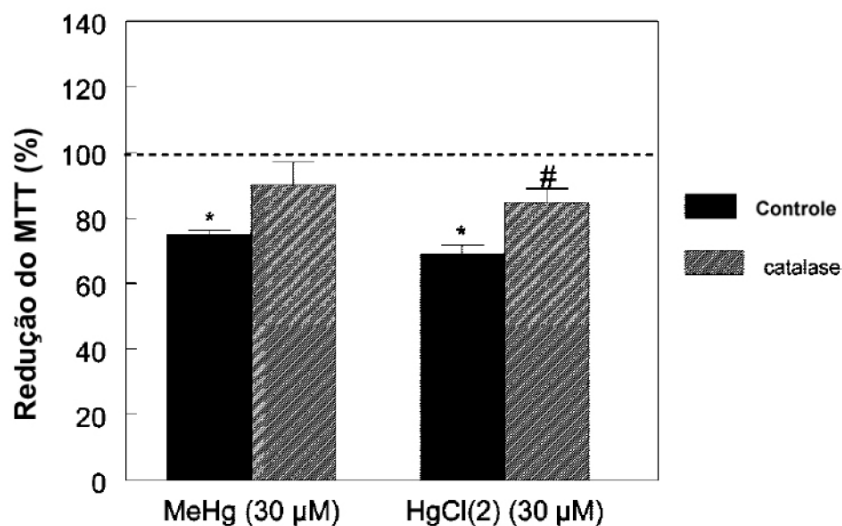


Figura 27. Efeitos da catalase sobre a disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento *in vitro* com MeHg ou HgCl₂. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com (A) MeHg ou (B) HgCl₂ (30 μM) e/ou catalase (200 U). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), a atividade mitocondrial foi determinada pelo método da redução do MTT (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=4). * p<0,05 estatisticamente diferente entre os grupos que receberam mercúrio e mercúrio+catalase. # p<0,05 estatisticamente diferente do controle (linha pontilhada – 100 %).

Figura 28.

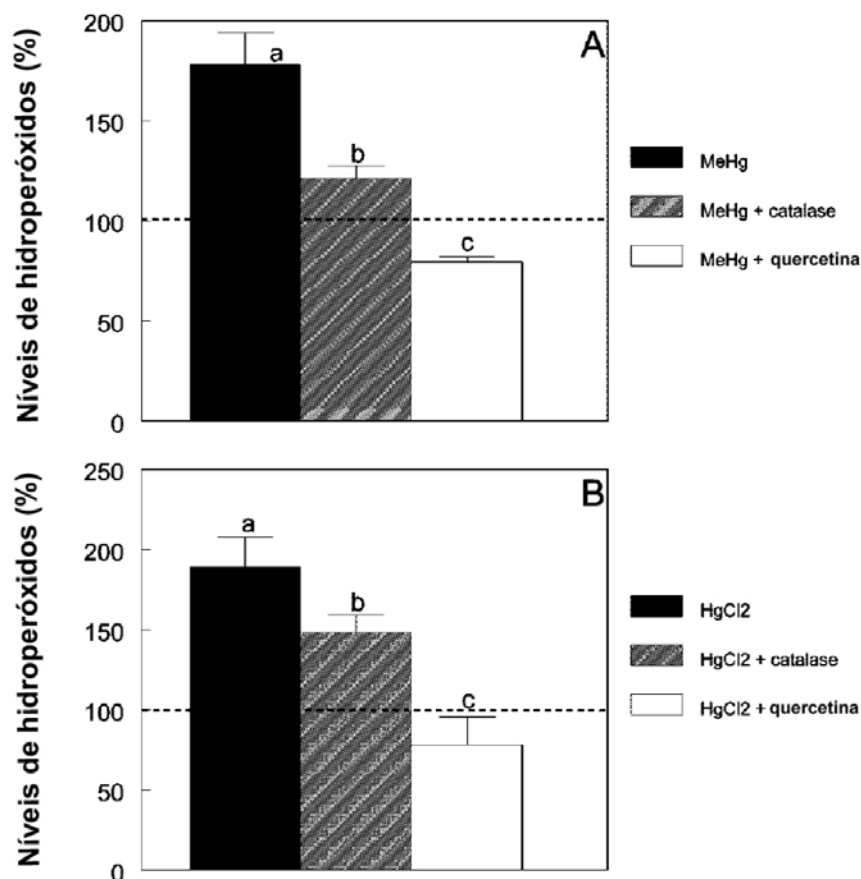


Figura 28. Efeitos do tratamento *in vitro* com mercuriais sobre a produção mitocondrial de hidroperóxidos. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com (A) MeHg ou (B) HgCl₂ (30 μM) e/ou catalase (200 U) e/ou quercetina (100 μM). Após a incubação (60 minutos a temperatura ambiente), os níveis de hidroperóxidos foram mensurados conforme descrito nos Materiais e Métodos. Dados foram expressos como média ± desvio padrão da média e representados em porcentagem do controle (linha pontilhada) (n=4). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). Os níveis basais de hidroperóxidos foram 0,14 ± 0,021 nmol/mg proteína.

Figura 29.

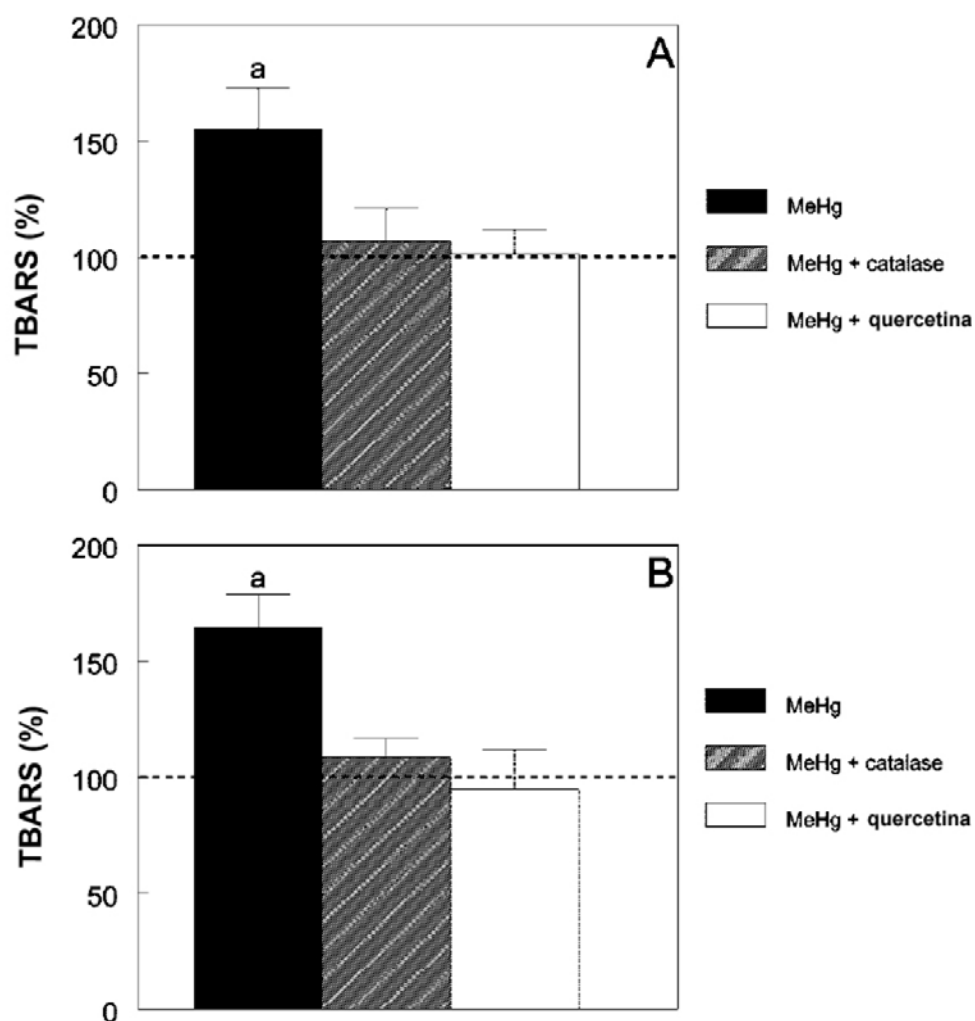


Figura 29. Efeitos do tratamento *in vitro* com mercuriais sobre a peroxidação lipídica mitocondrial. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com (A) MeHg ou (B) HgCl_2 ($30 \mu\text{M}$) e/ou catalase (200 U) e/ou quercetina ($100 \mu\text{M}$). Após a incubação (60 minutos a temperatura ambiente), os níveis de TBARS foram mensurados conforme descrito nos Materiais e Métodos. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e representados em porcentagem do controle (linha pontilhada) ($n=4$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$). Os níveis basais de TBARS foram $7,8 \pm 0,14 \text{ nmol MDA/mg proteína}$.

Tabela 9.

Tabela 9. Efeitos da quercetina sobre a oxidação de GSH induzida por mercuriais.

	<i>Glutathiona reduzida remanescente (nmol)</i>	
	<i>Sem quercetina</i>	<i>Com quercetina</i>
MeHg (nmol/ml)		
0	100 ± 3,9	96,8 ± 5,2
10	92,0 ± 2,5	88,7 ± 3,4
25	81,2 ± 1,7	81,7 ± 2,3
50	65,0 ± 8,4	60,7 ± 8,8
100	20,3 ± 0,6	18,2 ± 2,7
HgCl₂ (nmol/ml)		
0	98,9 ± 4,0	97,1 ± 2,2
10	87,7 ± 4,4	87,3 ± 6,5
25	62,1 ± 2,0	57,2 ± 5,2
50	18,5 ± 2,4	16,9 ± 2,1
100	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3

MeHg ou HgCl₂ (0, 10, 25, 50, and 100 μM) foram incubados com GSH (100 μM) na presença ou ausência de quercetina 100 μM. Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), os níveis de GSH foram determinados usando o composto DTNB (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média ± desvio padrão da média (nmol de GSH remanescente no tubo de ensaio) (n=3). * p<0,05 estatisticamente diferente do controle. O conteúdo de glutathiona basal foi 1,0 ± 0,028 nmol/mg proteína. A análise de variância de duas vias (cinco doses de mercuriais vs quercetina) não demonstrou interações significativas entre os mercuriais e quercetina sobre a oxidação de GSH. Desta forma, descartar-se um possível efeito quelante da quercetina sobre os mercuriais.

4.6. Efeito protetor de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzido pelo MeHg

O estudo previamente descrito demonstrou que, entre os compostos isolados do extrato de *Polygala*, apenas o flavonóide quercetina apresentou efeito protetor contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por mercuriais (Franco et al., 2007). Desta forma, decidimos testar os possíveis efeitos protetores de outros quatro flavonóides isolados de plantas neste modelo de estudo. Os flavonóides estudados foram: miricetina, canferol, miricitrina e rutina. As estruturas químicas destes compostos são apresentadas na Figura 30.

A incubação das mitocôndrias com MeHg na concentração de 100 μM causou uma diminuição significativa na viabilidade mitocondrial (Figura 31A). Este efeito foi concomitante com uma queda nos níveis de GSH mitocondrial (Figura 31B). Os níveis de TBARS foram substancialmente elevados após a incubação das amostras por 60 minutos com MeHg (Figura 31C). Também observamos um aumento na produção de EROs nas mitocôndrias expostas ao MeHg (Figura 31D).

A perda de viabilidade mitocondrial induzida por MeHg foi parcialmente prevenida pela incubação com o flavonóide miricetina na concentração de 30 μM . A proteção foi completa nas concentrações de miricetina 100 e 300 μM (Figura 32A). O flavonóide canferol protegeu parcialmente contra a perda de viabilidade mitocondrial apenas nas concentrações de 100 e 300 μM (Figura 32B). A incubação com das amostras com o flavonóide miricitrina bloqueou parcialmente a disfunção mitocondrial em todas as concentrações testadas (Figura 32C). O flavonóide rutina não foi capaz de bloquear o efeito do MeHg sobre a viabilidade mitocondrial em nenhuma das doses utilizadas (Figura 32D).

A ação antioxidante dos flavonóides é demonstrada na Figura 33. O flavonóide miricetina bloqueou parcialmente a produção de EROs em mitocôndrias incubadas com MeHg na concentração de 30 μM e totalmente nas doses de 100 e 300 μM (Figura 33A). O flavonóide canferol bloqueou a indução de EROs por MeHg de forma parcial na concentração de 100 μM e total em 300 μM (Figura

33B). Um efeito similar ao observado para o composto canferol foi notado para o flavonóide miricitrina (Figura 33C). O flavonóide rutina bloqueou a produção de EROs mitocondrial induzida por MeHg apenas parcialmente nas concentrações de 100 e 300 μM (Figura 33D).

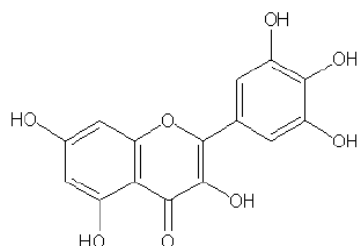
A peroxidação lipídica induzida por MeHg foi bloqueada de forma parcial após a incubação com miricetina 100 μM e total em 300 μM (Figura 34A). Os flavonóides canferol e miricitrina protegeram apenas parcialmente contra a peroxidação lipídica induzida por MeHg na maior dose testada (Figura 34B e 34C). O flavonóide rutina não apresentou efeito protetor contra a indução de TBARS (Figura 34D).

Apenas o flavonóide miricetina preveniu parcialmente a oxidação de GSH induzida por MeHg em nosso modelo de estudo (Figura 35A).

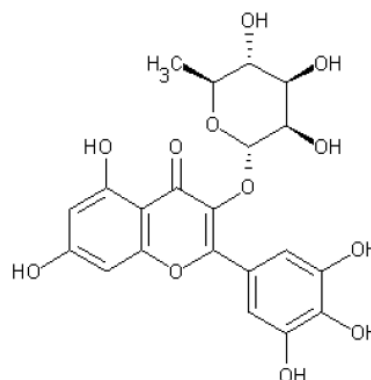
As concentrações EC_{50} para os flavonóides testados neste estudo são demonstradas na Tabela 10. A ordem de potência dos flavonóides em bloquear os efeitos deletérios induzidos por MeHg em nosso modelo de estudo foi: miricetina>canferol>miricitrina>rutina.

Figura 30.

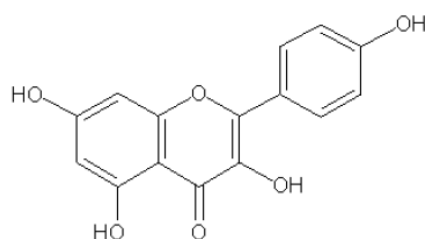
A. Miricetina (3,3',4',5,5',7-Hexahidroxilavona)



C. Miricitrina (Miricetina-3-O-ramnosídeo)



B. Canferol (3,4',5,7-Tetrahidroxiflavona)



D. Rutina (Quercetina-3-O-rutinosídeo)

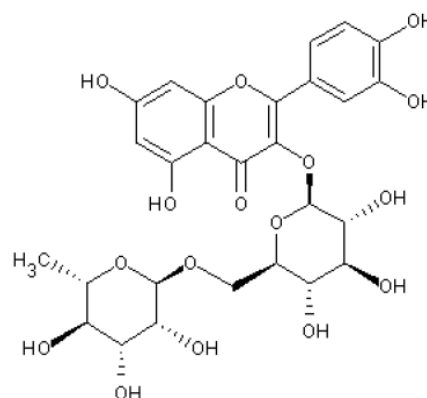


Figura 30. Estrutura química dos flavonóides (A) miricetina, (B) canferol, (C) miricitrina, (D) rutina.

Figura 31.

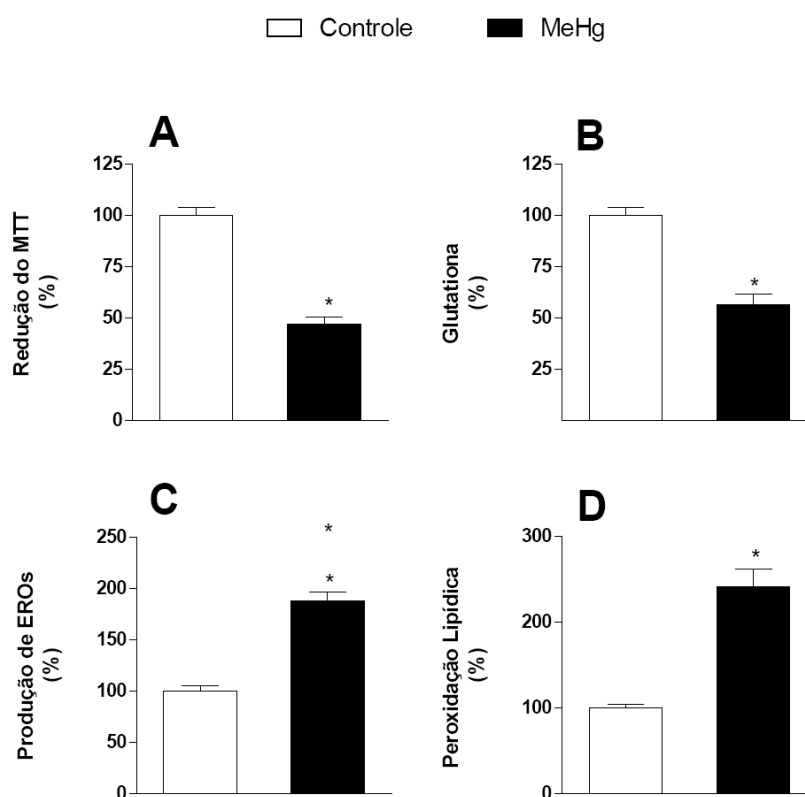


Figura 31. Efeitos do MeHg sobre a atividade mitocondrial e marcadores de estresse oxidativo. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (100 μM) e em seguida foram avaliadas (A) a atividade mitocondrial, (B) os níveis de GSH, (C) a produção de EROs e (D) a peroxidação lipídica. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média e representados em porcentagem do controle (n=6). * indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle.

Figura 32.

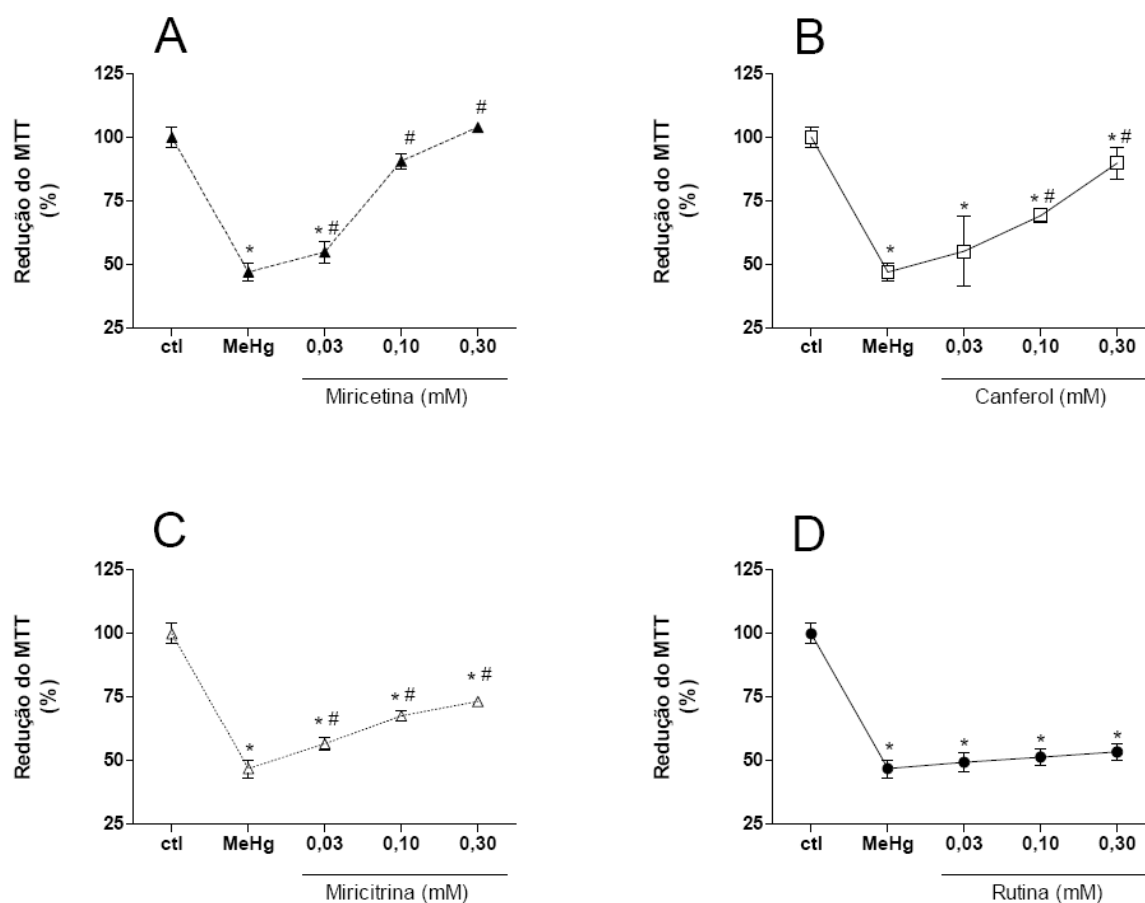


Figura 32. Efeitos de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial induzida por MeHg. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (100 μ M) e (A) miricetina, (B) canferol, (C) miricitrina, (D) rutina (30, 100 e 300 μ M). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), a atividade mitocondrial foi determinada pelo método da redução do MTT (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média \pm erro padrão da média (porcentagem do controle) (n=6). * p<0,05 estatisticamente diferente do grupo controle. # p<0,05 estatisticamente diferente do grupo MeHg.

Figura 33.

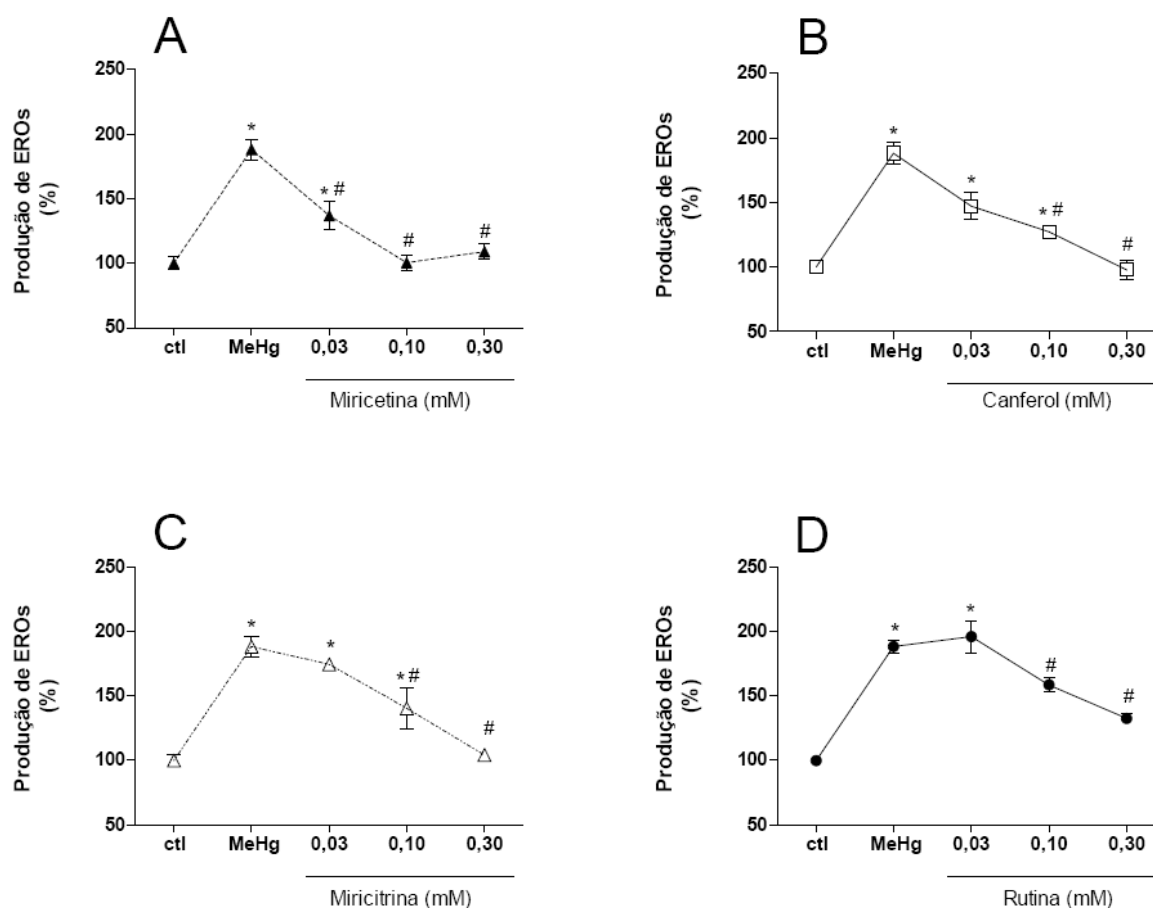


Figura 33. Efeitos de flavonóides sobre a produção de ROS induzida por MeHg. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (100 μ M) e (A) miricetina, (B) canferol, (C) miricitrina, (D) rutina (30, 100 e 300 μ M). As amostras foram incubadas com o composto DCFDA, que ao reagir com EROs, forma um produto fluorescente que foi acompanhado fluorimetricamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média (porcentagem do controle) (n=6). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$ estatisticamente diferente do grupo MeHg.

Figura 34.

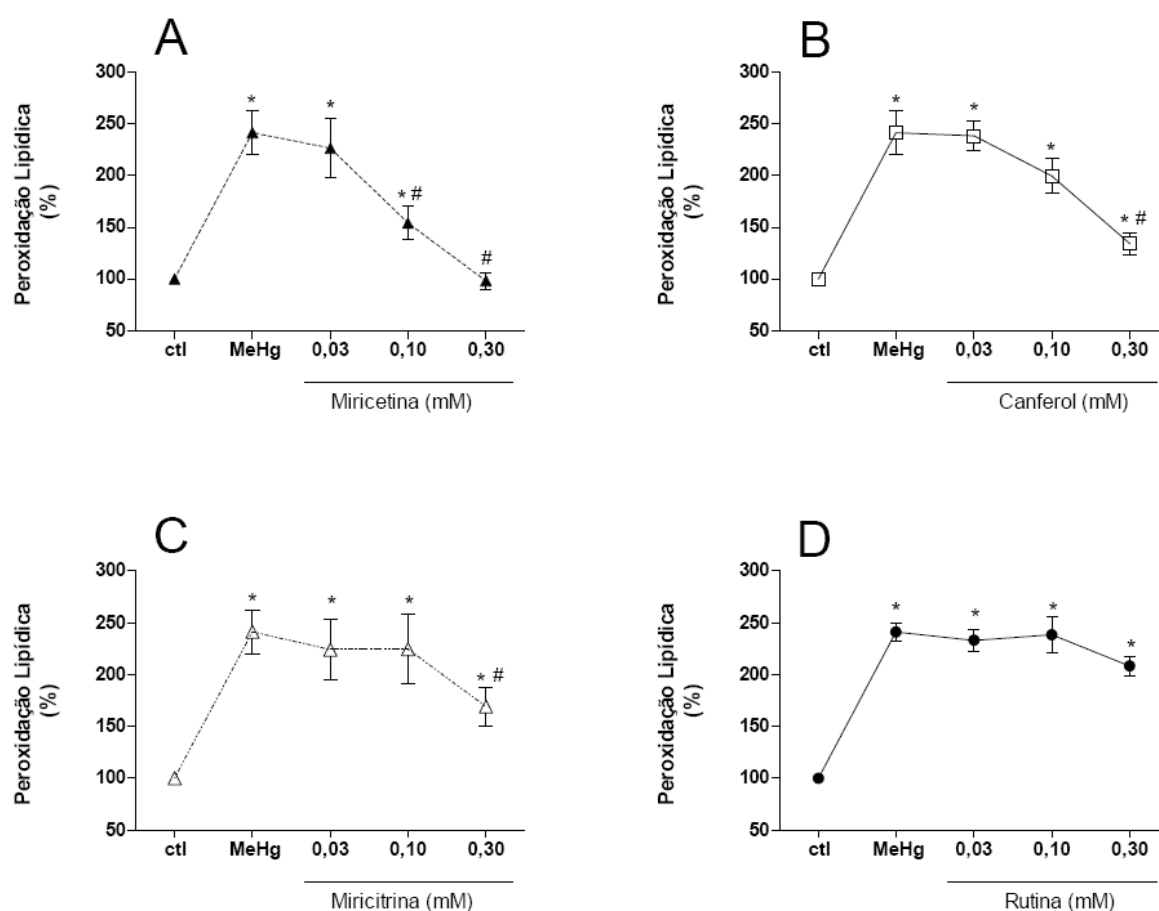


Figura 34. Efeitos de flavonóides sobre a peroxidação lipídica induzida por MeHg. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (100 μ M) e (A) miricetina, (B) canferol, (C) miricitrina, (D) rutina (30, 100 e 300 μ M). Após a incubação (60 minutos a temperatura ambiente), a produção de TBARS foi usada como índice de peroxidação lipídica (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=6). * p<0,05 estatisticamente diferente do grupo controle. # p<0,05 estatisticamente diferente do grupo MeHg.

Figura 35.

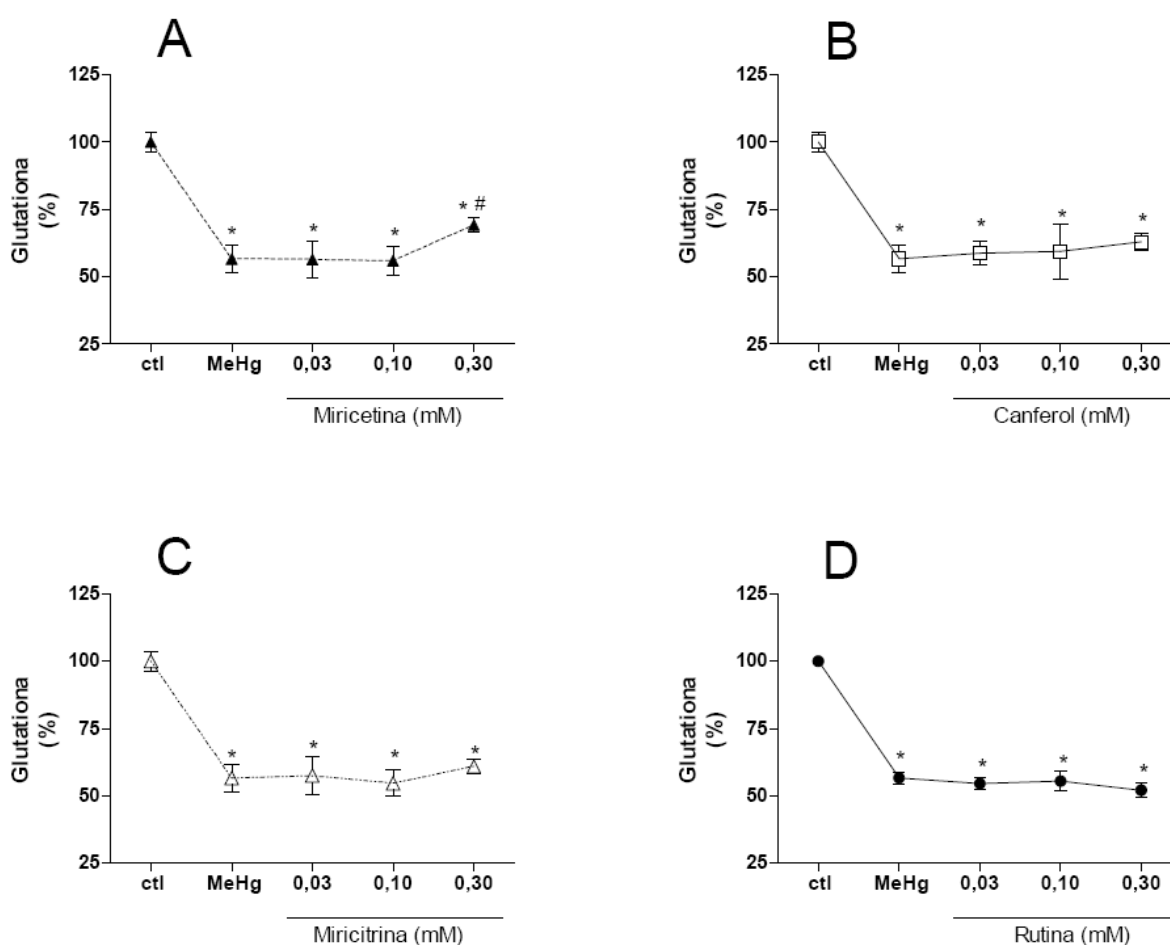


Figura 35. Efeitos de flavonóides sobre a oxidação de GSH induzida por MeHg. Frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg (100 μ M) e (A) miricetina, (B) canferol, (C) miricitrina, (D) rutina (30, 100 e 300 μ M). Após a incubação (30 minutos a temperatura ambiente), os níveis de GSH foram determinados usando o composto DTNB (conforme descrito em Materiais e Métodos). Dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (porcentagem do controle) (n=6) * p<0,05 estatisticamente diferente do grupo controle. # p<0,05 estatisticamente diferente do grupo MeHg.

Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações EC_{50} dos flavonóides na reversão dos efeitos do MeHg sobre a viabilidade mitocondrial, produção de EROs e peroxidação lipídica.

<i>Flavonóide</i>	<i>EC₅₀ (mM)</i>		
	<i>Redução do MTT</i>	<i>Produção de EROs</i>	<i>Peroxidação Lipídica</i>
<i>Miricetina</i>	0,0562	0,0278	0,0810
<i>Canferol</i>	0,1167	0,0406	0,1626
<i>Miricitrina</i>	0,2707	0,0946	0,2976
<i>Rutina</i>	---	0,2175	0,4514

Os dados foram obtidos através de análise de regressão não linear usando o software GraphPad Prism 5. A ordem de potência dos flavonóides estudados em reverter os efeitos do MeHg foi: miricetina>canferol>miricitrina>rutina.

5. DISCUSSÃO

5.1. Exposição lactacional ao MeHg

Vários estudos mostram que a exposição pré e pós-natal ao MeHg podem provocar mudanças comportamentais em camundongos (Goulet et al. 2003, Kim et al., 2000) e ratos (Sakamoto et al., 2002a). Além disso, a ocorrência de déficits neurológicos em crianças cujas mães foram expostas a MeHg durante o período gestacional tem sido documentada (Aschner et al. 2000; Harada, 1995; Grandjean et al., 1997; Weihe et al. 2002). No entanto, estudos sobre a exposição lactacional ao MeHg são escassos, o que aponta a exposição trans-placentária como a principal causa de neurotoxicidade na prole exposta ao MeHg. Neste contexto, um estudo comparativo sobre o acidente ocorrido no Iraque demonstrou que a exposição pré-natal ao MeHg em humanos é mais tóxica do que a exposição durante o período de lactação (Amin-Zaki et al., 1976). Além disso, Grandjean et al. (1995) relataram que a exposição ao MeHg através do leite humano não causa efeitos adversos no desenvolvimento de lactantes, e o estudo de Sakamoto et al., (2002b) relatou um declínio no risco de exposição ao MeHg em jovens durante o período de lactação, comparado ao período gestacional. Estes mesmo pesquisadores (Sakamoto et al., 2002a) mostraram uma redução gradual nos níveis de mercúrio no sangue e cérebro de ratos neonatos após o nascimento, mesmo quando a exposição das mães ao MeHg foi mantida. Os resultados do nosso estudo indicaram um aumento nos níveis de mercúrio no cerebelo (Tabela 2) e a presença de efeitos neurotóxicos (alterações bioquímicas e comportamentais) em camundongos lactantes como consequência da exposição ao MeHg dada de forma exclusiva através da lactação.

Do ponto de vista toxicológico, estes resultados representam uma descoberta importante devido ao fato de demonstrarem que a exposição de mães ao MeHg durante o período lactacional pode causar efeitos neurotóxicos na prole, sem a necessidade de uma intoxicação prévia *in útero*. É importante ressaltar que este achado não está em desacordo com os estudos previamente relatados. De fato, embora Sakamoto et al. (2002b) encontraram que o risco de transferência do MeHg para a prole é especialmente alta durante a gestação e que pode diminuir durante a lactação, a

contribuição exclusiva da exposição lactacional ao MeHg não foi investigada naquele estudo. Em contrapartida, é notável que os níveis de Hg no cerebelo das fêmeas encontrado em nosso estudo foram bastante similar ao achados no cérebro das mães no estudo de Sakamoto et al. (2002a). Além disso, naquele estudo foi encontrado um déficit significativo na coordenação motora da prole exposta ao MeHg (Sakamoto et al., 2002a). Assim, baseando-se em estudos prévios em humanos (Grandjean et al., 1995; Sakamoto et al., 2002b), ratos (Sakamoto et al., 2002a) e em nosso estudo em camundongos, torna-se possível inferir que a exposição *in útero* ao MeHg é mais perigosa para a prole do que a exposição lactacional. Entretanto, a exposição lactacional a este metal pode causar neurotoxicidade na prole e ser uma forma importante de intoxicação.

É conhecido que mercuriais são capazes de interagir e causar a oxidação de grupos sulfidrilas presentes em biomoléculas e que este efeito está fortemente relacionado com as ações neurotóxicas destes compostos de mercúrio (Aschner e Clarkson, 1988; Shanker et al., 2004; James et al., 2005). No entanto, até onde sabemos, não existem estudos sobre as possíveis relações entre o perfil ontogenético, a neurotoxicidade do MeHg e o status tiólico intracelular. Uma importante descoberta do nosso estudo foi que a diminuição de GSH cerebelar induzida por MeHg foi dependente do período ontogenético (comparando os animais adultos com os filhotes lactantes; Figura 7). Os efeitos pró-oxidativos do MeHg sobre os tióis cerebelares foram observados apenas nos filhotes expostos lactacionalmente e não em suas respectivas mães expostas diretamente ao MeHg. A causa pela qual os filhotes apresentam uma resposta neuropatológica diferente e uma maior suscetibilidade ao MeHg em relação aos adultos ainda é desconhecida (Castoldi et al., 2003). Neste contexto, um estudo realizado por Ballatori e Clarkson (1982) mostrou que o tempo de meia vida mais prolongado do MeHg em roedores neonatos é explicada por uma incapacidade do fígado neonatal em secretar a toxina na bile, o que em adultos representa a principal via de eliminação. Esta habilidade em secretar mercúrio na bile parece estar completamente desenvolvida a partir da 2-4 semanas de idade e é correlacionada com o aumento na habilidade do fígado em desenvolvimento em secretar GSH na bile (Ballatori e Clarkson, 1982). Porém, nossos dados demonstraram que os níveis de MeHg no cerebelo

da mães foi maior que o encontrado em suas respectivas proles. Desta forma, poder-se-ia concluir que a elevada susceptibilidade dos filhotes aos efeitos neurotóxicos do MeHg não está diretamente relacionado a um alto conteúdo de Hg no cerebelo como resultado de uma incapacidade em secretar a toxina.

A glutatona redutase (GR) é uma importante enzima envolvida na redução de glutatona oxidada (GSSG) para sua forma reduzida, GSH, usando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato como equivalente redutor (Gul et al., 2000). No presente estudo demonstramos que a exposição ao MeHg causou um aumento na atividade GR no cerebelo das mães, porém não em suas respectivas proles (Figura 8). De acordo com estes dados, evidências demonstram que o mercúrio é capaz de aumentar a atividade GR sob condições *in vivo* (Lash e Zalups, 1996; Farina et al., 2005a). Em outro estudo foi demonstrado que baixas concentrações de MeHg causaram um aumento na concentração de GSH em astrócitos co-cultivados com neurônios (Morken et al., 2005). O observado aumento na atividade GR no cerebelo das mães pode estar relacionada, ao menos em parte, aos efeitos oxidativos do MeHg diretamente sobre a GSH endógena. Este fenômeno pode ser interpretado como uma resposta protetora compensatória para preservar os níveis intracelulares de GSH em sua forma reduzida. A significativa correlação positiva entre a atividade GR e os níveis de GSH cerebelares nas fêmeas reforça esta hipótese (Figura 9). É notável que apenas as mães, expostas ao MeHg, apresentaram esta resposta compensatória na atividade GR cerebelar. A ausência deste mecanismo nos filhotes está provavelmente relacionada a uma incapacidade do sistema imaturo em responder contra uma condição pró-oxidativa.

A glutatona peroxidase (GPx) pertence a uma classe de enzimas que catalisam a redução de hidroperóxidos através da oxidação de GSH e sua principal função está relacionada à proteção contra os efeitos danosos destas moléculas formadas endógenamente (Flohe, 1971). Particularmente, os efeitos pró-oxidantes do MeHg podem estar relacionados, ao menos em parte, à habilidade deste toxicante em inibir a atividade GPx (Farina et al., 2004, 2005a; Manfroi et al., 2004). No presente estudo, o MeHg causou uma pequena porém não significativa diminuição na atividade GPx das mães

(Figura 10). Em um estudo similar, nosso grupo demonstrou uma redução significativa na atividade GPx cerebelar em camundongos adultos tratados com MeHg (Farina 2005a). No entanto, naquele estudo, utilizamos uma dose mais elevada de MeHg do que a administrada no presente estudo.

Existem evidências de que células cerebelares são alvos seletivos de compostos de mercúrio *in vivo* (Sanfeliu et al., 2003) e que a neurotoxicidade do MeHg afeta o sistema motor (Grandjean et al., 1997). A relação entre os déficits motores e o dano cerebelar induzidos por MeHg são fenômenos bastante relatados (Sakamoto et al., 1993). Neste contexto, estudos do nosso grupo relatam que animais expostos ao MeHg durante a idade adulta (Dietrich et al., 2005; Farina et al., 2005b) e durante o período pós-natal (Manfroi et al., 2004) apresentam problemas locomotores. Neste estudo observamos que a exposição lactacional ao MeHg afetou o desempenho locomotor dos filhotes (Tabela 3). Baseando-se em dados na literatura relacionados aos níveis cerebelares de GSH em filhotes expostos ao MeHg, podemos propor que os efeitos deletérios do MeHg sobre o desempenho motor observados nos filhotes expostos lactacionalmente ao MeHg estão relacionados, ao menos em parte, aos efeitos pró-oxidativos do MeHg no cerebelo.

Em conclusão, nossos dados indicam que a exposição de camundongos lactantes ao MeHg causa importantes déficits motores na prole, um efeito que pode estar relacionado ao estado tiólico cerebelar. Além disso, o aumento nos níveis de GSH e atividade GR observado apenas no cerebelo das mães expostas ao MeHg podem representar uma resposta patofisiológica compensatória aos efeitos do MeHg sobre os tióis endógenos. O fato de os filhotes serem incapazes de efetivar este tipo de resposta, provavelmente devido a uma imaturidade do sistema nervoso central, resultou em uma maior sensibilidade aos efeitos deletérios do MeHg sobre estado tiólico cerebelar.

5.2. Exposição lactacional ao $HgCl_2$

No item anterior, demonstramos que a exposição lactacional de camundongos neonatos ao MeHg, uma forma orgânica de mercúrio, foi capaz de induzir déficits motores acompanhados por alterações no estado tiólico cerebelar. No presente estudo evidenciamos que o $HgCl_2$, uma forma inorgânica de mercúrio considerada menos neurotóxica que os organomercuriais, foi capaz de induzir sinais de neurotoxicidade em camundongos lactantes expostos pela via lactacional. Do ponto de vista toxicológico, estes resultados representam uma importante descoberta, pois eles mostram, pela primeira vez, que a exposição de mães ao mercúrio inorgânico durante o período lactacional pode causar efeitos neurotóxicos na prole. Levando em consideração que a exposição humana ao mercúrio inorgânico é bastante comum, sendo freqüentemente relacionada à atividade industrial e de mineração (Bluhm et al., 1992) e que há evidências de que o mercúrio inorgânico é mais concentrado no leite materno do que as formas orgânicas deste metal (Sundberg et al., 1998), nossos dados apontam a exposição lactacional ao mercúrio inorgânico como um importante fenômeno toxicológico.

Existem vários estudos indicando que a exposição perinatal a mercuriais orgânicos e inorgânicos causa alterações comportamentais em animais (Goulet et al., 2003; Kim et al., 2000; Sakamoto et al., 2002; Szasz et al., 2002). Além disso, também são demonstrados déficits neurológicos em crianças cujas mães foram expostas a mercúrio orgânico durante o período gestacional (Aschner et al., 1994; Harada, 1995; Grandjean et al., 1997; Weihe et al., 2002). Entretanto, a maioria destes estudos está relacionada à exposição trans-placentária como a principal causa de neurotoxicidade na prole exposta ao Hg. Neste contexto, o mercúrio elementar e formas orgânicas de Hg podem ser facilmente transferidos para o embrião ou feto através da placenta (Yoshida, 2002). Inversamente, o mercúrio inorgânico não parece ser transferido para o feto através da membrana placentária. De fato, após administração de doses elevadas de mercúrio inorgânico em roedores no período gestacional, um significativo acúmulo de mercúrio foi observado na placenta, e uma menor acumulação no feto, o que sugere que a membrana placentária constitui uma barreira

contra a penetração do mercúrio inorgânico no feto (Berlin e Ullberg, 1963, Yang et al., 1996). Por outro lado, a transferência do mercúrio através do aleitamento parece ser mais eficiente após a administração de mercúrio inorgânico do que após a administração de compostos orgânicos de mercúrio (Sundberg et al., 1998). De acordo com o estudo de Sundberg e colaboradores (1998), a transferência lactacional do mercúrio em camundongos foi mais eficiente após o tratamento com mercúrio inorgânico do que com MeHg, atingindo um pico de concentração cinco vezes maior no leite materno e plasma. Também foi observado neste estudo que a taxa de excreção do Hg no leite foi de 8% da dose administrada para o mercúrio inorgânico, comparando com os 4% observados para o metilmercúrio. Em conjunto, nossos dados e os relatos na literatura (Sundberg et al., 1998) tornam relevante a exposição lactacional ao mercúrio inorgânico em termos de problemas de saúde. No entanto, é importante afirmar que as doses utilizadas em nosso estudo foram relativamente elevadas e as doses equivalentes em seres humanos ainda têm de ser estabelecidas.

É bem conhecido que mercuriais orgânicos e inorgânicos causam alterações neurocomportamentais em animais e humanos, principalmente durante as fases iniciais do desenvolvimento, levando a perda de funções cognitivas e motoras na infância (Szasz et al., 2002; Grandjean et al., 1997; Roegge et al., 2004). No estudo de Sanfeliu e colaboradores (2003), foi demonstrado que células cerebelares são alvos seletivos do mercúrio *in vivo* e a relação entre déficits motores induzidos por Hg e o dano cerebelar induzido por este metal são fenômenos bem descritos (Sakamoto et al., 1993). No presente estudo nós observamos que a exposição ao mercúrio inorgânico exclusivamente pela via lactacional foi capaz de causar uma diminuição na locomoção e desempenho motor de maneira dependente da dose. Estes animais também apresentaram uma elevada peroxidação lipídica no tecido cerebelar, sugerindo que as propriedades pró-oxidativas do mercúrio poderiam ser responsáveis pelos seus efeitos neurocomportamentais. Além disso, é importante salientar que estes animais apresentaram altos níveis de Hg no tecido cerebelar, confirmando a transferência do mercúrio inorgânico através do leite materno. Entretanto, é importante ressaltar que a redução em torno de 40 % no peso corporal da prole, observada nos animais expostos a maior

dose de Hg utilizada, pode significar um importante déficit no crescimento, o que poderia por si só afetar o comportamento motor.

A produção excessiva de EROs e, subsequente, estresse oxidativo constituem numa das principais conseqüências envolvidas na toxicidade de metais (Hansen et al., 2006). De forma notável, a glutatona e suas enzimas relacionadas, representam importantes aparatos de defesa celular para combater o estresse oxidativo (Sies et al., 1999; Dringen et al., 2005). Particularmente, a neurotoxicidade induzida por Hg está, ao menos em parte, relacionada aos efeitos do Hg sobre o sistema antioxidante da glutatona. Estudos do nosso grupo têm demonstrado que organomercuriais diminuem os níveis de GSH e elevam os níveis de peróxidos e produtos finais da peroxidação lipídica no sistema nervoso central de roedores (Manfroi et al., 2004; Farina et al., 2005b). Além disso, a exposição à organomercuriais altera a atividade de enzimas relacionadas à GSH no SNC de camundongos, tais como a GPx e GR (Farina et al., 2005b, Stringari et al., 2006). No presente estudo, a exposição lactacional de camundongos lactantes ao mercúrio inorgânico não afetou os níveis de GSH no cerebelo. Entretanto, os níveis de TBARS cerebelares foram aumentados nestes animais, apontando para a ocorrência de dano oxidativo aos lipídeos de membrana. Também observamos um aumento na atividade GR em resposta ao mercúrio inorgânico, exposto através do leite materno. Como já mencionado anteriormente, a enzima GR é importante na manutenção dos níveis de GSH (Gul et al., 2000). O aumento na atividade GR durante a exposição a mercúrio orgânico e inorgânico também foi demonstrada em estudos anteriores (Lash e Zalups, 1996, Farina et al., 2005b), e este fenômeno pode contribuir para a manutenção dos níveis de GSH em concentrações fisiológicas no SNC, como demonstrado na Figura 11. É importante notar que no estudo anterior de nosso grupo, mostramos que a exposição ao MeHg (Franco et al., 2006) causou um aumento na atividade GR no cerebelo das mães, porém não nos filhotes, demonstrando que a capacidade da prole em responder a toxicidade do mercúrio varia de acordo com a forma química do metal. Em conjunto com dados da literatura, nossos resultados apontam para a modulação da atividade GR como uma importante resposta celular frente à toxicidade induzida por mercúrio inorgânico, favorecendo a manutenção de

a homeostase do estado tiol e um ambiente celular reduzido, imprescindível para a sobrevivência e função celular. Novos estudos são necessários para esclarecer as respostas contrastantes relacionadas à atividade GR observadas após a exposição às diferentes formas de mercúrio.

No presente estudo, não pudemos observar alterações neuroquímicas nos parâmetros avaliados no cerebelo das fêmeas injetadas com mercúrio inorgânico. Em contrapartida, a prole exposta lactacionalmente a esta forma de mercúrio apresentou sinais neuroquímicos e comportamentais de neurotoxicidade. No estudo de Sundberg e colaboradores (1998), foi demonstrado que o mercúrio inorgânico concentra-se de forma mais acentuada no leite materno do que o MeHg. Desta forma, uma maior carga de mercúrio poderia estar sendo incorporada pela prole, levando às observadas alterações comportamentais e bioquímicas. Devido ao fato de o SNC em desenvolvimento ser mais suscetível aos efeitos tóxicos de metais e ao estresse oxidativo, a exposição ao mercúrio inorgânico parece ser um importante tópico concernente à neurotoxicologia durante o período de aleitamento. A tabela 5 apresenta uma comparação entre os efeitos da exposição lactacional ao MeHg (Franco et al., 2006, Manfroi et al., 2004) e o HgCl₂, em testes comportamentais/funcionais e sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo em camundongos lactantes. Podemos observar que as diferentes formas de mercúrio causam alguns efeitos distintos sobre os parâmetros avaliados. Estes dados nos levam a entender a exposição lactacional a estas diferentes formas de mercúrio como eventos toxicológicos singulares e que requerem intervenções específicas no que diz respeito a possíveis tratamentos.

Em conclusão, os presentes resultados indicam que a exposição lactacional ao mercúrio inorgânico é capaz de induzir alterações bioquímicas no cerebelo de animais lactantes, além de déficits motores. Este fenômeno aparenta estar relacionado às ações pró-oxidativas do mercúrio inorgânico e torna relevante a exposição lactacional a esta forma de mercurial em termos de problemas de saúde.

5.3. A neurotoxicidade do MeHg está associada à inibição da enzima antioxidante GPx

Vários estudos mostram que o estresse oxidativo atua como um dos principais mecanismos de toxicidade induzida por MeHg (Ou et al., 1999; Manfroi et al., 2004; Yin et al., 2007; Aschner et al., 2007). Os mecanismos pelos quais o MeHg leva à indução do estresse oxidativo envolvem uma produção excessiva de EROs (Ali et al., 1992; Lund et al., 1993) e uma redução, nas defesas celulares antioxidantes (Shanker et al., 2005; Kaur et al., 2006). Estudos anteriores do nosso grupo (Manfroi et al., 2004; Carvalho et al., 2007; Stringari et al., 2008) e outros (Watanabe et al., 1999; Mori et al., 2007) têm demonstrado que o MeHg é capaz de reduzir a atividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GPx) *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, uma investigação detalhada sobre o papel da GPx na neurotoxicidade causada pelo MeHg não está disponível. A exposição prolongada por via oral de camundongos Swiss adultos a uma concentração de 40 mg/L de MeHg causou uma diminuição significativa na atividade GPx no cérebro (em torno de 50 %). A vulnerabilidade das células aos efeitos tóxicos de compostos de mercúrio depende de um sistema de defesa funcional (Sarafian et al., 1996). Considerando o papel de EROs na toxicidade do MeHg (Ou et al., 1999), um mal funcionamento do aparato celular de defesa antioxidante pode resultar em uma maior suscetibilidade aos efeitos deletérios do MeHg. Uma atividade GPx reduzida prejudica os sistemas de defesa celular contra uma gama de condições pró-oxidativas e aumenta a formação de ROS e dano oxidativo (Asahi et al., 1995; Cheng et al., 1999; Shin et al., 2008). Devido à conhecida capacidade do MeHg em aumentar a produção de EROs, incluindo peróxido de hidrogênio, a GPx pode atuar como uma enzima central na proteção contra os efeitos adversos do H₂O₂ induzido pelo MeHg. Além disso, a inibição da GPx pode ser considerada um importante fator responsável pelo aumento na produção de H₂O₂ promovido por mercúrio.

Uma atividade GPx diminuída tem sido associada com apoptose em modelos de lesão isquêmica (Crack et al., 2001) e diabetes (Wentzel et al., 2008) bem como em estudos de intoxicação por metais (Quinteros et al., 2008). No nosso estudo, o tratamento de camundongos com MeHg na água de beber por 21 dias causou um aumento na clivagem de PARP, indicando que além da

observada inibição da atividade GPx, o MeHg também causou apoptose no cérebro dos animais tratados. A PARP é uma enzima responsável pelo reparo de mutações sofridas pelo DNA e sua clivagem proteolítica leva a sua inativação, sendo considerado um importante passo na cascata de morte celular apoptótica (Soldani e Scovassi, 2002). Em estudos anteriores, pudemos demonstrar que o regime de tratamento empregado no presente estudo é capaz de aumentar os níveis de mercúrio no cérebro e induzir déficits motores (Dietrich et al., 2005; Farina et al., 2005b; Carvalho et al., 2007). Assim, os presentes resultados, em conjunto com dados previamente publicados por nosso grupo, sugerem que os efeitos deletérios do MeHg podem estar relacionados ao aumento no estresse oxidativo causado pela inibição da GPx e aumentada morte celular por apoptose no cérebro dos animais tratados.

A mitocôndria tem sido apontada como um importante alvo subcelular para os efeitos pró-oxidativos do MeHg (Dreiem et al., 2005; Mori et al., 2007). A apoptose induzida por distúrbios nas mitocôndrias geralmente envolve alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e a liberação de citocromo-C no citoplasma, seguido da ativação de caspases (Kluck et al., 1997; Ghribi et al., 2001). É conhecido que o mercúrio acumula-se no interior das mitocôndrias, onde pode afetar a permeabilidade da membrana mitocondrial e causar uma redução no $\Delta\psi_m$ (Insug et al., 1997; Shenker et al., 1999; Araragi et al., 2003). Conseqüentemente, muitos estudos têm sugerido que a apoptose é um fenômeno crítico envolvido na neurotoxicidade induzida por MeHg (Nishioku et al., 2000; Dare et al., 2001).

Com o objetivo de avaliar o papel da GPx mitocondrial na disfunção mitocondrial induzida por MeHg, utilizamos um modelo experimental em que mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos previamente tratados com MeHg foram incubadas *in vitro* com o ácido mercaptosuccínico (MS), um inibidor da GPx, e/ou terc-butíl hidroperóxido (TBOOH), um peróxido degradado preferencialmente pela GPx. A atividade GPx mitocondrial foi inibida substancialmente após o tratamento com MeHg (em torno de 65%). Este resultado corrobora com dados na literatura que mostram que o mercúrio acumula-se na mitocôndria e representa uma importante descoberta

em relação aos efeitos prejudiciais do MeHg sobre o estado redox mitocondrial no SNC, apontando a GPx como um alvo central da neurotoxicidade induzida por MeHg. No estudo de Mori et al. (2007), foi relatado que o MeHg pode diminuir a atividade GPx mitocondrial, potencializando a disfunção mitocondrial induzida por este metal. Em nosso estudo, a inibição da GPx mitocondrial após a intoxicação com MeHg foi acompanhada por uma aumentada produção de ROS, níveis de peróxidos totais e produtos finais da peroxidação lipídica. Corroborando com estes resultados, observamos também uma queda na viabilidade mitocondrial. A inibição da GPx com MS provocou um aumento substancial no estresse oxidativo mitocondrial e perda de viabilidade causada pela intoxicação com MeHg. Quando as mitocôndrias foram incubadas MS e TBOOH, isoladamente ou em combinação, um efeito aditivo sobre os efeitos do MeHg sobre a peroxidação lipídica esteve sempre aparente (Figura 15E). Os níveis de GSH nas mitocôndrias isoladas de animais tratados com MeHg não foram alterados (dados não mostrados). Estas observações sugerem de maneira expressiva que a peroxidação lipídica causada pelo MeHg está associada a uma inibição da GPx. Para confirmar esta hipótese, incubamos as mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos com GPx exógena/purificada de fonte comercial e então dosamos os níveis de TBARS. A adição de GPx no meio de incubação bloqueou completamente a peroxidação lipídica induzida por MeHg (Figura 15F), indicando que uma reduzida capacidade em degradar peróxidos devido a uma reduzida atividade tiol-peroxidase é um fenômeno importante na indução de peroxidação lipídica pelo MeHg. A adição da enzima catalase também diminuiu a formação de TBARS, no entanto de maneira menos consistente, confirmando o papel principal da GPx mitocondrial na proteção contra os efeitos pró-peroxidativos do MeHg. A formação de ROS pela mitocôndria está fortemente ligada a alterações no potencial de membrana mitocondrial (Boveris e Chance, 1973). Levando-se em consideração que o MeHg é capaz de causar distúrbios no $\Delta\psi_m$, uma inibição da GPx pode causar efeitos deletérios severos na função mitocondrial, via uma exacerbada produção de EROs.

Neste estudo, também investigamos o papel da GPx na toxicidade induzida por MeHg em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) em cultura. De maneira similar ao experimento com

mitocôndrias isoladas, o MeHg também causou uma diminuição na atividade GPx nas células SH-SY5Y (em torno de 25 %). Este efeito foi correlacionado com uma perda de viabilidade celular e aumentada apoptose. Quando as células foram incubadas com o inibidor da GPx (MS), a perda de viabilidade celular e apoptose induzida por MeHg foi significativamente estimulada. De maneira importante, a inibição causada pelo MeHg nestas células foi correlacionada com uma diminuída habilidade das mesmas em degradar H_2O_2 , sugerindo que a inibição da GPx por MeHg estaria contribuindo para o estabelecimento de uma condição pró-oxidante.

As alterações pró-apoptóticas causadas por MeHg em células SH-SY5Y podem estar ligadas a uma diminuição da função mitocondrial nestas células. Foi demonstrado que o MeHg afeta de forma potente o $\Delta\Psi_m$, causando disfunção mitocondrial (Yin et al., 2007). A perda do $\Delta\Psi_m$ causa a liberação de citocromo-C no citosol e pode iniciar cascatas bioquímicas pró-apoptóticas, envolvendo a ativação de caspases (Kluck et al., 1997; Ghribi et al., 2001). No nosso estudo, encontramos que a incubação de células SH-SY5Y com MeHg causou proteólise de PARP, um substrato de diferentes caspases. Este dado está de acordo com a literatura que mostra que o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) induziu apoptose em células HL-60 via disfunção mitocondrial, liberação de citocromo-C e clivagem de PARP (Araragi et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que o timerosal, uma forma orgânica de mercúrio usada em conservantes de vacinas, causa clivagem de PARP associada à liberação de citocromo-C e ativação de caspases em linhagens de células SK-N-SH (Humphrey et al., 2005).

Estudos usando a deleção gênica da GPx celular demonstraram que os animais deficientes nesta enzima são altamente suscetíveis a desafios oxidativos (Cheng et al., 1998). Tem sido também demonstrado que o tratamento com antioxidantes como a vitamina E não é capaz de substituir os efeitos protetores da GPx contra insultos oxidativos agudos (Cheng et al., 1999). Entretanto, o tratamento com compostos miméticos da GPx são conhecidos por aumentar a atividade GPx e podem proteger contra o estresse oxidativo (Davis e Bartfay, 2004; Sun et al., 2005). Considerando que o MeHg é um contaminante ambiental conhecido por causar morte celular por mecanismos que levam a superprodução de EROs, incluindo peróxido de hidrogênio, a GPx pode ser apontada como

uma proteína de defesa celular primária contra os efeitos tóxicos do MeHg. Neste contexto, nossos dados mostram que o MeHg é capaz de inibir a atividade GPx e causar efeitos deletérios em modelos de cultura de células humanas, frações mitocondriais do cérebro de camundongos e também no tecido cerebral *in vivo*. Além disso, nossos dados também revelam que a inibição da GPx resulta em uma exacerbação da neurotoxicidade induzida por MeHg e contribuem de forma positiva para o melhor entendimento dos mecanismos de ação tóxicas do MeHg.

Em conclusão, nosso estudo contribui com evidências que substancialmente sugerem a GPx como um importante alvo molecular e uma defesa celular primária contra a neurotoxicidade induzida por MeHg. Nossos resultados mostraram que o MeHg é capaz de inibir a atividade GPx em três diferentes modelos de estudo e que a inibição desta enzima antioxidante causa um aumento significativo nos efeitos prejudiciais do MeHg sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo.

5.4. Estudo dos efeitos protetores do extrato de Polygala em animais tratados com MeHg por via oral

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos protetores de plantas e seus compostos isolados em diversas condições neuropatológicas (Scalbert e Williamson, 2000; Walle, 2004; Lee e Choi, 2008; Vicente-Sánchez et al., 2008; Silva et al., 2008). Além disso, em estudo realizado em ratos foi demonstrado o efeito protetor do flavonóide lespeflan contra a toxicidade renal induzida por mercúrio (Nikolic e Sokolovic, 2004) e plantas do gênero *Polygala* têm sido investigadas devido ao seu potencial afeito neuroprotetor em modelos de neurodegeneração e excitotoxicidade (Lee et al., 2004; Park et al., 2006). No presente estudo, o tratamento dos animais com MeHg causou uma redução significativa no desempenho motor dos animais no rotarod. Este efeito foi acompanhado por um aumento significativo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um índice de peroxidação lipídica, no córtex cerebral e cerebelo destes animais. A co-administração de extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* preveniu a peroxidação lipídica induzida pelo tratamento com MeHg a níveis do controle tanto no córtex cerebral como no cerebelo.

O aumento nos níveis de produtos da peroxidação lipídica, um indicador de dano oxidativo a lipídeos de membranas celulares (Mattson et al., 1998), pode estar relacionado a uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes importante na proteção celular contra o dano oxidativo causado por EROs. Entre estas, as enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) desempenham um papel fundamental (Dringen et al., 2000). Em nosso estudo, em paralelo com o observado aumento nos níveis de TBARS, observamos também uma diminuição significativa na atividade GPx. Esta enzima, junto com a catalase, tem como função a detoxificação de peróxidos produzidos pela célula ou oriundos de fontes exógenas. De forma peculiar, a catalase não é capaz de remover outros peróxidos que não o H_2O_2 . Já a GPx é capaz de degradar tanto o H_2O_2 , quanto outros peróxidos, incluindo hidroperóxidos lipídicos, que são produzidos em larga escala durante o processo de peroxidação de membranas celulares (Ohkawa et al., 1979). Este fato apresenta extrema importância no sistema nervoso central, onde se encontram altos níveis de ácidos graxos passíveis de oxidação. Desta forma, a GPx representa uma importante ferramenta de defesa contra peróxidos de natureza orgânica e inorgânica no SNC (Dringen et al., 2000, 2005). Tendo em vista o fato de que o MeHg leva a uma exacerbada produção de peróxidos e que o SNC é relativamente mais suscetível aos efeitos danosos destes agentes oxidantes, o aumento na peroxidação lipídica, observado no córtex cerebral e cerebelo dos animais tratados com MeHg, pode estar relacionado ao efeito inibitório deste metal sobre a enzima antioxidante GPx (Tabela 1), caracterizando um possível mecanismo de ação tóxica dos mercuriais. Outros estudos também demonstraram o efeito inibitório de mercuriais sobre a enzima GPx (Carvalho et al., 2007, Mori et al., 2007). Entretanto, este fenômeno ainda não foi investigado em maiores detalhes. Considerando a importância deste achado para a melhor compreensão dos mecanismos de ação dos mercuriais, procuramos investigar o papel da GPx na neurotoxicidade induzida por MeHg, conforme detalhado anteriormente no item 4.3.

Em paralelo ao efeito inibitório do tratamento dos animais com MeHg sobre a atividade GPx, observamos um aumento significativo na atividade da enzima antioxidante GR, tanto no córtex cerebral como no cerebelo (Tabela 6). Esta enzima é responsável pela manutenção dos níveis de

glutaciona (GSH) intracelular na sua forma reduzida (Mize e Langdon, 1962). Esta enzima atua de forma acoplada à atividade GPx, que a partir da redução de peróxidos utiliza os equivalentes redutores da GSH, desta forma produzindo glutaciona oxidada, ou dissulfeto (GSSG). Em contrapartida, para reduzir a GSSG, a enzima GR utiliza outros equivalentes redutores presentes na célula, especificamente, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Carlberg e Mannervik, 1985). O observado aumento na atividade GR induzida pelo tratamento dos camundongos com MeHg pode estar relacionado a uma resposta celular frente aos efeitos oxidativos causados por este metal. Em outros estudos também foi observado um aumento na atividade GR após a administração de agentes tóxicos em camundongos (Medeiros et al., 2007). No estudo de Lash e Zalups (1996), foi demonstrado que o mercúrio pode aumentar a atividade GR *in vivo*. Além disso, em nosso próprio estudo, discutido anteriormente no item 4.1, relatamos um aumento na atividade GR após a administração de MeHg a camundongos. Este efeito pode estar relacionado, em parte, aos efeitos oxidativos diretos do mercúrio sobre os tióis endógenos, o que sinalizaria para um incremento na atividade GR. É importante ressaltar que apesar de ser bem conhecido que o MeHg pode reagir com tióis como a GSH, em nosso estudo os níveis de GSH permaneceram intactos no córtex e cerebelo do cérebro dos animais tratados. No entanto, é conhecido que a exposição à xenobióticos pode levar à síntese e ao aumento nos níveis de GSH, um efeito que poderia mascarar a ação do MeHg sobre os níveis de GSH em nosso estudo. Corroborando com esta idéia, conforme anteriormente relatado no item 4.1, observamos uma significativa correlação positiva entre o aumento na atividade GR e os níveis cerebelares de GSH, que foram aumentados naquele protocolo experimental.

A regulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes se dá principalmente através da ativação de fatores de transcrição como o Nrf2. Quando em repouso, este fator nuclear encontra-se no citoplasma da célula associado ao seu repressor Keap1, formando um complexo inativo. Keap1 possui em sua estrutura uma série de resíduos de cisteína reativos, isto é, voltados ao solvente, suscetíveis à oxidação. Com um aumento na produção de EROs, a oxidação ou modificação covalente destes resíduos de cisteína críticos leva à inativação de Keap1 e, por consequência, à estabilização de

Nrf2, que poderá migrar para o núcleo. Uma vez no núcleo, Nrf2 poderá associar-se aos denominados elementos de resposta antioxidante (*antioxidant responsive elements - ARE*), que estão localizados em regiões promotoras de genes para diversas proteínas antioxidantes e enzimas de detoxificação de fase 2 (Zhang 2006; Surh et al., 2008). Desta forma, conforme já discutido anteriormente, a indução de GR pode estar associada a uma resposta celular frente aos efeitos pró-oxidativos causados pela exposição ao MeHg. A participação de uma via de sinalização associada à ativação de Nrf2 ou outros fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo poderia, ao menos em parte, esclarecer este fenômeno. No entanto, estudos futuros são necessários para elucidar esta hipótese.

É importante salientar que agentes fitoquímicos são capazes de ativar a via de Nrf2 além de outros fatores nucleares (Surh et al., 2008). Em nosso estudo observamos que o tratamento com extrato de *Polygala paniculata* bloqueou o aumento na atividade GR induzida por MeHg no cerebelo dos camundongos. Desta forma, uma potencial ação antioxidante do extrato poderia bloquear a ativação de uma hipotética via de sinalização “redox-sensível” levando à resposta de indução da GR, possivelmente através da ativação de Nrf2.

Em conclusão, os resultados aqui relatados evidenciam, de forma inédita, os efeitos protetores do extrato de *Polygala paniculata* contra a neurotoxicidade induzida por MeHg em camundongos. Apesar de os mecanismos precisos relacionados a este efeito não terem sido identificados no presente estudo, um efeito antioxidante aparentemente é o responsável por parte dos efeitos benéficos do extrato frente à intoxicação com MeHg.

5.5. Efeito neuroprotetor de compostos isolados de Polygala sobre a disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo em preparações cerebrais expostas a mercuriais in vitro.

No estudo anterior, publicado por nosso grupo (Farina et al., 2005a), relatamos os efeitos benéficos do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* contra a neurotoxicidade induzida por MeHg em camundongos. Conforme demonstrado naquele estudo, o extrato foi capaz de prevenir as

alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela exposição oral ao MeHg, apontando esta planta como um potencial agente terapêutico para o tratamento das condições patológicas associadas à excitotoxicidade e estresse oxidativo, incluindo a intoxicação por MeHg. Conforme mencionado anteriormente, plantas do gênero *Polygala* apresentam efeitos neuroprotetores em diversas condições neuropatológicas relacionadas à excitotoxicidade e estresse oxidativo (Lee et al., 2004; Park et al., 2006).

Estudos fitoquímicos realizados por nosso grupo de pesquisa com o extrato de *Polygala* demonstraram a presença de diversas classes de constituintes. Dentre os compostos identificados, foram encontrados xantonas, flavonóides e fitoesteróis, entre outros (Cristiano et al., 2003). No presente estudo, buscamos identificar compostos derivados de *Polygala* que poderiam ser responsáveis pela observada proteção conferida pelo extrato hidroalcoólico da planta. Para isto, usamos um modelo de frações do cérebro de camundongos enriquecida em mitocôndrias. Três moléculas de diferentes grupos químicos, um flavonóide (quercetina), uma cumarina (7-preniloxi-6-methoxicumarina), e uma xantona (1,5-dihidroxi-2,3-dimethoxi xantona), foram selecionadas para este propósito. Considerando a possível degradação do MeHg em mercúrio inorgânico em tecidos de mamíferos (Suda e Hirayama, 1992), investigamos os potenciais efeitos tóxicos de ambas as formas orgânica (MeHg) e inorgânica (HgCl_2) de mercuriais em nosso modelo de mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos.

Interessantemente, a incubação *in vitro* com ambos os mercuriais (MeHg e HgCl_2) causaram uma similar diminuição na viabilidade mitocondrial, que foi dependente de concentração. Este efeito foi correlacionado positivamente com a diminuição nos níveis de GSH. Do ponto de vista molecular, estes resultados representam importantes descobertas. De fato, considerando o número diferencial de regiões potencialmente eletrofílicas no átomo de mercúrio em suas formas organometiladas (uma carga positiva) e na forma de sal de mercúrio (duas cargas positivas), quando dissociadas em ambiente aquoso, os perfis similares de disfunção mitocondrial e oxidação de GSH após a exposição de mitocôndrias a estes compostos foi inesperada. Estes resultados indicam que a disfunção

mitocondrial induzida por MeHg e HgCl₂ depende de um fenômeno distinto da simples e direta interação entre o mercúrio e grupos tióis de biomoléculas. Considerando a conhecida degradação do MeHg em mercúrio inorgânico em tecidos de mamíferos, pode-se supor que a forma similar com que os dois mercuriais afetaram a viabilidade mitocondrial e a oxidação de GSH pode estar relacionada, ao menos em parte a uma instabilidade do MeHg e sua conversão ao mercúrio inorgânico. Embora esta hipótese não tenha sido esclarecida no presente estudo, é importante salientar que a degradação do MeHg em mercúrio inorgânico depende da atividade NADPH-citocromo P-450 redutase, uma enzima presente apenas em preparações microssomais (Suda e Hirayama, 1992).

No presente estudo, a incubação de frações ricas em mitocôndrias com MeHg ou HgCl₂ aumentou em torno de 80% a produção de H₂O₂ e este efeito foi reduzido pela adição de catalase, apontando fortemente para o H₂O₂ como uma molécula crucial envolvida na disfunção mitocondrial induzida por mercuriais. Este resultado foi confirmado pelo fato de que ambos os mercuriais aumentaram os níveis de TBARS (marcadores de peroxidação lipídica) e tal fenômeno também foi prevenido pela adição de catalase, uma enzima que degrada H₂O₂. Desta forma, o aumento na formação de H₂O₂ por mercuriais representa uma importante descoberta do nosso estudo, considerando o papel oxidativo do H₂O₂ sobre grupos sulfidril. Este dado esteve de acordo com o estudo de Lund et al., (1993) onde foi efetivamente demonstrado que o HgCl₂ é capaz de induzir disfunção de mitocôndrias renais e apontando para o H₂O₂ como molécula efetora da toxicidade do mercúrio em tecido renal. Além disso, um aumento na produção de EROs em preparações cerebrais tem sido demonstrado após exposição a mercuriais (Shanker et al., 2005; Dreiem et al., 2005). No entanto, estes estudos foram baseados na metodologia que emprega a 2',7'-diclorofluorescina (DCF), que não possibilita a discriminação entre radicais hidroxila, peroxinitrito ou H₂O₂ (Myhre et al., 2003).

Dentre os três compostos derivados de *Polygala*, apenas a quercetina demonstrou efeitos protetores contra a disfunção mitocondrial induzida por MeHg. Com relação a isso, vários estudos têm apresentado os efeitos protetores da quercetina em diversos modelos de dano químico sob condições *in vitro* e *in vivo* (Naidu et al., 2003; Heo et al., 2004; Lu et al., 2006). Particularmente

importante, a quercetina tem sido relatada por apresentar efeitos benéficos contra toxicidade induzida por metais (Meng et al., 2004; Morales et al., 2006). Além disso, dois estudos recentes demonstraram a ação anti-peroxidativa da quercetina *in vitro* (Dufour e Loonis, 2007; Dufour et al., 2007). Entretanto, baseando-se em nosso conhecimento, não existem dados na literatura mostrando os efeitos protetores da quercetina contra a neurotoxicidade induzida por mercuriais.

Apesar de a quercetina ter prevenido a disfunção mitocondrial e oxidação de GSH, nossos resultados demonstram que tal efeito não está diretamente ligado a um possível efeito quelante. De fato, a quercetina não alterou a capacidade oxidativa de ambos MeHg e HgCl₂ sobre a glutatona reduzida, indicando que não há uma interação entre a quercetina e os mercuriais. Devido ao fato de a disfunção mitocondrial observada após a exposição aos mercuriais estar relacionada à produção de H₂O₂, levantou-se a hipótese de que a quercetina seria capaz de detoxificar o H₂O₂ gerado pela exposição das mitocôndrias cerebrais aos mercuriais. Nossos resultados mostraram que a quercetina diminuiu a produção de H₂O₂ induzida por mercuriais, o que corroborou também com o fato de a quercetina ter prevenido a peroxidação lipídica causada por estes agentes tóxicos. De acordo com isto, os efeitos protetores da quercetina contra a toxicidade induzida por H₂O₂ têm sido relatados em estudos *in vitro* (Chow et al., 2005).

Apesar de a quercetina ter prevenido a toxicidade induzida por mercuriais em mitocôndrias sob condições *in vitro*, não podemos afirmar que este flavonóide está diretamente e exclusivamente relacionado aos efeitos benéficos de plantas do gênero *Polygala* observado *in vivo* (Farina et al., 2005a; Lee et al., 2004; Park et al., 2006). Inúmeros compostos têm sido isolados da planta *Polygala paniculata* e estudos sobre seus efeitos biológicos ainda não estão disponíveis (Hamburger et al., 1985; Cristiano et al., 2003). Desta forma, é possível que os efeitos benéficos apresentados por *Polygala paniculata* *in vivo* (Farina et al., 2005a) não estejam necessariamente relacionados a um único composto. Esta afirmativa é reforçada pelo fato de que as concentrações de quercetina usadas neste estudo (100 e 300 µM) são altas e praticamente não poderiam ser atingidas em condições *in vivo*. De fato, flavonóides como a quercetina podem atingir níveis da ordem de 10 µM no plasma em

peessoas com dieta rica em frutas e vegetais ou suplementados com flavonóides (Hollman et al., 1996).

Concluindo, nosso estudo mostra que a oxidação de tióis é um fenômeno central envolvido na disfunção mitocondrial induzida por mercuriais e que os efeitos protetores da quercetina neste processo não estão ligados a um efeito quelante. Além disso, nossos dados mostram pela primeira vez que o H_2O_2 está envolvido com os efeitos tóxicos de ambas as formas orgânicas e inorgânicas de mercuriais em mitocôndrias do cérebro. O estudo também mostra que o efeito protetor da quercetina contra a toxicidade causada por mercuriais está ligado capacidade deste antioxidante em bloquear a produção de H_2O_2 induzida pelos mercuriais, apontando para este fenômeno como um potencial mecanismo molecular de neuroproteção. Em conjunto, estes resultados contribuem com novas informações sobre os mecanismos moleculares associados à toxicidade de mercuriais e apontam à quercetina como uma molécula promissora para estudos farmacológicos relacionados à intoxicação com mercúrio.

5.6. Efeito protetor de flavonóides sobre a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzido pelo MeHg

No estudo anterior publicado por nosso grupo (Franco et al., 2007), relatamos os efeitos protetores do flavonóide quercetina na disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por mercuriais. Naquele estudo, pudemos demonstrar que o H_2O_2 é potencialmente um efetor molecular primário envolvido na neurotoxicidade causada por mercuriais. Considerando as propriedades pró-oxidativas dos compostos de mercúrio, o flavonóide quercetina, devido a sua capacidade em degradar H_2O_2 , apresentou efeitos protetores significativos. Levando-se em conta os efeitos benéficos da quercetina em nosso modelo de estudo, decidiu-se então testar se outros flavonóides também seriam capazes de bloquear a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por MeHg em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos.

Conforme já comentado anteriormente, os tratamentos disponíveis para o envenenamento com mercuriais são baseados em terapias com agentes quelantes. De maneira geral, estes procedimentos não atingem resultados completamente efetivos em abolir a toxicidade mercurial, além de apresentarem efeitos adversos (Tchounwou et al., 2003). Além disso, as terapias quelantes são normalmente utilizadas para o tratamento de intoxicações com mercúrio inorgânico, como o vapor de mercúrio e sais de mercúrio, sendo ineficiente para o tratamento de envenenamentos com formas orgânicas de Hg, como o MeHg e etilmercúrio (Clarkson et al., 2003). De fato, estudos do nosso grupo e de outros têm demonstrado os efeitos benéficos do tratamento de animais intoxicados com MeHg com o agente quelante 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato (DMPS) (Pingree et al., 2001; Koh et al., 2002; Carvalho et al., 2007). Embora o estudo de Carvalho e colaboradores (2007) tenha mostrado pela primeira vez as ações protetoras do DMPS contra os efeitos tóxicos do MeHg no cérebro, alguns sinais de estresse oxidativo induzido por MeHg não foram revertidos. Este fato poderia estar relacionado à ineficiência de agentes quelantes de metais em abolir completamente os efeitos deletérios do MeHg. Desta forma, o estudo de compostos com ação antioxidante e baixa toxicidade representaria um importante avanço na busca de terapias efetivas

contra o envenenamento com mercuriais. Neste contexto, flavonóides poderiam ser considerados importantes candidatos, devido a suas já conhecidas ações antioxidantes e protetoras (Rice-Evans et al., 1996; Pietta, 2000; Rice-Evans, 2001). No presente estudo, testamos as propriedades benéficas de quatro flavonóides (miricetina, canferol, miricitrina e rutina) contra as ações deletérias do MeHg em frações mitocondriais isoladas do cérebro de camundongos.

Evidências na literatura relatam as ações protetoras destes compostos em modelos de neurodegeneração (Williams et al., 2004). Além disso, no estudo de Lee e Choi (2008), o flavonóide miricetina protegeu linhagens celulares contra os efeitos oxidativos da 2-deoxi-d-ribose e causou neuroproteção contra a proteína beta-amilóide (Shimmyo et al., 2008). Os efeitos protetores de flavonóides também são relatados em modelos de toxicidade de metais (Vicente-Sánchez et al., 2008). No presente estudo, quando frações enriquecidas em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram incubadas com MeHg, observamos uma condição de estresse oxidativo, marcada por uma elevada produção de EROs, peroxidação lipídica e níveis de GSH diminuídos. Tais efeitos foram acompanhados por uma diminuição significativa na viabilidade mitocondrial. Dentre os flavonóides investigados neste estudo, a miricetina foi capaz de bloquear a produção de EROs e a peroxidação lipídica induzida por MeHg de maneira mais expressiva, quando comparado aos efeitos dos flavonóides canferol, miricitrina e rutina. A habilidade antioxidante da miricetina foi acompanhada por um efeito protetor significativo sobre a queda na viabilidade mitocondrial induzida por MeHg. Os flavonóides canferol e miricitrina aboliram parcialmente os efeitos do MeHg e a rutina foi ineficiente neste contexto. Embora o composto rutina tenha diminuído a produção de EROs causada por MeHg nas concentrações mais elevadas testadas, os efeitos do MeHg sobre a peroxidação lipídica e viabilidade foram fracamente abolidos por este flavonóide.

De maneira similar ao observado para o flavonóide quercetina no estudo anterior, os efeitos protetores do flavonóide miricetina em nosso modelo de estudo estão aparentemente relacionados com as propriedades antioxidantes deste composto, especialmente a sua habilidade em remover H_2O_2 . A atividade antioxidante dos flavonóides depende de sua estrutura química. Basicamente, a

presença de grupos hidroxilas ligados a anéis fenólicos conferem a estes compostos uma grande capacidade de doar elétrons, caracterizando suas propriedades antioxidantes (Harborne, 1986). A posição e, principalmente, a quantidade de grupos funcionais hidroxila distribuídos pelos anéis fenólicos do composto aumenta sua habilidade em estabilizar espécies reativas (Rice-Evans et al., 1996). Baseando-se nisso, é aceitável que o flavonóide que apresentou a maior capacidade em bloquear a produção de EROs e diminuir a peroxidação lipídica, contribuindo assim para uma menor perda de viabilidade mitocondrial causada pelo MeHg, tenha sido o flavonóide miricetina. Ao observarmos a estrutura química do composto miricetina (Figura 30), é notável que este composto possua três grupos hidroxila no anel-B (catecol). Se compararmos ao composto canferol, que foi o segundo mais efetivo em bloquear os efeitos deletérios do MeHg em nosso modelo, a miricetina possui dois grupos hidroxila a mais que o canferol no anel catecol. Dados na literatura mostram que a capacidade antioxidante do composto miricetina é maior do que a do canferol, possivelmente devido ao maior número de grupos funcionais hidroxila livres presentes na molécula da miricetina, em comparação ao canferol (Rice-Evans et al., 1996).

Outra importante característica que contribui para a atividade antioxidante dos flavonóides é presença de um grupo hidroxila na região de insaturação no anel-C da molécula (fazer referência a Figura 5 na Introdução). A remoção deste grupo funcional leva a uma diminuição na atividade antioxidante do flavonóide (Shahidi, 1992). De maneira similar, o bloqueio do grupo hidroxila no anel-C da molécula através de glicosilação, ou seja, a inserção de um açúcar nesta região do flavonóide causa uma diminuição na capacidade antioxidante (Shahidi, 1992). Isto poderia, em parte, explicar a menor capacidade dos compostos miricitrina e rutina em bloquear os efeitos pró-oxidantes do MeHg em nosso modelo de estudo. Ao olharmos para a estrutura química dos flavonóides miricitrina e rutina (Figura 30), é possível notar a presença de glicosilação na região onde originalmente estava presente um grupo funcional hidroxila. Desta forma, a menor capacidade antioxidante dos compostos miricitrina e rutina pode estar diretamente relacionada ao seu menor efeito protetor contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzido por MeHg em nosso

modelo *in vitro*. No entanto, não podemos descartar uma potencial ação protetora destes compostos em modelos *in vivo*. Isto se deve ao fato de que estes compostos glicosilados podem sofrer uma clivagem no trato gastrointestinal, liberando assim o esqueleto polifenólico do flavonóide, aumentando sua capacidade antioxidante (Harborne, 1986).

Em conclusão, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, a ação protetora dos flavonóides miricetina, canferol e miricitrina contra a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo induzido por MeHg *in vitro*. Os mecanismos precisos pelos quais estes compostos desempenharam sua função protetora não foram completamente esclarecidos neste estudo, porém, uma ação antioxidante, que foi capaz de bloquear a produção de EROs e a peroxidação lipídica, parece estar envolvida. Devido a sua maior atividade antioxidante, o composto miricetina apresentou os melhores resultados em combater os efeitos deletérios do MeHg em nosso modelo de estudo.

6. CONCLUSÕES

- a) Nossos estudos demonstraram que a exposição lactacional é uma importante rota de intoxicação por mercuriais (MeHg e HgCl₂), causando déficits motores e neuroquímicos em camundongos jovens (no período de desmame), indicando esta via de exposição como um fator relevante em questões de saúde pública;
- b) Nossos dados afirmam que a exposição lactacional ao mercúrio orgânico (MeHg) causa uma redução no desempenho motor dos filhotes e isto está aparentemente relacionado ao estado tiólico cerebelar.
- c) O aumento na atividade GR parece ser uma importante resposta de defesa celular frente aos efeitos deletérios dos mercuriais. A exposição de animais adultos ao MeHg causou um aumento na atividade desta enzima, enquanto que os animais jovens expostos lactacionalmente ao MeHg não apresentaram esta resposta adaptativa. Isto pode estar relacionado a uma menor capacidade do sistema nervoso imaturo em responder aos efeitos tóxicos do MeHg. No entanto, animais jovens expostos lactacionalmente ao mercúrio inorgânico (HgCl₂) tiveram a atividade GR aumentada no cerebelo, o que caracteriza uma importante descoberta do nosso estudo, apontando para mecanismos de neurotoxicidade específicos para as diferentes formas de mercúrio.
- d) O aumento na atividade GR pode representar um mecanismo compensatório contra os efeitos pró-oxidativos do mercúrio sobre tióis endógenos no sistema nervoso central.
- e) Nossos estudos apontam para um aumento na produção de peróxido de hidrogênio como um importante mecanismo molecular relacionado à neurotoxicidade dos mercuriais, corroborando com evidências da literatura que demonstraram efeito similar em outros tecidos.
- f) Nossos estudos confirmam que a enzima antioxidante GPx é um importante alvo na neurotoxicidade induzida por MeHg, sendo que a inibição desta enzima aumenta os efeitos deletérios e pró-oxidantes deste agente tóxico. Demonstramos que a inibição da GPx pelo

MeHg está relacionada a um aumento na expressão de marcadores de morte celular e disfunção mitocondrial em modelos *in vivo* e *in vitro* em roedores e *in vitro* em células humanas.

- g) A inibição da enzima antioxidante GPx pelo MeHg pode, ao menos em parte, ser responsável pelo observado aumento na produção de peróxidos e a conseqüente peroxidação lipídica induzida por este agente tóxico.
- h) Nossos resultados, em conjunto com dados da literatura, apontam para uma importante relação entre a inibição da GPx, o aumento na produção de EROs e a apoptose relacionada à disfunção mitocondrial induzidos por MeHg.
- i) Nossos resultados indicam que as mitocôndrias representam importantes alvos celulares na neurotoxicidade induzida por MeHg, contribuindo de forma significativa na apoptose induzida por estes agente.
- j) Nossos estudos demonstram, pela primeira vez, os efeitos neuroprotetores do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* contra a neurotoxicidade induzida por MeHg. Este fenômeno pode estar relacionado à capacidade do extrato em bloquear os efeitos pró-oxidantes do MeHg no sistema nervoso central de camundongos adultos.
- k) Entre os constituintes do extrato de *Polygala*, podemos indicar o flavonóide quercetina como um importante agente responsável pelos efeitos benéficos do extrato. No entanto, não podemos descartar a participação de outras moléculas neste fenômeno.
- l) Os flavonóides miricetina e canferol apresentaram efeitos protetores contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos por MeHg em modelo *in vitro*. Este fato está aparentemente relacionado à maior atividade antioxidante destes flavonóides em relação aos flavonóides glicosilados miricitrina e rutina, que apresentaram menor efeito protetor em nosso modelo de estudo.
- m) Tomados em conjunto, nossos dados demonstram que as ações deletérias dos compostos de mercúrio estão diretamente ligadas as suas ações pró-oxidativas, através da redução na

capacidade antioxidante celular, afetando sistemas de defesa importantes como o sistema antioxidante da glutathiona, o que poderia estar diretamente ligado ao aumento na produção de espécies reativas, culminando no estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo. O tratamento de animais intoxicados com compostos naturais que poderiam de maneira direta ou indireta, causar um aumento na capacidade de defesa celular, pode resultar em importantes estratégias terapêuticas que poderão ser extrapoladas para estudos em humanos no futuro.

7. PUBLICAÇÕES

Os resultados que compõem esta tese resultaram na produção dos seguintes artigos científicos:

1. Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos AR (2005) Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol* 57:1503-1508.
2. Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairros AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2006) Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 102:22-28.
3. Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M (2007) Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20:1919-1926.
4. Franco JL, Braga HC, Nunes AK, Ribas CM, Stringari J, Silva AP, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Santos AR, Dafre AL, Farina M (2007) Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol Teratol* 29:360-367.
5. Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, Bainy ACD, Dafre AL, Farina M (2009) Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Submetido a Free Radical Biology and Medicine*.
6. Franco JL, Posser T, Pizzolatti MG, Dafre AL, Farina M (2009) Neuroprotective effect of plant isolated flavonoids against methylmercury deleterious effects on mouse brain mitochondria. *Submetido a Chem Res Toxicol*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Agullo G, Gamet-Payrastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, Payrastre B (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53:1649-1657.
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13:637-648.
- Allen JW, Mutkus LA, Aschner M (2001a) Methylmercury-mediated inhibition of 3H-D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res* 902:92-100.
- Allen JW, Shanker G, Aschner M (2001b) Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 894:131-140.
- Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA, Greenwood M (1974) Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54:587-595.
- Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA, Greenwood MR, Giovanoli-Jakubczak T (1976) Perinatal methylmercury poisoning in Iraq. *Am J Dis Child* 130:1070-1076.
- Aposhian HV, Maiorino RM, Gonzalez-Ramirez D, Zuniga-Charles M, Xu Z, Hurlbut KM, Junco-Munoz P, Dart RC, Aposhian MM (1995) Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology* 97:23-38.
- Araragi S, Kondoh M, Kawase M, Saito S, Higashimoto M, Sato M (2003) Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 184:1-9.
- Arthur JR (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57:1825-1835.

- Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N (1995) Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270:21035-21039.
- Aschner M, Clarkson TW (1988) Distribution of mercury 203 in pregnant rats and their fetuses following systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. *Teratology* 38:145-155.
- Aschner M, Du YL, Gannon M, Kimelberg HK (1993) Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 602:181-186.
- Aschner M, Yao CP, Allen JW, Tan KH (2000) Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int* 37:199-206.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 40:285-291.
- Audesirk G, Armstrong D, van den Maagdenberg AM, Atchison W, Shafer T, Fletcher C (2000) Calcium channels: critical targets of toxicants and diseases. *Environ Health Perspect* 108:1215-1218.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181:230-241.
- Baliga MS, Wang H, Zhuo P, Schwartz JL, Diamond AM (2007) Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biol Trace Elem Res* 115:227-242.
- Ballatori N, Clarkson TW (1982) Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science* 216:61-63.
- Ballatori N, Clarkson TW (1985) Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol* 5:816-831.
- Ballatori N, Gatmaitan Z, Truong AT (1995) Impaired biliary excretion and whole body elimination of methylmercury in rats with congenital defect in biliary glutathione excretion. *Hepatology* 22:1469-1473.

- Berlin M, Ullberg S (1963) Accumulation and retention of mercury in the mouse. I. An autoradiographic study after a single intravenous injection of mercuric chloride. *Arch Environ Health* 6:589-601.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648.
- Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK (2003) Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med* 11:229-234.
- Bluhm RE, Bobbitt RG, Welch LW, Wood AJ, Bonfiglio JF, Sarzen C, Heath AJ, Branch RA (1992) Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. *Hum Exp Toxicol* 11:201-210.
- Bors W, Michel C (1999) Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med* 27:1413-1426.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K (2001) Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods Enzymol* 335:166-180.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134:707-716.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brigelius-Flohe R (2006) Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387:1329-1335.
- Brookes N, Kristt DA (1989) Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂ and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. *J Neurochem* 53:1228-1237.
- Brustovetsky T, Antonsson B, Jemmerson R, Dubinsky JM, Brustovetsky N (2005) Activation of calcium-independent phospholipase A (iPLA) in brain mitochondria and release of apoptogenic factors by BAX and truncated BID. *J Neurochem* 94:980-994.

- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484-490.
- Carvalho MC, Franco JL, Ghizoni H, Kobus K, Nazari EM, Rocha JB, Nogueira CW, Dafre AL, Muller YM, Farina M (2007) Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology* 239:195-203.
- Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L (2001) Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull* 55:197-203.
- Castoldi AF, Coccini T, Manzo L (2003) Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health* 18:19-31.
- Catterall WA (1998) Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24:307-323.
- Chaudiere J, Wilhelmsen EC, Tappel AL (1984) Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem* 259:1043-1050.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF, Jr., Lei XG (1998) Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 128:1070-1076.
- Cheng WH, Valentine BA, Lei XG (1999) High levels of dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. *J Nutr* 129:1951-1957.
- Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, Saleem T (1978) Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 37:719-733.
- Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 69:1839-1851.
- Clarkson TW (1997) The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 34:369-403.
- Clarkson TW (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1:11-23.

- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ (2003) The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 349:1731-1737.
- Clarkson TW, Magos L (2006) The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 36:609-662.
- Cooper AJ, Pulsinelli WA, Duffy TE (1980) Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *J Neurochem* 35:1242-1245.
- Cossa D (1995) Peces al mercurio: un plato temible. In: *Mundo Científico*, pp 784-785.
- Counter SA, Buchanan LH (2004) Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:209-230.
- Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC, Kola I (2001) Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* 78:1389-1399.
- Cristiano R, Pizzolatti MG, Delle Monache F, Rezende CM, Branco A (2003) Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. *Z Naturforsch [C]* 58:490-494.
- Dare E, Li W, Zhivotovsky B, Yuan X, Ceccatelli S (2001) Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radic Biol Med* 30:1347-1356.
- Dave V, Mullaney KJ, Goderie S, Kimelberg HK, Aschner M (1994) Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci* 16:222-231.
- Davis MA, Flaws JA, Young M, Collins K, Colburn NH (2000) Effect of ceramide on intracellular glutathione determines apoptotic or necrotic cell death of JB6 tumor cells. *Toxicol Sci* 53:48-55.
- Davis MT, Bartfay WJ (2004) Ebselen decreases oxygen free radical production and iron concentrations in the hearts of chronically iron-overloaded mice. *Biol Res Nurs* 6:37-45.

- Dekermendjian K, Kahnberg P, Witt MR, Sterner O, Nielsen M, Liljefors T (1999) Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. *J Med Chem* 42:4343-4350.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Denny MF, Hare MF, Atchison WD (1993) Methylmercury alters intrasynaptosomal concentrations of endogenous polyvalent cations. *Toxicol Appl Pharmacol* 122:222-232.
- Dietrich MO, Mantese CE, dos Anjos G, Souza DO, Farina M (2005) Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19:169-175.
- Dreiem A, Gertz CC, Seegal RF (2005) The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. *Toxicol Sci* 87:156-162.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J (2005) Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79:157-165.
- Dufour C, Loonis M (2007) Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation. *Biochim Biophys Acta*.
- Dufour C, Loonis M, Dangles O (2007) Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med* in press.
- Duhan NW, Miya TS (1957) A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46:208-209.
- Durmaz A, Dikmen N (2007) Homocysteine effects on cellular glutathione peroxidase (GPx-1) activity under in vitro conditions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22:733-738.

- Ebinghaus R, Tripathi RM, Wallschläger D, Lindberg SE (1999) Natural and anthropogenic mercury sources and their impact on the air-surface exchange of mercury on regional and global scales. In: *Mercury Contaminated Sites: Characterization, Risk Assessment and Remediation*, (Ebinghaus R, Turner RR, Lacerda LD, Vasiliev O, Salomons W, eds), pp 3-50. New York: Springer-Verlag.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
- Eto K, Oyanagi S, Itai Y, Tokunaga H, Takizawa Y, Suda I (1992) A fetal type of Minamata disease. An autopsy case report with special reference to the nervous system. *Mol Chem Neuropathol* 16:171-186.
- Farina M, Dahm KC, Schwalm FD, Brusque AM, Frizzo ME, Zeni G, Souza DO, Rocha JB (2003) Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol Sci* 73:135-140.
- Farina M, Frizzo ME, Soares FA, Schwalm FD, Dietrich MO, Zeni G, Rocha JB, Souza DO (2003b) Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol Lett* 144:351-357.
- Farina M, Soares FA, Zeni G, Souza DO, Rocha JB (2004) Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol Lett* 146:227-235.
- Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos AR (2005a) Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol* 57:1503-1508.
- Flohe L (1971) [Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects]. *Klin Wochenschr* 49:669-683.
- Fonfria E, Vilaro MT, Babot Z, Rodriguez-Farre E, Sunol C (2005) Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 79:545-553.

- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairros AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2006) Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 102:22-28.
- Franco JL, Braga Hde C, Nunes AK, Ribas CM, Stringari J, Silva AP, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Santos AR, Dafre AL, Farina M (2007) Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol Teratol* 29:360-367.
- Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M (2007) Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20:1919-1926.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI (2008) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a Trois. *Mutat Res*.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.
- Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG (1999) Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27:605-611.
- Gatti R, Belletti S, Uggeri J, Vettori MV, Mutti A, Scandroglio R, Orlandini G (2004) Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. *Toxicology* 204:175-185.
- Ghribi O, DeWitt DA, Forbes MS, Herman MM, Savory J (2001) Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: changes in cytochrome c, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits. *Brain Res* 903:66-73.
- Goldwater L (1972) *Mercury: A history of quicksilver*. Baltimore, MD: York Press.
- Goulet S, Dore FY, Mirault ME (2003) Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol Teratol* 25:335-347.
- Grandjean P, Weihe P, White RF (1995) Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology* 16:27-33.

- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ (1997) Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19:417-428.
- Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O (2000) Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol* 38:625-634.
- Hajnoczky G, Hoek JB (2007) Cell signaling. Mitochondrial longevity pathways. *Science* 315:607-609.
- Hall AG (1999) Glutathione and the regulation of cell death. *Adv Exp Med Biol* 457:199-203.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University press.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University press.
- Hamburger M, Gupta M, Hostettmann K (1985) Coumarins from *Polygala paniculata*. *Planta Med* 51:215-217.
- Hansen JM, Zhang H, Jones DP (2006) Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med* 40:138-145.
- Harada M (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25:1-24.
- Harborne JB (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213:15-24.
- Hare MF, McGinnis KM, Atchison WD (1993) Methylmercury increases intracellular concentrations of Ca^{++} and heavy metals in NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1626-1635.
- Hare MF, Atchison WD (1995) Nifedipine and tetrodotoxin delay the onset of methylmercury-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in NG108-15 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 135:299-307.
- Haworth RA, Hunter DR (1979) The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. *Arch Biochem Biophys* 195:460-467.

- Heo HJ, Lee CY (2004) Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 52:7514-7517.
- Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21:703-707.
- Hughes WL (1957) A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. *Ann N Y Acad Sci* 65:454-460.
- Humphrey ML, Cole MP, Pendergrass JC, Kiningham KK (2005) Mitochondrial mediated thimerosal-induced apoptosis in a human neuroblastoma cell line (SK-N-SH). *Neurotoxicology* 26:407-416.
- Hunter D (1969) *Diseases of occupations*. London: Little, Brown.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10:2495-2505.
- InSug O, Datar S, Koch CJ, Shapiro IM, Shenker BJ (1997) Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* 124:211-224.
- James SJ, Slikker W, 3rd, Melnyk S, New E, Pogribna M, Jernigan S (2005) Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology* 26:1-8.
- Jemmerson R, Dubinsky JM, Brustovetsky N (2005) Cytochrome C release from CNS mitochondria and potential for clinical intervention in apoptosis-mediated CNS diseases. *Antioxid Redox Signal* 7:1158-1172.
- Johansson C, Castoldi AF, Onishchenko N, Manzo L, Vahter M, Ceccatelli S (2007) Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox Res* 11:241-260.

- Juarez BI, Portillo-Salazar H, Gonzalez-Amaro R, Mandeville P, Aguirre JR, Jimenez ME (2005) Participation of N-methyl-D-aspartate receptors on methylmercury-induced DNA damage in rat frontal cortex. *Toxicology* 207:223-229.
- Kaur P, Aschner M, Syversen T (2006) Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *Neurotoxicology* 27:492-500.
- Kelner MJ, Bagnell RD, Ugluk SF, Montoya MA, Mullenbach GT (1995) Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch Biochem Biophys* 323:40-46.
- Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW (1992) Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol* 262:R761-765.
- Kim CY, Nakai K, Kasanuma Y, Satoh H (2000) Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 22:397-403.
- Kiss T, Osipenko ON (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol Rev* 46:245-267.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Koh AS, Simmons-Willis TA, Pritchard JB, Grassl SM, Ballatori N (2002) Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1. *Mol Pharmacol* 62:921-926.
- Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T (2000) Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* 23:1-16.
- Lash LH, Zalups RK (1996) Alterations in renal cellular glutathione metabolism after in vivo administration of a subtoxic dose of mercuric chloride. *J Biochem Toxicol* 11:1-9.

- LeBel CP, Ali SF, Bondy SC (1992) Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 112:161-165.
- Lee HJ, Ban JY, Koh SB, Seong NS, Song KS, Bae KW, Seong YH (2004) Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. *Am J Chin Med* 32:599-610.
- Lee K-H, Choi E-M (2008) Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-d-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *European Journal of Pharmacology* 591:1-6.
- Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW (2000) The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 60:3927-3939.
- Li Q, Sato EF, Kira Y, Nishikawa M, Utsumi K, Inoue M (2006) A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radic Biol Med* 40:173-181.
- Limke TL, Bearss JJ, Atchison WD (2004) Acute exposure to methylmercury causes Ca²⁺ dysregulation and neuronal death in rat cerebellar granule cells through an M3 muscarinic receptor-linked pathway. *Toxicol Sci* 80:60-68.
- Lindstrom H, Luthman J, Oskarsson A, Sundberg J, Olson L (1991) Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. *Environ Res* 56:158-169.
- Liu G, Hinch B, Davatol-Hag H, Lu Y, Powers M, Beavis AD (1996) Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel. The relationship between temperature and inhibition by protons. *J Biol Chem* 271:19717-19723.
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais do Brasil. Nativas e Exóticas. . In, p 512: Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Lu YP, Lou YR, Yen P, Newmark HL, Mirochnitchenko OI, Inouye M, Huang MT (1997) Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res* 57:1468-1474.

- Lu J, Zheng YL, Luo L, Wu DM, Sun DX, Feng YJ (2006) Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav Brain Res* 171:251-260.
- Lund BO, Miller DM, Woods JS (1993) Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45:2017-2024.
- Malm O (1998) Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res* 77:73-78.
- Malm O (1998) Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res* 77:73-78.
- Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, Abreu F, Oliveira A, Bizarro L, Rocha JB, Frizzo ME, Souza DO, Farina M (2004) Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol Sci* 81:172-178.
- Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, Abreu F, Oliveira A, Bizarro L, Rocha JB, Frizzo ME, Souza DO, Farina M (2004) Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol Sci* 81:172-178.
- Marty MS, Atchison WD (1997) Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 147:319-330.
- Mattson MP (1998) Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* 21:53-57.
- Matyja E, Albrecht J (1993) Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neurosci Lett* 158:155-158.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8852-8857.
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB (2007) Connecting TNF-alpha signaling

- pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* 27:5394-5404.
- Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, Paladini AC (1997) Overview-- flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res* 22:419-425.
- Meister A (1974) Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci* 15:177-190.
- Meng F, Liu R, Bai H, Liu BW, Liu Y (2004) [Inhibitory effect of quercetin, rutin and puerarin on HDL oxidation induced by Cu²⁺]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35:836-838.
- Minich T, Yokota S, Dringen R (2003) Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *J Neurochem* 86:605-614.
- Misra I, Griffith OW (1998) Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* 13:268-276.
- Miura K, Clarkson TW (1993) Reduced methylmercury accumulation in a methylmercury-resistant rat pheochromocytoma PC12 cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 118:39-45.
- Mize CE, Langdon RG (1962) Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem* 237:1589-1595.
- Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM, Egido J, Mayoral P, Arevalo MA, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F (2006) Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol* 44:2092-2100.
- Moretto MB, Franco J, Posser T, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Ebselen protects Ca²⁺ influx blockage but does not protect glutamate uptake inhibition caused by Hg²⁺. *Neurochem Res* 29:1801-1806.

- Mori N, Yasutake A, Hirayama K (2007) Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch Toxicol* 81:769-776.
- Morken TS, Sonnewald U, Aschner M, Syversen T (2005) Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture. *Toxicol Sci* 87:169-175.
- Myers GJ, Marsh DO, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Tanner M, Choi A, Cernichiari E, Choisy O, Clarkson TW (1995) Main neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: outcome at six months. *Neurotoxicology* 16:653-664.
- Myers GJ, Davidson PW, Strain JJ (2007) Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. *J Nutr* 137:2805-2808.
- Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65:1575-1582.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2003) Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Neuropharmacology* 44:1100-1106.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279.
- Nikolic J, Sokolovic D (2004) Lespeflan, a bioflavonoid, and amidinotransferase interaction in mercury chloride intoxication. *Ren Fail* 26:607-611.
- Nishioku T, Takai N, Miyamoto K, Murao K, Hara C, Yamamoto K, Nakanishi H (2000) Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia. *Brain Res* 871:160-164.
- Norenberg MD, Rao KV (2007) The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* 50:983-997.

- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220:403-409.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-139.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
- Oskarsson A, Schultz A, Skerfving S, Hallen IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ (1996) Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health* 51:234-241.
- Ou YC, White CC, Krejsa CM, Ponce RA, Kavanagh TJ, Faustman EM (1999) The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. *Neurotoxicology* 20:793-804.
- Owuor ED, Kong AN (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 64:765-770.
- Park JH, Kim JS, Jang DS, Lee SM (2006) Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. *Am J Chin Med* 34:115-123.
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042.
- Pingree SD, Simmonds PL, Woods JS (2001) Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on tissue and urine mercury levels following prolonged methylmercury exposure in rats. *Toxicol Sci* 61:224-233.
- Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pelicci PG, Rizzuto R (2007) Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 315:659-663.

- Pollard KM, Hultman P (1997) Effects of mercury on the immune system. *Met Ions Biol Syst* 34:421-440.
- Quinteros FA, Machiavelli LI, Miler EA, Cabilla JP, Duvilanski BH (2008) Mechanisms of chromium (VI)-induced apoptosis in anterior pituitary cells. *Toxicology* 249:109-115.
- Rao GN, Berk BC (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 70:593-599.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956.
- Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8:797-807.
- Rodier PM (1994) Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 2:121-124.
- Rodier PM (1995) Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6:73-76.
- Roegge CS, Wang VC, Powers BE, Klintsova AY, Villareal S, Greenough WT, Schantz SL (2004) Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. *Toxicol Sci* 77:315-324.
- Sagara J, Makino N, Bannai S (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66:1876-1881.
- Sakamoto M, Nakano A, Kajiwara Y, Naruse I, Fujisaki T (1993) Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. *Environ Res* 61:43-50.
- Sakamoto M, Ikegami N, Nakano A (1996) Protective effects of Ca²⁺ channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacol Toxicol* 78:193-199.
- Sakamoto M, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H, Nakano A, Akagi H (2002a) Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study

- with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res* 949:51-59.
- Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akagi H (2002b) Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. *Environ Res* 90:185-189.
- Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E (2003) Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res* 5:283-305.
- Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E (2003) Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res* 5:283-305.
- Sarafian TA, Vartavarian L, Kane DJ, Bredesen DE, Verity MA (1994) bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol Lett* 74:149-155.
- Sarafian TA, Bredesen DE, Verity MA (1996) Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology* 17:27-36.
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S-2085S.
- Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ (2001) Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J* 358:547-557.
- Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23:861-880.
- Sen CK, Roy S, Han D, Packer L (1997) Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis. *Free Radic Biol Med* 22:1241-1257.
- Shahidi F, Wanasundara PK (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67-103.
- Shanker G, Mutkus LA, Walker SJ, Aschner M (2002) Methylmercury enhances arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 expression in primary cultures of neonatal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 106:1-11.

- Shanker G, Aschner JL, Syversen T, Aschner M (2004) Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res Mol Brain Res* 128:48-57.
- Shanker G, Syversen T, Aschner JL, Aschner M (2005) Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 137:11-22.
- Shenker BJ, Guo TL, O I, Shapiro IM (1999) Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol* 157:23-35.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2008) Multifunction of myricetin on A beta: neuroprotection via a conformational change of A beta and reduction of A beta via the interference of secretases. *J Neurosci Res* 86:368-377.
- Shin EJ, Ko KH, Kim WK, Chae JS, Yen TP, Kim HJ, Wie MB, Kim HC (2008) Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. *Neurochem Int* 52:1134-1147.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291-295.
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27:916-921.
- Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO (2008) Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res* 13:265-279.
- Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen WM, Tannenbaum SR (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14428-14433.
- Sirois JE, Atchison WD (1996) Effects of mercurials on ligand- and voltage-gated ion channels: a review. *Neurotoxicology* 17:63-84.
- Sirois JE, Atchison WD (2000) Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 167:1-11.
- Skerfving S (1988) Mercury in women exposed to methylmercury through fish consumption, and in their newborn babies and breast milk. *Bull Environ Contam Toxicol* 41:475-482.

- Soldani C, Scovassi AI (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7:321-328.
- Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, Rice-Evans C (2001) Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 354:493-500.
- Spyker JM, Sparber SB, Goldberg AM (1972a) Subtle consequences of methylmercury exposure: behavioral deviations in offspring of treated mothers. *Science* 177:621-623.
- Spyker JM, Smithberg M (1972b) Effects of methylmercury on prenatal development in mice. *Teratology* 5:181-190.
- Stringari J, Meotti FC, Souza DO, Santos AR, Farina M (2006) Postnatal Methylmercury Exposure Induces Hyperlocomotor Activity and Cerebellar Oxidative Stress in Mice: Dependence on the Neurodevelopmental Period. *Neurochem Res*.
- Stringari J, Nunes AK, Franco JL, Bohrer D, Garcia SC, Dafre AL, Milatovic D, Souza DO, Rocha JB, Aschner M, Farina M (2008) Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:147-154.
- Suda I, Hirayama K (1992) Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Arch Toxicol* 66:398-402.
- Sun Y, Mu Y, Ma S, Gong P, Yan G, Liu J, Shen J, Luo G (2005) The molecular mechanism of protecting cells against oxidative stress by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin with glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 1743:199-204.
- Sundberg J, Jonsson S, Karlsson MO, Hallen IP, Oskarsson A (1998) Kinetics of methylmercury and inorganic mercury in lactating and nonlactating mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 151:319-329.
- Sundberg J, Jonsson S, Karlsson MO, Oskarsson A (1999) Lactational exposure and neonatal kinetics of methylmercury and inorganic mercury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:160-169.

- Surh YJ, Kundu JK, Na HK (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 74:1526-1539.
- Szasz A, Barna B, Gajda Z, Galbacs G, Kirsch-Volders M, Sente M (2002) Effects of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. *Neurotoxicology* 23:197-206.
- Tchounwou PB, Ayensu WK, Ninashvili N, Sutton D (2003) Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol* 18:149-175.
- Torres M, Forman HJ (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17:287-296.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A (1995) Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54.
- Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, Daino H, Honda Z, Sonoyama J, Shibayama H, Sugahara H, Machii T, Kanakura Y (2002) Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* 99:3342-3349.
- Vicente-Sanchez C, Egido J, Sanchez-Gonzalez PD, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM, Morales AI (2008) Effect of the flavonoid quercetin on cadmium-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol* 46:2279-2287.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2005) Ca²⁺-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. *J Neurochem* 93:526-537.
- Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36:829-837.
- Warkany J, Hubbard DM (1953) Acrodynia and mercury. *J Pediatr* 42:365-386.

- Watanabe C, Yoshida K, Kasanuma Y, Kun Y, Satoh H (1999) In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. *Environ Res* 80:208-214.
- Week ME, Leicester HM (1997) Anthropogenic use of mercury. In: *Wisconsin Mercury Sourcebook*, pp 87–91K. Madison, WI, USA: Wisconsin Department of Natural Resource.
- Weihe P, Hansen JC, Murata K, Debes F, Jorgensen P, Steuerwald U, White RF, Grandjean P (2002) Neurobehavioral performance of Inuit children with increased prenatal exposure to methylmercury. *Int J Circumpolar Health* 61:41-49.
- Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J (2001) Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12503-12508.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.
- Wentzel P, Gareskog M, Eriksson UJ (2008) Decreased cardiac glutathione peroxidase levels and enhanced mandibular apoptosis in malformed embryos of diabetic rats. *Diabetes*.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36:838-849.
- Yang JM, Jiang XZ, Chen QY, Li PJ, Zhou YF, Wang YL (1996) The distribution of HgCl₂ in rat body and its effects on fetus. *Biomed Environ Sci* 9:437-442.
- Yee S, Choi BH (1996) Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* 17:17-26.
- Yin Z, Milatovic D, Aschner JL, Syversen T, Rocha JB, Souza DO, Sidoryk M, Albrecht J, Aschner M (2007) Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res* 1131:1-10.
- Yoshida T, Watanabe M, Engelman DT, Engelman RM, Schley JA, Maulik N, Ho YS, Oberley TD, Das DK (1996) Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 28:1759-1767.

- Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Magnenat JL, Rousou JA, Flack JE, 3rd, Deaton D, Das DK (1997) Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation* 96:II-216-220.
- Yoshida M (2002) Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. *Tohoku J Exp Med* 196:79-88.
- Zhang DD (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 38:769-789.