

SÉRGIO JOSÉ MACEDO JÚNIOR

**A INOSINA PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO METILMERCÚRIO EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Alcíbia Helena de Azevedo Maia.

Co-orientador: Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

Florianópolis  
Fevereiro/2014

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

Macedo Júnior, Sérgio José  
A INOSINA PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO METILMERCÚRIO EM CAMUNDONGOS /  
Sérgio José Macedo Júnior ; orientadora, Alcibia Helena de  
Azevedo Maia ; coorientador, Adair Roberto Soares dos  
Santos. - Florianópolis, SC, 2014.  
109 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Toxicologia. 3. Contaminantes  
ambientais. 4. Metilmercúrio. 5. Inosina. I. Maia, Alcibia  
Helena de Azevedo. II. Santos, Adair Roberto Soares dos.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bênçãos e por me proporcionar todas as aprendizagens, experiências e amigos que tive nesta jornada.

Aos meus pais, Sérgio e Rita. Pelo amor, pelo carinho, pelo apoio durante esses anos que passamos distantes, pelo incentivo e por todos os esforços que fizeram para que eu pudesse estudar e alcançar este momento. Meu eterno muito obrigado.

À minha irmã Ana Luiza (*In memoriam*). Guerreira pelo bem mais precioso que nós temos, a vida. Obrigado por estar guiando meus passos e iluminado meus caminhos.

À minha orientadora Professora Alcíbia (Biba). Obrigado por ter encarado este desafio junto comigo. Agradeço não apenas pela orientação mas pela amizade, carinho e dedicação ao longo desses dois anos. Muito obrigado.

Ao meu co-orientador Professor Adair. Obrigado por ter me dado a primeira oportunidade de conhecer a ciência e a pesquisa. Obrigado pelos ensinamentos e pela amizade nesses seis anos de trabalho que realizamos juntos. Valeu Professor.

Ao Ney. Obrigado pela dedicação em ensinar tudo o que sei de ciência e principalmente de inosina. Obrigado pela amizade e companheirismo durante esses seis anos de trabalho. Tenho orgulho de dizer que fiz minha iniciação científica contigo querido! Muito obrigado!

À todos os amigos do LANDI, os que já passaram e os que ainda estão por lá. Obrigado pela amizade durante todo esse tempo juntos, pelas discussões científicas e não-científicas, e por compartilharem momentos tensos e alegres comigo. Valeu Murilo, Marina, Gaúcho, Fran, Igã, Tátilla, Stella, Rafaela, Tay, Josiel, Fernanda, Daniel, Leidiane, Morgana, Ane, Stephani, Ana Paula, Celeste, Chico, Ari, Tati, Bira, Carol, Deise, Débora, Rodrigo, Cris Setim, Cris Baggio, Maria Fernanda e mais.

Às colegas e amigas do LPTox, Amanda, Ana, Vanessa, Fabi, Tati e mais. Obrigado pela amizade durante os últimos dois anos e pela contribuição para realização deste trabalho, Muito Obrigado.

Ao Professor Marcelo Farina, por ter aberto as portas do seu laboratório para realização dos experimentos de estresse oxidativo. Agradeço também pelas discussões científicas que contribuíram para realização deste trabalho.

A Vivi, aluna de iniciação científica do laboratório do Professor Marcelo Farina. Obrigado pela grande dedicação e ajuda na realização dos experimentos de estresse oxidativo.

À Denise, do departamento de Química da UFSM, pelo auxílio com as dosagens de mercúrio.

Ao Itamar, Farmacêutico-Bioquímico do Petlabor, laboratório de análises clínicas veterinárias. Agradeço pela estimada ajuda com as dosagens bioquímicas (colesterol, HDL, LDL, AST e ALT).

Ao Seu Carlos e a Dona Vilma, sempre solícitos, papo bom e amizade no departamento de Fisiologia.

À todos os professores da pós-graduação em Farmacologia por terem contribuído para minha formação científica.

Aos animais usados nesta pesquisa meu profundo respeito.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Farmacologia pelo apoio técnico e por proporcionar todas as condições para que este trabalho fosse realizado.

À CAPES, CNPq e UFSC pelo apoio financeiro.

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

**Introdução:** O metilmercúrio (MeHg) tem sido especulado como contaminante ambiental envolvido em efeitos tóxicos em modelos animais e seres humanos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetor da inosina, uma purina endógena, diante dos efeitos promovidos pelo MeHg em camundongos. **Métodos:** Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (45 – 60 dias). Os animais foram expostos a uma solução de MeHg (40 mg/L) diluída na água de beber, durante 15 dias. A ingestão de líquidos foi monitorada diariamente. Concomitantemente, os animais foram tratados com inosina pela via intraperitoneal (i.p.), em doses de 3, 10, 30 ou 100 mg/kg, uma vez por dia, durante 15 dias consecutivos. No 15º dia, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais, a fim de avaliar o desempenho motor e coordenação motora (teste da barra giratória, teste da retração dos membros posteriores, teste da caminhada na viga e teste do poste), cada animal foi usado em apenas um teste. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanaziados por decapitação e o cerebelo foi coletado para a determinação subsequente dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), anti-inflamatória (IL-1ra) e BDNF, por ELISA, bem como para determinação da atividade da glutatona peroxidase e glutatona redutase. Em outro conjunto de experimentos, os animais foram tratados pela via i.p. com inosina (10 mg/kg) ou uma mistura de inosina (10 mg/kg) e cafeína (3 mg/kg, antagonista não-seletivo de receptores para adenosina), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, visando investigar o possível envolvimento de receptores de adenosina nos efeitos promovidos pela inosina. Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste da barra giratória e testados frente à manifestação e o grau de retração dos membros posteriores. O efeito da inosina também foi investigado diante dos efeitos hepatotóxicos (atividade sérica de ALT e AST) e genotóxicos (ensaio do micronúcleo) do MeHg, bem como diante das alterações nos níveis séricos de lipídeos (colesterol total, HDL e não-HDL) induzidos pelo MeHg. **Resultados:** O consumo de líquidos não diferiu entre os grupos avaliados. A inosina (10 mg/kg, i.p.) preveniu parcialmente os efeitos deletérios do MeHg em relação ao desempenho motor no teste da barra giratória, no grau de retração dos membros posteriores e no teste da caminhada na viga. No entanto, a inosina não foi capaz de prevenir os efeitos deletérios do MeHg, observados no teste do poste. A co-administração de inosina (10 mg/kg,

i.p.) com cafeína (3 mg/kg, i.p.) reverteu totalmente o efeito protetor da inosina no teste da barra giratória e parcialmente no grau de retração dos membros posteriores. Inosina (10mg/kg, i.p.) foi capaz de prevenir a redução nos níveis de IL-6 e o aumento nos níveis de BDNF induzidos pelo MeHg no cerebelo. MeHg (40 mg/L) reduziu a atividade cerebelar da glutathiona peroxidase, a qual não foi prevenida pelo tratamento com inosina, mas não afetou a atividade cerebelar da glutathiona redutase, quando comparado com o grupo não-exposto. Animais expostos ao MeHg apresentaram níveis cerebelares de Hg total mais elevados, quando comparados com animais não-expostos, o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) não preveniu o aumento nos níveis cerebelares de Hg total induzido pela exposição ao MeHg. Além disso, a inosina (10 mg/kg, i.p.) preveniu a redução na atividade sérica da ALT induzida pelo MeHg. Com relação aos níveis séricos de lipídeos, a inosina (10 mg/kg, i.p.) não foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de colesterol total induzido pelo MeHg, no entanto, previniu o aumento dos níveis de colesterol não-HDL e promoveu um aumento nos níveis de colesterol HDL, quando comparado com animais expostos ao MeHg tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.). Finalmente, a inosina foi capaz de prevenir o efeito genotóxico do MeHg, observado no ensaio do micronúcleo em cultura primária de linfócitos humanos, reduzindo o número de células binucleadas micronucleadas quando comparado com o grupo exposto ao MeHg tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). **Conclusões:** Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que a inosina apresenta efeito protetor diante das alterações comportamentais (desempenho motor e coordenação) e bioquímicas no sistema nervoso central induzidas pela exposição ao MeHg. Além disso, esses efeitos parecem ser mediados por receptores de adenosina. A inosina também apresenta efeito protetor contra os efeitos hepatotóxicos e genotóxicos do MeHg, bem como sobre as alterações nos níveis séricos de lipídeos induzidos pelo MeHg. Em síntese, nossos dados demonstram que a inosina foi capaz de prevenir as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo MeHg, além disso, contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade do MeHg.

## ABSTRACT

**Introduction:** Methylmercury (MeHg) has been speculated as environmental contaminants involved in toxic effects in both animals models and humans. The objective of the present study was to evaluate the protective effect of inosine, an endogenous purine, in face of MeHg-promoted effects in mice. **Methods:** Were used adult male Swiss mice (45 – 60 days old). Animals were exposed to MeHg solution (40 mg/L) in drink water during 15 days. Liquid ingestion was monitored daily. Concomitantly, animals received inosine intraperitoneally (i.p.) at doses of 3, 10, 30 or 100 mg/kg, once a day during 15 consecutive days. On the 15<sup>th</sup> day, animals were submitted to different behavioral tests in order to evaluate motor performance and coordination (rotarod test, hind limb claspings phenomenon, beam walking test and pole test), each animal was used in only one test. After behavioral tests, animals were sacrificed by decapitation and the cerebellum was collected for subsequent measurement of pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6), anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra) and BDNF levels by ELISA, as well as glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. In another set of experiments, animals were treated by i.p. route with inosine (10 mg/kg) or a mixture of inosine (10 mg/kg) and caffeine (3 mg/kg, non selective adenosine receptors antagonist), once a day during 15 consecutive days, to investigate the possible involvement of adenosine receptors in the effects promoted by inosine. Twenty-four hours after the last injection animals were submitted to the rotarod test and tested for the manifestation and the degree of hind limb claspings phenomenon. The effect of inosine was also investigated in face of the hepatotoxic (ALT and AST serum activity) and genotoxic (micronucleus assay) effects of MeHg, as well as on the changes in serum lipid levels (total cholesterol, HDL and non-HDL levels) induced by MeHg. **Results:** Liquid consumptions did not differ between groups. Inosine (10mg/kg, i.p.) partially protected against the deleterious effects of MeHg toward motor performance in the rotarod test, in face of the hind limb claspings phenomenon and in the beam walking test ( $87 \pm 10\%$ ; mean= $21.57 \pm 3.06$  s vs  $46.88 \pm 11.93$  s). However, inosine was not able to prevent the deleterious effects of MeHg observed in the pole test. Co-administration of inosine (10 mg/kg, i.p.) with caffeine (3 mg/kg, i.p.) completely prevented inosine protective effect in rotarod test and partially in the hind limb claspings phenomenon. Inosine (10 mg/kg, i.p.) was able to prevented MeHg-induced IL-6 decreased and

also prevented MeHg-induced BDNF increased levels in cerebellum. MeHg (40 mg/L) reduced glutathione peroxidase activity, which was not prevented by inosine treatment, but did not affect glutathione reductase cerebellar activity when compared with non-exposed group. MeHg-exposed animals exhibited higher total Hg levels in cerebellum when compared to non-exposed animals. Inosine did not prevent total Hg-increased level induced by MeHg in cerebellum. Furthermore, inosine (10 mg/kg, i.p.) prevented the reduction in ALT serum activity induced by MeHg. Regarding serum lipid levels, inosine (10 mg/kg, i.p.) did not prevent MeHg-increased total cholesterol levels, however, was able to prevent MeHg-increased non-HDL cholesterol levels and promoted an increase in HDL cholesterol levels when compared with MeHg-exposed animals treated with vehicle (10 ml/kg, i.p.). Finally, inosine was able to prevent the genotoxic effect of MeHg, observed in the micronucleus assay in primary culture of human lymphocytes, reducing the number of binucleated micronucleated cells when compared with the MeHg-exposed group treated with vehicle (10 ml/kg, i.p.). **Conclusions:** Taken together these results suggest that inosine presents protective effect in face of MeHg-behavioral (motor performance and coordination) and biochemical effects in the central nervous system. Whereas, inosine also presents protective effects against hepatotoxic and genotoxic effects of MeHg, as well as on the changes in serum lipid levels induced by MeHg. In summary, our data demonstrate that inosine was able to prevent behavioral and biochemical changes induced by MeHg, furthermore, contribute to understanding mechanisms mediating MeHg-toxicity.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Tabela 1.** Consumo de líquidos

**Figura 1.** Ciclo do mercúrio no meio ambiente

**Figura 2.** Biossíntese da via purinérgica

**Figura 3.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste da barra giratória) de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 4.** Influência da cafeína no efeito da inosina em relação ao desempenho motor (teste da barra giratória) de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 5.** Efeito da inosina e influência da cafeína no efeito da inosina em relação ao teste de retração dos membros posteriores em animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 6.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste da caminhada na viga) de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 7.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste do poste) de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 8.** Efeito da inosina nos níveis de citocinas e BDNF no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 9.** Efeito da inosina na atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 10.** Efeito da inosina na concentração de mercúrio no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 11.** Efeito da inosina na atividade das enzimas hepáticas de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 12.** Efeito da inosina nos níveis de lipídeos de animais expostos ao cloreto de MeHg

**Figura 13.** Efeito da inosina diante da formação de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos exposta ao cloreto de MeHg

**Figura 14.** Esquema representativo dos efeitos promovidos pela inosina diante da exposição ao cloreto de metilmercúrio

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 – Receptor A1 para Adenosina  
A2A – Receptor A2A para Adenosina  
A2B – Receptor A2B para Adenosina  
A3 – Receptor A3 para Adenosina  
ABCA1 - do inglês Adenosine 5'-triphosphate-binding Cassette  
Transporter A1  
ADA – Adenosina Desaminase  
ADN – Ácido Desoxirribonucléico  
ALT – Alanina Aminotransferase  
AMP – Monofosfato de Adenosina  
AMPc – Monofosfato de Adenosina Cíclico  
ANOVA – Análise de Variância  
AST – Aspartato Aminotransferase  
ATSDR – do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*  
ATP – Adenosina Trifosfato  
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro  
Ca<sup>2+</sup> - Íon Cálcio  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg<sup>+</sup> - Dimetilmercúrio  
CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> - Monometilmercúrio  
CH<sub>3</sub>HgCl – Cloreto de Metilmercúrio  
CHO-K1 - do inglês Chinese Hamster Ovary  
CREB - Elemento Responsivo Ligador de AMPc  
DAG – Diacilglicerol  
DMSA – Ácido 2,3-dimercaptosuccínico  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
E.P.M. – Erro Padrão da Média  
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético  
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
ERK1/ERK2 - Quinases Reguladoras de Sinais Extracelulares 1 e 2  
GABA – Ácido- $\gamma$ -aminobutírico  
GPx – Glutathione Peroxidase  
GR – Glutathione Redutase  
GSH – Glutathione  
GSSG – Glutathione Oxidada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
HDL – do inglês *High Density Lipoprotein*  
Hg(CNO)<sub>2</sub> – Fulminato de Mercúrio

Hg<sup>++</sup> - Mercúrio II ou Mercúrico  
Hg<sup>0</sup> – Mercúrio Metálico  
Hg<sub>2</sub><sup>++</sup> - Mercúrio I ou Mercuroso  
HgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Mercúrio  
HgS – Sulfeto de Mercúrio  
HMGOa redutase - 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase  
IARC - do inglês International Agency for Research on Cancer  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL-1 – Interleucina 1  
IL-1Ra – Antagonista do Receptor de Interleucina 1  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta  
IP<sub>3</sub> – Inositol Trifosfato  
K<sup>+</sup> - Íon Potássio  
LAT – do inglês L-type Neutral Amino Acid Carrier Transport System  
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês Low Density Lipoprotein)  
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
MeHg – Metilmercúrio  
MN – Micronúcleo  
Na<sup>+</sup> - Íon Sódio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidrogênio  
NMDA - N-Metil-D-Aspartato  
NT5E – Ecto-5'-Nucleotidase  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion Superóxido  
PBS – do inglês Phosphate Buffer Saline  
PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase  
PKA – Proteína Quinase A  
PKC – Proteína Quinase C  
PLC – Fosfolipase C  
PLD – Fosfolipase D  
PMSF - Fluoreto Fenilmetilsulfonil  
RPMI – do inglês “Roswell Park Memorial Institute”  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SnCl<sub>2</sub> – Cloreto Estanoso  
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa  
TrkB - Receptores Tropomiosina Quinase B  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. MERCÚRIO - ASPECTOS HISTÓRICOS .....	15
1.2. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E USOS DO MERCÚRIO .....	16
1.3. CICLO DO MERCÚRIO NO MEIO AMBIENTE .....	17
1.4. FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO.....	19
1.5. TOXICOCINÉTICA E EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO ...	22
1.6. TRATAMENTO.....	28
1.7. SISTEMA PURINÉRGICO .....	29
1.8. INOSINA.....	30
1.9. RECEPTORES DE ADENOSINA E INOSINA.....	32
1.10. METILMERCÚRIO E INOSINA .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1. ANIMAIS.....	37
3.2. DROGAS E REAGENTES.....	37
3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	38
3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS .....	38
3.4.1. TESTE DA BARRA GIRATÓRIA .....	39
3.4.2. TESTE DO GRAU DE RETRAÇÃO DOS MEMBROS POSTERIORES (DO INGLÊS <i>HIND LIMB CLASPING PHENOMENON</i> ) .....	39
3.4.3. TESTE DA CAMINHADA NA VIGA (DO INGLÊS <i>BEAM WALKING TEST</i> ) .....	39
3.4.4. TESTE DO POSTE (DO INGLÊS <i>POLE TEST</i> ).....	40
3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS EM CÉREBELO .....	40
3.5.1. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E BDNF.....	40
3.5.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GPX .....	41
3.5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GR .....	41
3.6. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MERCÚRIO NO CÉREBELO .....	41

3.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS EM SORO .....	42
3.7.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS ALT E AST .....	42
3.7.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL .....	43
3.7.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL HDL E NÃO-HDL ..	43
3.8. ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....	44
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1. CONSUMO DE LÍQUIDOS .....	46
4.2. TESTE DA BARRA GIRATÓRIA.....	46
4.3. TESTE DO GRAU DE RETRAÇÃO DOS MEMBROS POSTERIORES .....	49
4.4. TESTE DA CAMINHADA NA VIGA .....	50
4.5. TESTE DO POSTE.....	52
4.6. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E BDNF.....	53
4.7. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA GPX E GR.....	54
4.8. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MERCÚRIO NO CEREBELO.....	56
4.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS HEPÁTICAS ALT E AST .....	57
4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL, HDL E COLESTEROL NÃO-HDL .....	58
4.11. ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....	60
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Mercúrio - Aspectos Históricos

A relação entre o homem e o mercúrio mostra-se bastante antiga. Acredita-se, que para realizar seus desenhos sobre as paredes das cavernas em que habitava, ou em seus objetos e em suas pinturas faciais, o homem pré-histórico muito provavelmente se serviu de uma pedra avermelhada, a qual apresentava tal coloração devido à grande quantidade de cinábrio em sua composição. O cinábrio é conhecido quimicamente como sulfeto de mercúrio (HgS), o principal minério do mercúrio. Admite-se que tanto o mercúrio quanto o cinábrio começaram a ser extraídos de minas há mais de 2.300 anos, nessa época, eram bastante valorizados devido sua densidade e principalmente por sua cor vermelho-dourada. Acredita-se que a primeira forma de utilização do mercúrio foi para produção de tintas como base de um pigmento avermelhado, muito usado para decorações. Por volta de 500 a.C., Vitruvius, um famoso arquiteto romano, observou que o mercúrio dissolvia prontamente o ouro e descreveu o método para recuperação do metal nobre usado nas vestimentas da época (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; GRAEME; POLLACK, 1998).

Além do uso decorativo e na forma de amálgama com outros metais, existem relatos da sua utilização com finalidades medicinais. Os antigos chineses acreditavam que o mercúrio possuía propriedades que prolongavam a vida, no entanto, vários imperadores morreram devido à ingestão constante do metal na tentativa de assegurar a imortalidade. Por outro lado, os antigos hindus consideravam que este elemento possuía propriedades afrodisíacas, enquanto os gregos utilizavam o mercúrio como componente de unguentos ou pomadas para o tratamento de diversas doenças de pele. Além disso, alguns relatos mostram que outras civilizações utilizaram este metal para o tratamento de doenças em diferentes órgãos, como, por exemplo, olhos, ouvido, pulmões e intestino. Por volta do século XV, o mercúrio foi usado como medicamento para o tratamento da sífilis na Europa, porém, em meados do século XIX, vários estudos vieram questionar seus benefícios terapêuticos e evidenciar seus efeitos tóxicos (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; GRAEME; POLLACK, 1998).

Sendo assim, fica evidente quão antiga é a relação entre o homem e o mercúrio, e atualmente, essa relação permanece tão estreita quanto nos tempos antigos, principalmente devido ao intenso interesse em ampliar o conhecimento a cerca da interação desse metal com o meio ambiente, bem como, da sua interação com o homem.

## 1.2. Características Químicas e Usos do Mercúrio

O mercúrio é um metal pesado de aspecto argênteo, cujo símbolo Hg deriva do latim *hydrargyrum* (*Hydro*: água; *árgyros*: prata), por apresentar-se, na sua forma elementar, como um líquido denso e prateado, sob condições normais de temperatura e pressão. Antoine Laurent Lavoisier, no século XVIII, foi o primeiro a reconhecê-lo como elemento químico. Pertence a família química dos metais do grupo IIb, possui número atômico 80 e massa atômica de 200,59 sendo considerado um metal de transição e apresentando os seguintes isótopos naturais com as respectivas abundâncias: 202 (29,80%), 200 (23,13%), 199 (16,84%), 201 (13,22%), 198 (10,02%), 204 (6,85%) e 196 (0,14%) (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK, 2000).

O mercúrio pode apresentar-se na forma de mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ) e também nas formas oxidadas, onde os átomos perdem um ou dois elétrons, respectivamente, formando mercúrio I ou mercuroso ( $\text{Hg}_2^{++}$ ) e o mercúrio II ou mercúrico ( $\text{Hg}^{++}$ ). Tanto o mercúrio I quanto o mercúrio II podem formar diversos compostos químicos inorgânicos e orgânicos. Os principais compostos inorgânicos são formados a partir da combinação do mercúrio com o cloro, enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Dessa forma formam-se alguns importantes sais, como, por exemplo, o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) altamente tóxico e corrosivo; o sulfeto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ), citado anteriormente, de coloração vermelha e utilizado como pigmento de tintas e o fulminato de mercúrio [ $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ ] usado como detonador em explosivos. Já os compostos orgânicos, também chamados de compostos organomercuriais, são formados a partir da ligação do metal (ligação covalente) a pelo menos um átomo de carbono. Dentre os compostos organomercuriais, os que causam maior preocupação são os ligados aos radicais alquila de cadeia curta, onde o mercúrio se liga aos grupos metila, etila ou propila, devido às suas propriedades tóxicas (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK, 2000; NAÇÕES UNIDAS, 2013).

Com relação a sua utilização, o mercúrio é usado principalmente como cátodo em células eletrolíticas na produção de cloro e da soda cáustica na indústria de cloro álcali. Além disso, é utilizado em lâmpadas elétricas, incluindo as fluorescentes e as de descarga de alta densidade; em manômetros, barômetro, termômetros e outros instrumentos de pressão, medição e calibração. O seu emprego também abrange a formação de amálgamas dentários juntamente com a

liga de prata-estanho. Os compostos mercuriais eram amplamente utilizados em formulações farmacêuticas, geralmente formando sais à base de nitrato, iodeto, cloreto, cianeto, sulfato, tiocianato, brometo e acetato, principalmente como conservantes em soluções nasais, oftálmicas, vacinas e produtos injetáveis (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003). Dados do ano de 2001 estimavam que cerca de 80 kg de compostos mercuriais eram utilizados como princípio ativo em formulações farmacêuticas anualmente, dentre outros, destaca-se o Timerosal (princípio ativo etilmercúrio) amplamente utilizado como conservantes em vacinas. Devido ao seu potencial efeito tóxico o Timerosal foi progressivamente substituído por outros conservantes, no entanto, em alguns países como, por exemplo, no Brasil ainda é bastante utilizado devido ao seu baixo custo. (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997).

No Brasil, o mercúrio foi bastante utilizado em processos de mineração, estima-se que para cada kg de ouro produzido utilizam-se cerca de 2 kg de mercúrio. Entretanto, devido à redução progressiva na produção de ouro desde a segunda metade da década de 90, também houve uma progressiva redução na utilização do mercúrio nesse processo. Ainda assim, estima-se que aproximadamente 50 a 70 toneladas de Hg<sup>0</sup> foram lançados no ambiente garimpeiro anualmente, nos diversos locais de mineração do território brasileiro (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; PFEIFER, et al., 1990).

### 1.3. Ciclo do Mercúrio no Meio Ambiente

Em uma revisão publicada no início dos anos 2000, Boening sugere que existam dois ciclos para o mercúrio no meio ambiente. Um deles é considerado global e envolve a circulação atmosférica do mercúrio elementar na forma de vapores, a partir de fontes terrestres para os oceanos. O outro ciclo é considerado local e depende da metilação do mercúrio inorgânico que se origina principalmente a partir de fontes antropogênicas. De maneira geral, tanto o ciclo global quanto o local de mercúrio compreendem a emissão, a circulação atmosférica de seus vapores e a precipitação com as chuvas que faz com que o mercúrio retorne as terras e as águas (Para revisão ver BOENING, 2000).

Assim, a emissão de mercúrio para a atmosfera pode acontecer de duas formas, a natural e a antropogênica. A emissão natural ocorre, principalmente, devido à desgaseificação da crosta terrestre, de vulcões

e provavelmente da evaporação a partir dos oceanos. A emissão antropogênica deriva principalmente da queima de combustíveis fósseis, das indústrias (p. ex. cloro álcali) e da mineração (o carvão contém de 8,53 a 10 ppb de mercúrio; petróleo contém de 20 a 2000 ppb de mercúrio) (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; LINDBERG, 2007; HANSEN; DANSCHER, 1997).

O mercúrio emitido tanto de forma natural quanto antropogênica encontra-se na forma inorgânica, acredita-se que a principal forma de mercúrio na atmosfera seja o vapor de  $Hg^0$ , contudo, a presença de metilmercúrio ( $MeHg$ ) também pode ser observada. Neste sentido, a forma química do mercúrio influencia diretamente o seu transporte, uma vez que, o vapor de  $Hg^0$  pode percorrer grandes distâncias, enquanto as outras formas podem se ligar a partículas mais pesadas e precipitar. Diz-se que o mercúrio na forma de vapor apresenta distribuição global devido ao seu tempo médio de residência na atmosfera entre quatro meses e quatro anos. Diferentemente, as formas solúveis possuem tempo de residência na atmosfera de apenas algumas semanas, apresentando, portanto, pouca capacidade de dispersão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991; AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003). Na atmosfera o mercúrio sofre um processo de transformação onde o  $Hg^0$  é transformado em  $Hg^{++}$ , o qual pode rapidamente precipitar com a chuva e/ou neve ou ser adsorvido por pequenas partículas e posteriormente sofrer um processo de deposição seco ou úmido. Sendo assim, pode-se observar que fontes antropogênicas responsáveis pela emissão de  $Hg^0$  para a atmosfera, também contribuem para a sua deposição no solo e na água (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989, 1990; UNITED STATES OF AMERICA, 1997).

A distribuição e a mobilidade do mercúrio no solo dependem de algumas características do solo, como, por exemplo, tipo, potencial de oxirredução, pH e drenagem. O mercúrio na sua forma elementar e iônica é adsorvido em humatos e, assim, sua mobilidade para camadas profundas do solo torna-se pequena. Dessa forma, microorganismos aeróbicos e anaeróbicos, os quais apresentam maior atividade em camadas superficiais do solo, podem transformar prontamente o mercúrio inorgânico em mercúrio orgânico, por um processo chamado de metilação, dando origem ao monometilmercúrio ( $CH_3Hg^+$ ) e ao dimetilmercúrio [ $(CH_3)_2Hg$ ]. O  $CH_3Hg^+$ , por sua vez, irá fazer parte da cadeia trófica enquanto o  $(CH_3)_2Hg$ , por ser mais volátil será emitido para a atmosfera, retornando mais tarde ao solo na forma de  $CH_3Hg^+$ . Processos de lixiviação e erosão de solos contendo mercúrio, são os

principais responsáveis pela transferência de compostos mercuriais do solo para a água e sedimentos aquáticos, tanto do ambiente marinho quanto de água doce (CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003; AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; QUEIROZ, 1995).

No ambiente aquático, o mercúrio pode estar presente na forma de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , proveniente das águas das chuvas, bem como, formado a partir da metilação do mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{++}$ ) também proveniente da atmosfera. Microorganismos aeróbicos e anaeróbicos presentes nos sedimento aquáticos apresentam a capacidade de formar  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  a partir do  $\text{Hg}^{++}$ . Para isso, a metilcobalamina, uma coenzima produzida tanto por microorganismos aeróbicos quanto anaeróbicos, é capaz de transferir um grupamento metila para o íon  $\text{Hg}^{++}$ , dando origem ao  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (Para revisão ver AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003; BALDI, 1997; FITZGERALD; CLARKSON, 1991). Dessa forma, o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  passa a integrar a cadeia alimentar aquática. O mercúrio apresenta a capacidade de se bioacumular em plantas aquáticas, invertebrados, peixes e mamíferos. Como será comentado adiante essa bioacumulação é facilitada devido a sua complexação com o aminoácido L-cisteína. O complexo  $\text{MeHg-L-cisteína}$  é estruturalmente muito semelhante a metionina e assim pode compartilhar com esta o sistema transportador de aminoácidos neutros do tipo L [do inglês (LAT) *L-type neutral amino acid carrier transport system*] (KERPER; BALLATORI; CLARKSON, 1992; YIN, et al., 2008), o que torna mais fácil o seu transporte através das membranas celulares, e por conseguinte a sua capacidade de reagir e se ligar a componentes celulares. Além da bioacumulação, o mercúrio apresenta a capacidade de biomagnificação, ou seja, a capacidade de acumular-se por níveis tróficos sucessivos, sendo que sua concentração se eleva proporcionalmente quanto maior for o nível trófico do organismo. Assim, os processos de bioacumulação e biomagnificação permitem que o mercúrio chegue até o homem representando um importante fator de risco para a saúde humana.

#### 1.4. Formas de Exposição ao Mercúrio

Episódios de exposição ao mercúrio têm sido relatados há mais de 150 anos atrás em acidentes laboratoriais. No entanto, atualmente, acredita-se que existam três formas principais pelas quais o homem encontra-se exposto ao mercúrio. Uma delas compreende a exposição a partir do mercúrio contido em amálgamas utilizadas em restaurações dentárias. Aproximadamente 50% da amálgama utilizada nesses

procedimentos é constituída de mercúrio combinado com prata e zinco. Durante o processo de mastigação e ingestão de líquidos quentes, pode ocorrer a liberação de vapor de mercúrio na cavidade bucal e posteriormente a sua absorção. Estima-se que uma restauração com amálgama de mercúrio libere de 3 a 17 µg de vapor de mercúrio (Para revisão ver CLARKSON, 1997; CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003; SALLSTEN, 1996). Alguns estudos têm demonstrado uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de restaurações com amálgama de mercúrio e as concentrações sanguíneas e urinárias elevadas de mercúrio (KINGMAN; ALBERTINI; BROWN, 1998). Além disso, outros estudos têm demonstrado concentrações urinárias de mercúrio mais elevadas em dentistas, bem como um pior desempenho psicomotor nesses indivíduos quando comparados ao grupo controle (RITCHIE, et al., 2002). A utilização de amálgamas contendo mercúrio têm sido gradativamente substituída pelo uso de resinas menos tóxicas. Ainda assim, principalmente nos serviços públicos de saúde bucal, os amálgamas contendo mercúrio são extensivamente empregados em restaurações dentárias, compreendendo uma importante fonte de exposição ao mercúrio tanto para os profissionais quanto para a população em geral.

Outra forma importante de exposição ao mercúrio ocorre por meio do Timerosal, o qual vem sendo utilizado como conservante em vacinas graças à ação bactericida de um dos seus componentes, o etilmercúrio. Estudos realizados nos Estados Unidos da América no final dos anos 90 demonstraram que crianças nas quais era administrada toda a série de vacinas recomendada, chegavam a receber até 187,5 µg de etilmercúrio durante os seis primeiros meses de vida, podendo atingir doses cumulativas de 0,1 µg mercúrio/kg/dia, valor bem acima do recomendado pelos órgãos regulamentadores da época. Alguns trabalhos sugerem que as vacinas contendo etilmercúrio podem provocar hiperatividade, autismo e alteração no desenvolvimento neuromotor. Em decorrência disso, atualmente, o Timerosal tem sido utilizado com menor frequência na preparação de vacinas, sendo substituído por outros agentes conservantes, os quais apresentam menor toxicidade (CLEMMENTS, et al., 2000; BALL; BALL; PRATT, 2001; ANDREWS, et al., 2004; HVIID, et al., 2003).

Apesar dos amálgamas dentários e do Timerosal compreenderem formas importantes de exposição ao mercúrio, a ingestão de peixes e frutos do mar contaminados com mercúrio, correspondem à principal forma de exposição a esse metal pesado. De acordo com o que foi discutido anteriormente, o mercúrio sofre processo

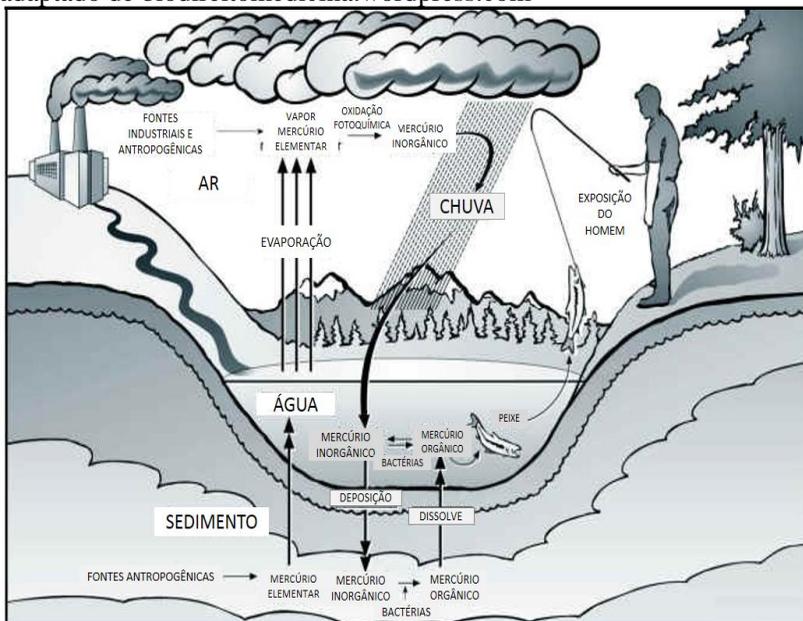
de biometilação no ambiente aquático, dando origem ao MeHg, o qual, por sua vez, apresenta uma importante capacidade de bioacumulação e biomagnificação. Considerando que o homem encontra-se no topo da cadeia alimentar, uma das principais (senão a principal) formas da exposição ambiental humana ao mercúrio se dá por meio do consumo de peixes e frutos do mar contaminados com MeHg (Para revisão ver CLARKSON; MAGOS, 2006; CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003).

Salienta-se que foi dessa forma que ocorreu o principal acontecimento de contaminação humana envolvendo exposição ao MeHg, em 1953, na baía de Minamata no Japão. Dejetos industriais contendo grande quantidade de mercúrio foram despejados no mar e a ingestão de peixes contaminados com MeHg pela população representou um dos principais episódios de contaminação por este agente tóxico já relatado (Para revisão ver HARADA, 1995). Além disso, no início da década de 70, no Iraque, ocorreu outro importante episódio de contaminação por MeHg, quando a população ingeriu alimentos preparados a partir de grãos que haviam sido tratados com fungicidas à base de MeHg (BAKIR, et al., 1973). Outros episódios semelhantes aconteceram na Guatemala, Paquistão e Gana (Para revisão ver CLARKSON, 2002).

Os referidos episódios tornaram crescente a preocupação mundial com relação a contaminação ambiental e consequente exposição do homem ao mercúrio, levando a Nações Unidas, por meio do seu Programa Ambiental (do inglês *United Nations Environment Programme* - UNEP), a organizar a Convenção de Minamata em 2013. O objetivo dessa convenção foi estabelecer medidas obrigatórias e voluntárias a fim de controlar as emissões de mercúrio proveniente de diversas fontes e principalmente restringir o seu comércio e eliminar progressivamente o elemento de certos produtos e processos industriais (NAÇÕES UNIDAS, 2013). Diante do exposto, um ponto que merece destaque é o descarte do mercúrio presente tanto em produtos industrializados (p.ex. lâmpadas fluorescentes, baterias e pilhas) quanto utilizado em processos industriais (p.ex. produção de cloro álcali), uma vez que, não há política para armazenamento seguro dos resíduos e as indústrias de reciclagem conseguem reciclar apenas uma pequena porcentagem da demanda de produtos que contêm mercúrio (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013). Dessa forma, o descarte inadequado no meio ambiente de resíduos industriais, bem como de produtos contendo mercúrio, pode contribuir extensivamente para a geração de MeHg pelo processo de biometilação do mercúrio descrito anteriormente, contribuindo para o risco de intoxicação do homem pelo

metal pesado. A figura 1 mostra resumidamente o ciclo do mercúrio no meio ambiente, e uma das principais formas de exposição do homem a esse metal pesado.

**Figura 1.** Ciclo do mercúrio no Meio Ambiente. Fonte: Retirado e adaptado de [biodireitomedicina.wordpress.com](http://biodireitomedicina.wordpress.com)



### 1.5. Toxicocinética e Efeitos da Exposição ao Metilmercúrio

A cinética do MeHg no organismo contribui diretamente para o desenvolvimento dos seus efeitos tóxicos. Assim, do ponto de vista cinético, sabe-se que o MeHg é facilmente absorvido no trato gastrointestinal (cerca de 90% – 95%) (NIELSEN; ANDERSEN, 1992), sendo que a microflora intestinal é responsável pela sua lenta metabolização à mercúrio inorgânico, a uma taxa de cerca de 1% da carga corporal por dia (ATSDR, 1999; CLARKSON, 2002). Acredita-se que o MeHg pode ser transportado através das membranas celulares por difusão passiva ou através do sistema LAT 1 ou 2, permitindo que seja prontamente absorvido e facilmente distribuído pelo organismo, em um processo que dura aproximadamente 30 horas (CLARKSON, 2002; KERPER; BALLATORI; CLARKSON, 1992). Além disso, a

distribuição do MeHg no organismo é facilitada pela sua capacidade de interagir com grupamentos tióis de diferentes proteínas. Dessa forma, o MeHg pode depositar-se em diferentes órgãos, especialmente cérebro, intestino, fígado e rins. O MeHg é excretado do organismo principalmente pelas fezes, sendo que apenas 10% é eliminado pela urina. O MeHg é secretado na bile e parcialmente reabsorvido na circulação portal retornando ao fígado ou ao intestino pela circulação enterohepática. Assim, no fígado e no intestino o MeHg é metabolizado por demetilação, originando o mercúrio inorgânico, o qual é pouco absorvido e conseqüentemente eliminado do organismo nas fezes. Acredita-se que a excreção do MeHg do organismo obedece uma cinética de primeira ordem, sendo que o seu tempo de meia-vida de eliminação depende do tecido onde o metal se encontra, variando de 45 a 70 dias (Para revisão ver ATSDR, 1999, CLARKSON, 2002; CLARKSON, VYAS; BALLATORI, 2007). Assim, o fato do MeHg ser lentamente eliminado do organismo, contribui sobremaneira para o seu acúmulo no organismo e conseqüentemente para os efeitos tóxicos decorrentes da exposição prolongada ao metal pesado.

As catástrofes acontecidas no Japão e no Iraque permitiram conhecer os sintomas clínicos decorrentes da exposição ao MeHg: parestesias, constrição do campo visual, danos auditivos e da fala, ataxia cerebelar, entre outros (EKINO, et al., 2007). Além disso, despertaram o interesse de se obter maiores conhecimentos acerca dos seus efeitos no organismo humano. Neste sentido, o desenvolvimento de modelos experimentais animais, bem como estudos realizados em humanos, vêm demonstrando que alterações motoras representam a principal alteração comportamental induzida pela exposição ao MeHg (CHARBONNEAU, et al., 1976; MATTSSON, et al., 1981; INOUE; MURAO; KAJIWARA, 1985; EKINO, et al., 2007). Um dos modelos animais mais amplamente utilizado para investigar os efeitos desencadeados por este agente tóxico compreende a exposição de camundongos através da ingestão de MeHg (DIETRICH et al., 2005), devido sua alta taxa de absorção através do trato gastrointestinal, em torno de 90-95% (NIELSEN; ANDERSEN, 1992), e o fato de a exposição oral representar a principal forma de contaminação das populações. Neste modelo, o MeHg é diluído na água de beber e é permitido aos animais ingerirem a referida solução *ad libitum*. Esta proposta é capaz de induzir notável deficit locomotor em camundongos, muito semelhante ao encontrado em humanos, podendo ser observado através de testes como o da pegada (do inglês *footprint*) (CARTER et al., 1999), caminhada na viga (do inglês *beam walking*) (PERRY et al., 1995), barra giratória (do

inglês *rotarod*) (JONES; ROBERTS, 1968) e campo aberto (LUCENA et al., 2007). Sendo assim, distúrbios motores, consistindo principalmente de ataxia, perda de equilíbrio e da coordenação, têm sido extensivamente reportados em estudo experimentais utilizando animais expostos ao MeHg, além disso, permitem traçar um importante paralelo entre os parâmetros comportamentais e as alterações em nível celular e molecular induzidas por este contaminante ambiental (Para revisão ver FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

Acredita-se que as alterações moleculares e celulares, e consequentemente as alterações comportamentais induzidas pelo MeHg devem-se principalmente ao acúmulo do metal pesado em áreas motoras do encéfalo, como, por exemplo, o cerebelo. Alguns trabalhos sugerem que ele é transportado da circulação sanguínea para o sistema nervoso central (SNC) complexado com o aminoácido L-cisteína, através do sistema transportador de aminoácidos neutros do tipo L [do inglês (LAT) *L-type neutral amino acid carrier transport system*] (KERPER; BALLATORI; CLARKSON, 1992; YIN, et al., 2008). Uma vez no SNC, o MeHg é capaz de combinar-se covalentemente com grupos sulfidrilas, podendo levar à inibição da atividade de enzimas que contenham este grupamento. Neste sentido, uma das principais alterações moleculares promovidas pelo MeHg está relacionada com o sistema antioxidante da glutatona (GSH) (KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006; STRINGARI et al., 2008). A GSH é o componente de baixo peso molecular que contém grupos sulfidrilas mais abundante no compartimento intracelular (DRINGEN, 2000). A sua capacidade redutora é determinada pelas propriedades nucleofílicas dos seus grupos tíóis, sendo que seu papel antioxidante é mantido graças as enzimas que catalizam sua interação com moléculas eletrofílicas de origem endógena ou exógena (ZHU, et al., 2006). Dentre essas enzimas destacam-se a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona redutase (GR), as quais desempenham papel central na destoxificação de peróxidos e na redução da glutatona oxidada (GSSG), respectivamente (DRINGEN, 2000). O MeHg é capaz de interagir diretamente com os grupos tíóis da GSH formando um complexo excretável, GS-HgCH<sub>3</sub> (BALLATORI; CLARKSON, 1982), reduzindo, assim, os níveis de GSH. Essa redução nos níveis de GSH foi observado em culturas primárias de células neuronais e da glia (KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006), em células não-neuronais (AMONPATUMRAT, et al., 2008), e em mitocôndrias isoladas do encéfalo de camundongos (FRANCO, et al., 2007). No entanto é importante mencionar que o MeHg pode causar estresse oxidativo por outro mecanismo que necessariamente não

envolva alterações nos níveis de GSH. Alguns trabalhos têm demonstrado que o MeHg é capaz de inibir a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando, conseqüentemente a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (MORI; YASUTAKE; HIRAYAMA, 2007; FRANCO, et al., 2007). Além disso, o MeHg pode interagir diretamente com os grupos selenóis da GPx reduzindo a sua atividade e, conseqüentemente sua capacidade de detoxificar peróxidos. Dessa forma, toda essa cadeia de eventos culmina com aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo à moléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (FRANCO et al., 2007).

Outro importante alvo molecular do MeHg é o sistema glutamatérgico (Para revisão ver ASCHNER, et al., 2007), o principal neurotransmissor excitatório do SNC. O glutamato desempenha importantes funções fisiológicas, no entanto, em concentrações extracelulares elevadas está bem estabelecido que pode provocar lesão neuronal, em um processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica. Nesse processo ocorre ativação excessiva de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), conseqüentemente há um aumento no influxo de íons  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  nos neurônios. O aumento nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  está associado com a geração de estresse oxidativo e neurotoxicidade (Para revisão ver FEATHERSTONE, 2010; MELDRUM, 2000; CHOI, 1992; CECCATELLI; DARÉ; MOORS, 2010). Moléculas transportadoras localizadas na membrana de células gliais (astrócito e micróglia) são responsáveis pela remoção do glutamato da fenda sináptica, controlando, assim, seus níveis extracelulares e mantendo um equilíbrio entre suas ações fisiológicas e patológicas (ANDERSON; SWANSON, 2000; MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2001). Estudos *in vitro* utilizando cultura de neurônios e astrócitos, bem como, fatias de tecidos e vesículas sinápticas e sinaptossomas isolados têm contribuído para esclarecer a participação do glutamato na neurotoxicidade induzida pelo MeHg. Estes estudos têm demonstrado que ele é capaz de aumentar a liberação espontânea de glutamato em cultura de neurônios e, além disso, inibe a captação de glutamato em cultura de astrócitos, vesículas sinápticas e fatias de córtex cerebral de ratos (BROOKES; KRISTT, 1989; ASCHNER, 2000; PORCIUNCULA, et al., 2003; MORETTO, et al., 2005). Corroborando esses resultados, estudos *ex vivo* têm demonstrado um aumento na liberação espontânea de glutamato de fatias de cerebelo de camundongos expostos ao MeHg, bem como uma

redução na captação de glutamato em fatias de córtex cerebral (REYNOLDS; RACZ, 1987; FARINA, et al., 2003). Esses achados sugerem fortemente que este contaminante seja capaz de promover um desbalanço considerável na homeostase do glutamato no SNC, sendo que a consequente ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA contribui diretamente para a sua neurotoxicidade. Tem sido constatado que a ativação de receptores NMDA leva a um aumento nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , o qual, por sua vez, pode ativar vias intracelulares envolvidas com a morte celular. Além disso, o  $Ca^{2+}$  pode ser captado pela mitocôndria onde vai favorecer a produção de espécies reativas de oxigênio (REYNOLDS; HASTINGS, 1995).

Está bem estabelecido que três eventos moleculares principais e interrelacionáveis estão envolvidos na neurotoxicidade do MeHg: 1) desbalanço na homeostase do glutamato, 2) desbalanço na homeostase do  $Ca^{2+}$  e 3) aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo (Para revisão ver FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

Além do SNC, o MeHg pode atingir também outros órgãos e sistemas, como o sistema hepático. Assim, alguns trabalhos têm demonstrado que células hepáticas apresentam uma propensão particular para acumular uma quantidade considerável de mercúrio após exposição ao MeHg, sendo que esse acúmulo é favorecido quando o MeHg encontra-se complexado com aminoácidos, como, por exemplo, a cisteína. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o MeHg é capaz de induzir um estado de estresse oxidativo no sistema hepático, alterando a atividade do sistema antioxidante da glutatona, promovendo peroxidação lipídica e reduzindo a atividade/viabilidade mitocondrial, no entanto, sem afetar as defesas antioxidantes enzimáticas (de FREITAS, et al., 2009; ROOS, et al., 2010; 2011). Assim, parece que o MeHg é capaz de promover lesões no fígado, sendo que a atividade sérica de enzimas hepáticas específicas como a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), podem fornecer um panorama da função hepática diante da exposição a este contaminante.

Algumas evidências têm sugerido que a exposição ao MeHg pode desencadear alguns eventos cardiovasculares, como aumento da pressão arterial, aterosclerose e infarto do miocárdio (RISSANEN, et al., 2000; SALONEN, et al., 2000). Acredita-se que exista uma estreita relação entre essas disfunções cardiovasculares e a dislipidemia. Alguns estudos têm demonstrado que a exposição ao MeHg é capaz de alterar os níveis de lipídeos no plasma, apresentando um aumento nos níveis de colesterol total e colesterol não HDL (do inglês *High Density*

*Lipoprotein*). Além disso, sugere-se que os eventos pró-oxidativos desencadeados pelo MeHg podem estar relacionados às alterações nos níveis plasmáticos de lipídeos induzidos por esse contaminante (JIN, et al., 2012). Assim, têm-se demonstrado que os níveis de mercúrio são preditores dos níveis de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL, do inglês *Low Density Lipoprotein*), a qual está intimamente relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SALONEN, et al., 1995; WALLENFELDT, et al., 2004). Portanto, pode-se sugerir que a hipercolesterolemia desempenha um papel primordial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares induzidas pela exposição ao MeHg.

Além dos seus efeitos deletérios sobre o SNC, danos hepáticos e cardiovasculares, o mercúrio apresenta potencial genotóxico, capaz de promover alterações no material genético (ADN - ácido desoxirribonucleico) celular podendo resultar, eventualmente, no desenvolvimento de processos carcinogênicos, teratogênicos e/ou mutagênicos (Para revisão ver CRESPO-LÓPEZ, et al., 2009). Alguns trabalhos têm demonstrado que a exposição ocupacional ao mercúrio é capaz de induzir aberrações cromossômicas estruturais, como, por exemplo, cromossomos quebrados, resultantes de quebras não reparadas na dupla fita de ADN, ou ainda, rearranjos cromossômicos, resultantes de reparações mal sucedidas nos filamentos de ADN danificados (Para revisão ver CRESPO-LÓPEZ, et al., 2009). Deve-se ressaltar que a exposição ao MeHg é capaz de promover efeitos epigenéticos significativos, como, por exemplo o descrito por Onishchenko e colaboradores (2008), com relação ao comportamento tipo-depressivo acompanhado de alterações epigenéticas na regulação da expressão do gene para o BDNF. Considerando o exposto, uma das técnicas mais amplamente utilizadas para se avaliar a existência de danos cromossômicos *in vivo* ou em uma população de células, é o ensaio do micronúcleo (FENECH et al., 2011; BONASSI et al., 2011; FENECH, 2008, SCHMID, 1975; HEDDLE, 1973). Micronúcleos (MN) são expressos geralmente em células que estão em processo de divisão e que por algum motivo apresentam cromossomos danificados e/ou incapazes de migrarem para os pólos do fuso mitótico durante o processo de divisão celular. Neste caso, na fase de telófase da mitose, esses cromossomos danificados e fragmentos de cromossomos são envoltos por um envelope nuclear e gradualmente assumem uma morfologia muito semelhante ao núcleo da célula, quando esta encontra-se na fase de interfase da divisão celular, com a ressalva de que são menores do que os núcleos principais da célula, por isso são chamados de MN (Para

revisão ver FENECH, 2000). Dessa forma, a presença de MN indica a presença de cromossomos danificados e possivelmente de danos ao material genético da célula. Alguns estudos têm demonstrado que o MeHg é capaz de induzir a formação de MN em cultura primária de linfócitos (Para revisão ver CRESPO-LÓPEZ, et al., 2009; OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996), corroborando os achados acerca do seu efeito genotóxico.

## 1.6. Tratamento

De acordo com a literatura, três estratégias podem ser utilizadas para o tratamento da intoxicação pelo MeHg, reduzir a absorção após a exposição, reduzir a carga corporal do metal pesado absorvido e interferir nos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos tóxicos.

As estratégias utilizadas para reduzir a absorção do metal, devem levar em consideração a via pela qual a exposição tem ocorrido e a forma química específica em que ele se encontra no momento da exposição (mercúrio elementar, mercúrio inorgânico ou mercúrio orgânico). No caso do MeHg, conforme comentado anteriormente, a principal forma de exposição se dá pela via oral e consequente absorção pelo trato gastrointestinal. Neste sentido, considerando sua afinidade por grupamentos sulfidrilas, têm sido demonstrado que proteínas, bem como agentes não-absorvíveis (p.ex. resinas de poliestireno) que contenham esses grupamentos, são capazes de reduzir a absorção do MeHg pelo trato gastrointestinal. Além disso, lavagem gástrica e o uso de purgativos (p.ex. sulfato de magnésio) também parecem ser eficazes em reduzir a absorção do metal no trato gastrointestinal (ATSDR, 1999).

Com relação as terapias utilizadas para reduzir a carga corporal de mercúrio, destaca-se o uso de agentes quelantes. Dentre os quelantes mais utilizados, pode-se citar o dimercaprol, a D-penicilamina e seu análogo N-acetil-D,L-penicilamina, e o ácido 2,3-dimercaptosuccinico (do inglês DMSA) os quais diferem em suas eficácias, dependendo da forma química de mercúrio predominante (p.ex. mercúrio elementar, mercúrio inorgânico ou mercúrio orgânico), vias de administração e vias de excreção. Esses agentes quelantes apresentam grupamentos sulfidrilas em sua estrutura e, assim podem competir com os grupamentos sulfidrilas dos tecidos pela ligação ao mercúrio. O complexo quelante-mercúrio então formado pode ser excretado pelos rins ou pelas fezes (ATSDR, 1999; CARVALHO et al., 2007; ARNOLD et al., 1983).

As estratégias utilizadas para interferir nos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos tóxicos do MeHg, levam em consideração,

principalmente, o estresse oxidativo gerado decorrente da exposição. Agentes antioxidantes, como, por exemplo, a N-acetilcisteína, vitamina E (alfa tocoferol) e N,N'-difetil-p-fenilenodiamina, têm se mostrado efetivos na proteção frente aos efeitos tóxicos induzidos pelo MeHg. Além destes, o selênio também têm se mostrado eficaz neste propósito (ATSDR, 1999; AREMU; MADEJCZYK; BALLATORI, 2008; YAMASHITA et al., 2004).

Conforme abordado, diferentes possibilidades estão disponíveis para o tratamento da intoxicação pelo MeHg, no entanto, não são completamente satisfatórias. Dessa forma, faz-se importante a busca e o desenvolvimento de novas estratégias, especialmente farmacológicas, que visem prevenir os efeitos desencadeados pela exposição ao MeHg.

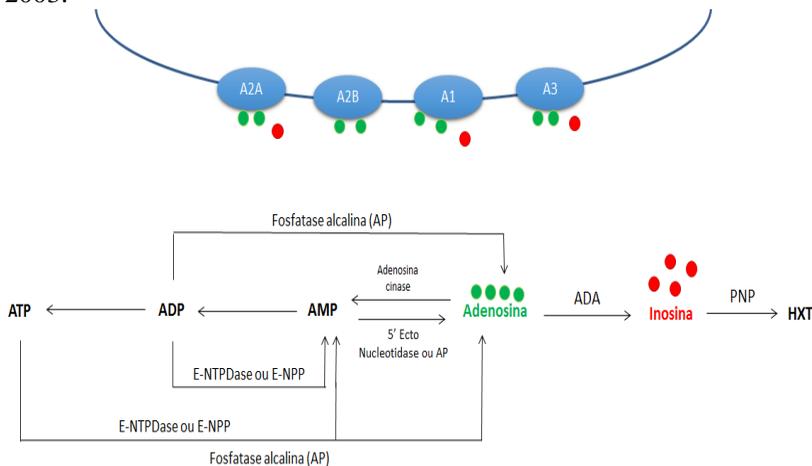
### 1.7. Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico está envolvido em diversas funções fisiológicas incluindo a regulação do sono, o comportamento locomotor, a memória, a cognição, a neuroproteção, a dor e outros (SAWYNOK; REID, 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; DUNWIDDIE; MASINO, 2001; BLUM et al., 2003; TAKAHASHI; PAMPLONA; PREDIGER, 2008), representando, assim, um interessante alvo terapêutico para modulação farmacológica.

Este sistema apresenta o trifosfato de adenosina (ATP) como principal molécula precursora de seus diversos constituintes ou metabólitos. No interior da célula, o ATP pode ser convertido em monofosfato de adenosina (AMP), de forma reversível por ação da ATPase (converte ATP em AMP) e adenilato quinase (converte AMP em ATP). O AMP, por sua vez, pode ser convertido em adenosina através da enzima intracelular 5-endonucleotidase. Adicionalmente, o ATP pode sair para o meio extracelular e uma parte deste ATP pode gerar adenosina pela via das ecto-nucleotidases, pelo metabolismo de nucleotídeos, sendo a ecto-5-nucleotidase (NT5E) a principal enzima responsável em realizar estas reações em condições fisiológicas. Outra parte do ATP no meio extracelular pode ativar seus respectivos receptores purinérgicos do tipo P2 (P2X e P2Y). Semelhantemente ao ATP, a adenosina pode deixar o meio intracelular, transportada para o meio extracelular através de transportadores bidirecionais de nucleosídeos, podendo ativar receptores de adenosina em células adjacentes ou ainda ser convertida em inosina. A adenosina deaminase (ADA) é responsável pela conversão da adenosina em inosina tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular. (Para revisão ver SALA-

NEWBY; SKLADANOWSKI; NEWBY, 1999; SAWYNOK; LIU, 2003). Ademais, são conhecidos 3 subtipos de ADA, a ADA 1, a ADA 1 + CP e a ADA 2A. As ADA 1 e 2 podem ser encontradas tanto em tecidos quanto no plasma, sendo que a ADA 1 encontra-se predominantemente em linfócitos. A figura 2 mostra resumidamente a rota biossintética do sistema purinérgico.

**Figura 2.** Biossíntese da via purinérgica. Adaptado de Sawynok e Liu, 2003.



ATP, trifosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; A1, A2A, A2B e A3, receptores de adenosina; E-NTPDases, Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases; E-NPP, Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases; AP, Fosfatase alcalina; ADA, adenosina desaminase; PNP, purina nucleosídeo fosforilase; HXT, hipoxantina.

### 1.8. Inosina

Como mencionado anteriormente, a inosina é um metabólito do sistema purinérgico, originado a partir da adenosina, pela ação da ADA, tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Apresenta peso molecular de 268,23 g/mol e sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{12}N_4O_5$ . Após a sua descoberta, acreditava-se que a inosina era apenas um metabólito do sistema purinérgico, incapaz de exercer algum efeito biológico. No entanto, os primeiros trabalhos com a inosina demonstraram a sua participação juntamente com a adenosina e outros fosfatos em diferentes processos metabólicos, como, por exemplo, no metabolismo muscular (KLEINZELLER, 1942), reações com miosina (SPICER; BOWEN,

1951) e na síntese *de novo* (GREENBERG, 1951). Além disso, vários estudos, boa parte realizados na Itália durante os anos 60, pesquisavam os efeitos da inosina principalmente nos sistemas cardiovascular e hepático (CARMINATI, 1963; TINCANI E TRALDI, 1963; CORSINI; GRAZIA; MEI, 1964). Posteriormente, nos anos 70, Juhasz-Nagy e Aviado (1977) e Aviado (1978) demonstraram que a inosina exerce ações cardiotônicas e aumento da vasodilatação coronariana, além de reduzir a contratilidade ventricular, diminuir a resistência vascular coronariana e em altas doses induzir uma leve queda da pressão arterial sanguínea (JUHASZ-NAGY; AVIADO, 1977; AVIADO, 1978).

No início dos anos 2000 alguns trabalhos evidenciaram outros efeitos da inosina além daqueles relacionados com o sistema cardiovascular. Com este propósito, foi demonstrado que administração de inosina no córtex sensoriomotor de ratos é capaz de estimular o crescimento axonal de células piramidais intactas após transecção unilateral do trato corticoespinal. Além disso, outro trabalho demonstrou que a inosina é capaz de promover regeneração de células ganglionares da retina axotomizadas em um modelo animal onde o nervo óptico é seccionado. Ademais, usando um modelo de isquemia cerebral, demonstraram que a inosina foi capaz de estimular neurônios do lado não lesionado do cérebro à emitirem novas projeções para áreas lesionadas do cérebro e da medula espinal, promovendo uma melhora significativa em diversos parâmetros comportamentais avaliados. De maneira semelhante, foi possível observar em outro estudo, que em animais que sofreram oclusão da artéria cerebral média, a administração de inosina foi capaz de aumentar a atividade locomotora e reduzir a área lesionada, além de antagonizar a excitação promovida pelo glutamato em neurônios do córtex cerebral. (BENOWITZ, et al., 1999; WU, et al., 2003; CHEN, et al., 2002; SHEN, et al., 2005). Dessa forma, estes dados sugerem que a inosina possui um importante efeito neuroprotetor, podendo ser utilizada em futuros estudos como uma nova abordagem para tratar lesões no SNC.

Está bem estabelecido que a inosina também apresenta um importante efeito anti-inflamatório, observado em diversos modelos experimentais de inflamação, como, por exemplo, em modelos de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, pancreatite, choque séptico e endotóxico, esclerose múltipla, entre outros. Tem sido evidenciado que o efeito anti-inflamatório apresentado pela inosina deve-se a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (do inglês TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (do inglês IL-1) e interferon gama (do inglês IFN- $\gamma$ ) e redução da ativação de neutrófilos (HASKO, et al.,

2000a; 2000b; MARTON, et al., 2001; GOMEZ; SITKOVSKY, 2003). Acredita-se que esses efeitos promovidos pela inosina são mediados pela ativação de receptores de adenosina.

### 1.9. Receptores de Adenosina e Inosina

Os receptores de adenosina são todos acoplados a proteína G, e são subdivididos em 4 subtipos, A1, A2A, A2B e A3 de acordo com suas características moleculares, farmacológicas e bioquímicas (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; RIBEIRO; SEBASTIÃO; de MENDONÇA, 2002; SAWYNOK; LIU, 2003). No final da década de 70 Van Calker et al. (1978; 1979) evidenciaram que a adenosina poderia diminuir ou aumentar o acúmulo de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) em células do SNC, sugerindo a existência de dois subtipos de receptores de adenosina. Além disso, os mesmos pesquisadores observaram que a adenosina e seus derivados poderiam inibir ou estimular a atividade da ciclase de adenilil em cultura de células de cérebro de camundongos dependendo do subtipo de receptor de adenosina que era ativado (VAN CALKER; MULLER; HAMPRECHT, 1978; 1979). Um ano depois Londos e colaboradores obtiveram resultados semelhantes e denominaram esses receptores de Ri e Ra, porque um receptor era capaz de inibir e outro capaz de ativar a ciclase de adenilil (LONDOS; COOPER; WOLFF, 1980). Mais tarde, Ri e Ra foram denominados A1 e A2, respectivamente. Alguns anos mais tarde, os receptores A2 foram subdivididos em receptores A2A e receptores A2B. Esta divisão foi originalmente proposta devido à descoberta de que a estimulação da ciclase de adenilil mediada pela adenosina em cérebro de ratos era afetada por alta afinidade de ligação em alguns sítios como membranas estriatais, e ligações de baixa afinidade em outros sítios presentes em todo o encéfalo (DALY; BUTTS-LAMB; PADGETT, 1983). No início dos anos 90 foi identificado o quarto receptor para adenosina, que foi nomeado receptor A3. Este receptor quando ativado reduz a produção de AMPC através do acoplamento à proteína  $G_{i/o}$  (ZHOU, et al., 1992).

Os receptores A1 apresentam uma distribuição ampla, sendo que, no SNC estão distribuídos no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, medula espinhal (substância gelatinosa), tronco encefálico, bulbo olfatório e outras regiões. Quando ativados, os receptores A1, acoplados à família das proteínas  $G_{i/o}$  sensíveis à toxina *Pertussis*, podem induzir a redução da entrada de  $Ca^{2+}$  (DOLPHIN; FORDA;

SCOTT 1986; MACDONALD; SKERRITT; WERZ, 1986; CARRUTHERS, et al., 2001) e ativar as vias fosfatidilinositol 3 quinase (do inglês PI3K) e proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês MAPK), mais especificamente as quinases reguladoras de sinais extracelulares 1 e 2 (do inglês ERK1/ERK2) e MEK, causando mudanças na expressão gênica (BOISON; CHEN; FREDHOLM, 2010; SCHULTE; FREDHOLM, 2003). O receptor A2A, acoplado à proteína  $G_s$  (na sua maioria) ou à proteína  $G_{olf}$  (principalmente no estriado), também é encontrado no SNC e periférico, mas sobretudo, no núcleo acumbens, putamen, timo, músculo liso vascular, endotélio, plaquetas e neurônios sensoriais primários (DIXON et al., 1996; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; CARRUTHERS, et al., 2001). O principal evento intracelular após a ativação do receptor A2A é a estimulação da ciclase de adenilil e consequente aumento da produção de AMPc, o qual pode induzir a ativação da proteína quinase A (do inglês PKA), que se torna capaz de ativar proteína quinase C (do inglês PKC), canais de  $Ca^{2+}$ , canais de  $K^+$ , elemento responsivo ligador de AMPc (CREB), MAPK, fosfolipase C (do inglês PLC) entre outros (FREDHOLM; CUNHA; SVENNINGSSON, 2003; BURNSTOCK, 2008; CUNHA, et al., 2008). Os receptores A2B podem ser encontrados principalmente no intestino e bexiga, apresentando-se em baixas densidades no SNC. Estão acoplados as proteínas  $G_s$  e  $G_q$ , e possuem como primeiros alvos a ciclase de adenilil e a PLC, sendo que em humanos a sua ativação pode aumentar o nível de  $Ca^{2+}$  intracelular por intermédio do inositol trifosfato (do inglês IP3) (FEOKTISTOV; BIAGGIONI, 2011; PEAKMAN; HILL, 1994; JACOBSON; GAO, 2006). Por último, o receptor A3 acoplado às proteínas  $G_{i/o}$ , mas também pode ser encontrado acoplado às proteínas  $G_{q/11}$ . A principal sinalização desse receptor é a inibição da adenilil ciclase e ativação da PLC, IP3, dialcil glicerol (do inglês DAG), PKC e fosfolipase D (do inglês PLD).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a inosina é um ligante natural dos receptores de adenosina. Em ensaios *in vitro*, Jin et al. (1997) observaram que a inosina é capaz de se ligar a receptores A3 de adenosina em mastócitos (JIN, et al., 1997). Alguns estudos realizados posteriormente constataram que a inosina foi capaz de ativar receptores A2A e A3 e assim exercer um efeito imunossupressor (HASKO, et al., 2000; GOMEZ; SITKOVSKY, 2003). Resultados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa, usando ensaio de ligação específica, antagonistas seletivos e animais *knockout*, demonstram fortemente que a inosina interage diretamente com receptores A1 de adenosina, e que essa interação é essencial para seu efeito antinociceptivo. Além disso,

ferramentas farmacológicas como moléculas antagonistas, fornecem informações importantes que sugerem que a inosina é capaz de se ligar e ativar receptores de adenosina, desempenhando diferentes efeitos biológicos (NASCIMENTO, et al., 2010; HASKO, et al., 2000a; 2000b; GOMEZ; SITKOVSKY, 2003; HASKO; SITKOVSKY, SZABÓ, 2004). Dessa forma, diversos estudos têm evidenciado que em animais a inosina liga-se diretamente aos receptores A1, A2A e A3, e em humanos apresenta uma grande afinidade por receptores A3 (Para revisão ver HASKO; SITKOVSKY, SZABÓ, 2004).

#### 1.10. Metilmercúrio e Inosina

Uma breve busca na literatura revela a escassez de dados relacionados ao possível efeito protetor da inosina diante dos efeitos desencadeados pela exposição ao MeHg. No entanto, conforme comentado anteriormente, fica claro que a inosina é capaz de exercer efeito protetor em modelos experimentais que promovam alterações comportamentais (especialmente déficit motor) e moleculares/bioquímicas semelhantes àquelas induzidas pelo MeHg, como, por exemplo, àquelas observadas em modelos de dano cerebral traumático (DACHIR et al., 2014), lesão medular (KIM et al., 2013) e isquemia cerebral (SHEN et al., 2005; CHEN et al., 2002). Além disso, têm-se demonstrado que os receptores de adenosina, o mecanismo de ação mais conhecido pelo qual a inosina exerce seus efeitos, compreendem alvos terapêuticos capazes de modular diretamente alguns efeitos semelhantes aos promovidos pelo MeHg. Neste sentido, um estudo interessante revelou que agonistas seletivos do receptor A1 de adenosina previnem a redução da viabilidade de células da camada granular do cerebelo expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (uma das principais espécies reativas de oxigênio produzida pela exposição ao MeHg) ou glutamato (aminoácido excitatório cujos níveis extracelulares encontram-se elevados pela exposição ao MeHg) (FATOKUN; STONE; SMITH, 2007; 2008). Ademais, estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a ativação de receptores de adenosina, especialmente A1 e A2A, inibem a alteração de potencial de membrana induzida pela ativação do receptor do tipo NMDA do glutamato, em outras palavras, a ativação de receptores de adenosina podem inibir as correntes induzidas pela ativação do receptor NMDA (GUNTZ et al., 2008) (lembrando que a excitabilidade glutamatérgica é um dos principais mecanismos moleculares responsáveis pelo efeito do MeHg).

Não obstante, alguns trabalhos têm demonstrado que a inosina é capaz de prevenir a formação de MN tanto em cultura de linfócitos quanto em linfócitos obtidos de animais expostos à radiações X (GUDKOV et al., 2006; 2009). Conforme comentado anteriormente, o MeHg também é capaz de induzir a formação de MN. Dessa forma, além de prevenir o desenvolvimento de sintomas neurológicos, a inosina apresenta potencial para prevenir a genotoxicidade do MeHg.

Diante do exposto, aventamos a hipótese de que a inosina seja capaz de prevenir os efeitos promovidos pela exposição ao MeHg, além disso, especulamos que receptores de adenosina sejam os mediadores do efeito da inosina.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito protetor da inosina diante dos efeitos tóxicos desencadeados pela exposição de camundongos ao cloreto de MeHg.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da inosina frente às alterações motoras induzidas pelo MeHg em diferentes testes comportamentais.

Avaliar o envolvimento de receptores de adenosina no possível efeito protetor da inosina.

Investigar o efeito da inosina frente às alterações bioquímicas cerebelares (atividade de enzimas antioxidantes GPx e GR; níveis de citocinas pro-inflamatórias, anti-inflamatórias e BDNF) induzidas pelo MeHg.

Determinar os níveis de mercúrio no cerebelo de animais exposto ao MeHg e tratados ou não com inosina.

Avaliar o efeito da inosina diante de alterações bioquímicas (atividade das enzimas hepáticas ALT e AST; determinação dos níveis de colesterol total, colesterol-HDL e colesterol não-HDL) no soro de animais expostos ao MeHg.

Avaliar o efeito da inosina frente à genotoxicidade do MeHg em cultura primária de linfócitos humanos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos (25 a 35 g) com idade entre 45 e 60 dias, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no número de 5 a 6 em caixas acrílicas em sistema com circulação de ar sob pressão positiva (microisoladores), com temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C, em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acessas às 06:00h) e com livre acesso à água e ração. Os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos diferentes testes comportamentais. Todos os experimentos foram realizados após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo nº 00745) e conduzidos em acordo com o Guia de Princípios no Uso de Animais em Toxicologia (do inglês *Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology*) adotado pela Sociedade de Toxicologia em julho de 1989 e alterado em dezembro de 2008 (SOCIETY OF TOXICOLOGY, 2008).

#### 3.2. Drogas e Reagentes

Cloreto de metilmercúrio (II), inosina e cafeína foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cloreto de metilmercúrio (II) foi dissolvido em água, enquanto a inosina e a cafeína foram dissolvidas em solução salina isotônica (NaCl 0,9%) imediatamente antes do uso. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando conjuntos de diagnósticos (kits) de imunoabsorção ligada à enzima (do inglês ELISA) obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ), ácido clorídrico (HCl) obtidos Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Kits diagnósticos foram utilizados para determinar a atividade enzimática de AST e ALT (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), e os níveis de colesterol total e HDL (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil). Meio de cultura RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*), soro fetal bovino, fitohemaglutinina, penicilina, estreptomicina e dimetilsulfóxido (DMSO do inglês *dimethylsulfoxide*) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PBS (do inglês *Phosphate Buffer Saline*) obtido da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

### 3.3. Protocolo experimental

O protocolo experimental foi executado como descrito a seguir, fundamentado no trabalho de Dietrich et al. (2005) com mínimas modificações. No dia 0 os animais foram expostos a uma solução de cloreto de MeHg ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) à uma concentração de 40 mg/L na água de beber. Durante 15 dias consecutivos foi permitido aos animais ingerirem a solução de MeHg *ad libitum*. Neste período os animais foram tratados pela via intraperitoneal (i.p.), uma vez ao dia, com inosina (3, 10, 30 ou 100 mg/kg) ou solução salina (0,9% NaCl, 10 ml/kg).

A fim de se avaliar o envolvimento de receptores de adenosina no possível efeito da inosina, foi realizada a coadministração de inosina e cafeína (10 e 3 mg/kg, i.p., respectivamente) durante os 15 dias de exposição ao MeHg.

A ingestão de líquidos foi monitorada a cada três dias, a partir da diferença dos pesos dos bebedouros antes e após o período descrito. No décimo quinto dia foram realizados diferentes testes comportamentais visando avaliar a função locomotora dos animais, sendo utilizados grupos independentes para cada teste, de forma que cada animal foi utilizado em apenas um teste. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanaziados por decapitação e o cerebelo foi coletado para posterior determinação dos níveis de mercúrio e análises bioquímicas (níveis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF*); atividade de enzimas antioxidantes). Os animais pertencentes ao grupo controle ingeriram água *ad libitum* e foram tratados com inosina (3, 10, 30 ou 100 mg / kg), salina (0,9% NaCl) ou coadministrados com inosina e cafeína (10 e 3 mg / kg, respectivamente) pela via i.p. durante os 15 dias do protocolo experimental.

### 3.4. Testes Comportamentais

Vinte e quatro horas após a última administração de inosina, salina ou coadministração de inosina e cafeína os animais foram submetidos a testes comportamentais para se avaliar sua função locomotora e coordenação. Cada teste comportamental foi realizado com grupos diferentes de animais, ou seja, um animal foi utilizado somente em um determinado teste comportamental.

### 3.4.1. Teste da Barra Giratória

O teste da barra giratória foi realizado conforme o estudo de Duhan e Miya (1957) com mínimas modificações. Dessa forma, foi utilizado um aparato constituído por uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em 4 compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. Essa barra gira a uma velocidade de 17 rotações por minuto, sendo cada animal exposto ao aparato e avaliado três vezes com um intervalo de 60 segundos entre cada ensaio. O tempo máximo para cada ensaio foi de 60 segundos, após o qual o animal foi removido se, por ventura, ainda estivesse no aparato. Foi realizado uma medida basal antes da exposição ao MeHg. Os resultados foram expressos através do tempo em que o animal permanece no aparato sem cair, sendo utilizada a média dos três ensaios como variável dependente na análise estatística.

### 3.4.2. Teste do Grau de Retração dos Membros Posteriores (do inglês *Hind Limb Clasp Phenomenon*)

Este teste é caracterizado pela retração e prensão dos membros posteriores do animal junto ao seu abdômen quando suspenso pela cauda, refletindo uma postura discinética (para revisão ver CARTER et al., 1999). Para este teste, os camundongos foram suspensos pela base da cauda e filmados durante um período de 10-15 segundos. O grau de retração dos membros posteriores foi avaliado de 0 a 3 de acordo com a severidade: 0 = patas posteriores totalmente abertas e distantes do abdômen; 1 = um membro posterior retraído em direção ao abdômen durante pelo menos 50% do período de observação; 2 = ambos os membros posteriores parcialmente retraídos em direção ao abdômen durante pelo menos 50% do período de observação; 3 = ambos os membros posteriores completamente retraídos em direção ao abdômen durante pelo menos 50% do período de observação. Foram utilizadas contagens de 0,5 quando apropriado.

### 3.4.3. Teste da Caminhada na Viga (do inglês *Beam Walking Test*)

O teste da caminhada na viga foi realizado conforme no trabalho de Dietrich et al. (2005), com mínimas modificações. Neste teste foi avaliado a habilidade do animal para percorrer uma viga de madeira até alcançar uma gaiola de segurança (20 cm × 20 cm × 20 cm). A viga de madeira usada no teste apresentava 1 metro de comprimento e uma superfície arredondada de 20 milímetros de diâmetro e estava a 50 centímetros do chão. Uma lâmpada incandescente de 60 Watt foi posicionada na extremidade inicial da viga, com a finalidade de induzir

os animais a iniciar a travessia da mesma. Antes de começar a exposição ao MeHg e os tratamentos, os animais foram treinados em três dias consecutivos, uma vez ao dia, sendo considerado um tempo máximo de 20 segundos para percorrer a barra. Os animais que não percorreram a viga em no máximo 20 segundos até o terceiro dia de treino foram excluídos do experimento. No dia do teste foi avaliado o tempo que cada animal despendeu para percorrer toda a extensão da viga até a caixa de segurança.

#### 3.4.4. Teste do Poste (do inglês *Pole Test*)

O teste do poste foi originalmente desenvolvido para quantificar a bradicinesia em modelos animais da Doença de Parkinson (OGAWA et al., 1985). Neste teste o animal é colocado logo abaixo do topo de um poste de madeira vertical (50 centímetros de altura e 1 centímetro de diâmetro) com a cabeça voltada para o topo do poste. Foi avaliado o tempo de latência para o animal se virar completamente (cabeça em direção ao chão) após ser colocado no poste e o tempo para descer o poste até o chão após ter se virado completamente. Antes de iniciar a exposição ao MeHg e os tratamentos, os animais foram treinados em três dias consecutivos, uma vez ao dia, sendo considerado um tempo máximo de 120 segundos tanto para o animal se virar completamente com a cabeça em direção ao chão quanto para descer o poste até o chão após se virar. Os animais que não realizaram estas tarefas dentro do tempo determinado (120 segundos) até o terceiro dia de treino foram excluídos do experimento. No dia do teste, foi avaliado o tempo que cada animal despendeu tanto para se virar completamente com a cabeça em direção ao chão quanto para descer o poste até o chão após se virar.

#### 3.5. Análises Bioquímicas em Cerebelo

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação, o cerebelo foi coletado, pesado e armazenado em freezer à -70 °C para posterior determinação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias [TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interleucina 6 (IL-6)], anti-inflamatória [interleucina 1Ra (IL-1Ra)] e BDNF. Além disso, foi determinado a atividade de enzimas antioxidantes GPx e GR.

##### 3.5.1. Determinação dos Níveis de Citocinas e BDNF

Inicialmente o cerebelo foi homogeneizado com uma solução de tampão fosfato contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto fenilmetilsulfonil (do inglês PMSF) 0,1mM, ácido etilenodiaminotetracético (do inglês

EDTA) 10 mM, aprotinina 2 ng / ml e cloreto de benzametônio 0,1mM. Os homogenatos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga do tipo *eppendorf* de 1,5 ml e centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi armazenado à -70 °C para posterior análise. Para determinação dos níveis de citocinas e BDNF foram utilizados kits comerciais disponíveis, com metodologia baseada em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1Ra e BDNF, foram mensurados de acordo com as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados através da interpolação de uma curva padrão através de ensaio colorimétrico, medido a 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placa de ELISA (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, Alemanha). Todos os resultados foram expressos em pg de citocina/mg de proteínas. Os níveis de proteínas totais foram determinados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

### 3.5.2. Determinação da Atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada indiretamente, através do monitoramento do consumo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogênio (do inglês NADPH), espectrofotometricamente, a 340 nm, baseando-se no método de Wendel (1981). A GPx usa a GSH para reduzir o tert-butilhidroperóxido produzindo glutationa dissulfeto (do inglês GSSG). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg do conteúdo total de proteínas.

### 3.5.3. Determinação da Atividade da GR

A atividade da GR foi determinada baseando-se em Carlberg e Mannervik (1985). A GR reduz GSSG à GSH à custa de NADPH como agente redutor, dessa forma, pode-se acompanhar o desaparecimento do NADPH, espectrofotometricamente, a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg do conteúdo total de proteínas.

## 3.6. Determinação do Conteúdo de Mercúrio no Cerebelo

Após os testes comportamentais os animais foram sacrificados por decapitação, o cerebelo foi coletado, pesado e homogeneizado com solução salina estéril (NaCl 0,9%) na proporção de 1:10. Em seguida foi realizado o processo de digestão das amostras. Para isso, uma alíquota de 150  $\mu$ L das amostras homogeneizadas foi adicionada a uma mistura de 435  $\mu$ L de ácidos previamente preparada em frasco âmbar (300  $\mu$ L de

ácido nítrico 65% ultra-puro; 75 uL de ácido sulfúrico supra puro; 30 uL de ácido perclórico P.A.; 30 uL de peróxido de hidrogênio 30 – 32% supra-puro). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente durante 24 – 48 h. A determinação dos níveis de mercúrio no cerebelo foi realizada por espectrometria de absorção atômica (Espectrômetro de Absorção Atômica SpectrAA 200 Varian com gerador de hidretos VGA - 77), utilizando a técnica de vapor frio e cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$  25% dissolvido em ácido clorídrico HCl 20%) como agente redutor. A concentração de mercúrio presente nas amostras foi estimada a partir da interpolação de suas absorbâncias à absorbância de uma curva padrão de mercúrio (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5  $\mu\text{g/L}$ ), obtidas a 253,7 nm, por meio de lâmpada de cátodo oco específica para mercúrio.

### 3.7. Análises Bioquímicas em Soro

Após os testes comportamentais os animais foram previamente anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado utilizando a técnica da punção infra-orbital com capilares heparinizados. Após a coleta o sangue foi centrifugado durante 5 minutos a uma velocidade de  $3900 \times g$  a  $25^\circ\text{C}$  para obtenção do soro. Após a centrifugação o soro foi separado e armazenado em geladeira à temperatura de  $2 - 8^\circ\text{C}$  para posterior determinação da atividade das enzimas hepáticas ALT e AST. Além disso, foram determinados os níveis de colesterol total, colesterol-HDL e colesterol não-HDL.

#### 3.7.1. Determinação da Atividade das Enzimas Hepáticas ALT e AST

Para determinar a atividade enzimática de AST e ALT foram utilizados kits comerciais (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil) e analisador automatizado BS120 Mindray (*Mindray Medical International Limited*, Shenzhen, China), seguindo-se as instruções do fabricante. O princípio da metodologia empregada nesses kits, leva em consideração que as enzimas AST e ALT catalisam a transferência reversível dos grupos amino do aspartato (AST) e da alanina (ALT) para o  $\alpha$ -cetoglutarato, formando oxaloacetato (AST) ou piruvato (ALT) e ácido glutâmico. O oxaloacetato na presença de malato desidrogenase, e o piruvato na presença de lactato desidrogenase, reagem com o NADH reduzindo-se a malato e lactato, respectivamente, enquanto o NADH oxida-se a  $\text{NAD}^+$ . A velocidade de oxidação ou consumo do NADH pode ser monitorada obtendo-se as absorbâncias no comprimento de onda de 340 nm, utilizando-se a metodologia de cinética enzimática. Assim, a velocidade de oxidação ou consumo do NADH é proporcional

a atividade das enzimas AST e ALT. Os resultados são expressos em U/L (INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY, 1999).

### 3.7.2. Determinação dos Níveis de Colesterol Total

Para determinação dos níveis de colesterol total, foi utilizado kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisador automatizado BS120 Mindray (*Mindray Medical International Limited*, Shenzhen, China), seguindo-se as instruções do fabricante e o princípio descrito a seguir, baseado em Allain et al. (1974). Os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase produzindo o colesterol livre. A enzima colesterol oxidase, em presença de oxigênio, catalisa a oxidação do colesterol livre, produzindo o peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (fenol) pelo peróxido de hidrogênio formado, em presença de 4 aminoantipirina, produzindo um composto rosa (quinonimina) com máximo de absorção em 505 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os resultados são expressos em mg/dL.

### 3.7.3. Determinação dos Níveis de Colesterol HDL e não-HDL

Para determinação dos níveis de colesterol total, foi utilizado kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisador automatizado BS120 Mindray (*Mindray Medical International Limited*, Shenzhen, China), seguindo-se as instruções do fabricante e o princípio descrito a seguir. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 r.p.m. com fosfotungstato (16 mmol/L) e cloreto de magnésio (3,5 mmol/L). Esses agentes promovem a precipitação de quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade. Após a centrifugação o sobrenadante contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol pode ser quantificado baseando-se no princípio descrito acima para determinação dos níveis de colesterol total (ALLAIN et al., 1974). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Os níveis séricos de colesterol não-HDL foram determinados subtraindo o valor obtido de HDL do valor de colesterol total. Os resultados foram expressos em mg/dL.

### 3.8. Ensaio do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado em cultura de linfócitos obtidos do sangue total de humanos, baseado na técnica descrita por Fenech (2000) com algumas modificações. Para a cultura de linfócitos 0,5 mL do sangue total de humanos saudáveis foi adicionado à 3,9 mL de meio de cultura RPMI, 1 mL de soro fetal bovino, 0,1 mL de fitohemaglutinina (1 mg/mL), 60 µL de penicilina (5 mg/mL) e 25 µL de estreptomicina (1 mg/mL). A cultura foi colocada em estufa a 37 °C. Vinte horas após, foi adicionado à cultura 25 µL de DMSO 0,25%, 25 µL de cloreto de MeHg 10 µM (diluído com DMSO 0,25%), 25 µL de inosina 5 µM ou 25 µL de cloreto de MeHg 10 µM + 25 µL de inosina 5 µM. A cultura foi colocada novamente em estufa a 37 °C. Vinte e quatro horas depois foi realizado a retirada do DMSO, do MeHg e da inosina. Para isso as culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 r.p.m, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 3 mL de PBS. A centrifugação e adição de PBS repetiram-se por mais duas vezes. Ao final da última lavagem o sobrenadante foi descartado restando apenas um sedimento no fundo do tubo. Ao sedimento foi adicionado 3,9 mL de meio de cultura RPMI, 1 mL de sangue fetal bovino, 0,1 mL de fitohemaglutinina (1 mg/mL), 60 µL de penicilina (5 mg/mL), 25 µL de estreptomicina (1 mg/mL) e 30 µL de citocalasina B (1mg/mL). A cultura foi colocada novamente em estufa a 37 °C por mais 28 h. Após 28 h as culturas foram centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão com 3 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, 3 mL de solução fixadora (contendo 75% de metanol e 25% de ácido acético) e 150 µL de formaldeído 37%. As culturas foram novamente centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão com 5 mL de solução fixadora. Esse procedimento foi realizado por mais 1 vez. Após a última centrifugação o sobrenadante foi retirado restando cerca de 0,5 mL de solução fixadora, a qual foi utilizada para ressuspender o sedimento. O volume de 150 µL da suspensão celular foi distribuído em lâminas previamente limpas, utilizando pipeta de Pasteur, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e em seguida foram coradas com solução de Giemsa diluída em água na proporção 1:15. Por fim as lâminas foram novamente secas a temperatura ambiente, seladas com meio de montagem rápida e sem água (Entellan<sup>®</sup>, Merck).

A análise foi realizada em microscópio óptico (Marca Carl Zeiss Microlmaging GmbH, modelo Primo Star). As lâminas

preparadas foram inicialmente avaliadas na objetiva de 20X visando uma rápida varredura para averiguar as condições das células. Na sequência, as lâminas viáveis foram analisadas na objetiva de 40X, sendo determinado o número de células binucleadas micronucleadas em 1000 células binucleadas. Durante a leitura, ao localizar as células com micronúcleos, realizou-se a troca da objetiva de 40X pela objetiva de imersão (100X), para avaliação das alterações encontradas. As leituras foram realizadas em teste cego, uma vez que as lâminas foram codificadas. Cada lâmina foi analisada no mínimo por dois analistas. Os seguintes critérios foram seguidos para qualificar uma célula binucleada micronucleada (FENECH et al., 2003):

- Célula com aparência oval ou arredondada, com citoplasma intacto, núcleos similares (redondos ou ovais) e nitidamente delimitados;
- Considerou-se micronúcleo, fragmentos com tamanho entre 1/16 e 1/3 do tamanho dos núcleos principais, coloração semelhante aos núcleos principais, sem emissão de refringência e sem sobreposição a qualquer um dos núcleos principais.

### 3.9. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da media (E.P.M.). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Foi utilizando o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03.

## 4. Resultados

### 4.1. Consumo de Líquidos

De acordo com a tabela 1 pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao consumo de líquidos entre os grupos avaliados em nenhum dos pontos avaliados.

**Tabela 1.** Consumo de líquidos (ml/animal). Os dados foram avaliados pela análise de variância de duas vias (do inglês *two-away* ANOVA) de medidas repetidas. n=6

Grupo	Dias de Exposição					Total
	1 a 3	4 a 6	7 a 9	10 a 12	13 a 15	
Controle	15,00	21,30	21,50	22,30	20,75	100,85
Inosina	17,00	23,00	20,5	23,5	15,00	99,00
MeHg	13,50	18,20	21,16	22,20	18,66	93,72
MeHg + Inosina	18,30	20,50	22,16	22,70	16,50	100,16

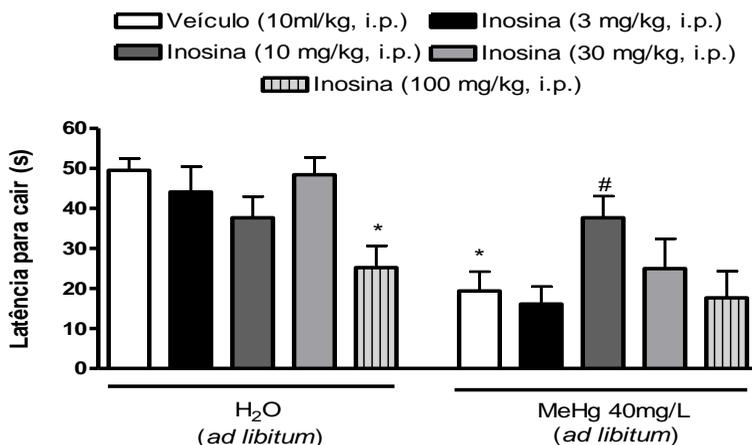
A partir do consumo médio de líquidos e do peso médio de cada animal durante os 15 dias de exposição ao MeHg, podemos calcular a dose diária média de MeHg para os grupos expostos e tratados com veículo (6,71 mg/kg de peso corporal) e inosina (7,01 mg/kg de peso corporal).

### 4.2. Teste da Barra Giratória

De acordo com a figura 3 os animais que ingeriram solução de cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos *ad libitum* (grupo exposto) e foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) apresentaram uma redução significativa ( $61 \pm 10\%$ ) no tempo de latência para cair da barra (média =  $19,39 \pm 4,84$  s) quando comparados aos animais que ingeriram apenas água *ad libitum* (grupo não exposto) tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $49,54 \pm 2,91$  s). O tratamento com inosina apenas na dose de 10 mg/kg, i.p., uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, foi capaz de prevenir, de forma significativa ( $94 \pm 28\%$ ; média =  $37,67 \pm 5,40$  s), a redução no tempo

latência para cair da barra induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L. Ainda na figura 3 pode-se observar que o tratamento com inosina na dose de 100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos em animais pertencentes ao grupo não exposto reduziu o tempo de latência para cair da barra quando comparado aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo 10 ml/kg, i.p.

**Figura 3.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste da barra giratória) de animais expostos ao cloreto de MeHg.

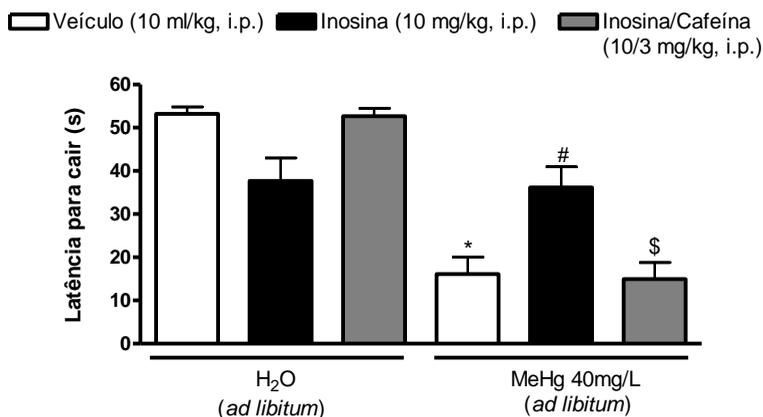


Desempenho motor de animais tratados com inosina (3 – 100 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). O desempenho motor está representado como a latência para cair da barra giratória (segundos). Os dados estão expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) e foram avaliados pela análise de variância de duas vias (do inglês *two-way* ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). n = 6 – 12 animais por grupo.

De acordo com o que está representado na figura 4, a co-administração de cafeína (3 mg/kg, i.p.) com inosina (10 mg/kg, i.p.)

uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, em animais pertencentes ao grupo exposto, aboliu completamente (média =  $14,98 \pm 3,80$  s) a prevenção promovida pela inosina (média =  $39,06 \pm 6,10$  s) na redução do tempo de latência para cair da barra induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L (média =  $16,14 \pm 3,93$  s).

**Figura 4.** Influência da cafeína no efeito da inosina em relação ao desempenho motor (teste da barra giratória) de animais expostos ao cloreto de MeHg.



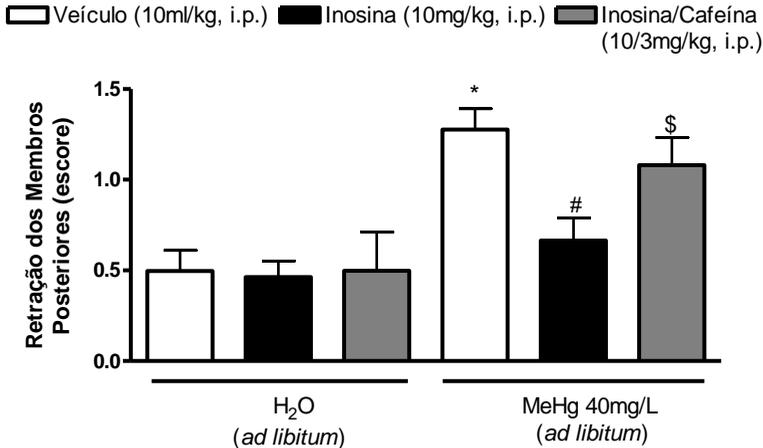
Os animais foram coadministrados com inosina e cafeína (10/3 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, a fim de se avaliar a influência da cafeína sobre o efeito da inosina em relação ao desempenho motor de animais expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). O desempenho motor está representado como a latência para cair da barra giratória (segundos). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). \$ representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com inosina (10 mg/kg, i.p.). n = 6-12 animais por grupo.

#### 4.3. Teste do Grau de Retração dos Membros Posteriores

Os dados representados na figura 5 mostram que os animais pertencentes ao grupo exposto, tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram uma elevação significativa ( $157 \pm 23\%$ ) no escore representativo do grau de retração dos membros posteriores (média =  $1,277 \pm 0,115$ ) quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo 10 ml/kg, i.p. (média =  $0,497 \pm 0,114$ ). Pode-se observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, foi capaz de promover uma redução significativa ( $52 \pm 10\%$ ), no escore representativo do grau de retração dos membros posteriores (média =  $0,6696 \pm 0,125$ ) quando comparado ao grupo exposto tratado com veículo 10 ml/kg, i.p. (média =  $1,277 \pm 0,115$ ).

De acordo com a figura 5, a coadministração de cafeína (3 mg/kg, i.p.) com inosina (10 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, em animais pertencentes ao grupo exposto, reverteu significativamente ( $63 \pm 23\%$ ) a prevenção promovida pela inosina na elevação do escore representativo do grau de retração dos membros posteriores induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L (média =  $1,081 \pm 0,152$ ).

**Figura 5.** Efeito da inosina e influência da cafeína no efeito da inosina em relação ao teste de retração dos membros posteriores em animais expostos ao cloreto de MeHg



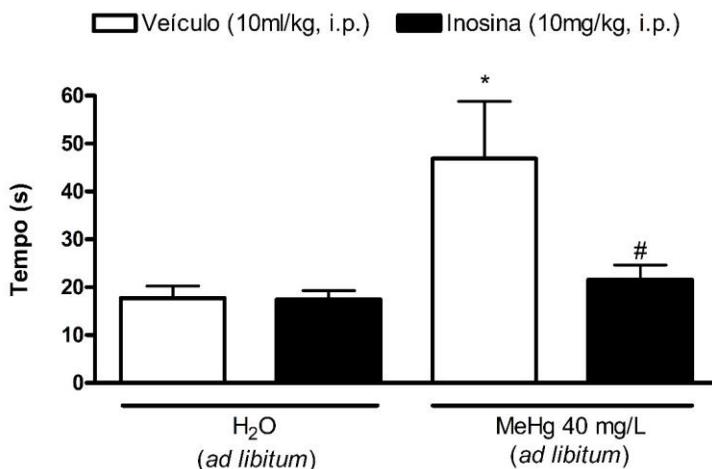
Escore representativo da retração dos membros posteriores junto ao abdômen de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.) ou coadministrados com inosina e cafeína (10/3 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). A retração dos membros posteriores junto ao abdômen está representada pelo escore. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). \$ representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com inosina (10 mg/kg, i.p.). n = 6-12 animais por grupo.

#### 4.4. Teste da Caminhada na Viga

Conforme os dados representados na figura 6, os animais pertencentes ao grupo exposto, tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram um aumento significativo ( $167 \pm 67\%$ ) no tempo despendido para percorrer toda a extensão da viga até a caixa de

segurança (média =  $46,88 \pm 11,93$  s), quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo 10 ml/kg, i.p. (média =  $17,71 \pm 2,53$  s). O tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, foi capaz de promover uma redução significativa ( $87 \pm 10\%$ ) no tempo despendido para percorrer toda a extensão da viga até a caixa de segurança (média =  $21,57 \pm 3,06$  s) quando comparado ao grupo exposto tratado com veículo 10 ml/kg, i.p. (média =  $46,88 \pm 11,93$  s).

**Figura 6.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste da caminhada na viga) de animais expostos ao cloreto de MeHg.

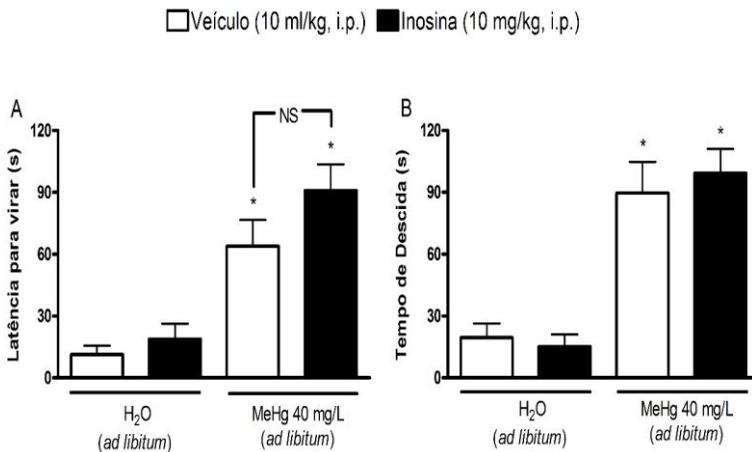


Desempenho motor de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). O desempenho motor está representado como o tempo despendido pelo animal para percorrer toda a extensão da viga até a caixa de segurança (segundos). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).  $n = 7 - 8$  animais por grupo.

#### 4.5. Teste do Poste

De acordo com as figuras 7A e 7B, pode-se observar que os animais pertencentes ao grupo exposto, tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram um aumento significativo ( $465 \pm 113\%$ ; média =  $63,88 \pm 12,82$  s) no tempo de latência para se virar completamente com a cabeça em direção ao chão, após serem colocados no poste (figura 7A), bem como, no tempo despendido para descer o poste até o chão após terem se virado completamente ( $362 \pm 78\%$ ; média =  $89,67 \pm 15,20$  s) (figura 7B), quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $11,30 \pm 4,32$  s e  $19,4 \pm 7$  s, respectivamente). Ainda de acordo com as figuras. 7A e 7B, o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos, não foi capaz de prevenir a alteração comportamental induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L, em nenhum dos parâmetros avaliados (média =  $90,82 \pm 12,83$  s e  $99,25 \pm 11,77$  s, respectivamente).

**Figura 7.** Efeito da inosina no desempenho motor (teste do poste) de animais expostos ao cloreto de MeHg.



Desempenho motor de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). O desempenho motor está representado como a latência para o animal se virar completamente com a cabeça em direção ao chão, após ser colocados no poste (A) e o tempo despendido para descer o poste até o chão após ter se virado

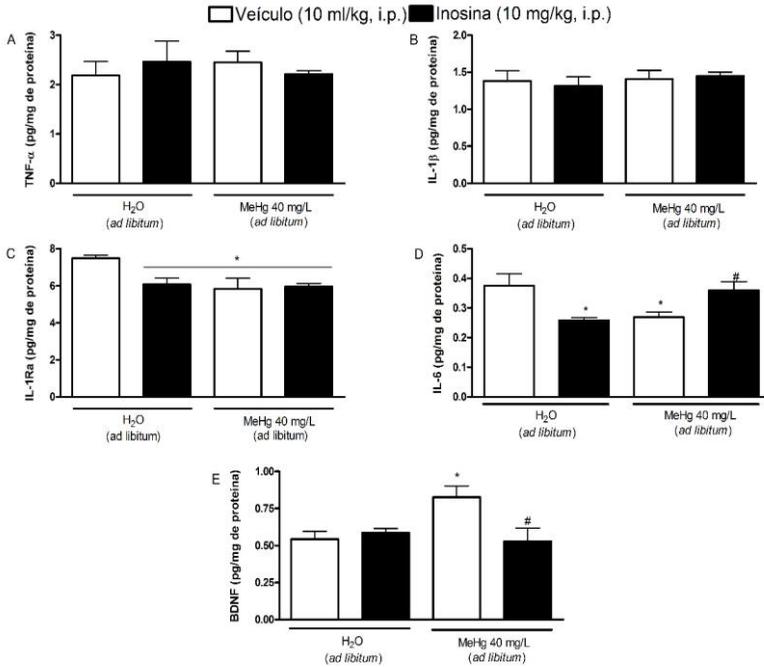
completamente (B). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). NS indica diferença não significativa entre os grupos. n = 9 – 12 animais por grupo.

#### 4.6. Determinação dos Níveis de Citocinas e BDNF

Os dados representados nas figuras 8A-E correspondem à determinação dos níveis de citocinas pro-inflamatórias, anti-inflamatória e BDNF no cerebelo. De acordo com as figuras. 8A-B a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L não foi capaz de promover quaisquer alterações nos níveis cerebelares de TNF- $\alpha$  (figura 8A) (média = 2,45  $\pm$  0,23) ou IL-1 $\beta$  (figura 8B) (média = 1,41  $\pm$  0,12), quando comparado ao grupo não exposto (média = 2,18  $\pm$  0,29 e 1,38  $\pm$  0,14, respectivamente). Por outro lado, a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos promoveu uma redução significativa nos níveis cerebelares de IL-1Ra (figura 8C) (22  $\pm$  8%; média = 5,83  $\pm$  0,57) e IL-6 (figura 8D) (28  $\pm$  5%; média = 0,27  $\pm$  0,02) quando comparado ao grupo não exposto (média = 7,45  $\pm$  1,67 e 0,37  $\pm$  0,04, respectivamente). O tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, foi capaz de prevenir significativamente (aproximadamente 100%) a redução dos níveis de IL-6 (figura 8D) (média = 0,36  $\pm$  0,03) induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L, sem afetar a redução dos níveis de IL-1Ra (fig. 8C) (média = 5,95  $\pm$  0,17). Ainda segundo as figuras 8C-D, o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos em animais pertencentes ao grupo não exposto, reduziu significativamente os níveis cerebelares de IL-1Ra (figura 8C) e IL-6 (figura 8D) quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).

Conforme demonstrado na figura 8E, a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos, promoveu uma elevação significativa (52  $\pm$  14%) nos níveis cerebelares de BDNF (média = 0,826  $\pm$  0,076), quando comparado ao grupo não exposto (média = 0,543  $\pm$  0,052). Já o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, foi capaz de prevenir significativamente (aproximadamente 100%; média = 0,53  $\pm$  0,09) a elevação dos níveis de BDNF induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L.

**Figura 8.** Efeito da inosina nos níveis de citocinas e BDNF no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg.



Níveis das citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-1- $\beta$  (B), IL-1Ra (C) e IL-6 (D) e de BDNF (E) no cerebelo de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). Os resultados estão expressos como pg de citocina/mg de proteína. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). n = 6 – 8 animais por grupo.

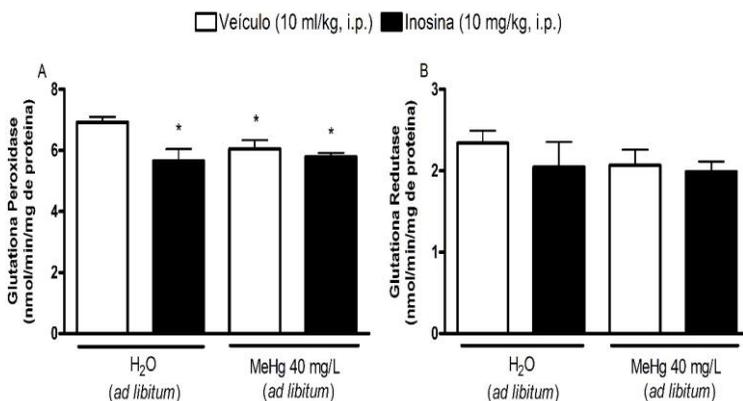
#### 4.7. Determinação das Atividades da GPx e GR

Nas figuras 9A-B estão representados os dados referentes às atividades das enzimas GPx e GR no cerebelo. De acordo com a figura 9A a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias

consecutivos promoveu uma redução significativa na atividade da enzima GPx ( $13 \pm 4\%$ ; média =  $6,05 \pm 0,28$ ), quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $6,93 \pm 0,17$ ). O tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, não foi capaz de prevenir a redução na atividade da GPx (média =  $5,79 \pm 0,13$ ) induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L. Ainda conforme a figura 9A, o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos em animais pertencentes ao grupo não exposto, reduziu significativamente ( $16 \pm 2\%$ ; média =  $5,65 \pm 0,39$ ) a atividade da GPx quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).

De acordo com a figura 9B a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos não foi capaz de promover quaisquer alterações na atividade enzimática da GR (média =  $2,067 \pm 0,19$ ) quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $2,34 \pm 0,15$ ). O tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos também não promoveu quaisquer alterações na atividade da GR (média =  $1,98 \pm 0,13$ ) quando comparado tanto ao grupo exposto quanto ao grupo não exposto tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.).

**Figura 9.** Efeito da inosina na atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg.



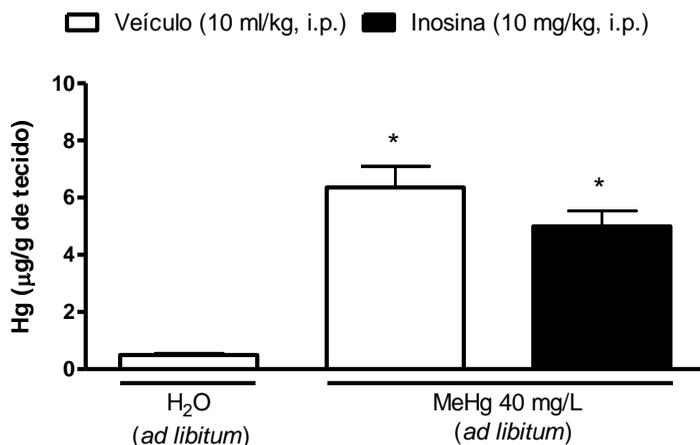
Atividade das enzimas GPx e GR no cerebelo de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). Os

resultados estão expressos como nmol/min/mg de proteína. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).  $n = 6 - 8$  animais por grupo.

#### 4.8. Determinação do Conteúdo de Mercúrio no Cerebelo

Segundo a figura 10, pode-se verificar que os animais expostos ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos e tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram uma concentração significativamente maior de mercúrio no cerebelo (média =  $6,35 \pm 0,73$ ) quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $0,494 \pm 0,063$ ). Ainda de acordo com a figura 10, pode-se observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, não foi capaz de prevenir (média =  $4,99 \pm 0,54$ ) a elevação nos níveis cerebelares de mercúrio induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L.

**Figura 10.** Efeito da inosina na concentração de mercúrio no cerebelo de animais expostos ao cloreto de MeHg.



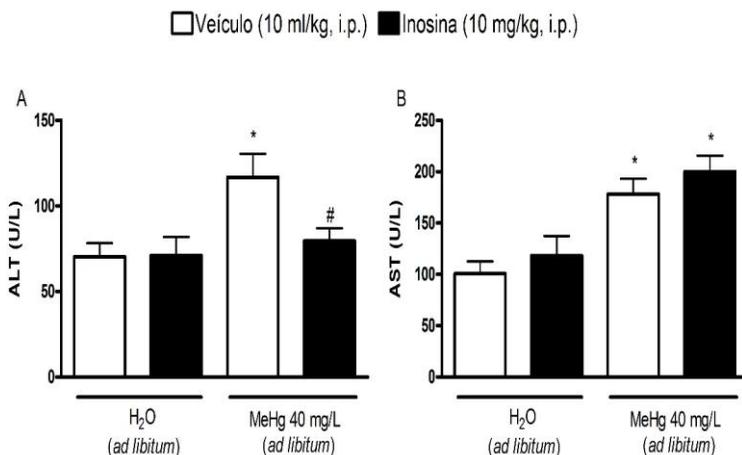
Concentração de mercúrio no cerebelo de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). Os resultados estão expressos como µg de Hg/g de tecido. Os dados estão expressos

como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).  $n = 5 - 6$  animais por grupo.

#### 4.9. Determinação da Atividade das Enzimas Hepáticas ALT e AST

De acordo com as figuras 11A e 11B, os animais expostos ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos e tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram uma elevação significativa na atividade sérica das enzimas hepáticas ALT (figura 11A) ( $66 \pm 20\%$ ; média =  $116,6 \pm 13,83$ ) e AST (figura 11B) ( $77 \pm 15\%$ ; média =  $178,3 \pm 14,79$ ), quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $70,16 \pm 8,16$  e  $100,8 \pm 11,80$ , respectivamente). Pode-se observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, foi capaz de prevenir apenas a elevação na atividade sérica da enzima hepática ALT (figura 11A) ( $82 \pm 16\%$ ; média =  $79,61 \pm 7,32$ ), induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L, sem interferir na elevação da atividade sérica da enzima hepática AST (figura 11B) (média =  $200,1 \pm 15,45$ ).

**Figura 11.** Efeito da inosina na atividade das enzimas hepáticas de animais expostos ao cloreto de MeHg.



Atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (A) e aspartato aminotransferase (B) de animais tratados com inosina (10

mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).  $n = 6 - 12$  animais por grupo.

#### 4.10. Determinação dos Níveis de Colesterol Total, HDL e Colesterol Não-HDL

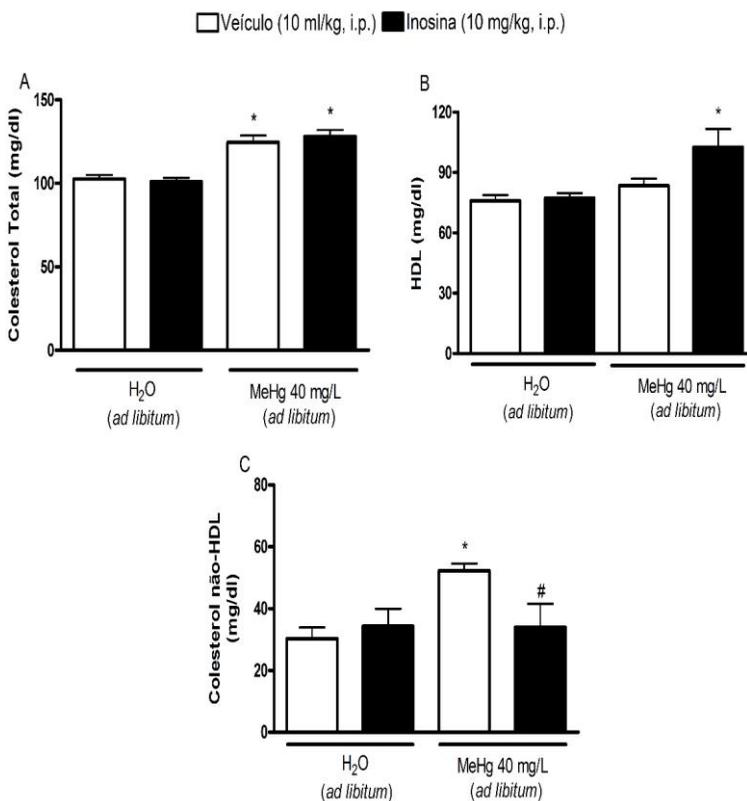
As figuras 12A-C representam os dados correspondentes aos níveis de colesterol total, HDL e colesterol não-HDL. De acordo com a figura 12A, os animais expostos ao cloreto de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos e tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.), apresentaram elevação significativa (21,42%; média =  $124,7 \pm 3,93$ ) nos níveis sanguíneos de colesterol total, quando comparados aos animais pertencentes ao grupo não exposto tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $102,7 \pm 2,41$ ). O tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, não foi capaz de prevenir (média =  $128,0 \pm 4,06$ ) a elevação nos níveis sanguíneos de colesterol total induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L (figura 12A).

Segundo os dados mostrados na figura 12B a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L não foi capaz de promover alterações significativas nos níveis sanguíneos de HDL (média =  $83,53 \pm 3,39$ ), quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $75,99 \pm 2,88$ ). Diferentemente, o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos, em animais pertencentes ao grupo exposto, promoveu elevação significativa nos níveis sanguíneos de HDL ( $35 \pm 12\%$  e  $23 \pm 11\%$ ; média =  $102,7 \pm 9,01$ ), quando comparado tanto ao grupo não exposto (média =  $75,99 \pm 2,88$ ) quanto ao grupo exposto (média =  $83,53 \pm 3,39$ ) tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.).

Por fim, conforme mostrado na figura 12C, a exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L, promoveu uma elevação significativa ( $73 \pm 8\%$ ; média =  $52,29 \pm 2,29$ ) nos níveis sanguíneos de colesterol não-HDL, quando comparado ao grupo não exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.) (média =  $30,23 \pm 3,65$ ). Ainda em relação à figura 12C, pode-se

observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) durante 15 dias consecutivos foi capaz de prevenir ( $83 \pm 35\%$ ; média =  $33,89 \pm 7,68$ ) a elevação nos níveis sanguíneos de colesterol não-HDL induzida pela exposição ao cloreto de MeHg 40 mg/L.

**Figura 12.** Efeito da inosina nos níveis de lipídeos de animais expostos ao cloreto de MeHg



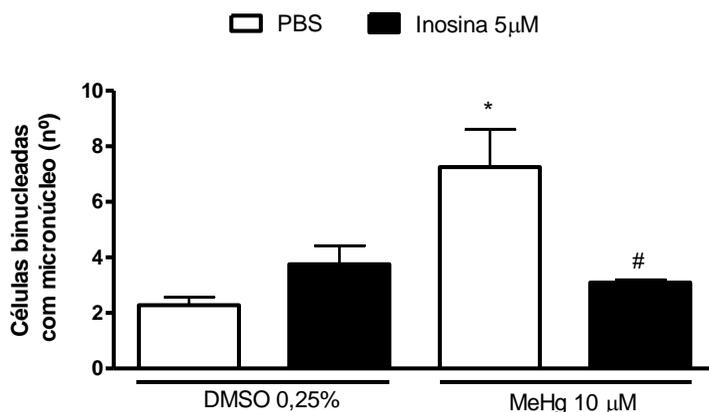
Níveis de colesterol total (A), HDL (B) e colesterol não-HDL (C) de animais tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos, expostos ou não a uma solução de cloreto de MeHg (40 mg/L). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu água *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.). # representa diferença

estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo que ingeriu cloreto de MeHg (40 mg/L) *ad libitum* tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.).  $n = 9 - 12$  animais por grupo.

#### 4.11. Ensaio do Micronúcleo

Conforme representado na figura 13, a exposição ao cloreto de MeHg (10  $\mu$ M) induziu significativamente a formação de MN na cultura de linfócitos, quando comparado ao grupo não exposto (média =  $7,25 \pm 1,35$  vs  $2,27 \pm 0,28$ ). Por outro lado, a inosina (5  $\mu$ M) foi capaz de prevenir significativamente a formação de MN induzida pelo cloreto de MeHg (média =  $3,10 \pm 0,1$  vs  $7,25 \pm 1,35$ ).

**Figura 13.** Efeito da inosina diante da formação de MN em cultura de linfócitos humanos exposta ao cloreto de MeHg



Número de células binucleadas com MN em cultura de linfócitos expostos ou não ao cloreto de MeHg 10  $\mu$ M e tratados com inosina 5  $\mu$ M. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M e foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. \* representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo não exposto ao cloreto de MeHg. # representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo exposto ao cloreto de MeHg (10  $\mu$ M).  $n = 6 - 8$ .

## 5. Discussão

Desde os episódios ocorridos no Japão nos anos 50 e no Iraque no início dos anos 70 esforços significativos têm sido feitos na tentativa de esclarecer os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dos sintomas decorrentes da exposição ao MeHg. Neste sentido, estudos epidemiológicos e experimentais fornecem informações importantes a respeito das alterações comportamentais observadas em animais expostos ao MeHg, as quais corroboram os achados em humanos. No início dos anos 50 um estudo epidemiológico realizado no distrito de Minamata demonstrou que gatos alimentados com uma dieta rica em peixes apresentavam uma condição chamada de “doença da dança” (do inglês *dancing disease*), caracterizada principalmente por distúrbios do movimento, convulsões e morte. Da mesma forma, outro estudo epidemiológico realizado no Canadá demonstrou que gatos alimentados com peixes desenvolveram sintomas neurológicos como, por exemplo, marcha atáxica, movimentos involuntários, uivos descontrolados e convulsões. Sintomas semelhantes a esses também foram observados em estudos experimentais usando gatos, cachorros, macacos, peixes, ratos e camundongos. Em comum, tais estudos experimentais demonstraram que distúrbios do movimento, especialmente ataxia e perda da coordenação e do equilíbrio, compreendem as principais alterações comportamentais em animais expostos ao MeHg (KITAMURA et al., 1957; TAKEUCHI et al., 1977; CHARBONNEAU et al., 1976; MATTSSON et al., 1981; INOUYE; MURAO; KAJIWARA, 1985; DIETRICH et al., 2005).

Considerando os achados obtidos a partir de estudos epidemiológicos e experimentais aliado ao fato da exposição oral representar a principal forma de contato humano com o MeHg e sua excelente absorção no trato gastrointestinal, Dietrich et al. (2005) elaboraram um protocolo experimental no qual camundongos Swiss são expostos ao MeHg a fim de ampliar os conhecimentos acerca dos distúrbios de movimento promovidos pelo metal pesado. Neste protocolo experimental, é disponibilizado aos animais uma solução de cloreto de MeHg (II) 40 mg/L, sendo que os camundongos ingerem *ad libitum* durante um período de 15 ou 21 dias. Salienta-se que a utilização deste protocolo teve boa aceitação pela comunidade científica, uma vez que permitiu observar que a exposição ao MeHg induziu uma considerável deficiência no desempenho locomotor dos animais. Tais alterações foram observadas nos testes do campo aberto, da caminhada na viga, do grau de retração dos membros posteriores, da pegada e no

teste da barra giratória, corroborando dados de estudos prévios e subsequentes que mostram que os distúrbios de movimento compreendem os marcadores comportamentais da intoxicação por MeHg tanto em animais quanto em humanos (DIETRICH et al., 2005; FARINA et al., 2005; EKINO et al., 2007; MURATA et al., 2007).

Sendo assim, o presente estudo utilizou o protocolo experimental descrito por Dietrich et al. (2005), utilizando um período de exposição ao MeHg de 15 dias consecutivos. O estudo usado como referência demonstrou que a exposição à solução de 40 mg/L de MeHg por um período de 15 dias promove as mesmas alterações motoras e na mesma intensidade que a exposição durante 21 dias. No entanto, ao final dos 15 dias de exposição a taxa de mortalidade dos animais é significativamente maior quando comparada a exposição por 21 dias (85% vs 0%). Além disso, estima-se que com esse protocolo seja alcançado uma dose diária de MeHg de 7 mg/kg de peso corporal, bastante semelhante a dose utilizada em outros estudos experimentais onde o MeHg é administrado pela via intraperitoneal ou subcutânea e promove alterações comportamentais semelhantes (KOBAYASHI et al., 1981; STRINGARI et al., 2006). De acordo com nossos resultados, encontramos uma dose diária média de 6,70 mg/kg de peso corporal para o grupo exposto tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.), bastante semelhante a dose diária descrita pela literatura (7 mg/kg de peso corporal). Ademais, o protocolo descrito por Dietrich et al. (2005) possui a vantagem de apresentar similaridade com a principal forma de exposição humana ao MeHg (exposição oral), bem como a ausência de injeções diárias, evitando desconforto aos animais, conferindo excelente praticidade e permitindo a exposição por longos períodos (p.ex. vários meses usando baixas doses).

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo corroboram dados da literatura, uma vez que a exposição à solução de MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos foi capaz de promover *deficit* motor significativamente maior quando comparado aos animais não expostos. Os distúrbios de movimento puderam ser observados nos testes da barra giratória, retração dos membros posteriores, caminhada na viga e no teste do poste.

Esses testes comportamentais avaliam, sobretudo, a coordenação motora do animal. Assim, está bem estabelecido que uma das principais estruturas do SNC envolvida no controle motor é o cerebelo. Sugere-se que o cerebelo contribui para a aquisição espacial e sensorial, bem como para a predição das consequências sensoriais do movimento. Evidências clínicas demonstram que pacientes com lesão

cerebelar são caracterizados por apresentarem distúrbios na precisão e coordenação dos movimentos, como, por exemplo, distúrbios de movimentos oculares, distúrbios de fala, distúrbios de movimentos de membros inferiores e prejuízo na postura e marcha (Para revisão ver MANTO et al., 2012). Com relação aos movimentos de membros inferiores, tem sido demonstrado que parâmetros cinemáticos dos movimentos são afetados por lesões cerebelares, uma vez que, são comuns o aparecimento de erros de posição, ajuste direcional e velocidade dos movimentos, sendo que, tanto a iniciação quanto o término do movimento são prejudicados (Para revisão ver MANTO et al., 2012; GOODKIN et al., 1993). Além disso, diversos modelos animais têm demonstrado que danos à circuitaria cerebelar, especialmente mutações genéticas relacionadas às células de Purkinje, células da camada granular do cerebelo e células de Golgi, são capazes de promover distúrbios motores significativos tanto em animais jovens quanto em adultos. Tais distúrbios motores são caracterizados por perda da coordenação motora, tremor em repouso e durante o movimento e ataxia com instabilidade da marcha, a qual mostra-se tão grave que animais adultos não conseguem ficar em pé sem desequilibrarem ou mesmo mover um passo sem cair. Ademais, também pode-se observar imobilidade extrema, devido a hipertonía rígida e um balanceio lateral, o qual obriga os animais a inclinarem-se contra a parede das gaiolas para evitar alguma queda (Para revisão ver SWINNY; VAN DER WANT; GRAMSBERGEN, 2005; RAKIC; SIDMAN, 1973; GRUSSER-CORNEHLS, 1995; HERRUP; WILCZYNSKI, 1982). Sendo assim, pode-se sugerir que o *deficit* motor observado nos animais expostos ao MeHg, muito provavelmente devem-se a lesões no cerebelo promovidas pelo metal pesado. De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que o MeHg possui capacidade de acumular-se no cerebelo, bem como de promover alteração na citoarquitetura cerebelar (GLASER et al., 2013; ROOS et al., 2010; de FREITAS et al., 2009; FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011). Os resultados obtidos no presente trabalho, por espectrometria de absorção atômica utilizando a técnica de vapor frio, corroboram dados da literatura, uma vez que, foi possível encontrar níveis significativamente maiores de mercúrio no cerebelo de animais expostos ao MeHg 40 mg/L durante 15 dias consecutivos, quando comparado aos animais não expostos reforçando que as alterações comportamentais promovidas pelo MeHg estão relacionadas com seu acúmulo no cerebelo e consequente dano as células que constituem o tecido cerebelar.

Diante do exposto, diversos estudos têm procurado investigar o efeito de diferentes drogas diante das alterações comportamentais promovidas pelo MeHg. No entanto, nenhum estudo procurou investigar o potencial efeito protetor da inosina diante da exposição ao MeHg, apesar de estar bem estabelecido que a mesma desempenha importantes efeitos biológicos, como, por exemplo, anti-inflamatório, antinociceptivo, cardiovascular e neuroprotetor (HASKO, et al., 2000a; 2000b; MARTON, et al., 2001; GOMEZ; SITKOVSKY, 2003; da ROCHA LAPA et al., 2013; MACEDO-JUNIOR et al., 2013; NASCIMENTO, et al., 2010; JUHASZ-NAGY; AVIADO, 1977; AVIADO, 1978; BENOWITZ, et al., 1999; WU, et al., 2003; CHEN, et al., 2002; SHEN, et al., 2005).

Os resultados aqui apresentados, demonstram pela primeira vez que a inosina, um nucleosídeo endógeno, foi capaz de exercer um efeito protetor diante da exposição ao MeHg. Inicialmente, objetivou-se determinar em qual dose a inosina seria capaz de prevenir as alterações comportamentais induzidas pelo MeHg. Para isso os animais foram tratados com inosina (3 – 100 mg/kg) pela via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante os 15 dias de exposição ao MeHg. Após esse período os animais foram avaliados no teste da barra giratória, um dos testes mais utilizados em protocolos experimentais que visam investigar as alterações motoras promovidas pelo MeHg. Assim, foi possível observar que apenas o tratamento com a dose de 10 mg/kg de inosina foi capaz de prevenir o *deficit* motor induzido pelo MeHg no teste da barra giratória. A partir desse resultado a dose de 10 mg/kg foi adotada para investigar o possível efeito protetor da inosina em outros testes comportamentais. Em seguida, foi demonstrado que a inosina 10 mg/kg foi capaz de prevenir o *deficit* motor promovido pelo MeHg no teste de retração dos membros posteriores e no teste da caminhada na viga.

Poucos estudos têm relatado o efeito da inosina frente ao desenvolvimento de *deficit* motor em diferentes modelos experimentais. Neste sentido, Chen et al. (2002) demonstraram de maneira interessante que a infusão de inosina no ventrículo lateral foi capaz de prevenir o *deficit* motor de ratos após oclusão da artéria cerebral média. Em outro estudo, Smith et al. (2007) demonstraram que a infusão contínua de inosina 10 mM no ventrículo lateral durante 28 dias promoveu uma recuperação significativa das funções motoras em um modelo de traumatismo cranioencefálico. Além disso, um estudo investigou o efeito da inosina em 36 pacientes portadores da Síndrome de Tourette, caracterizada por movimentos repentinos (espasmos ou tiques motores) e vocalizações. Este trabalho demonstrou que o tratamento diário com

inosina (50 - 90 mg/kg) foi capaz de controlar a frequência de tiques motores ou não motores em pelo menos 75% dos pacientes estudados, mantendo-se efetiva no controle dos sintomas em pelo menos 50% dos pacientes após um ano de tratamento (CHENG; JIANG, 1990). Dessa forma, dados da literatura corroboram os resultados obtidos no presente trabalho, os quais claramente apontam para o importante efeito preventivo da inosina diante dos *deficits* motores decorrentes da exposição ao MeHg em diferentes modelos experimentais.

Ainda de acordo com os resultados dos testes comportamentais, pode-se observar que o tratamento com inosina não foi capaz de prevenir o *deficit* motor induzido pelo MeHg no teste do poste, em nenhum dos parâmetros avaliados. O teste do poste tem sido amplamente utilizado para detectar alterações na coordenação motora e bradicinesia em modelos experimentais da Doença de Parkinson (OGAWA et al., 1985). Está bem estabelecido que a Doença de Parkinson deve-se a uma redução significativa no conteúdo dopaminérgico na região dos gânglios da base, especialmente na substância *nigra pars compacta*. Além disso, as alterações comportamentais observadas no teste do poste têm sido prevenidas por agonistas dopaminérgicos, tanto em modelos químicos quanto genéticos da Doença de Parkinson (FLEMING et al., 2006). Diante do exposto, parece que o componente dopaminérgico nos gânglios da base, especialmente na substância *nigra pars compacta*, é realmente preponderante para o comportamento do animal observado no teste do poste.

Sabe-se que nos gânglios da base (mais especificamente no estriado) receptores A2A de adenosina e receptores D2 de dopamina estão colocalizados e fisicamente associados. Assim, considerando que esses receptores desempenham efeitos opostos sobre a ciclase de adenilil, a ativação de receptores A2A inibe a sinalização dos receptores D2 (Para revisão ver SHOOK; JACKSON, 2011; FINK et al., 1992). Sendo assim, podemos sugerir que a inosina esteja ativando receptores A2A de adenosina nos gânglios da base e assim inibindo o componente dopaminérgico necessário para o correto comportamento do animal no teste do poste. Além disso, esse efeito contrabalancearia o possível efeito positivo que a inosina exerce, provavelmente via receptores A1 de adenosina, no cerebelo, conforme será discutido a seguir. Dessa forma, a hipótese formulada para o fato da inosina não ter prevenido o *deficit* motor induzido pelo MeHg no teste do poste é a mesma postulada para o fato dela ter prevenido o *deficit* motor nos outros testes

comportamentais realizados (barra giratória e retração dos membros posteriores), sua interação com receptores de adenosina.

Nossa suposição é de que o efeito protetor da inosina diante do *deficit* motor induzido pelo MeHg deva-se a ativação de receptores de adenosina, uma vez que, conforme comentado anteriormente, diversos trabalhos têm demonstrado sua capacidade de interagir com receptores de adenosina e que seus diferentes efeitos biológicos dependem da interação e ativação desses receptores (JIN et al., 1997; (NASCIMENTO et al., 2010; HASKO et al., 2000a; 2000b; GOMEZ; SITKOVSKY, 2003; HASKO; SITKOVSKY, SZABÓ, 2004; da ROCHA LAPA et al., 2013; MACEDO-JUNIOR et al., 2013).

Neste sentido, são poucos os estudos que procuram investigar o possível efeito neuroprotetor da inosina e o envolvimento de receptores de adenosina neste efeito. Em um estudo interessante, usando um modelo de isquemia cerebral, Shen et al. (2005) demonstraram que a administração intracerebroventricular de inosina (25 nmol/L em 25 µL) após oclusão da artéria cerebral média em ratos, promoveu uma melhora significativa da atividade locomotora e uma menor área de isquemia. Ademais, o mesmo estudo demonstrou que a coadministração de inosina com um antagonista seletivo de receptores A3 de adenosina, MRS1191, preveniu significativamente o efeito protetor da inosina. Dessa forma, esse trabalho sugere que o efeito protetor da inosina no referido modelo de isquemia cerebral depende da ativação de receptores A3 de adenosina, sendo um dos poucos a demonstrar que a inosina apresenta efeito neuroprotetor e que esse efeito parece ser mediado por receptores de adenosina. Diferentemente, está consagrado na literatura o efeito neuroprotetor desempenhado pela modulação de receptores de adenosina em uma variedade de modelos experimentais (Para revisão ver GOMES et al., 2011; STONE; CERUTI; ABBRACCHIO, 2009). Diante do exposto, a fim de investigar o envolvimento de receptores de adenosina no efeito protetor da inosina frente à exposição ao MeHg, os animais foram coadministrados, uma vez ao dia, com inosina (10 mg/kg) e cafeína (3 mg/kg), uma metilxantina antagonista não seletivo de receptores de adenosina, durante os 15 dias de exposição. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a cafeína foi capaz de prevenir o efeito protetor da inosina tanto no teste da barra giratória quanto no teste de retração dos membros posteriores, sugerindo que esse efeito protetor da inosina diante do *deficit* motor induzido pelo MeHg depende da ativação de receptores de adenosina.

Conforme comentado anteriormente, a cafeína é um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, assim como outras

metilxantinas (p.ex. teobromina e teofilina), amplamente utilizada como ferramenta farmacológica para se demonstrar o envolvimento de receptores de adenosina no efeito biológico de moléculas endógenas ou exógenas. Por se tratar de um antagonista não seletivo, o antagonismo promovido pela cafeína não permite distinguir qual receptor de adenosina está sendo o principal mediador do efeito da inosina. No entanto, enquanto em humanos a afinidade da cafeína é semelhante para os 4 subtipos de receptores de adenosina, em ratos têm sido sugerido que a cafeína apresenta uma afinidade maior para o receptor A3 em detrimento dos demais (Para revisão ver MÜLLER; JACOBSON, 2011; FREDHOLM et al., 1994; VAN GALEN et al., 1994). Além disso, no cerebelo, uma das principais estruturas do SNC afetadas pelo MeHg, há expressão principalmente dos receptores A1 e A3 de adenosina, sendo que a expressão do primeiro é aparentemente maior que a do segundo (Para revisão ver FREDHOLM et al., 2001; RIBEIRO; SEBASTIÃO; de MENDONÇA, 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a ativação de receptores A1 de adenosina pode interferir na neurotransmissão cerebelar. Neste sentido, estudos têm demonstrado que o *input* excitatório proveniente das fibras musgosas (do inglês *mossy fibers*) para as células granulares do cerebelo é reduzido após ativação de receptores A1 localizados a nível pré-sináptico, ou seja, nas fibras musgosas. A ativação desses receptores leva a redução na liberação de neurotransmissores, no caso o glutamato. Por outro lado as células granulares do cerebelo recebem um *input* inibitório, mediado pelo neurotransmissor ácido- $\gamma$ -butírico (GABA) proveniente das células de Golgi. Tem sido demonstrado que a ativação de receptores A1 na membrana das células de Golgi reduz a liberação do neurotransmissor GABA e conseqüentemente ocorre redução do *input* inibitório para as células granulares. As células granulares por sua vez promovem um *output* excitatório para as células de Purkinje, mediado pela liberação de glutamato. Constatou-se ainda que a ativação de receptores A1 na membrana das células granulares promove uma redução na liberação de glutamato, em um mecanismo que envolve a redução no influxo de  $Ca^{2+}$ , levando conseqüentemente a redução do *output* excitatório para as células de Purkinje (Para revisão ver COURJARET; MIRAS-PORTUGAL; DEITMER, 2012; COURJARET; TROGER; DEITMER, 2009; KOCSIS; ENG; BHISITKUL, 1984).

Dessa forma, fica evidente que a ativação de receptores A1 de adenosina é capaz de modular prontamente a neurotransmissão cerebelar, podendo interferir diretamente nas funções desempenhadas

pelo cerebelo. Muito provavelmente, o efeito protetor da inosina diante das alterações motoras induzidas pelo MeHg deve-se a sua interação e consequente ativação de receptores A1 de adenosina. Sendo assim, pode-se sugerir que a ativação de receptores A1 de adenosina pela inosina pode atenuar as alterações moleculares/bioquímicas promovidas pelo MeHg no cerebelo, prevenindo as alterações comportamentais correlacionadas. No entanto, não podemos descartar a possibilidade dos receptores A3 de adenosina também estarem envolvidos nos efeitos promovidos pela inosina.

Outro mecanismo pelo qual a inosina poderia estar prevenindo as alterações comportamentais induzidas pelo MeHg seria pela prevenção da elevação dos níveis cerebelares de mercúrio. Neste sentido, pode-se observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg) durante os 15 de exposição ao MeHg, não foi capaz de prevenir a elevação dos níveis cerebelares de mercúrio. Portanto, pode-se descartar a hipótese de que o efeito protetor da inosina se deva a uma possível interação com o sistema transportador de aminoácidos neutros do tipo L, principal mecanismo utilizado pelo MeHg para atravessar as membranas celulares.

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm contribuído sobremaneira para esclarecer os mecanismos moleculares/bioquímicos envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (Para revisão ver FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011). Inicialmente foi demonstrado que a captação de mercúrio pelo SNC de ratos é aumentada pela infusão contínua de L-cisteína, sugerindo que o mercúrio pode ser transportado através da barreira hematoencefálica pelo sistema LAT. Em seguida foi demonstrado que o MeHg penetra no SNC de ratos complexado com cisteína através do sistema LAT, devido à semelhança existente entre o complexo MeHg/cisteína e a L-metionina, o substrato para o sistema de transporte de aminoácidos LAT. Estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão do transportador de aminoácidos LAT, especialmente o LAT 1, está associada a captação de MeHg na presença de L-cisteína e a redução da viabilidade de células de ovário de hamster chinês (do inglês *Chinese Hamster Ovary*, *CHO-k1*). Assim, pode-se concluir que o complexo MeHg-L-cisteína é um substrato para o sistema de transporte LAT 1, o qual transporta o MeHg através das membranas contribuindo para elevação nos níveis de mercúrio no SNC após exposição ao MeHg (KERPER; BALLATORI; CLARKSON, 1992; YIN, et al., 2008).

Uma vez no SNC o MeHg apresenta a capacidade de combinar-se covalentemente com grupamentos sulfidril (tiol) de enzimas que contêm esses grupos funcionais, sugerindo que interações entre MeHg e

tióis de proteínas e moléculas não protéicas contribuem para o desenvolvimento da sua neurotoxicidade. Neste sentido, o sistema antioxidante da glutatona (do inglês GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cysteinylglycine) é um alvo importante para o MeHg. A capacidade redutora da GSH é determinada pelas propriedades nucleofílicas de seus grupos tióis, e sua atividade antioxidante depende de enzimas que catalisam sua interação com moléculas eletrofílicas endógenas ou exógenas, particularmente a GPx e GR, as quais promovem a detoxificação de peróxidos e redução da glutatona oxidada, respectivamente. Sabe-se que o MeHg interage diretamente com grupamentos tióis da GSH, formando um complexo excretável GS-HgCH<sub>3</sub>, reduzindo, assim, os níveis de GSH (KAUR; ASCHNER; SYVERSEN, 2006; STRINGARI et al., 2008; ZHU et al., 2006; DRINGEN, 2000; BALLATORI; CLARKSON, 1982). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o MeHg é capaz de interagir também com grupamentos selenóis da GPx, reduzindo sua atividade e sua capacidade de detoxificar peróxidos. De fato, alguns estudos têm demonstrado que a exposição ao MeHg *in vivo* ou *in vitro* reduz os níveis de GSH e a atividade da GPx, além de aumentar a atividade da GR (Para revisão ver FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011; FRANCO et al., 2009). Assim, o MeHg pode perturbar o funcionamento do sistema antioxidante GSH e contribuir para o desenvolvimento de estresse oxidativo. Aliado a isso, têm sido demonstrado que o MeHg é capaz de interagir com grupamentos tióis de proteínas mitocondriais, como, por exemplo, creatina quinase mitocondrial e os complexos que formam a cadeia respiratória. Assim, o MeHg pode inibir a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o que, por sua vez, contribui para produção de espécies reativas de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e óxido nítrico) e desenvolvimento de estresse oxidativo (Para revisão ver FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011; GLASER et al., 2010; ROOS et al., 2011), o qual, conseqüentemente, poderia perturbar a neurotransmissão cerebelar basal culminando com alteração comportamental. Dessa forma, a atividade de enzimas antioxidantes como a GPx e GR podem ser utilizadas como parâmetros para se avaliar as alterações moleculares/bioquímicas promovidas pelo MeHg.

Diante do exposto, o presente trabalho procurou avaliar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR no cerebelo, a fim de determinar se um possível desequilíbrio redox no cerebelo poderia estar contribuindo para as alterações comportamentais induzidas pelo MeHg. Neste sentido, pode-se observar que a exposição ao MeHg (40 mg/L) foi capaz de reduzir a atividade da GPx quando comparado ao grupo não

exposto, sem no entanto afetar a atividade da GR. Assim, os achados do presente estudo, corroboram, ao menos em parte, dados descritos na literatura, uma vez que, boa parte dos estudos relatam redução na atividade da GPx, mas, entretanto, aumento na atividade da GR. Apesar desses achados, pode-se sugerir que o estresse oxidativo contribui, sobremaneira, para as alterações comportamentais observadas nos animais expostos ao MeHg no presente estudo. Obviamente, outros dados poderiam fornecer um suporte mais concreto para essa afirmação, como, por exemplo, a atividade de outras enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase), bem como a determinação de outros parâmetros oxidativos (p. ex. peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio). Ainda, pode-se observar que o tratamento com inosina (10 mg/kg) não foi capaz de prevenir a redução da atividade da enzima GPx no grupo exposto ao MeHg, sugerindo que a prevenção no *deficit* motor promovido pela inosina, não está correlacionado com a manutenção dos níveis basais de atividade da GPx e possível manutenção do equilíbrio redox a nível cerebelar. Diferentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que a inosina apresenta efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral, onde há o desenvolvimento de estresse oxidativo semelhante ao encontrado na exposição ao MeHg e que a ativação de receptores A1 de adenosina (o principal mediador dos efeitos biológicos da inosina), usando agonistas seletivos é capaz de prevenir a redução da viabilidade de células granulares do cerebelo *in vitro* induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma das principais espécies reativas de oxigênio produzidas pela exposição ao MeHg (SHEN et al., 2005; FATOKUN; STONE; SMITH, 2007). Além disso, outros trabalhos têm demonstrado que a inosina exerce efeito protetor frente à peroxidação lipídica e dano celular induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células de Sertolli (GELAIN et al., 2004). Assim, diante das evidências citadas anteriormente, estudos adicionais também seriam cruciais na tentativa de elucidar a participação da inosina frente à manutenção do equilíbrio redox no cerebelo diante da exposição ao MeHg (p. ex. determinação da atividade da catalase, determinação da peroxidação lipídica).

Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo e a neuroinflamação são eventos inter-relacionáveis que ocorrem concomitantemente e contribuem para o desenvolvimento de alterações moleculares e comportamentais observadas em diferentes modelos experimentais que promovem o estabelecimento de um processo neurodegenerativo (p. ex. Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, esclerose múltipla) (Para revisão ver HSIEH; YANG, 2013). Neste

sentido, mediadores inflamatórios, dentre os quais destacamos as citocinas, funcionam como neuromoduladores, regulando o desenvolvimento neural, neuroinflamação e transmissão sináptica. As citocinas são produzidas e liberadas principalmente a partir da ativação de células da microglia (macrófagos residentes do SNC) e de astrócitos. De fato, a neurodegeneração ocorre concomitantemente com a microgliose, astrogliose e participação de citocinas pro-inflamatórias. Algumas dessas citocinas como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , chamadas de citocinas pro-inflamatórias, facilitam o desenvolvimento da neuroinflamação e podem contribuir para neurodegeneração. Por outro lado, outras citocinas, como, por exemplo, a IL-1Ra, considerada uma citocina com potencial anti-inflamatório, atua no sentido de prevenir o desenvolvimento da neuroinflamação e do processo neurodegenerativo. Já a IL-6 apresenta um papel dual no processo neurodegenerativo, podendo atuar promovendo a sobrevivência neuronal ou em níveis elevados favorecendo a neurodegeneração (RAMESH; MacLEAN; PHILIPP, 2013; ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012; YE et al., 2013).

Neste íterim, poucos estudos têm procurado investigar a participação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias diante da exposição ao MeHg. Alguns trabalhos têm demonstrado que o MeHg é capaz de estimular a liberação de IL-6 a partir de células da glia (microglia e astrócitos), a qual pode desencadear efeitos pró-inflamatórios e lesão neuronal ou então exercer efeito neuroprotetor (CHANG, 2007; NOGUCHI et al., 2013). Quanto à relação de outras citocinas com a exposição ao MeHg, há uma considerável escassez de dados na literatura.

Diante do exposto, o presente trabalho procurou investigar se a exposição ao MeHg seria capaz de alterar os níveis cerebelares de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, uma vez que, os processos neuroinflamatórios e oxidativos parecem contribuir para as alterações moleculares presentes em diferentes condições neurodegenerativas. Assim, é possível observar que a exposição ao MeHg (40 mg/L) durante 15 dias, não foi capaz de alterar os níveis cerebelares de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo não exposto. No entanto, o MeHg promoveu uma redução significativa nos níveis cerebelares de IL-6. Considerando os dados disponíveis na literatura, seria de se esperar uma elevação nos níveis cerebelares de IL-6, uma vez que, outros trabalhos sugerem que o MeHg estimula a liberação de IL-6, principalmente a partir de células da glia (CHANG, 2007, 2011; NOGUCHI et al., 2013). Nossa hipótese é de que a dose e/ou o tempo

de exposição ao MeHg no presente estudo, os quais são diferentes dos utilizados pelos trabalhos citados anteriormente, podem estar interferindo diretamente na atividade de células da glia e consequentemente reduzindo a liberação de IL-6 por essas células. Neste sentido, estudos *in vitro* têm demonstrado que o MeHg, bem como, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (espécie reativa de oxigênio produzida pela exposição ao MeHg) induzem efeitos citotóxicos e reduzem a viabilidade celular de microglia e astrócitos, observados, respectivamente, no ensaio que determina a atividade da lactato desidrogenase e no ensaio do 3-[4,5- dimetiltiliazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio brometo (ensaio do MTT) (WORMSER et al., 2012; NI et al., 2012). Além disso, Noguchi et. al (2013) demonstraram que o MeHg é capaz de estimular a liberação de IL-6 a partir da cultura de astrócitos, e essa IL-6 é capaz de prevenir a redução da viabilidade de neurônios expostos ao MeHg (NOGUCHI et al., 2013).

Assim, podemos sugerir que a exposição ao MeHg no presente estudo levou a uma redução na atividade de células da glia, com consequente redução na liberação de IL-6, uma citocina que aparentemente exerce efeito neuroprotetor diante da exposição ao MeHg, culminando com o efeito neurodegenerativo do MeHg e suas alterações comportamentais. Por sua vez, o tratamento com inosina (10 mg/kg) durante os 15 dias de exposição ao MeHg, preveniu de maneira significativa, a redução nos níveis de IL-6. De alguma forma, a inosina foi capaz de prevenir o possível efeito neurotóxico do MeHg sobre as células da glia e assim, manter os níveis basais de IL-6. Por outro lado, os mesmos autores também demonstraram que o efeito protetor da IL-6 em cultura de neurônios expostos ao MeHg, foi totalmente revertido pelo antagonista seletivo de receptores A1 de adenosina. Além disso, a IL-6 promoveu um aumento na expressão de mRNA do receptor A1 na cultura de neurônios, sugerindo que o referido efeito protetor da IL-6 é mediado por receptores A1 de adenosina. Dessa forma, os dados da literatura e os obtidos neste trabalho permitem sugerir que o efeito protetor desempenhado pela inosina pode estar relacionado a um possível aumento na expressão de receptores A1 de adenosina (alvos para inosina), mediado pela IL-6 em neurônios do cerebelo (p. ex. células granulares). No entanto, estudo, adicionais são necessários para que esta hipótese seja confirmada, como, por exemplo, a determinação da atividade de células da glia utilizando técnicas de imunofluorescência.

Outro importante mecanismo molecular pelo qual o MeHg promove seu efeito neurotóxico é o desequilíbrio na homeostase do glutamato. A neurotransmissão cerebelar envolve um delicado equilíbrio

entre as ações de neurotransmissores excitatório e inibitórios. Assim, as células granulares do cerebelo sintetizam e liberam glutamato, fornecendo assim um *input* excitatório para as células de Purkinje. As células de Purkinje estabelecem o único *output* do córtex cerebelar, sendo as responsáveis por transmitir as informações necessárias para a correta execução das funções mediadas pelo cerebelo, principalmente as funções motoras. Neste sentido, o funcionamento cerebelar normal depende de uma modulação gabaérgica no *input* excitatório das células granulares para as células de Purkinje, ou seja, o neurotransmissor GABA liberado por outras células do cerebelo (p.ex. células de golgi) atua em receptores GABA<sub>A</sub> extrassinápticos localizados nas células granulares, promovendo uma inibição tônica dessas células devido à condutância permanente de íons cloreto. A inibição das células granulares leva a redução na liberação de glutamato e conseqüentemente a uma menor ativação das células de Purkinje, assim, ocorre um equilíbrio na neurotransmissão cerebelar permitindo seu perfeito funcionamento (Para revisão ver ATCHISON, 2005; HAMANN; ROSSI; ATTWELL, 2002; BRICKLEY; CULL-CANDY; FARRANT, 1996).

Neste sentido, tem sido demonstrado que o MeHg é capaz de inibir a captação de glutamato em cultura de astrócitos, vesículas sinápticas e fatias de córtex cerebral obtidos de ratos. Além disso, o MeHg pode aumentar a liberação espontânea de glutamato em fatias cerebelares de camundongos e em células neuronais em cultura (BROOKES; KRISTT, 1989; ASCHNER, 2000; PORCIUNCULA et al., 2003; MORETTO, et al., 2005; REYNOLDS; RACZ, 1987; FARINA et al., 2003). Somando-se a esses achados, outros estudos sugerem que o MeHg é capaz de impedir a ativação de receptores GABA<sub>A</sub> localizados nas células granulares do cerebelo, reduzindo a neurotransmissão inibitória tônica mediada pelos receptores GABA<sub>A</sub> (ATCHISON, 2005). Pode-se observar que o MeHg favorece a liberação de glutamato pelas células granulares e inibe mecanismos relacionados à remoção do glutamato da fenda sináptica. O glutamato então ficará disponível para atuar em seus receptores e conseqüentemente, poderá levar a chamada excitabilidade glutamatérgica, devido a superativação de receptores glutamatérgicos (principalmente do tipo NMDA), aumento nos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> e a ativação de vias intracelulares que podem levar a morte celular (REYNOLDS; HASTINGS, 1995; CECCATELLI; DARÉ; MOORS, 2010; MELDRUM, 2000; CHOI, 1992). Diante do exposto, apesar de não termos dados que confirmem essa hipótese, podemos sugerir que a

inosina esteja ativando receptores A1 localizados na membrana das células granulares, controlando a liberação excessiva de glutamato e assim reduzindo a excitabilidade glutamatérgica induzida pelo MeHg, prevenindo algumas das alterações moleculares e consequentemente alterações motoras induzidas pelo MeHg.

A superativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e a consequente elevação nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , pode levar a ativação de vias intracelulares que irão culminar com a ativação do CREB, um fator de transcrição capaz de estimular a transcrição de diferentes genes responsáveis pela codificação de diferentes proteínas. Uma das proteínas codificadas pelo CREB é o BDNF (Para revisão ver WANG; FIBUCH; MAO, 2007; VANHOUTTE; BADING, 2003). Assim, pode-se sugerir que o desequilíbrio glutamatérgico induzido pela exposição ao MeHg pode estimular a produção de BDNF a nível cerebelar. De fato, os resultados do presente estudo demonstraram que a exposição ao MeHg (40 mg/L) promoveu uma elevação significativa nos níveis cerebelares de BDNF, provavelmente mediado pelo glutamato. Alguns estudos têm sugerido que o BDNF é capaz de modular a atividade de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, especialmente, aumentando de forma rápida e transitória a fosforilação das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA, levando a um aumento na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ . Além disso, um estudo interessante demonstrou que o BDNF é capaz de acelerar a morte neuronal promovida pelo MeHg em cultura primária de células granulares de ratos, por um mecanismo dependente da ativação de receptores tropomiosina quinase B (TrkB) (SAKAUE et al., 2009; XU et al., 2006). Dessa forma, a nossa hipótese é que os níveis elevados de BDNF estão favorecendo as alterações moleculares induzidas pela exposição ao MeHg, especialmente a excitabilidade glutamatérgica, e assim corroborando para o *deficit* motor promovido pelo metal pesado. De fato, os dados apresentados neste trabalho demonstram que o tratamento com inosina (10 mg/kg) foi capaz de prevenir a elevação nos níveis de BDNF induzida pela exposição ao MeHg. Diante do exposto, sugerimos que a ativação de receptores A1 de adenosina pela inosina na membrana das células granulares do cerebelo leva a uma redução na liberação de glutamato e consequentemente a uma redução nos níveis de BDNF. Dessa forma, a inosina é capaz de prevenir, ao menos em parte, as alterações moleculares induzidas pelo MeHg, o que reflete na prevenção das alterações motoras induzidas pelo metal pesado.

Além de atuar no SNC, alguns trabalhos têm relatado que o mercúrio também pode exercer efeitos periféricos. Com este propósito

determinados estudos têm demonstrado que o mercúrio apresenta a capacidade de acumular-se em quantidades apreciáveis no fígado após a exposição ao MeHg. Assim como ocorre no SNC, esse acúmulo hepático de MeHg parece ser facilitado quando o metal encontra-se complexado com a cisteína (ROOS et al., 2010; 2011). Além disso, o MeHg foi capaz de promover alterações moleculares no fígado, as quais estão relacionadas ao aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês TBARS) e redução nos níveis de tiois não protéicos, sugerindo que o MeHg é capaz de induzir peroxidação lipídica no tecido hepático (de FREITAS et al., 2009; ROOS et al., 2010; 2011). Dados de estudos *in vitro* demonstraram que a exposição ao MeHg promove uma elevação significativa na concentração de mercúrio em fatias de fígado e em cultura de mitocôndrias isoladas de fatias de fígado de ratos. O mesmo estudo mostrou ainda que o MeHg aumenta os níveis de espécies reativas à diclorofluoresceína apenas na cultura de mitocôndrias isoladas de fígado, sugerindo uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem reagir rapidamente com macromoléculas celulares e promover dano mitocondrial (ROOS et al., 2011). Além disso, tem sido observado que a atividade/viabilidade de mitocôndrias isoladas de fígado é reduzida pela exposição ao MeHg (ROOS et al., 2011). Dessa forma, fica evidente que a exposição ao MeHg também pode causar lesão hepática.

Diante do exposto, do ponto de vista profilático, seria interessante que uma ferramenta farmacológica seja capaz de prevenir as alterações induzidas pelo MeHg, tanto no SNC quanto em nível periférico. Neste sentido, o presente estudo procurou investigar a atividade sérica das enzimas hepáticas ALT e AST a fim de determinar se a exposição ao MeHg poderia estar causando alguma lesão no tecido hepático. Além disso, buscou-se avaliar também se o tratamento com inosina seria capaz de prevenir as alterações periféricas promovidas pelo MeHg, uma vez que, já demonstrou ser eficiente em prevenir as alterações decorrentes da ação do metal pesado no SNC. Assim, encontramos que a exposição ao MeHg promoveu uma elevação significativa tanto na atividade sérica da ALT quanto da AST, sugerindo que o MeHg é capaz de causar danos ao tecido hepático. Por outro lado, o tratamento com inosina preveniu apenas a elevação na atividade sérica da ALT, não interferindo na atividade da AST.

ALT e AST são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades, principalmente, nos hepatócitos. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma dos hepatócitos, enquanto cerca de 80% da AST está presente na mitocôndria. Sendo assim, lesões ou destruição

dos hepatócitos liberam essas enzimas para a circulação, levando a um aumento de suas atividades séricas (Para revisão ver ANDRIOLO; BORGES, 1989; MOTTA, 2000). Dessa forma, os níveis séricos aumentados de ALT e AST, sugerem que o MeHg promoveu dano aos hepatócitos e também dano mitocondrial. Esses achados corroboram dados da literatura acerca das alterações relacionadas ao estresse oxidativo induzido pelo MeHg, o qual pôde ser observado tanto em fatias de fígado quanto em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (ROOS et al., 2011). Diante do exposto, pode-se sugerir que a atividade sérica aumentada de AST e ALT em animais expostos ao MeHg pode estar relacionada a lesões em hepatócitos e em mitocôndrias de hepatócitos, resultante do estresse oxidativo induzido pelo MeHg no fígado. O tratamento com inosina (10 mg/kg) foi capaz de prevenir apenas a elevação na atividade sérica da ALT, sem, no entanto, interferir na elevação dos níveis séricos de AST. Mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de ação responsável pelo efeito hepatoprotetor da inosina, no entanto, diante do exposto acima, podemos sugerir que a inosina esteja prevenindo o desenvolvimento de estresse oxidativo no fígado dos animais expostos ao MeHg e assim prevenindo a lesão hepática induzida pelo metal pesado.

Além do SNC e o sistema hepático, tem sido demonstrado que o MeHg é capaz de afetar o funcionamento do sistema cardiovascular. Neste sentido, a hipótese de que a exposição crônica ao MeHg está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares foi reforçada após estudo de Bofetta et al. (2001), no qual foi observado que trabalhadores de minas de mercúrio na Europa apresentavam maior incidência de hipertensão arterial sistêmica (46%) e doenças cardiovasculares (36%), quando comparados a indivíduos não expostos ao mercúrio. De fato, alguns estudos têm sugerido que a exposição ao MeHg em humanos está relacionada a infarto do miocárdio, elevação da pressão arterial, variabilidade na frequência cardíaca e aterosclerose (SALONEN et al., 2000).

O desenvolvimento de doença aterosclerótica pode ter relação com o fato de o MeHg ser capaz de promover um aumento na espessura da camada íntima/média das artérias carótidas (CHOI et al., 2009). Neste caso, Salonen et al. (1995) demonstraram que o mercúrio pode estar relacionado com o aumento da concentração de LDL, a qual é frequentemente associada à lesão aterosclerótica. Sendo assim, considerando que alterações nos níveis séricos de lipídeos (especialmente colesterol e suas frações, LDL e HDL) são cruciais para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e que esta, por sua vez,

está relacionada ao aparecimento de outras doenças cardiovasculares (WARE, 2008), pode-se sugerir que o colesterol desempenha um papel importante nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo MeHg. Neste sentido, o presente estudo procurou determinar os níveis de colesterol total, HDL e colesterol não-HDL no soro de animais expostos ao metal pesado. Foi observado que a exposição ao MeHg (40 mg/L) promoveu uma elevação significativa nos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL, sem no entanto alterar os níveis de HDL. Assim, podemos sugerir que a elevação nos níveis de colesterol total nos animais expostos ao MeHg deve-se a elevação, exclusivamente, dos níveis de colesterol não-HDL.

Dados da literatura corroboram nossos resultados, uma vez que, têm demonstrado que a exposição de camundongos *Swiss* e *C57BL/6* tratados com MeHg 40 mg/L diluído na água de beber, apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de colesterol total e colesterol não-HDL, inclusive em animais com deleção gênica (do inglês *knockout*) do receptor de LDL, sugerindo que esses achados não estão relacionados com redução na expressão do receptor de LDL, responsável pelo transporte de colesterol do plasma para outros tecidos (MOREIRA et al., 2012).

Além disso, Moreira et al. (2012) sugerem que essa hipercolesterolemia pode representar um fator de risco para a neurotoxicidade induzida pelo MeHg. Dessa forma, não podemos descartar que os efeitos neurotóxicos decorrentes da exposição ao MeHg observados no presente estudo estejam associados com a hipercolesterolemia induzida pelo metal pesado. Ainda, considerando que níveis elevados de colesterol total e LDL estão intimamente relacionados ao risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, nossos resultados corroboram a ideia de que a exposição ao MeHg é capaz de favorecer o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com inosina (10 mg/kg) não foi capaz de prevenir a elevação nos níveis séricos de colesterol total induzida pelo MeHg. No entanto, a inosina preveniu de maneira significativa a elevação nos níveis de colesterol não-HDL induzida pelo MeHg e, além disso, promoveu um aumento nos níveis de HDL em animais expostos ao metal pesado. Diante dos dados apresentados, podemos sugerir que a inosina não preveniu a elevação nos níveis de colesterol total, pois, concomitantemente à redução nos níveis de colesterol não-HDL, ela promoveu um aumento nos níveis de HDL. Em outras palavras, a redução nos níveis de colesterol não-HDL foi compensada pela elevação nos níveis de HDL, o que resultou em não

prevenção na elevação dos níveis de colesterol total. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos da inosina relacionados aos níveis de lipídeos frente à exposição ao MeHg. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a ativação de receptores A2A de adenosina podem favorecer o transporte reverso de colesterol, promovendo um aumento na expressão da proteína ABCA1 (do inglês *adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1*), a qual atua como uma proteína controladora da taxa de transporte de colesterol e fosfolipídeos dependente da apolipoproteína A1 ou HDL. Além disso, tem sido demonstrado que a ativação do receptor A2A promove um aumento na expressão da enzima colesterol-27-hidroxilase no fígado, responsável pela conversão do colesterol em oxiesteróis (27-hidroxicolesterol e ácido-3 $\beta$ -hidroxi-5-colestenóico) (VOLOSHYNA et al., 2013; BINGHAM et al., 2010; REISS et al., 2004), os quais são mais polares que o colesterol e conseqüentemente mais facilmente excretados. No fígado os oxiesteróis são potentes inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase, a HMGCoa redutase, enzima que catalisa o passo limitante na biossíntese *de novo* do colesterol (BJORKHEM et al., 1994). Assim, a ativação de receptores A2A de adenosina parece favorecer o transporte reverso de colesterol, aumentando a expressão de proteínas envolvidas com o transporte do colesterol de tecidos periféricos para o fígado e, além disso, aumentando a expressão de enzimas que promovem a degradação do colesterol facilitando sua eliminação. Diante do exposto, podemos sugerir que a inosina, atuando via receptores A2A de adenosina, pode estimular o transporte reverso de colesterol e assim prevenir a alteração nos níveis de lipídeos induzida pelo MeHg. Ademais, o tratamento com inosina preveniu, ao menos em parte, a lesão hepática induzida pelo MeHg, observada pela determinação da atividade sérica das enzimas ALT e AST, assim, não podemos descartar que isso esteja contribuindo para seu efeito na prevenção das alterações dos níveis de lipídeos induzida pelo MeHg, uma vez que o fígado é um dos principais locais onde ocorre a conversão do colesterol em metabólitos excretáveis.

Está consagrado na literatura que metais pesados, especialmente compostos mercuriais como o MeHg, apresentam efeito genotóxico. Diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição ao MeHg está relacionada com o desenvolvimento de processos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (Para revisão ver CRESPO-LÓPEZ et al., 2009), apresentando classificação 2B (possivelmente carcinogênico para humanos) pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (do inglês *International Agency for Research on Cancer – IARC*). Tem sido

sugerido que a exposição ao MeHg induz danos ao ADN e, neste sentido, parâmetros como, fragmentação do ADN, aberrações estruturais cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e MN, têm sido utilizados como biomarcadores do efeito genotóxico do MeHg (SILVA-PEREIRA et al., 2005; BETTI; DAVINI; BARALE, 1992; OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996; LEE et al., 1997). Assim, o ensaio do MN surgiu como um dos principais métodos para se investigar danos cromossômicos, uma vez que, permite avaliar de forma confiável tanto a perda de cromossomos quanto as quebras cromossômicas estruturais.

Considerando que o MN pode ser expresso apenas em células cuja divisão celular está completa, um método foi desenvolvido para identificar tais células pela sua aparência binucleada após bloqueio da sua citocinese pela citocalasina B. Este método permite identificar, baseando-se em critérios morfológicos os seguintes parâmetros indicativos de genotoxicidade e citotoxicidade: quebra cromossômica, perda cromossômica, rearranjo cromossômico, necrose e apoptose (FENECH et al., 2011; BONASSI et al., 2011; FENECH, 2008; FENECH, 2000; SCHMID, 1975; HEDDLE, 1973). De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que o MeHg é capaz de induzir a formação de MN *in vivo* (especialmente eritrócitos policromáticos obtidos da medula óssea), e *in vitro*, (cultura primária de linfócitos), corroborando para seu efeito genotóxico. Dessa forma, dados da literatura corroboram os resultados do presente estudo, que demonstram que o MeHg (10  $\mu$ M) é capaz de induzir a formação de MN em cultura primária de linfócitos humanos. Além da formação de MN, outros trabalhos têm revelado que o MeHg é capaz de induzir o aparecimento de outros parâmetros indicativos de seu efeito genotóxico em cultura de linfócitos (p.ex. aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs, redução do índice mitótico, entre outros), em doses semelhantes à utilizada no presente estudo (SILVA-PEREIRA et al., 2005; BETTI; DAVINI; BARALE, 1992; OGURA; TAKEUCHI; MORIMOTO, 1996; LEE et al., 1997). Assim, considerando o exposto acima e a potencialidade do MeHg em promover alterações epigenéticas, não pode ser descartada a hipótese de que o MeHg esteja promovendo tais alterações em linfócitos humanos, contribuindo para seu efeito genotóxico.

Alguns mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar o dano ao material genético promovido pelos compostos mercuriais e o seu conseqüente efeito genotóxico (Para revisão ver CRESPO-LÓPEZ et al., 2009). Neste sentido, um dos primeiros mecanismos descritos foi o dano ao ADN devido à ação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo estresse oxidativo induzido pelo

metal pesado. Por um lado, acredita-se que a ligação direta de espécies reativas de oxigênio aos ácidos nucleicos leva a geração de mutações gênicas (SCHURZ, F; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000). Assim, sugere-se que essas espécies reativas são capazes de induzir alterações conformacionais em proteínas responsáveis pela formação e manutenção do ADN, como, por exemplo, enzimas de reparo, ADN polimerases, e também em proteínas como a tubulina, responsáveis pela formação do fuso mitótico e segregação cromossômica (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005; STOIBER et al., 2004). Outra hipótese para o efeito genotóxico do mercúrio, é a sua ligação a proteínas formadoras dos microtúbulos, como a tubulina e cinesina, devido a sua forte interação com grupamentos sulfidrilas que constituem essas proteínas. Assim, o mercúrio interfere diretamente nos processos de formação do fuso mitótico, separação dos cromossomos e divisão nuclear, levando eventualmente a formação de MN (THIER et al., 2003; STOIBER et al., 2004). Ademais, o mercúrio pode influenciar diretamente mecanismos relacionados à reparação do material genético danificado e ainda ligar-se a moléculas que constituem o material genético, formando adutos com o ADN (STOHS; BAGCHI, 1995; LI; JIANG; YAN, 2006).

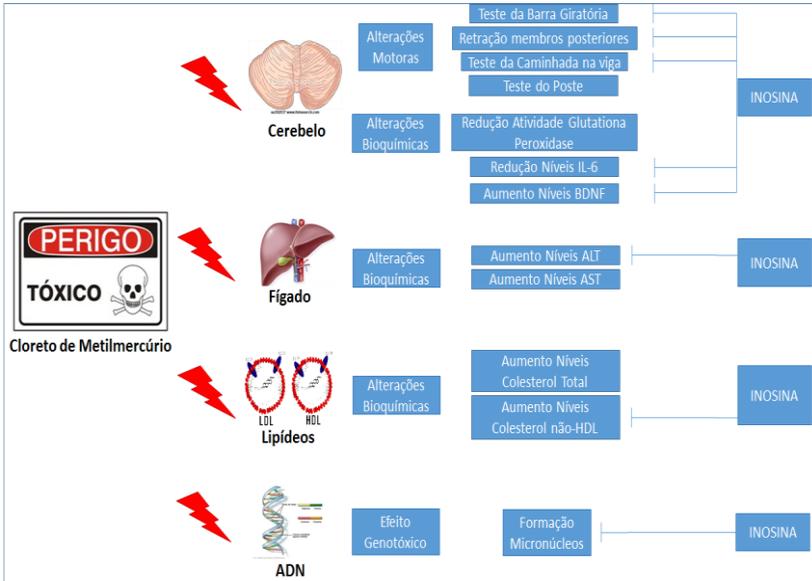
Diante do exposto, procurou-se investigar se a inosina seria capaz de prevenir o efeito genotóxico do MeHg, diante da formação de MN em cultura primária de linfócitos humanos. Segundo os dados apresentados, pode-se observar que a inosina (5  $\mu$ M) foi capaz de prevenir a formação de MN em cultura primária de linfócitos humanos exposta ao MeHg. Gudkov et al. (2009) demonstram que a inosina é capaz de prevenir a formação de MN em eritrócitos policromáticos obtidos da medula óssea de camundongos expostos a raios X. Além disso, os mesmos autores utilizaram o ensaio do cometa para demonstrar que a inosina é capaz de prevenir a fragmentação do DNA de linfócitos expostos a radiação X *in vitro*. Previamente, esses autores já haviam demonstrado que a inosina é capaz de proteger o ADN *in vitro* do dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio (GUDKOV et al., 2009). Em conjunto, esses dados da literatura corroboram nossos achados, e reforçam a hipótese da inosina apresentar um efeito antígeno-tóxico.

Tem sido sugerido que o efeito antígeno-tóxico da inosina frente à radiação X está relacionado a um reparo rápido e completo do material genético danificado. Buckley et al. (2005) demonstraram que o tratamento com inosina *in vivo* foi capaz de proteger células epiteliais alveolares do tipo 2 de ratos contra o dano ao ADN induzido por

hiperoxia. Os autores sugerem que o efeito protetor da inosina deve-se a um aumento na expressão da enzima 8-oxoguanina-ADN glicosilase, envolvida com reparo do ADN danificado. Somando-se a isso, o estudo de Gudkov et al. (2009) demonstrou que o efeito protetor da inosina parece depender da atividade da poli (ADP-ribose) polimerase, outra enzima envolvida com o reparo do ADN danificado nas células. Eles demonstraram que a nicotinamida, a qual inibe a atividade da poli (ADP-ribose) polimerase foi capaz de prevenir o efeito da inosina. Diante do exposto, podemos sugerir que os resultados encontrados em nosso trabalho, referentes à prevenção promovida pela inosina na formação de MN induzida pelo MeHg em cultura primária de linfócitos, podem estar relacionados à capacidade da inosina de ativar mecanismos responsáveis pelo reparo do material genético danificado [enzimas 8-oxoguanina-ADN glicosilase e poli (ADP-ribose) polimerase], ou ainda pela sua habilidade de proteger o ADN do dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio produzidas pelo MeHg.

A figura 14 representa resumidamente os resultados obtidos no presente trabalho. Em síntese, nossos dados demonstram que a inosina é uma ferramenta farmacológica com potencial para prevenir os diferentes efeitos decorrentes da exposição ao MeHg. Demonstramos, pela primeira vez, que a inosina foi capaz de prevenir algumas das alterações comportamentais e moleculares responsáveis pelo efeito neurotóxico do MeHg em camundongos, bem como, preveniu alguns efeitos deletérios desencadeados pela exposição ao metal pesado, como, por exemplo, efeitos hepatotóxicos, cardiovasculares e genotóxicos. Ainda assim, estudos adicionais são necessários para fortalecer o uso da inosina na prevenção da intoxicação por MeHg.

**Figura 14.** Esquema representativo dos efeitos promovidos pela inosina diante da exposição ao cloreto de MeHg.



Efeito tóxico: Efeito Protetor:

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

A inosina foi capaz de prevenir alterações motoras induzida pela exposição ao MeHg, sugerindo uma possível atividade neuroprotetora.

O efeito protetor da inosina parece ser mediado por receptores de adenosina.

A inosina foi capaz de prevenir algumas das alterações bioquímicas cerebelares induzidas pelo MeHg, especialmente a redução nos níveis de IL-6 e a elevação nos níveis de BDNF.

A inosina não foi capaz de prevenir a elevação nos níveis cerebelares de mercúrio decorrente da exposição ao MeHg, sugerindo que seu efeito protetor está relacionado ao impedimento do MeHg de acessar o cerebelo.

A inosina preveniu alterações bioquímicas a nível sérico (elevação na atividade da ALT e nos níveis de colesterol não-HDL) induzidas pelo MeHg, o que pode contribuir para seu efeito neuroprotetor.

A inosina preveniu o efeito genotóxico do MeHg, indicando uma possível atividade antígenotóxica.

## 7. Referências

ALLAIN, CC et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, v.20, n.4, Apr, p.470-5, 1974.

AMONPATUMRAT, S et al. L-glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative stress. *J Pharmacol Sci*, v.108, n.3, Nov, p.280–9, 2008.

ANDERSON, CM; SWANSON, RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, v.32, n.1, Oct, p.1–14, 2000.

ANDREWS, N et al. Retrospective Cohort Study in the United Kingdom Does Not Support a Causal Association. *Pediatrics*, v.114, n.3, Sep, p.584-591, 2004.

ANDRIOLO, A; BORGES, DR. Enzimologia clínica em doenças do fígado. *Rev Bras Patol Clin*, v.25, p.95-8, 1989.

AREMU, DA; MADEJCZYK, MS; BALLATORI, N. N-acetylcysteine as a potential antidote and biomonitoring agent of methylmercury exposure. *Environ Health Perspect*, v.116, n.1, Jan, p.26-31, 2008.

ARNOLD, AP et al. Chelation therapy for methylmercury(II) poisoning. Synthesis and determination of solubility properties of MeHg(II) complexes of thiol and dithiol antidotes. *J Inorg Biochem*, v.19, n.4, Dec, p.19-27, 1983.

ASCHNER, M et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res*, v.40, n.3, Mar, p.285–91, 2007.

ASCHNER, M. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int*, v.37, n.2–3, Aug-Sep, p.199–206, 2000.

ATCHISON, WD. Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction? *Trends Pharmacol Sci*, v.26, n.11, Nov, p.549-57, 2005.

ATSDR. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta,GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

AVIADO, DM. Effects of fluorocarbons, chlorinated solvents, and inosine on the cardiopulmonary system. *Environ Health Perspect*. v.26, Oct p.207-15, 1978.

AZEVEDO, FA; NASCIMENTO, ES; CHASIN, AAM. Mercúrio. In: *Metais: Gerenciamento da Toxicidade. Mercúrio*. São Paulo. 2003 p. 299-352.

BAKIR, F Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, v.181, n.4096, Jul, p.230-241, 1973.

BALDI, F. Microbial transformation of Mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of Mercury. *Met Ions Biol Syst*, v.34, p.213-57, 1997.

BALL, LK; BALL, R; PRATT, RD. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics*, v.107, n.5, Maio, p.1147-1154, 2001.

BALLATORI, N; CLARKSON, TW. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science*, v.216, n.4541, Apr, p.61-3, 1982.

BENOWITZ, LI et al. Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.23, Nov 9, p.13486-90, 1999.

BETTI, C; DAVINI, T; BARALE, R. Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. *Mutat Res*, v.281, n.4, Apr, p.255-60, 1992.

BINGHAM, TC. et al. A2A adenosine receptor stimulation decreases foam cell formation by enhancing ABCA1-dependent cholesterol efflux, *J Leukoc Biol* v.87, n.4, Apr, p.683–690, 2010.

BJORKHEM, I. et al. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, n.18, Aug, p.8592–8596, 1994.

BLUM, D, et al. Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. *Lancet Neurol*, v.2, n.6, Jun, p.366-74, 2003.

BOENING, DW. Ecological effects, transport, and fate of Mercury: a general review. *Chemosphere*, v.40, n.12, Jun, p.1335-1351, 2000.

BOFFETTA, P et al. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med*, v.58, n.7, Jul, p.461–466, 2001.

BOISON, DJ; CHEN F; FREDHOLM, BB. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ*, v.17, n.7, Jul, p.1071-82, 2010.

BONASSI, S et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, v.26, n.1, Jan, p.93-100, 2011.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.7, n.72, May, p.248-54, 1976.

BRICKLEY, SG; CULL-CANDY, SG; FARRANT, M. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J Physiol*. v.497, n.3, Dec, p.753-9, 1996.

BROOKES N; KRISTT, DA. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl<sub>2</sub> and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. *J Neurochem*, v.53, n.4, Oct, p.1228–37, 1989.

BUCKLEY, S. et al. In vivo inosine protects alveolar epithelial type 2 cells against hyperoxia-induced DNA damage through MAP kinase signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.288, n.3, Mar, 2005.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, v.7, n.7, Jul, p.575-90, 2008.

CARLBERG, I; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, v.113, p.484-90, 1985.

CARMINATI, GM. Demonstration of the cardiotropic action of inosine on the hypofunctioning isolated heart. *Boll Soc Ital Biol Sper*, v.30, n.39, Apr, p.468-70, 1963.

CARRUTHERS, AM et al. Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. *Mol Pharmacol*, v.59, n.6, Jun, p.1533-41, 2001.

CARTER, RJ et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, v.19, n.8, Apr, p. 3248–3257, 1999.

CARVALHO MC, et al. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology*, v.239, n.3, Oct, p.195-203, 2007.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. et al. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutat Res*, v.586, n.2, Oct, p.102–14, 2005.

- CECCATELLI, S; DARÉ, E; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact*, v.188, n.2, Nov, p.301–8, 2010.
- CHANG, JY. Methylmercury causes glial IL-6 release. *Neurosci Lett*, v.416, n.3, Apr , p.217-20, 2007.
- \_\_\_\_\_. Methylmercury-induced IL-6 release requires phospholipase C activities. *Neurosci Lett*. v.496, n.3, Jun, p.152-6, 2011.
- CHARBONNEAU, SM et al. Chronic toxicity of methylmercury in the adult cat. Interim report. *Toxicology*, v.5, n.3, Mar, p.337–49, 1976.
- CHEN, P et al. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.13, Jun 25, p.9031-6, 2002.
- CHENG, Y; JIANG DH. Therapeutic effect of inosine in Tourette syndrome and its possible mechanism of action. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi*, v.23, n.2, Apr, p.90-3, 1990.
- CHOI, DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, v.23, n.9, Nov, p.1261–76, 1992.
- CHOI, AL. et al. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environ. Health Perspect*, v.117, n.3, Mar, p.367–372, 2009.
- CLARKSON TW; MAGOS L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Ver Toxicol*, v.36, n.8, Sep, p.609–62, 2006.
- CLARKSON TW; MAGOS L; MYERS GJ. The toxicology of mercury current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*, v.349, n.18, Oct, p.1731-1737, 2003.
- CLARKSON, TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect*, v.110, Suppl. 1, Feb, p.11–23, 2002.

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

CLARKSON, TW; VYAS, JB; BALLATORI, N.  
Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med*, v.50, n.10, Oct, p.757-64, 2007.

CLEMENTS, CJ et al. Thimerosal in vaccines. *Lancet*, v.355, n.9211, Apr, p.1279–1280, 2000.

CORSINI, F; GRAZIA, G; MEI, V. Observations on the utilization of inosine on the part of the normal erythrocyte. *Clin Pediatr*, v.46, n.11, Nov p.931-43, 1964.

COURJARET, R; MIRAS-PORTUGAL, MT; DEITMER, JW.  
Purinergic modulation of granule cells. *Cerebellum*, v.11, n.1, Mar, p.62-70, 2012.

\_\_\_\_\_. TROGER, M; DEITMER, JW. Suppression of GABA input by A1 adenosine receptor activation in rat cerebellar granule cells. *Neuroscience*, v.162, n.4, Sep, p.946–58, 2009.

CRESPO-LÓPEZ ME, et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol Res*, v.60, n.4, Oct, p.212-20, 2009.

CUNHA, RA et al. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des*, v.14, n.15, p.1512-24, 2008.

da ROCHA LAPA, F et al. Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2A and A3 receptors. *Purinergic Signal*, v.9, n.3, Sep, p.325-36, 2013.

DALY, JW; BUTTS-LAMB, P; PADGETT, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with

caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol*, v.3, n.1, Mar, p.69-80, 1983.

de FREITAS, AS et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury- induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull*, v.79, n.1, Apr, p.77–84, 2009.

DIETRICH, MO et al. Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, v.19, n.1, Jan, p.169–75, 2005.

DIXON, AK et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol*, v.118, n.6, Jul, p.1461-8, 1996.

DOLPHIN, AC, FORDA, SR, SCOTT, RH. Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol*, v.373, Apr, p.47-61, 1986.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, v.62, n.6, Dec, p.649–71, 2000.

DUNHAM, NW; MIYA, TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)*. v.46, n.3, Mar p.208-9, 1957.

DUNWIDDIE, TV; MASINO, SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, v.24, p.31-55, 2001.

EKINO, S et al. Methylmercury causes diffuse damage to the somatosensory cortex: how to diagnose Minamata disease. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, v.109, n.5, p.420–37, 2007.

ERTA, M; QUINTANA, A; HIDALGO, J. Interleukin-6 a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, v.8, n.9, p. 1254–1266, 2012.

FARINA, M et al. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol Sci*, v.73, n.1, May, p.135–40, 2003.

FARINA, M et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol*, v.57, n.11, Nov, p.1503–8, 2005.

FARINA, M; ASCHNER, M; ROCHA, JB. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.256, n.3, Nov, p.405-17, 2011.

\_\_\_\_\_. ROCHA, JB; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci*, v.89, n.15-16, Oct, p.555-63, 2011.

FATOKUN, AA; STONE, TW; SMITH, RA. Adenosine receptor ligands protect against a combination of apoptotic and necrotic cell death in cerebellar granule neurons. *Exp Brain Res*, v.186, n.1, Mar, p.151-60, 2008.

\_\_\_\_\_. STONE, TW; SMITH, RA. Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: Mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. *Brain Res*, v.1132, n.1, Feb, p.193-202, 2007.

FEATHERSTONE, DE. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. *ACS Chem Neurosci*, v.1 n.1, Jan, p.4–12, 2010.

FENECH, M et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res*, v.534, n.1-2, Jan, p.45-64, 2003.

\_\_\_\_\_. The in vitro micronucleous technique. *Mutat Res*, v.455, n.1-2, Nov, p.81-95, 2000.

\_\_\_\_\_. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v.26, n.1, Jan, p.25-32, 2011.

\_\_\_\_\_. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods Mol Biol*, v.410, p.185-216, 2008.

FEOKTISTOV, I; BIAGGIONI, I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol*, v.61, p.115-44, 2011.

FINK, JS et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Mol Brain Res*, v.14, n.3, Jul, 186–195, 1992.

FITZGERALD, WF; CLARKSON, TW. Mercury and Monomethylmercury: Present and Future Concerns. *Envir. Health Perspec*, v.96, Dec, p.159-166, 1991.

FLEMING, SM et al. Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Neuroscience*, v.142 n.4, Nov, p.1245-53, 2006.

FRANCO, JL et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol*, v.20, n.12, Dec, p. 1919–26, 2007.

\_\_\_\_\_. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med*, v.47, n.4, Aug, p.449–457, 2009.

FREDHOLM, BB et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, v.53, n.4, Dec, p.527–552, 2001.

\_\_\_\_\_. Nomenclature and classification of purinoceptors: a report from the IUPHAR subcommittee. *Pharmacol Rev*, v.46, n.2, Jun, p.143–156, 1994.

\_\_\_\_\_. CUNHA, RA; SVENNINGSSON, P. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem*, v.3, n.4, p.413-26, 2003.

GELAIN, DP et al. Extracellular inosine is modulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protects sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. *Free Radic Res*, v.38, n.1, Jan, p.37-47, 2004.

GLASER, V et al. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology*. v.31, n.5, Sep, p.454-460, 2010.

\_\_\_\_\_. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. *Chem Biol Interact*. v.206, n.1, Oct, p.18-26, 2013

GOMES, CV et al. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, v.1808, n.5, May, p.1380-99, 2011.

GOMEZ, G; SITKOVSKY, MV. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood*, v.102, n.13, Dec 15, p.4472-8, 2003.

GOODKIN, HP et al. Preserved simple and impaired compound movement after infarction in the territory of the superior cerebellar artery. *Can J Neurol Sci*, v.20, n.3, May, p.S93-S104, 1993.

GRAEME, AK; POLLACK, CV. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *J Emerg Med*, v.16, n.1, Feb, p.45-56, 1998.

GREENBERG, GR. De novo synthesis of hypoxanthine via inosine-5-phosphate and inosine. *J Biol Chem*. v. 190, n.2, Jun, p.611-31, 1951

GRUSSER-CORNEHLS, U. Response of flocculus and vestibular nuclei neurons in weaver mutant mice (B6CBA wv:wv) to combined head and body rotation. *Exp Brain Res*, v.107, n.1, p.26-33, 1995.

GUDKOV, SV et al. Guanosine and inosine as natural geneprotectors for mice blood cells exposed to X-rays. *Radiats Biol Radioecol*, v.46, n.6, Nov-Dec, p.713-8, 2006.

\_\_\_\_\_. Protection of mice against X-ray injuries by the post-irradiation administration of guanosine and inosine. *Int J Radiat Biol*, v.85, n.2, Feb, p.116-25, 2009.

GUNTZ, E et al. Expression of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the rat lumbar spinal cord and implications in the modulation of N-methyl-d-aspartate receptor currents. *Anesth Analg*, v.106, n.6, Jun, p.1882-9, 2008.

HAMANN, M; ROSSI, DJ; ATTWELL, D. Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron*, v.33, n.4, Feb, p.625-33, 2002.

HANSEN, JC; DANSCHER, G. Organic mercury na environmental therat to the health of dietary-exposed societies? *Rev Environ Health*, v.12, n.2, p.107-116, 1997.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol*, v.25, n.1, p.1-24, 1995.

HASKO, G et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A<sub>2A</sub> receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J*, v.14, n.13, Oct, p.2065-74, 2000.

\_\_\_\_\_. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*, v.164, n.2, Jan 15, p.1013-9, 2000.

\_\_\_\_\_. SITKOVSKY, MV; SZABÓ, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci*, v.25, n.3, Mar, p.152-7, 2004.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. Toxicology, occupational medicine and environmental series. Englewood: Micromedex, 2000.

HEDDLE, JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat Res*, v.18, n.2, May, p. 187–192, 1973.

HERRUP, K; WILCZYNSKI, SL. Cerebellar cell degeneration in the leaner mutant mouse. *Neuroscience*, v.7, n.9, p.2185-2196, 1982.

HSIEH, HL, YANG; CM. Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. *Biomed Res Int*, v.2013, article ID 484613, 2013.

HVIID, A et al. Association Between Thimerosal – Containing Vaccine and Autism. *JAMA*, v.290, n.13, Oct, p.1763-1766, 2003.

INOUYE, M; MURAO, K; KAJIWARA, Y. Behavioral and neuropathological effects of prenatal methylmercury exposure in mice. *Neurobehav Toxicol Teratol*, v.7, n.3, Maio-Jun, p.227–32, 1985.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC). Scientific Division, Working Group on enzymes. Methods for measurement of catalytic concentration of enzymes. *Clin Chi Acta*, v. 281, v.1-2, p.S5-S39, 1999.

JACOBSON, KA; GAO, ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, v.5, n.3, Mar, p.247-64, 2006.

JIN, X et al. Dietary selenium (Se) and vitamin E (V(E)) supplementation modulated methylmercury-mediated changes in markers of cardiovascular diseases in rats. *Cardiovasc. Toxicol*, v.12, n.1, Mar, p.10–24, 2012.

JIN, X et al. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest*, v.100, n.11, Dec 1, p.2849-57, 1997.

JONES, BJ; ROBERTS, DJ. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, v.20, n.4, p.302–4, 1968.

JUHASZ-NAGY, A; AVIADO, DM. Inosine as a cardiogenic agent that reverses adrenergic beta blockade. *J Pharmacol Exp Ther*, v.202, n.3, Sep, p.683-95, 1977.

KAUR, P; ASCHNER, M; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl Mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *Neurotoxicology*, v.27, n.4, Jul, p.492–500, 2006.

KERPER, LE; BALLATORI, N; CLARKSON, TW. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol*, v.262, n.5 Pt 2, May p.R761–5, 1992.

KINGMAN, A; ALBERTINI, T; BROWN, LJ. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res*, v.77, n.3, Mar, p.461-71, 1998.

KITAMURA, S et al. Epidemiological investigation of the unknown central nervous disorder in the Minamata district. *Kumamoto Med J*, v.31, n.1, p.1–9, 1957.

KLEINZELLER, A. Adenosine- and inosine-nucleotides in the phosphorus metabolism of muscle. *Biochem J*, v.36, n.10-12, Dec, p.729-36, 1942.

KOBAYASHI, H et al. Neuropharmacological effect of methylmercury in mice with special reference to the central cholinergic system. *Jpn J Pharmacol*, v.31, n.5, Oct, p.711–8, 1981.

KOCSIS, JD; ENG, DL; BHISITKUL, RB. Adenosine selectively blocks parallel-fiber-mediated synaptic potentials in rat cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.81, n.20, Oct, p.6531–4, 1984.

LEE, CH. et al. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. *Mutat Res*, v.392, n.3, Aug, p.269–76, 1997.

LI, Y; JIANG, Y; YAN, XP. Probing mercury species–DNA interactions by capillary electrophoresis with on-line electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Anal Chem*, v.78, n.17, Sep, p.6115–20, 2006.

LINDBERG, SE et al. Synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio*, v.36, n.1, Feb, p.19-32, 2007.

LONDOS, C; COOPER, DM; WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.77, n.5, Maio, p.2551-4, 1980.

LUCENA, GM et al. *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.101, n.2, Aug, p.127-31, 2007.

MACDONALD, RL; SKERRITT, JH; WERZ, MA. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J Physiol*, v.370, Jan, p.75-90, 1986.

MACEDO-JUNIOR, SJ et al. Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K<sup>+</sup> channels, and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the antinociceptive effect of inosine. *Purinergic Signal*, v.9, n.1, Mar, p.51-8, 2013.

MANTO, M et al. Consensus Paper: Roles of the Cerebellum in Motor Control—The Diversity of Ideas on Cerebellar Involvement in Movement. *Cerebellum*, v.11, n.2, Jun, p.457-87, 2012.

MARAGAKIS, NJ; ROTHSTEIN, JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol*, v.58, n.3, Mar, p.365–70, 2001.

MARTON, AP et al. Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. *Int J Mol Med*, v.8, n.6, Dec, p.617-21, 2001.

MATTSSON, JL et al. Early effects of methylmercury on the visual evoked response of the dog. *Neurotoxicology*, v.2, n.3, Nov, p.499–514, 1981.

MELDRUM, BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, v.130, n.4S Suppl, Apr, p.1007S–15S, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Segurança química: mercúrio. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>. Acesso em: 03/02/2014.

MOREIRA, EL. Does Methylmercury-Induced Hypercholesterolemia Play a Causal Role in Its Neurotoxicity and Cardiovascular Disease? *Toxicol Sci*, v.130, n.2, Dec, p.373-82, 2012.

MORETTO, MB et al. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg<sub>2</sub><sup>+</sup>. *Toxicology*, v.214, n.1–2, Oct, p.57–66, 2005.

MORI, N; YASUTAKE, A; HIRAYAMA, K. 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*, v.81, n.11, Nov, p.769–76, 2007.

MOTTA, VT. *Bioquímica Clínica: princípios e interpretações*. Editora: Médica Massau, 2000.

MÜLLER CE; JACOBSON, KA. Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol*, v.200, p.151-99, 2011.

MURATA, et al. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child development: messages from the newborn. *Tohoku J Exp Med*, v.213, n.3, Nov, p.187–202, 2007.

NAÇÕES UNIDAS. Programa Ambiental das Nações Unidas. Convenção de Minamata sobre Mercúrio. Minamata. 2013.

NASCIMENTO, FP et al. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, v.334, n.2, Aug, p.590-8, 2010.

NI, M et al. Glia and methylmercury neurotoxicity. *J Toxicol Environ Health*, v.75, n.16-17, p.1091-101, 2012.

NIELSEN, JB; ANDERSEN, O. The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury--effect of selenomethionine. *Toxicology*, v.74, n.2-3, Sep, p.233-41, 1992.

NOGUCHI, Y et al. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLoS One*, v.8, n.2, e57898, 2013.

ONISHCHENKO, N et al. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem*. v.106, n.3, p.1378-87, 2008.

OGAWA, N et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, v.50, n.3, Dec, p.435-441, 1985.

OGURA, H; TAKEUCHI, T; MORIMOTO, K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat Res*, v.340, Feb, p.175-82, 1996.

PEAKMAN, MC; HILL, SJ. Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol*, v.111, n.1, Jan, p.191-8, 1994.

- PERRY, TA et al. Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene. *Alzheimer's Res*, v.1, p.5–14, 1995.
- PFEIFER, WC et al. Ameaça de mercúrio nos garimpos. *Ciência Hoje*, v.11, n.61, p.12-16, 1990.
- PORCIUNCULA, LO et al. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport*, v.14, n.4, Mar, p.577–80, 2003.
- QUEIROZ, IR. Determinação de metilmercúrio em peixes de região de garimpo. 1995. 109 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RAKIC, P; SIDMAN, RL. Sequence of developmental abnormalities leading to granule cell deficit in cerebellar cortex of weaver mutant mice. *J Comp Neurol*, v.152, n.2, Nov, p.103-132, 1973.
- RALEVIC, V; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v.50, n.3, Sep, p.413-92, 1998.
- RAMESH, G; MacLEAN, AG; PHILIPP, MT. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm*, v.2013, article ID 480739, 2013.
- REISS, AB. et al. Adenosine A2A receptor occupancy stimulates expression of proteins involved in reverse cholesterol transport and inhibits foam cell formation in macrophages. *J Leukoc Biol*, v.76, n.3, Sep, p.727-34, 2004.
- REYNOLDS, IJ; HASTINGS, TG. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci*, v.15, n.5 Pt 1, May, p.3318–27, 1995.

REYNOLDS, JN; RACZ, WJ. Effects of methylmercury on the spontaneous and potassium-evoked release of endogenous amino acids from mouse cerebellar slices. *Can J Physiol Pharmacol*, v.65, n.5, May, p.791–8, 1987.

RIBEIRO, JA; SEBASTIÃO, A.M; de MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*, v.68, p.377–392, 2003.

\_\_\_\_\_. SEBASTIÃO, AM; de MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*, v.68, n.6, Dec, p.377-92, 2002.

RISSANEN, T et al. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: The Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation*, v.102, n.22, Nov, p.2677–2679, 2000.

RITCHIE, KA et al. Health and neuropsychological functioning of dentists exposed to mercury. *Occup Environ Med*, v.59, n.5, Maio, p.287-93, 2002.

ROOS, DH et al. Complex methylmercury-cysteine alters mercury accumulation in different tissues of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.107, n.4, Oct, p.789-92, 2010.

\_\_\_\_\_. Modulation of methylmercury uptake by methionine: prevention of mitochondrial dysfunction in rat liver slices by a mimicry mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.252, n.1, Apr, p.28–35, 2011.

SAKAUE, M et al. Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor in vitro. *Brain Res*, n.1273, Jun, p.155-62, 2009.

SALA-NEWBY, GB; SKLADANOWSKI, AC; NEWBY AC. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J Biol Chem*, v.274, n.25, Jun 18, p.17789-93, 1999.

SALLSTEN, G et al. Long-term use of nicotine chewing gum and mercury exposure from dental amalgam fillings. *J Dent Res*, v.75, n.1, Jan, p.594-98, 1996.

SALONEN, JT et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*, v.91, n.3, Feb, p.645-655, 1995.

\_\_\_\_\_. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: A population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis*, v.148, n.2, Feb, p.265-273, 2000.

SAWYNOK, J; LIU, X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*, v.69, n.5, Apr, p.313-40, 2003.

\_\_\_\_\_. REID A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. *Eur J Pharmacol*, v.330, n.2-3, Jul 9, p.115-21, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat Res*, v.31, n.1, Feb, p. 9-15, 1975.

SCHULTE, G; FREDHOLM, BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*, v.15, n.9, Sep, p.813-27, 2003.

SCHURZ, F; SABATER-VILAR, M; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis*, v.15, n.6, Nov, p.525-30, 2000.

SHEN, H et al. Inosine reduces ischemic brain injury in rats. *Stroke*, v.36, n.3, Mar, 654-9. 2005.

SHOOK, BC; JACKSON, PF. Adenosine A2A Receptor Antagonists and Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci*, v.2, n.10, Oct, p.555-67, 2011.

SILVA-PEREIRA, LC. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res*, v.38, n.6, Jun, p.901-7, 2005.

SMITH, JM et al. Inosine promotes recovery of skilled motor function in a model of focal brain injury. *Brain*, v.130, n.Pt 4, Apr, p.915-25, 2007.

SOCIETY OF TOXICOLOGY. Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology. Disponível em: <http://www.toxicology.org/ai/air/air6.asp>. Acesso em: 03/02/2014.

SPICER, SS; BOWEN, WJ. Reactions of inosine-and adenosinetriphosphates with actomyosin and myosin. *J Biol Chem*, v.188, n.2, Feb, p.741-51. 1951.

STOHS, SJ; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, v.18, n.2, Feb, p.321-36, 1995.

STOIBER, T. et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutat Res*, v.563, n.2, Oct, p.97-106, 2004.

STONE, TW; CERUTI, S; ABBRACCHIO, MP. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol*, v.193, p.535-87, 2009.

STRINGARI, J et al. Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. *Neurochem Res*, v.31, n.4, Apr, p.563-9, 2006.

\_\_\_\_\_. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.227, n.1, Feb, p.147–54, 2008.

SWINNY, JD; VAN DER WANT, JJ; GRAMSBERGEN, A. Cerebellar Development and Plasticity: Perspectives for Motor Coordination Strategies, Motor Skills, and Therapy. *Neural Plast*, v.12, n.2-3, p.153-60, 2005.

TAKAHASHI, RN; PAMPLONA FA; PREDIGER, RD. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front Biosci*, v.13, Jan 1, p.2614-32, 2008.

TAKEUCHI, T et al. The outbreak of Minamata disease (methyl mercury poisoning) in cats on Northwestern Ontario reserves. *Environ Res*, v.13, n.2, Apr, p.215–28, 1977.

THIER, R. et al. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol Lett*, v.140–141, Apr, p.75–81, 2003.

TINCANI, GP; TRALDI, A. Treatment of myocardial insufficiency with utp and inosine. *Minerva Cardioangiol*, v.11, Sep, p.553-6, 1963.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. Silver Spring, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/fdama/mercuryreport.htm>. Acesso em: 05/01/2014.

UNITED STATES OF AMERICA. Environmental Protection Agency. Mercury Study Report to Congress, Washington, DC: EPA, 1997.

VAN CALKER, D; MULLER, M; HAMPRECHT, B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature*, v.276, n.5690, Dec 21-28, p.839-41, 1978.

\_\_\_\_\_. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, v.33, n.5, Nov, p.999-1005, 1979.

VAN GALEN, PJM et al. A binding site model and structure-activity relationships for the rat A3 adenosine receptor. *Mol Pharmacol*, v.45, n.6, Jun, p.1101–1111, 1994.

VANHOUTTE, P; BADING, H. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol*, v.13, n.3, Jun, p.366-71, 2003.

VOLOSHYNA, I. et al. Adenosine A2A receptor activation supports an atheroprotective cholesterol balance in human macrophages and endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1831, n.2, Feb, p.407-16, 2013.

WALLENFELDT, K et al. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically health men. *J Intern Me*, v.256, n.5, Nov, p. 413-420, 2004.

WANG, JQ; FIBUCH, EE; MAO, L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem*, v.100, n.1, Jan, p.1-11, 2007.

WARE, WR. High cholesterol and coronary heart disease in younger men: The potential role of stress induced exaggerated blood pressure response. *Med Hypotheses*, v.70, n.3, Aug, p.543–547, 2008.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, v.77, p.325-33, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Inorganic mercury. *Environmental Health Criteria* 118. Geneva. 1991.

\_\_\_\_\_. Methylmercury. *Environmental Health Criteria* 101. Geneva. 1990.

\_\_\_\_\_. Mercury – environmental aspects. Environmental Health Criteria 86. Geneva. 1989.

WORMSER, U et al. Protective effect of a novel peptide against methylmercury-induced toxicity in rat primary astrocytes. *Neurotoxicology*, v.33, n.4, Aug, p.763-8, 2012.

WU, MM et al. Effects of inosine on axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Neurosci Lett*, v.341, n.1, Apr 24, p.84-6, 2003.

XU, F et al. Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain Res*, v.1121, n.1, Nov, p.22-34, 2006.

YAMASHITA, T et al. Inhibitory effect of  $\alpha$ -tocopherol on methylmercury-induced oxidative stress. *Environ Health Prev Med*, v.9, n.3, May, p.111-7, 2004.

YE, L et al. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem*, v.125, n.6, p.897–908, 2013.

YIN Z, et al. The methylmercury-Lcysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem*, v.107, n.4, Nov, p.1083–90, 2008.

ZHOU, QY et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.16, Aug 15, p.7432-6, 1992.

ZHU, H et al. 4-Hydroxy-2-nonenal upregulates endogenous antioxidants and phase 2 enzymes in rat H9c2 myocardial cells: protection against overt oxidative and electrophilic injury. *Free Radic Res*, v.40, n.8, Aug, p.875–84, 2006.

