

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

**EFEITOS NEUROTÓXICOS DO METILMERCURIO EM MODELOS EXPERIMENTAIS  
COM CAMUNDONGOS: SUSCEPTIBILIDADE SEXO-DEPENDENTE E POTENCIAL EFEITO  
PROTETOR DOS ESTRÓGENOS**

**KELLER SAMARA MALAGUTTI**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina  
Departamento de Bioquímica**

**FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 2007**

**“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original”.**

**(Albert Einstein)**

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial à minha família por estar sempre ao meu lado, acreditando em mim, me apoiando e incentivando em todos os momentos. Obrigado por todo amor e compreensão. Esta conquista é dedicada a vocês.

Ao meu orientador, professor Marcelo Farina, agradeço pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e por todos os conhecimentos transmitidos. Muito obrigada pela paciência, dedicação e pelo exemplo de ética e profissionalismo, que com certeza serão de importância fundamental em minha caminhada.

À Aline pela ajuda nos trabalhos, por me acolher em sua casa, pela amizade por sua alegria contagiante e sua risada inesquecível.

Aos meus amigos do laboratório Aline, Hugo, Jéferson, James, agradeço pela amizade, companheirismo e pela ajuda em todos os trabalhos, pelos ensinamentos na área bioquímica. Sem ajuda de vocês este trabalho não seria possível.

Aos meus colegas de trabalho Ernani, Gilmar, Flávia e Camila, muito obrigada pelo apoio e pela compreensão das minhas ausências.

A todos os meus amigos que direta, ou indiretamente estiveram presentes neste período me dando apoio e amizade.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação pela constante dedicação que sempre me atendeu.

A todos os professores da Pós-Graduação em Neurociências pelos ensinamentos transmitidos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. O Mercúrio e seu Ciclo Global	01
1.2. A Exposição Humana a Mercuriais	
02	
1.3. Efeitos Neurotóxicos do Metilmercúrio	05
1.4. Mecanismos de Neurotoxicidade - Metilmercúrio	06
1.5. Mecanismos de Defesas Antioxidantes	09
1.6. O Sistema Endócrino	11
1.7. Os Hormônios Esteróides	13
1.8. Estrógenos e Neuroproteção	15
1.9. Potenciais Mecanismos de Neuroproteção mediada pelos Estrógenos	16
1.10. Neurotoxicidade do MeHg: Susceptibilidade Sexo-Dependente	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
3.1. Objetivos Gerais	28
3.1.2. Objetivos Específicos	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
4.1. Animais	29
4.2. Tratamento	29
4.3. Testes Comportamentais	30
4.3.1. Campo Aberto	30
4.3.2. Rotarod	31
4.4. Análises Bioquímicas	32
4.4.1. Preparação Tecidual	32
4.4.2. Lipoperoxidação	32
4.4.3. Avaliação da Glutathiona Reduzida	32
4.4.4. Avaliação da atividade Glutathiona Peroxidase	33

4.4.5. Avaliação da atividade Glutathiona Redutase	33
4.4.6. Dosagem de Proteínas	34
4.5. Análise Estatística	34
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
5.1. Testes Comportamentais	36
5.2. Análises Bioquímicas	38
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÕES FINAIS</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - adenilato ciclase  
AMPA -  $\alpha$  amino-3 hydroxi-5methyl-4-isoxazole propionic acid  
AMPc - monofosfato de adenosina cíclico  
 $Ca^{2+}$  - cálcio  
CAM - cinase dependente de  $Ca^{2+}$  - calmodulina  
CRE - elemento de resposta ao AMPc.  
CREB - proteína de ligação ao elemento de responsivo ao AMPc  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
DTNB - ácido 5,5 – ditiobis – 2 – nitrobenzóico  
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético  
EPA - Environmental Protection Agency  
ERE - elementos de resposta ao estrogênio  
ERK - proteína cinase regulada por sinal extracelular  
EROs - espécies reativas de oxigênio  
GPx - glutathiona peroxidase  
GR - glutathiona redutase  
GSH - glutathiona reduzida  
GSSG - glutathiona oxidada  
GST - glutathiona-S-transferase  
 $H_2O_2$  - peróxido de hidrogênio  
HG - Mercúrio  
HEPES – ácido n-2- hidroxietilpiperazina  
 $HO_2^-$  - radical hidroperoxila  
L. - radical lipídico  
OMS – organização mundial de saúde  
OSHA - Occupational Safety and Health Administration  
MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos  
MDA – malondialdeído  
MeHg - metilmercúrio  
NaCl - cloreto de sódio

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídio  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
NPSH - grupos tióis não-protéicos  
NR15 – Norma Regulamentadora do Ministério do Trabalho e Emprego  
 $O_2^{\cdot-}$  - radical superóxido  
 $OH^{\cdot}$  - radical hidroxil  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PKA - proteína cinase A  
RNA – ácido ribonucléico  
RE – receptores estrogênicos  
RE-x - receptor estrogênico x  
-SH - grupos sulfidrílicos (grupo tiol)  
SNC - sistema nervoso central  
t - BOOH - peróxido de ter-butila  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA - ácido tricloroacético  
TFK - tampão fosfato de potássio  
TNB - ânion ácido 2 – nitro-5- mercapto- benzóico  
TRIS – tris-(hidroximetil)- aminoetano  
 $\epsilon$  - coeficiente de extinção molar

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1:</b> Ingesta líquida dos animais durante o tratamento	35
<b>Figura 1:</b> Ciclo Global do Mercúrio	02
<b>Figura 2:</b> Exposição Humana ao Metilmercúrio a partir da ingestão de Peixes	04
<b>Figura 3:</b> Controle Hormonal Hipotalâmico	12
<b>Figura 4:</b> Estrutura Química dos Hormônios Esteróides	14
<b>Figura 5:</b> Possíveis Mecanismos envolvidos na Neuroproteção pelo $\beta$ -estradiol	17
<b>Figura 6:</b> Mecanismo clássico de ação de estrógenos em receptores estrogênicos	19
<b>Figura 7:</b> Representação das principais vias envolvidas na fosforilação de CREB	23
<b>Figura 8:</b> Ilustração da caixa de Campo Aberto (open field)	30
<b>Figura 9:</b> Ilustração do aparato de Rotaroad	31
<b>Figura 10:</b> Efeitos da administração oral de MeHg sobre o desempenho motor de camundongos machos e fêmeas	36
<b>Figura 11:</b> Efeito da administração oral de MeHg sobre a locomoção de camundongos machos e fêmeas	37
<b>Figura 12:</b> Efeito da administração oral de MeHg sobre a peroxidação lipídica cerebelar	38



<b>Figura 13:</b> Efeito da administração oral de MeHg sobre os níveis cerebelares de glutathione de camundongos machos e fêmeas	39
<b>Figura 14:</b> Efeito da administração oral de MeHg sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase cerebelar de camundongos machos e fêmeas	40
<b>Figura 15:</b> Efeito da administração oral de MeHg sobre a atividade da enzima glutathione reductase cerebelar de camundongos machos e fêmeas	41

## Resumo

Neste estudo, investigou-se a neurotoxicidade induzida pela exposição oral ao metilmercúrio (MeHg) em camundongos Swiss adultos (machos e fêmeas), assim como o potencial efeito protetor da castração e da administração do hormônio estrógeno 17 $\beta$ -estradiol (somente nos machos) contra tal neurotoxicidade. Neurotoxicidade e neuroproteção foram avaliadas baseando-se na análise de parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo no cerebelo e comportamentais relacionados ao desempenho motor. Foram utilizados 36 animais (24 machos e 12 fêmeas), divididos em 6 grupos de 6 animais cada, totalizando quatro grupos de machos e dois grupos de fêmeas. Um grupo de machos e um grupo de fêmeas serviram como controles; os animais receberam água de torneira *ad libitum* como única fonte de líquido. Os animais dos demais grupos receberam uma solução de MeHg (40 mg/L, dissolvido em água de beber) como única fonte de líquido, *ad libitum*, durante 21 dias. Animais de um grupo de machos expostos ao MeHg foram castrados 14 dias antes do início do tratamento com MeHg. Animais de um outro grupo de machos receberam injeções do hormônio 17 $\beta$ -estradiol (dose 10  $\mu$ g/animal, subcutaneamente) em dias alternados, durante 28 dias, sendo que este tratamento foi iniciado 07 dias antes da exposição ao MeHg. Após o período de tratamento, a atividade locomotora espontânea e a coordenação motora dos animais foram avaliadas através dos testes do campo aberto e rotarod, respectivamente. A exposição ao MeHg promoveu alterações na locomoção e coordenação motora destes animais, sendo que este efeito mostrou-se mais acentuado nos machos. Estes efeitos foram prevenidos parcial ou totalmente pela castração e pelo tratamento com 17 $\beta$ -estradiol. Nas análises bioquímicas realizadas no cerebelo dos animais, foram investigados os efeitos do MeHg na peroxidação lipídica, nos níveis de glutathiona e na atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Os resultados destas análises mostraram aumento significativo da peroxidação lipídica em animais machos expostos ao MeHg, mas não nas fêmeas. Os níveis de glutathiona mantiveram-se inalterados em todos os grupos. A avaliação da atividade enzimática revelou que a exposição ao MeHg promoveu uma diminuição da atividade GPx nos machos, mas não nas fêmeas, sendo que este efeito foi prevenido pelo tratamento com 17 $\beta$ -estradiol e, de forma parcial, pela castração. A atividade GR mostrou-se significativamente aumentada nos machos tratados com MeHg e este efeito foi totalmente prevenido pela castração e parcialmente prevenido pela administração do hormônio 17 $\beta$ -estradiol. Estes dados indicam que camundongos Swiss são sensíveis à exposição ao MeHg, o qual induz dano oxidativo cerebelar e alteração no desempenho motor. Também indicam uma maior resistência das fêmeas a tal fenômeno e um possível efeito neuroprotetor do hormônio 17 $\beta$ -estradiol e da castração na toxicidade induzida por este xenobiótico em machos.

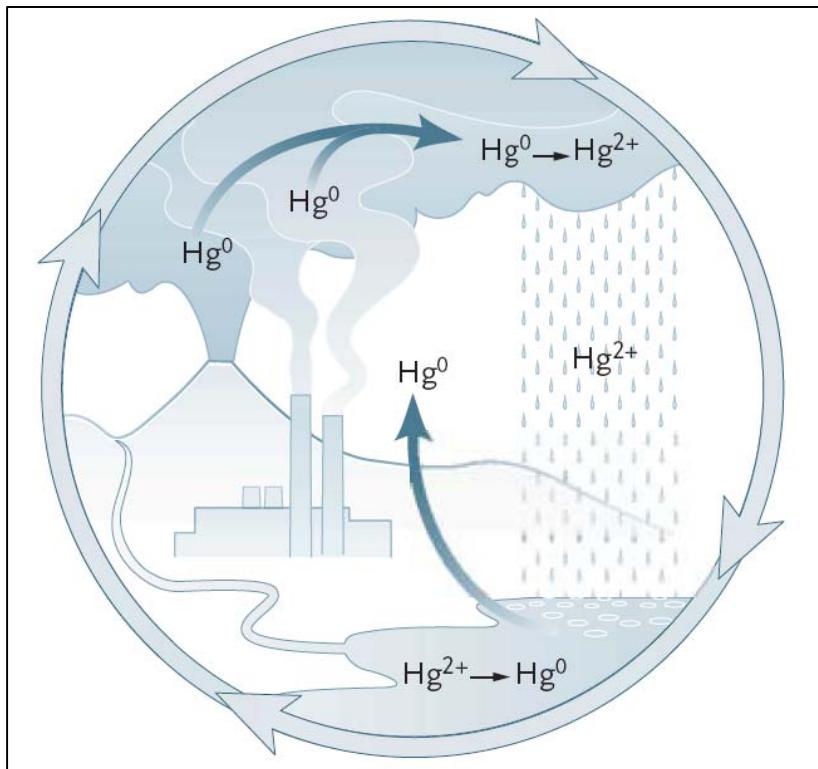
## Abstract

In this study, the potential neurotoxicity induced by oral methylmercury (MeHg) exposure in adult Swiss mice (male and female) were investigated, as well as the potential protective effects of castration and 17 $\beta$ -estradiol administration (only in males) against such neurotoxicity. Neurotoxicity and neuroprotection were evaluated based on biochemical parameters related to cerebellar oxidative stress and behavioral parameters related to the motor performance. Thirty six animals (24 males and 12 females) were divided into 6 groups with 6 animals each: 4 groups of males and 2 groups of females. One group of males and another group of females were used as controls; animals received tap water *ad libitum* as exclusive liquid source. Animals from the other groups received a MeHg solution (40 mg/L, diluted in tap water) as exclusive liquid source, *ad libitum*, during 21 days. Male individuals from one group received subcutaneous injections of the hormone 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ g/animal) in alternate days, during 28 days: treatment started 7 days before MeHg exposure. Animals from another group of males were castrated at 2 weeks before MeHg treatments. After the treatments, locomotor activity and motor performance were evaluated based on the open field and the rotarod tasks, respectively. MeHg exposure decreased locomotion and motor performance, but such phenomenon was higher in males. These events were partially or totally prevented by castration and 17 $\beta$ -estradiol administration. With respects to the biochemical parameters, cerebellar lipid peroxidation, glutathione levels, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities were evaluated. The results showed a significant increase in lipid peroxidation in male mice exposed to MeHg, but did not in females. Cerebellar glutathione levels were not changed by treatments. MeHg exposure induced a decrease in cerebellar GPx activity in males, but did not in females; such phenomenon was totally prevented by 17 $\beta$ -estradiol administration and partially prevented by castration. Cerebellar GR activity was increased in MeHg-exposed males and such event was totally prevented by castration and partially prevented by 17 $\beta$ -estradiol administration. These results indicate that Swiss mice are sensitive to MeHg exposure, which induces cerebellar oxidative damage and changes in the motor performance. The results also indicate a lower susceptibility of female when compared to male mice and potential neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol administration and castration against the neurotoxicity elicited by MeHg in males.

## 1.1. O MERCÚRIO E SEU CICLO GLOBAL

O mercúrio (Hg) é um elemento químico do grupo IIb (metais de transição) da tabela periódica. Chamado pelos antigos de ágyros khytós, que significa “prata derretida” (por sua semelhança, em aspecto e cor, com o metal nobre). Possui como propriedades físicas as seguintes características: número atômico igual a 80, massa atômica igual a 200, congela a  $-38,87^{\circ}$  C e entra em ebulição a  $356,9^{\circ}$  C (Magos, 1997). O mercúrio é um poderoso toxicante ambiental que pode ser encontrado no ambiente sob três diferentes formas químicas: vapor de mercúrio elementar, sais inorgânicos de mercúrio e compostos orgânicos de mercúrio (Clarkson, 1997). Muitas fontes antropogênicas deste metal têm sido identificadas, tais como a queima do carvão, a incineração de lixo e a extração de ouro (Cleary, 1990).

Na natureza, o vapor de mercúrio ( $\text{Hg}^0$ ), um gás monoatômico e estável, evapora da superfície terrestre (solo e águas) e é emitido por vulcões (Figura 1). Após aproximadamente um ano, o vapor de mercúrio é convertido em uma forma solúvel ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e retorna à terra na água da chuva. Este pode ser convertido novamente em vapor de mercúrio pela ação de microorganismos aquáticos ou terrestres, sendo re-emitido para a atmosfera. Desta forma, o mercúrio pode re-circular por longos períodos. O mercúrio depositado nos sedimentos aquáticos é convertido em metilmercúrio (MeHg) pela ação de microorganismos aquáticos, entrando na cadeia alimentar aquática. O MeHg atinge as mais altas concentrações em peixes predadores de vida longa tais como tubarões (Clarkson et al., 2003).



**Figura 1: O ciclo global do mercúrio. Fonte: Clarkson et al., (2003).**

## **1.2. A EXPOSIÇÃO HUMANA A MERCURIAIS**

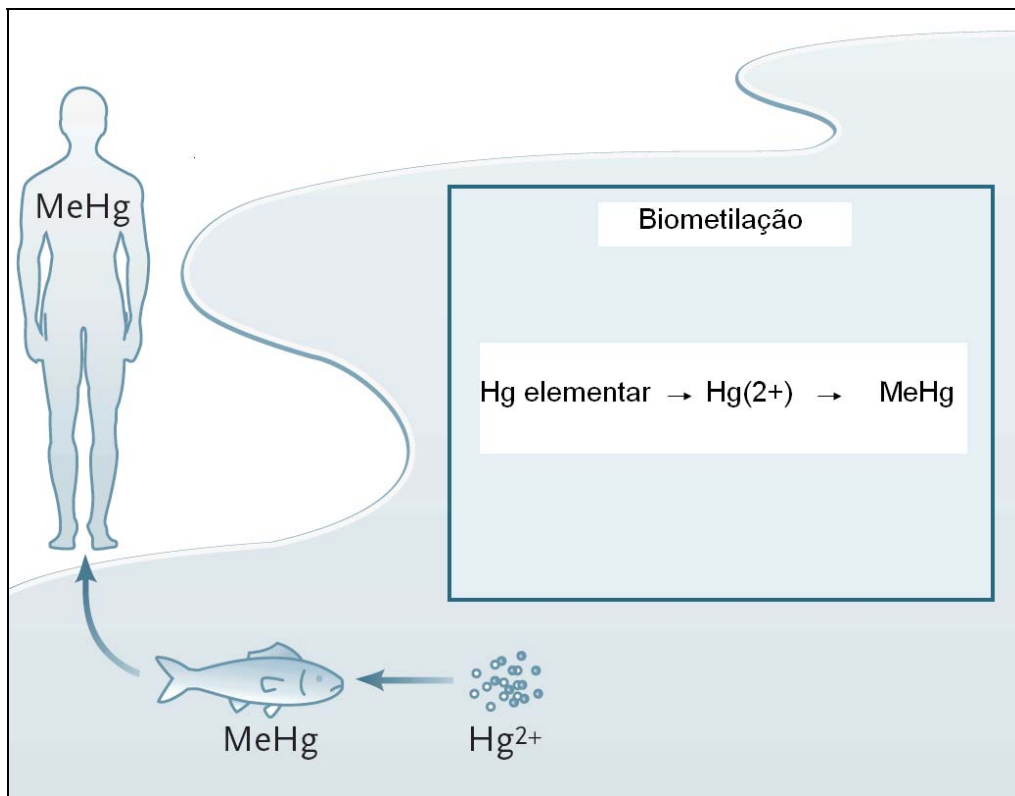
O uso do mercúrio em processos industriais e na produção de agentes terapêuticos tem sido relatado desde a idade média na China, Egito, Grécia e Roma. Concomitantemente, a intoxicação por este metal tem sido relatada desde há no mínimo 2000 anos atrás (23-79 D.C. *Naturae Historiarum Libri*), referindo-se à intoxicação de mineiros pelo composto cinabar ( $\text{HgS}$ ), na região de Almaden, Espanha (Rackman, 1952).

Historicamente, a intoxicação por mercúrio tem sido principalmente ocupacional. No século 18, descreveram-se doenças ocupacionais desenvolvidas por trabalhadores expostos ao mercúrio (Goldwater, 1936).

Tanto o mercúrio elementar quanto o mercúrio inorgânico eram bastante utilizados em processos industriais. No século 16, o composto calomel ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , cloreto mercurioso) foi introduzido como um tratamento para a sífilis (Laguna, 1955). A administração médica de mercúrio foi muito

praticada até o século 20. Os mercuriais foram apresentados como potenciais agentes terapêuticos para catarata, sífilis e como diuréticos (Ernst & Coon, 2001). Algumas destas preparações, que se tornaram populares nos países ocidentais, excediam as concentrações máximas permitidas por agências reguladoras (WHO - Organização Mundial da Saúde, 1991). Amalgamas dentárias, que liberam pequenas quantidades de mercúrio (vapor de mercúrio elementar e íons inorgânicos), parecem ser uma fonte significativa para a exposição humana ao mercúrio. Entretanto, os limites de segurança para tal fonte de exposição ainda são controversos (Dodes, 2001; Clarkson, 2002).

Embora o vapor de mercúrio elementar e sais inorgânicos foram bastante importantes no que se refere à intoxicação por mercuriais até a metade do século 20, o caso mais sério de contaminação humana já causada pelo mercúrio ocorreu na Baía Japonesa de Minamata, na década de 50. Na ocasião, o mercúrio (em sua forma inorgânica) foi lançado ao mar por uma indústria química japonesa, a Chisso Chemical Corporation. A contaminação da fauna marinha em Minamata foi a causa direta da intoxicação humana, já que as comunidades vizinhas à baía tinham, como principal dieta, peixes e frutos do mar. Neste caso, a exposição humana ocorreu devido à conversão do mercúrio inorgânico em MeHg, pela ação de microorganismos aquáticos, entrando na cadeia alimentar aquática (Figura 2). Os habitantes contaminados desenvolveram os sintomas de uma enfermidade que se tornou conhecida como “doença de Minamata” (Sanfeliu et al., 2003). Esta patologia afeta o sistema nervoso central (SNC), causando parestesia em membros, fraquezas musculares, deficiências visuais, dificuldades de fala, paralisia e morte. O metilmercúrio (MeHg) também atinge os fetos durante a gestação, sendo que fetos de mães aparentemente saudáveis podem ser gravemente afetados. Um grande número de crianças com deformidades causadas pela doença foi registrado nos anos que se seguiram à catástrofe japonesa. Neste episódio, 1.435 pessoas morreram e ainda hoje, mais de 20.000 vítimas contaminadas recebem indenizações (Ninomiya et al., 1995; Watts, 2001).



**Figura 2: Exposição humana ao mercúrio a partir da ingestão de peixes. Adaptado de Clarkson et al., (2003).**

Nas décadas de 60 e 70, após a descoberta da propriedade antifúngica de certos compostos de mercúrio, este passou a ser utilizado em lavouras de grãos, especialmente de trigo. Após esta disseminação do uso dos compostos de mercúrio como antifúngicos, foram registrados muitos casos de contaminação humana ao mercúrio em vários países em desenvolvimento (WHO - Organização Mundial da Saúde, 1976). Os casos mais recentes ocorreram no Iraque, na década de 70, onde mais de 6 mil indivíduos contaminados foram admitidos em hospitais em decorrência da exposição ao mercúrio presente em grãos de trigo. Particularmente, estudos epidemiológicos sugerem que mais de 40 mil pessoas foram contaminadas com este elemento neste episódio (Bakir, 1973).

### 1.3. EFEITOS NEUROTÓXICOS DO METILMERCÚRIO

O metilmercúrio (MeHg) é um composto orgânico de mercúrio conhecido por seus efeitos neurotóxicos em animais e humanos (Clarkson,, 1983). Conforme descrito previamente (Figura 2), a exposição ao MeHg ocorre principalmente através do consumo de peixes provenientes de águas contaminadas com este elemento, onde o mercúrio inorgânico é metilado por bactérias presentes no ecossistema aquático e entra na cadeia alimentar sob a forma de MeHg, atingindo níveis elevados em peixes predadores (Grandjean et al., 1995; Marsh et al., 1995).

Um grande esforço tem sido destinado para caracterizar os efeitos neurotóxicos da exposição ao MeHg utilizando modelos animais, como primatas e roedores, ou através de estudos epidemiológicos com humanos (Elsner et al. 1988; Burbacher et al., 1990; Goldey et al., 1994; Grandjean et al., 2003). Neste contexto, estudos realizados em macacos expostos in utero ao MeHg mostram alterações no desenvolvimento físico, cognitivo e social durante a infância e adolescência (Burbacher et al., 1990). Em roedores, estudos mostram que a exposição ao MeHg pode levar a alterações nas funções motoras, sensoriais e cognitivas. Déficits no comportamento exploratório, tremores e diminuição da habilidade de firmar as patas traseiras também foram observados em camundongos adultos tratados com MeHg (Elsner et al.,1988; Goldey et al., 1994). Crianças expostas pré-natalmente ao MeHg mostraram danos no desenvolvimento mental e motor com variações nos graus de retardo psicomotor (Clarkson, 1983). Algumas evidências correlacionam a exposição transplacentar e através do leite materno ao MeHg com efeitos neurotóxicos em animais e humanos (Grandjean et al., 2003; Manfroi et al., 2004). Ainda, alguns experimentos revelaram que a exposição pré-natal ao MeHg pode causar danos motores e cognitivos que persistem na fase adulta (Gimenez-Lort et al., 2001). Diversos estudos realizados em animais expostos ao MeHg no período pós-natal de desenvolvimento rápido, evidenciaram alterações locomotoras e uma grande vulnerabilidade cerebelar aos efeitos neurotóxicos e pró-oxidativos do MeHg nesta fase (Stringari et al., 2005).



Vários estudos epidemiológicos e experimentais com adultos demonstraram alterações locomotoras, cognitivas, comportamentais e bioquímicas após a exposição a altas doses de MeHg (Harbison 1977; Magos et al., 1985). Testes em roedores mostraram diminuição da atividade locomotora espontânea possivelmente relacionada a déficits de coordenação em camundongos adultos expostos ao MeHg (Myers et al., 2000). Concordando com estes dados, Dietrich e colaboradores (2004) afirmam que a exposição oral ao MeHg induz danos motores em camundongos adultos. Em humanos adultos, sintomas clínicos como parestesia, disartria, e ataxia foram observados após exposição ao MeHg (Myers et al., 2000). Análises em pacientes do desastre de Minamata, no Japão, demonstraram atrofia cerebelar e diminuição do fluxo sanguíneo no cerebelo inferior (Rossi et al., 1996).

A exposição de humanos e animais ao MeHg demonstra claramente uma vulnerabilidade do SNC aos seus efeitos tóxicos, sendo que o cerebelo a região parece ser a região mais afetada (Chang et al., 1980; Murakami, 1972). De acordo com estes dados, Chang e colaboradores (1977) e Choi e colaboradores (1981) relatam desenvolvimento anormal do cerebelo, principalmente das células granulo cerebelares após tratamento com MeHg.

#### **1.4. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE – METILMERCÚRIO**

Alguns dados sugerem que vários mecanismos podem explicar a grande heterogeneidade de sintomas observados na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (Aschner, 2007). Alguns deles serão descritos a seguir.

##### **1.4.1. Interação com grupos tióis**

A grande afinidade dos compostos mercuriais por grupos tióis (-SH) serve como base para explicar a ocorrência de vários efeitos biológicos do MeHg (Hughes, 1957). Nas reações de associação e dissociação, o mercúrio pode se mover de uma proteína ou molécula que contém grupo

tiol para outras. Os mercuriais inibem a ação de algumas enzimas celulares; esta inativação pode estar relacionada à sua ligação com grupos sulfidrílicos e pode ser revertida por compostos tiólicos (Okamura-Ikeda et al., 1985; Fonfria et al., 2001). O MeHg é capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica e sua ligação com grupos sulfidrílicos endógenos facilita sua entrada no cérebro através do sistema de transporte de L-aminoácidos neutros (Aschner & Clarkson, 1988). Por este mesmo sistema, o MeHg também cruza a placenta e atinge o feto quando o sistema nervoso em desenvolvimento é especialmente sensível aos seus efeitos neurotóxicos (Kajiwara et al., 1996).

#### **1.4.2. Neurotoxicidade induzida pelo Glutamato**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e está presente na maioria das sinapses (Cotman et al., 1981; Ozawa et al., 1998). Além do seu papel fundamental em vários processos fisiológicos como aprendizado e memória, em situações patológicas, como doenças neurodegenerativas e isquemias, a hiperativação do sistema glutamatérgico, como observado no excesso de glutamato liberado, leva à toxicidade celular, chamada de excitotoxicidade (Lipton & Rosenberg, 1994). Neste contexto, sabe-se que o MeHg pode aumentar a sensibilidade à toxicidade induzida pelo N-metil-D-aspartato (NMDA), um agonista glutamatérgico. A estimulação do receptor glutamatérgico ionotrópico NMDA é essencial durante a diferenciação e migração das células grânulo-cerebelares (Farrant et al., 1994; Rossi & Slater, 1993), e esse aumento à sensibilidade ao NMDA pode levar à morte celular ao invés de diferenciação normal (Rossi et al., 1997).

Um estudo recente *in vitro* demonstrou um efeito inibitório do MeHg na captação de glutamato por fatias cérebro-corticais em camundongos (Farina et al., 2003), apontando para a excitotoxicidade como um dos mecanismos de toxicidade do MeHg. Esta hipótese já havia sido confirmada por Aschner e colaboradores (2000), onde o MeHg inibiu a captação de glutamato por astrócitos cultivados, sugerindo que o MeHg leva a um aumento da concentração de glutamato extracelular. Em 2002,

Juarez e colaboradores observaram um aumento da concentração de glutamato extracelular no córtex frontal de ratos expostos ao MeHg. O MeHg induz a hiperativação dos receptores glutamatérgicos, dentre eles os do tipo NMDA, gerando assim um influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Este acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  causa morte celular através da ativação de enzimas proteolíticas, disfunções mitocondriais, alterações no citoesqueleto de células nervosas e geração de espécies reativas de oxigênio, que causam danos estruturais aos componentes celulares (Lafon-Cazal et al., 1993). Por outro lado, as espécies reativas de oxigênio que são geradas na presença de MeHg podem inibir o transporte de aminoácidos excitatórios nos astrócitos, causando excitotoxicidade (Allen et al. 2001).

Além do sistema glutamatérgico, outros sistemas também parecem estar envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg. Experimentos in vivo mostraram redução da resposta motora a agonistas de receptores da dopamina (Gimenez-Lort et al., 2001), indicando que a exposição ao MeHg pode afetar a função motora mediada pela dopamina durante a maturação do sistema dopaminérgico e seus receptores (Wilson et al., 1996). De acordo com estes dados, um estudo realizado por Daré e colaboradores mostrou alterações nos subtipos de receptores D1 e D2 de dopamina no estriado de ratos expostos ao MeHg. Pequenas concentrações de MeHg também podem alterar os receptores GABA estriatais como observado em culturas de células granulo-cerebelares (Fonfria et al., 2001).

#### **1.4.3. Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo tem sido implicado em uma variedade de doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes e inflamatórias, além de estar envolvido na toxicidade induzida por metais (Lebel, 1991; Yee, 1996). O sistema nervoso é extremamente sensível ao estresse oxidativo devido à sua baixa quantidade de defesas antioxidantes, à alta atividade metabólica e às elevadas concentrações de compostos oxidáveis (Halliwell & Guttridge, 1985).

O estresse oxidativo está associado à acumulação de altos níveis de espécies reativas tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs),

ou diminuição da capacidade antioxidante. As EROs podem ser formadas a partir de radicais de oxigênio como o radical superóxido ou radical hidroxil, e também por moléculas não radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estas espécies reativas são altamente oxidantes e podem causar danos em proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, causando também peroxidação das membranas celulares (Aschner, 2007).

Neste contexto, sabe-se que o MeHg pode levar a um aumento dos níveis de espécies reativas nos sistemas biológicos e este fenômeno parece envolver tanto a produção direta de tais espécies quanto a diminuição de suas detoxificações (Aschner, 2007). Um importante mecanismo pelo qual o MeHg leva a um aumento de espécies reativas é através de sua ação na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. De fato, o MeHg interage diretamente com os complexos mitocondriais responsáveis pela respiração celular causando dano oxidativo na mitocôndria (Yee & Choi, 1996). Além disso, enzimas antioxidantes do sistema glutaciona (glutaciona peroxidase e glutaciona redutase) parecem ser alvos moleculares relacionados aos efeitos neurotóxicos do MeHg (Franco et al., 2006). Sabe-se também que a geração de óxido nítrico é bastante aumentada após a indução da enzima óxido-nítrico-sintase neuronal em decorrência da exposição ao MeHg (Shinyashiki et al., 1998; Ikeda et al., 1999) e que a alta produção desta molécula pode levar ao dano oxidativo cerebral (Sanfeliu et al., 2003).

## **1.5. MECANISMOS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES**

Em sistemas aeróbicos, o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes (como as EROs) e o sistema de defesa antioxidante é essencial. De fato, para proteger-se dos efeitos deletérios de EROs, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que este cause lesão. Esta linha é constituída por glutaciona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutaciona-peroxidase (GPx) e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo

constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GR) e pela GPx, entre outros. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Hebbel, 1986; Ross et al, 1991).

O sistema antioxidante da glutathiona (GSH) representa um alvo molecular envolvido na neurotoxicidade induzida pelo MeHg. A GSH é um tripeptídeo que contém glutamato, cisteína e glicina e seu sítio ativo é representado por um grupo tiol (sulfidrila ou -SH) de um resíduo de cisteína. Este tripeptídeo tem sido identificado como essencial para muitos processos celulares, principalmente na detoxificação dos peróxidos de hidrogênio, peróxidos orgânicos e radicais livres (Lomaestro & Malone, 1995). A GSH participa também de muitas funções celulares como a modulação da proliferação celular, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa das enzimas (Paolicchi et al., 2002) e possui um importante papel na regulação da apoptose (Hall, 1999).

A função antioxidante da glutathiona depende primariamente do seu papel como um componente das vias enzimáticas que a célula possui para neutralizar as espécies reativas de oxigênio, sendo substrato para a enzima GPx na detoxificação de peróxidos orgânicos e de hidrogênio. A GPx catalisa a conversão de peróxidos orgânicos e de hidrogênio à H<sub>2</sub>O, oxidando duas moléculas de GSH formando assim glutathiona oxidada (GSSG). Para recuperar a glutathiona reduzida, a enzima glutathiona redutase (GR) utiliza equivalentes redutores de NADPH para converter GSSG novamente em duas moléculas de GSH (Dringen, 2000).

A glutathiona pode existir intracelularmente tanto na forma oxidada (GSSG) quanto na forma reduzida (GSH), sendo que a manutenção da razão GSH:GSSG (aproximadamente 100:1) é crucial para a sobrevivência celular (Bains & Shaw, 1997).

A GSH é sintetizada tanto em neurônios como em células gliais, sendo mais abundante nos astrócitos. No SNC, sua atividade antioxidante nos tecidos neurais é de extrema importância devida à alta geração de espécies reativas de oxigênio. A GSH parece prover neuroproteção contra excitotoxicidade por aminoácidos excitatórios, além de modular receptores

ionotrópicos controlando as correntes transmembrana e também possui ação neuromoduladora em muitas vias neurais (Dringen, 2000).

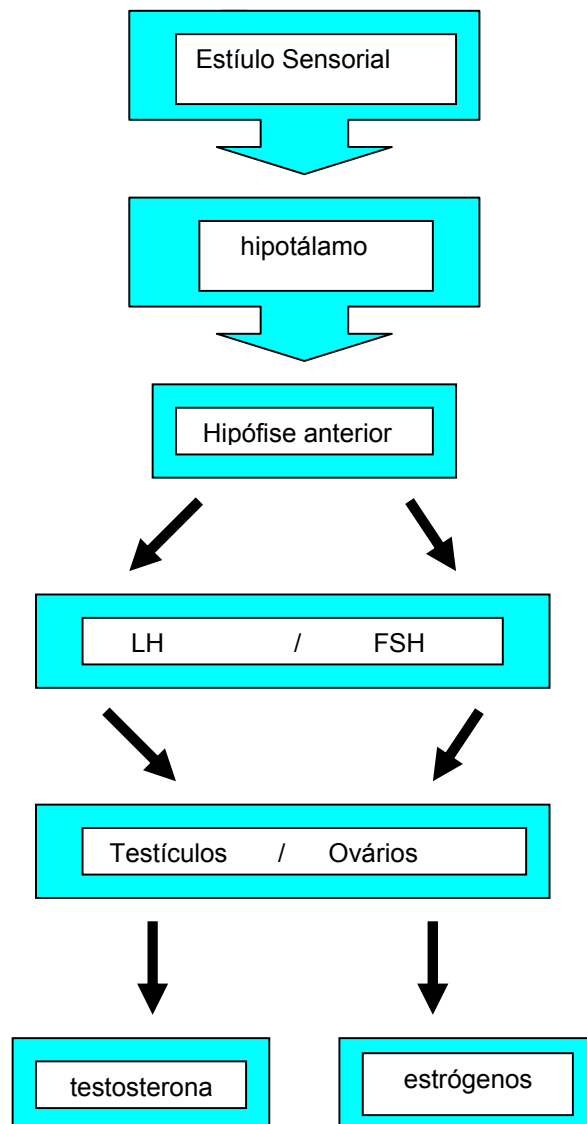
Análises bioquímicas mostraram uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, dos níveis de glutathiona, e um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no SNC de animais expostos ao MeHg (Yu & Choi 1996). O MeHg diminui os níveis de GSH e a atividade da enzima GPX. Estas duas moléculas são consideradas uma defesa primária que previne as demais macromoléculas do dano oxidativo (Vicente et al., 2004). A diminuição da atividade desta enzima parece resultar no aumento da peroxidação lipídica e morte celular nos cérebros de animais expostos ao MeHg (Farina et al., 2005; Franco et al., 2006).

## **1.6. O SISTEMA ENDÓCRINO**

O sistema endócrino é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como a tireóide, as gônadas e as glândulas supra-renais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina (Ankley et al., 1998; Birkett et al., 2003).

Hormônios são substâncias químicas (mensageiros) produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas e que, lançadas na corrente sangüínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Algumas funções que controlam são: atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e lípidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução, suas características sexuais, etc (Shimada et al., 2001; Birkett et al., 2003; Lintelmann et al., 2003; Ghiselli, 2003). O controle da produção e secreção hormonal acontece principalmente através do eixo hipotálamo-hipófise. Através de um estímulo sensorial o hipotálamo age sobre a hipófise anterior ou posterior, estimulando a produção de hormônios que ativam outras glândulas, estimulando a produção de hormônios específicos. No caso dos hormônios esteróides, através do estímulo hipotalâmico, a hipófise anterior produz dois

hormônios: luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH), que são responsáveis por funções como a produção de espermatozóides e o controle do ciclo menstrual. Os hormônios LH e FSH agem sobre as gônadas (testículos e ovários), estimulando a produção de hormônios esteróides que podem agir em diversos órgãos e tecidos (figura 3).



**Figura 3: Controle Hormonal Hipotalâmico**

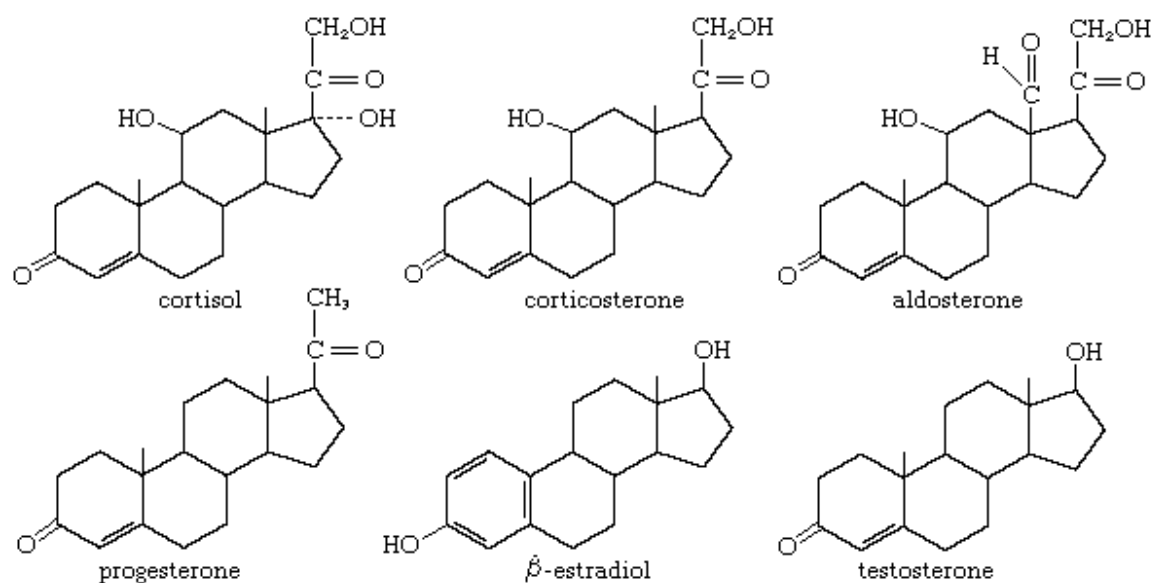
A ação de um determinado hormônio inicia-se através da sua ligação a um receptor específico, no interior de uma célula ou em receptores de membrana (Baird et al., 2002; Lintelman et al., 2003). Os mecanismos moleculares (ou de transdução de sinais) envolvidos na ação hormonal serão descritos posteriormente, enfatizando-se os hormônios esteróides.

### **1.7. OS HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Os hormônios esteróides possuem uma estrutura química baseada no núcleo esteróide e a maioria deles é derivada do colesterol (Figura 4). Estes hormônios são secretados pelo córtex adrenal (cortisol e aldosterona) ou pelas gônadas, sendo que os estrogênios e progesterona são secretados pelos ovários e a testosterona é secretada pelos testículos (Guyton & Hall, 2005).

A testosterona é um hormônio testicular fundamental, formado nas células intersticiais de Leydig, situadas entre os túbulos seminíferos testiculares. Após sua secreção, a testosterona circula na corrente sanguínea e é fixada aos tecidos ou degradada a produtos inativos que serão subsequentemente secretados. Em geral, a testosterona controla a produção de espermatozóides e é responsável também pelas características distintivas do corpo masculino (Litwack & Scimidt, 1997). Este hormônio também pode promover o aumento da síntese de proteínas, principalmente musculares, contribuindo para funções anabólicas.





**Figura 4: Estrutura Química dos Hormônios Esteróides.**  
 Fonte: <http://cache.eb.com/eb/image?id=6530&rendTypeld=4>

Existem dois tipos de hormônios sexuais femininos, os estrogênios e as progestinas. A mais importante das progestinas é a progesterona, que é secretada em quantidades significativas apenas durante a segunda metade do ciclo ovariano, quando é secretada pelo corpo lúteo. Os estrogênios são secretados em sua maior parte pelos ovários e uma pouca quantidade deste hormônio é secretada pelos córtices adrenais. Apenas três estrógenos estão presentes em quantidades significativas no plasma feminino: os hormônios β-estradiol, estrona e estriol. Pequenas quantidades de estrona são secretadas pelos ovários, mas a maior parte é formada nos tecidos periféricos a partir dos androgênios, secretados pelos córtices adrenais e pelas células tecais ovarianas (González et al., 2000). O estriol é um estrogênio fraco; é um produto oxidativo derivado do estradiol e da estrona. O principal estrogênio secretado pelos ovários é o β-estradiol. Este hormônio é produzido pelos ovários e atua no crescimento e desenvolvimento do organismo, é responsável pelo comportamento sexual, pelo desenvolvimento das características sexuais femininas e controlando também o ciclo reprodutivo.

Tanto o estradiol quanto a testosterona são produzidos já na vida fetal. Na infância, apenas uma pequena quantidade destes hormônios é produzida. Durante a puberdade, através do estímulo dos hormônios da hipófise anterior, esta produção aumenta, até por volta dos 50 anos de idade, quando começa novamente a decair.

Os estrogênios são lipofílicos e possuem baixo peso molecular, podendo cruzar livremente a barreira hemato-encefálica sem a necessidade de um sistema de transporte especializado. Tanto em homens quanto em mulheres, os estrógenos são sintetizados em várias áreas do sistema nervoso central pela conversão de androgênios a estrogênios pela ação da enzima aromatase (Brzowski et al., 1997). A testosterona é a molécula precursora da síntese dos estrógenos no sistema nervoso central e esta enzima, que é significativamente expressa no cérebro, é responsável por esta conversão (Willians & Satncel, 1996).

### **1.8. ESTRÓGENOS E NEUROPROTEÇÃO**

Vários estudos têm relatado a importância de hormônios estrógenos em relação ao sistema nervoso central. De fato, no sistema nervoso central em desenvolvimento, os estrógenos controlam a diferenciação e a plasticidade neuronal (Garcia-Segura et al, 2000) e o crescimento no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral (McEwen et al., 1999). No sistema nervoso central adulto, estes hormônios parecem regular a secreção de hormônios no hipotálamo e pituitária e atuam no controle do comportamento sexual (McEwen, 1982). Além disso, através da alteração dos níveis de neurotransmissores, receptores e segundo mensageiros, os estrógenos também podem prevenir más formações neuronais e esta regulação pode promover a sobrevivência dos neurônios e das ramificações dos dendritos (Garcia-Segura et al., 2000).

Efeitos neuroprotetores de hormônios estrógenos também têm sido relatados (Chetty et al., 2006). Alguns estudos realizados em células humanas mostraram efeitos protetores dos estrógenos em vários tipos de células neuronais seguidos de diferentes tipos de toxicidade, incluindo o

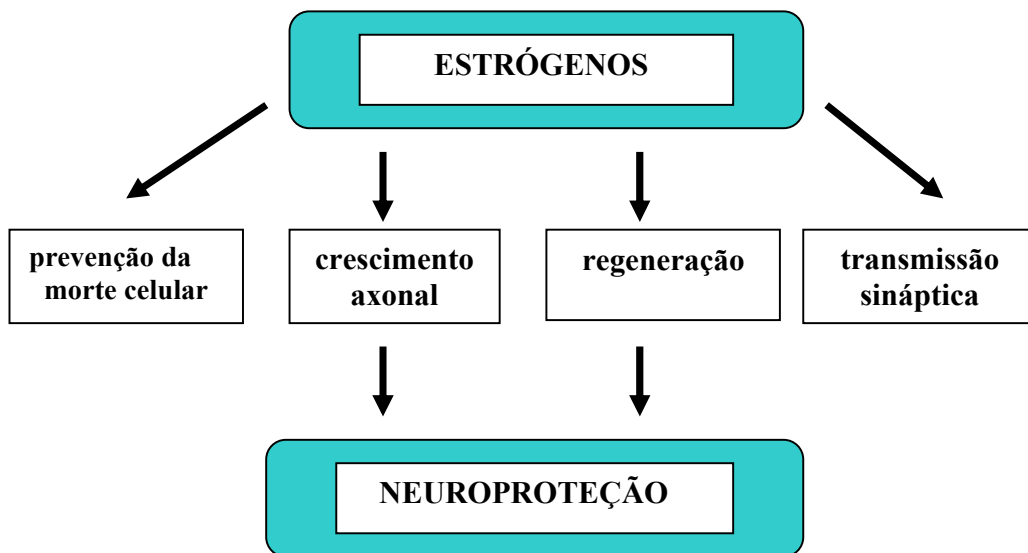
estresse oxidativo (Behl et al., 1995), toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (Behl et al., 1997) e excitotoxicidade (Goodman et al., 1996).

Estudos in vivo demonstram que o hormônio estradiol pode aumentar a viabilidade celular e a diferenciação de culturas primárias de células em diversos tipos de populações neuronais, incluindo neurônios hipotalâmicos (Chowen et al., 1992), neurônios da amígdala (Arimatsu & Hatanaka, 1986) e neurônios hipocâmpais (Brinton et al., 1997). Igualmente, há evidências de que o estradiol pode prevenir a morte celular induzida por diferentes estímulos nocivos, como o ferro (Vedder et al., 1999), a anóxia e a toxicidade do glutamato (Singer et al., 1996). Ainda, concordando com evidências clínicas, vários experimentos em animais mostram que este hormônio promove melhora da performance memorial em fêmeas: em um estudo realizado em ratas ovariectomizadas, a terapia de reposição de estrógenos promoveu melhora no desempenho dos tipos de memória dependentes dos sistemas estriatal e hipocâmpal (Rissanen et al., 1999).

### **1.9. POTENCIAIS MECANISMOS DE AÇÃO PARA A NEUROPROTEÇÃO MEDIADA POR ESTRÓGENOS**

Apesar dos estrógenos serem descritos como agentes neuroprotetores, os mecanismos pelos quais estes hormônios exercem a neuroproteção ainda não estão completamente esclarecidos. Todavia, alguns efeitos neuroprotetores dos estrógenos parecem estar relacionados com a ativação de receptores de estrógenos, o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, as interações com cascatas de segundos mensageiros, alterações na atividade glutamatérgica e atividade antioxidante (Green & Simpkins, 2000). Entretanto, a função exata de cada um destes eventos na neuroproteção induzida pelos estrógenos ainda precisa ser elucidada. De qualquer forma, sabe-se que estrógenos, tais como o estradiol, podem afetar diretamente a sobrevivência celular ou prevenir a morte celular pela ação nas cascatas de morte celular, promovendo sobrevivência celular pela indução do crescimento axonal de neurônios lesados através do aumento da regeneração das conexões

neurais e pela promoção da transmissão sináptica (Figura 5 - Garcia-Segura et al., 2000).



**Figura 5. Possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção pelo hormônio  $\beta$ -estradiol. Adaptado de Garcia-Segura et al., (2000).**

A seguir, serão abordados alguns fenômenos envolvidos na neuroproteção mediada por hormônios estrógenos.

### **1.9.1. Ativação de Receptores Estrogênicos**

O mecanismo de ação clássico do estrógeno ocorre através de sua interação com um dos dois tipos de receptores estrogênicos: tipo  $\alpha$  (RE  $\alpha$ ) e tipo  $\beta$  (RE  $\beta$ ), que agem como fatores de transcrição nuclear (Green et al., 1986; Kuiper et al., 1996). Cada tipo de receptor estrogênico é formado por vários domínios (Horvitz et al., 1996): (i) um domínio N-terminal altamente variável contendo uma região de trans-ativação que ativa a expressão de genes alvo pela integração com a maquinaria transcricional; (ii) um domínio ligante ao DNA envolvido na dimerização do receptor e na ligação específica ao DNA; (iii) um domínio complexo que também está envolvido na localização nuclear, na dimerização do receptor

e na interação com outros fatores transcricionais regulatórios. Os receptores do tipo  $\alpha$  e do tipo  $\beta$  possuem seqüências similares no DNA e nos domínios de ligação ao ligante. Quando um deles se liga ao estradiol, pode formar homo ou heterodímeros que, quando ligados aos elementos de resposta ao estrogênio (ERE) no DNA, recrutam outros componentes da maquinaria de transcrição para promover a expressão gênica (Webb, 1995). Quando ligado a algum tipo de receptor, o estradiol pode também ligar-se diretamente a um complexo que regula a expressão gênica através da ativação de outras proteínas, sendo que este mecanismo é independente dos EREs (figura 6).

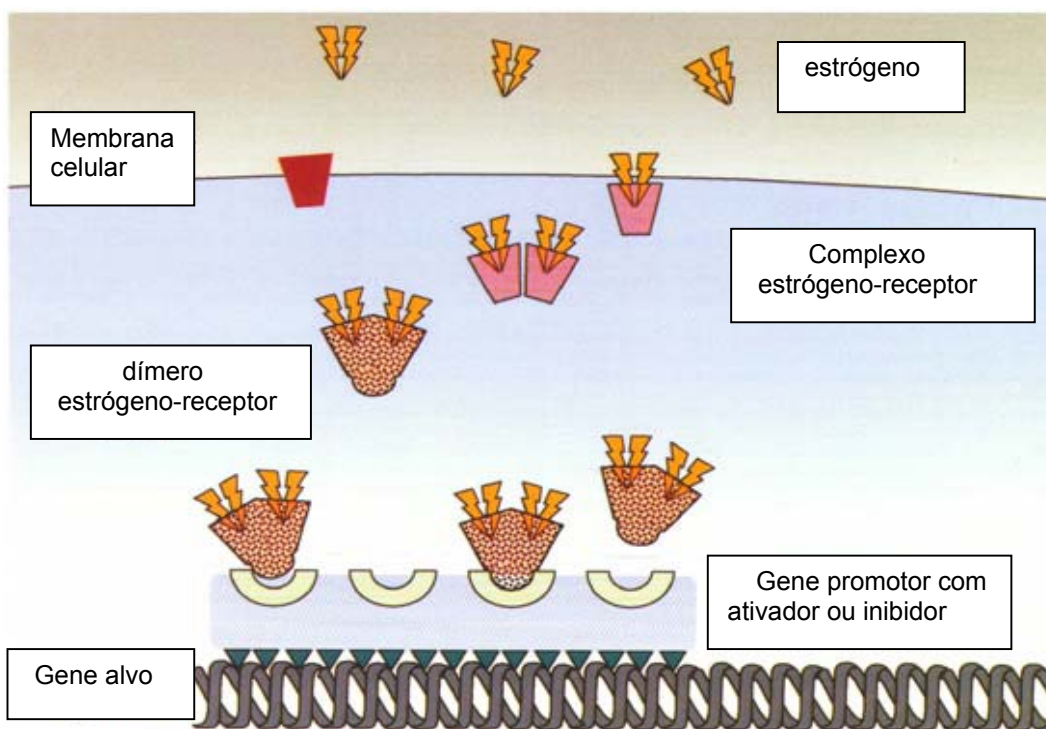
Diversos estudos *in vivo* foram realizados em fêmeas ovariectomizadas (para a remoção do ligante endógeno) que receberam injeção do hormônio na forma radioativa (Pfaff, 1973; Shshurue, 1998). Após autoradiografia, uma grande quantidade de receptores estrogênicos foi detectada nas estruturas límbicas e hipotalâmicas, consistente com os conhecidos efeitos dos estrógenos na fisiologia reprodutiva e no comportamento. Alguns estudos de expressão do RNA mensageiro para RE $\alpha$  e RE $\beta$  indicam uma pequena quantidade destes receptores em células piramidais e no hipocampo dorsal (Simerly et al., 1990; Shughrue et al., 1997). Em outros estudos, foi detectada a presença de receptores estrogênicos extranucleares, localizados nos axônios, dendritos, sinapses e também nas células da glia (Blaustein et al., 1992; Milner et al., 2001).

Várias evidências apontam para a existência de um terceiro tipo de receptor estrogênico extranuclear chamado receptor estrogênico X (RE-X) (Toran-allerand et al., 2002). A presença do RE-X foi observada primeiramente na membrana plasmática. Os efeitos cerebrais do estradiol dependentes deste tipo de receptor ocorrem principalmente durante o desenvolvimento e o mecanismo de ação do ER-X parece estar ligado à ativação MAPK (Toran-allerand et al., 2002).

Diversos estudos demonstram ações dos receptores estrogênicos na neuroproteção mediada pelos esteróides. Um estudo realizado por Gold e seus colaboradores (1999) mostrou que a ação neurotrófica do estradiol em culturas de células hipocâmpais é reduzida por algumas substâncias como a geldanamicina, que provoca a ruptura do complexo formado pelo

esteróide e seu receptor, indicando que os componentes deste complexo estão envolvidos nos efeitos neuroprotetores do estrógeno. Um estudo in vivo realizado por Azcoitia e seus colaboradores (1999) demonstrou que a administração intracerebroventricular de antagonistas de receptores estrogênicos promoveu a inibição dos efeitos neuroprotetores do estradiol em neurônios hipocâmpais de ratas ovariectomizadas expostas ao ácido caínico.

Apesar do exposto acima, algumas evidências mostram que alguns dos efeitos neuroprotetores do estradiol não ocorrem através do mecanismo de ação clássico mediado pelo receptor estrogênico (Green & Simpkins, 2000). De fato, em alguns estudos, os antagonistas dos receptores não atenuam as ações protetoras do  $\beta$ -estradiol em vários modelos de neurotoxicidade (Green et al., 1997; Moosman & Behl, 1999).



**Figura 6: Mecanismo clássico de ação de estrógenos em receptores estrogênicos - Adaptado de: [www.nsf.gov/news/mmg/media/images](http://www.nsf.gov/news/mmg/media/images)**

### **1.9.2. Regulação do crescimento sináptico e da regeneração axonal**

Como relatado anteriormente, os estrógenos podem regular a formação de sinapses durante o desenvolvimento e induzir a plasticidade sináptica no cérebro adulto (Matsumoto, 1991; Garcia-Segura et al., 1994). Estes efeitos hormonais estão envolvidos na diferenciação sexual de conectividade sináptica e na regulação fisiológica da função cerebral (Garcia-Segura et al., 2001). Os estrógenos também podem promover o crescimento sináptico após injúrias (Matsumoto et al., 1986).

Muitas moléculas diferentes incluindo componentes do cito-esqueleto, moléculas de adesão, fatores de crescimento, fatores solúveis e neurotrofinas participam do processo de crescimento axonal. Uma proteína que pode estar envolvida na regeneração axonal induzida pelo estrógeno é a GAP-43, conhecida também como B-50. Esta proteína pré-sináptica está envolvida no crescimento e regeneração de axônios e sua expressão é modulada pelo estrógeno (Oestreicher et al., 1997).

### **1.9.3. Modulação da expressão de proteínas reguladoras da morte celular**

As proteínas da família bcl-2 são importantes moduladoras da apoptose neuronal e incluem tanto inibidores (bcl-2, bcl-X<sub>L</sub>) quanto promotores (bax, bad e bcl-X<sub>S</sub>) de apoptose. Os níveis relativos destas duas classes de membros da família bcl determinam a vulnerabilidade de uma célula individual para o estímulo apoptótico via complexo de interação proteína-proteína (Merry & Korsmeyer, 1997). A bcl-2 e a bcl-X<sub>L</sub> são elementos responsivos ao estrógeno em suas regiões promotoras. O hormônio 17 $\beta$ -estradiol parece aumentar a imunoreatividade de bcl-2 e bcl-X<sub>L</sub> em alguns tipos de células neuronais (Garcia-Segura, 1998). A exposição ao hormônio 17 $\beta$ -estradiol também pode causar declínio nos níveis de RNA mensageiro para a proteína pró-apoptótica BAD (Gollalpudi & Oblinger, 1999). De acordo com estes dados, um estudo mostrou que o aumento da expressão de bcl-2 está associado com a proteção hormonal

de neurônios em modelos de morte celular induzida por glutamato e peróxido de hidrogênio (Singer et al., 1998). O estradiol também aumentou significativamente a expressão da proteína anti-apoptótica bcl-X em culturas de células neuronais, e esta indução está associada com a redução da apoptose induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (Singer et al., 1999).

Pela indução da bcl-2, o estradiol pode promover a sobrevivência neuronal após a injúria tanto pela inibição da morte celular induzida pela bcl-2, quanto pela facilitação da regeneração da conectividade neuronal, induzida por esta proteína. A bcl-2 pode atenuar a geração de espécies reativas de oxigênio e o estradiol pode reduzir o estresse oxidativo no tecido neural pela indução da expressão de bcl-2 (Bogdanov et al., 1999).

#### **1.9.4. Ativação da via de transdução de sinal MAPK**

A interação entre estrógenos e neurotrofinas é complexa, com regulação diferencial e recíproca de receptores estrogênicos e receptores de neurotrofinas pelos seus ligantes, sugerindo possíveis interações entre as duas vias de transdução de sinal (Green & Simpkins, 2000).

A via de transdução de sinal da MAPK (do inglês, mitogen-activated protein kinase; proteína cinase ativada por mitógeno) pode ser modulada pelos receptores estrogênicos de membrana, que ativam as proteínas G e regulam positiva ou negativamente a modulação transcricional. Esta ação requer modificações nas vias de transdução de sinal, como a ERK (proteína cinase regulada por sinal extracelular). A ativação da via MAPK é rápida e a fosforilação da ERK ocorre de 5 a 15 minutos após a exposição ao estradiol (Singh et al., 1999). Nesta via, ocorre grande ativação de b-raf, cuja atividade é rapidamente aumentada após tratamento com estradiol. Alguns dados sugerem a existência de um complexo formado pelo receptor estrogênico e pela b-raf que pode modular a ativação da via MAPK mediada pelo estradiol (Singh et al., 1999).

Algumas evidências sugerem que esta via pode mediar os efeitos neuroprotetores dos estrógenos. Em um experimento utilizando o inibidor

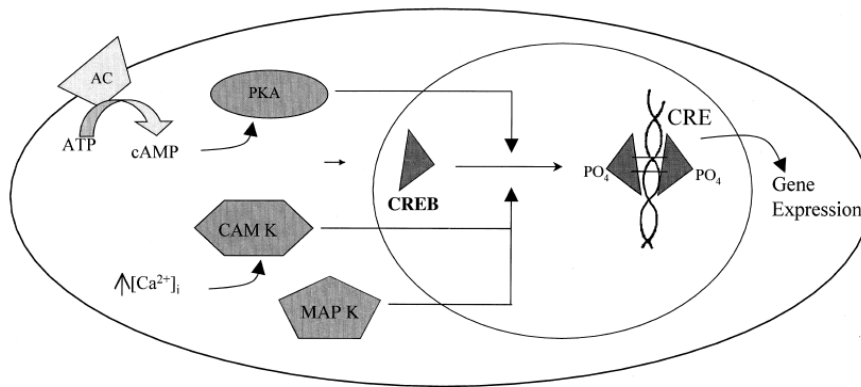


desta via, o PD 98059, observou-se uma inibição da proteção mediada por estrógenos em neurônios corticais expostos ao glutamato (Singer et al., 1999). Porém, a importância desta via na neuroproteção mediada pelos estrógenos pode diferir de acordo com o tipo de neurônio e de toxicidade (Green & Simpkins, 1997).

#### **1.9.5. Ativação da via AMPc-PKA-CREB**

A via AMPc-PKA é uma via de transdução de sinal que aumenta a atividade da adenilato ciclase resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e com a ativação da proteína cinase A (PKA) (Green & Simpkins, 2000). O estradiol aumenta a acumulação de AMPc em vários tipos de células neuronais. O aumento dos níveis celulares de AMPc gera aumento da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Gu & Moss, 1996). A CREB pode ser fosforilada por outras vias como a MAPK e a CAM cinase (Figura 7), que também são ativadas pela exposição ao estradiol (Hayashi et al., 1994).

A fosforilação de CREB via AMPc parece contribuir para os efeitos neuroprotetores do estradiol, pois a ativação da via do AMPc está associada com a diminuição da susceptibilidade de células neuronais aos sinais apoptóticos (Camparde et al., 1999; Kobayashi e Shinozawa, 1997). O aumento da fosforilação de CREB está associado ao aumento da sobrevivência neuronal e ao aumento da resistência destas células à injúria isquêmica (Hanson et al., 1998). A via AMPc-PKA-CREB pode aumentar a sobrevivência neuronal através do aumento da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2 (Ji et al., 1996).



**Figura 7. Representação das principais vias envolvidas na fosforilação de CREB, incluindo a via AMPc-PKA. Abreviações: AC, adenilato ciclase; PKA, proteína cinase A; CAMK, cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina; MAPK, proteína cinase ativada por mitógeno; CRE, elemento de resposta ao AMP cíclico; CREB, proteína ligante de CRE. Adaptado de Green & Simpkins, 2000.**

#### **1.9.5. Atenuação direta da ativação dos receptores de glutamato**

A morte celular por excitotoxicidade ocorre quando um dos tipos de receptores de glutamato AMPA, cainato ou NMDA é hiper-ativado, gerando grande influxo de cálcio. Os estrógenos podem exercer seus efeitos neuroprotetores pela interação direta com receptores glutamatérgicos, pois este hormônio tem sido demonstrado como um antagonista do receptor NMDA. Em alguns estudos, foram observadas alterações nas respostas despolarizantes ao AMPA e atenuação das correntes de cálcio induzidas pelo NMDA após exposição ao estradiol (Weaver et al., 1996). O estradiol pode bloquear o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula através de alterações nos canais de cálcio, sendo que este efeito é mediado pelo receptor estrogênico de membrana (Mermelstein et al., 1996). Alguns dados indicam que a exposição ao estrógeno pode aumentar a quantidade de cálcio intracelular quando expostas a concentrações fisiológicas de glutamato, mas pode atenuar a concentração de cálcio intracelular associada com níveis tóxicos de glutamato (Chen & Brinton, 1999; Zauolyanov et al., 1999).

### **1.9.6. Atividade antioxidante**

Para exercer seus efeitos antioxidantes, o estradiol pode utilizar outros possíveis mecanismos neuroprotetores, independentes da ativação do receptor estrogênico nuclear (Garcia-Segura et al., 2000). O estradiol pode interagir com sítios de ligação na membrana plasmática e provocar diversos efeitos na transmissão e excitabilidade neuronal (Ramirez & Zheng, 1996; Bicknell, 1998).

### **1.9.7. Neuroproteção: Neurônio x Glia**

As células gliais são componentes essenciais para a função neuronal normal e para a resposta do tecido neural à injúria. Há evidências de que as células gliais são alvos dos hormônios esteróides (Garcia-Segura et al., 1996; Jordan, 1999) e que participam do metabolismo da síntese destes hormônios (Melcangi et al., 1999). As células da glia medeiam diferentes ações de esteróides gonadais na regulação do desenvolvimento e plasticidade de populações neuronais específicas e no controle de eventos neuroendócrinos (Garcia-Segura et al., 1996; Ojeda & Ma, 1999). Portanto, estas células podem estar envolvidas nos efeitos de neuroproteção e regeneração dos hormônios gonadais (Melcangi et al., 1999; Nichols, 1999).

Receptores estrogênicos foram detectados em várias populações de células gliais (Azcoitia et al., 1999) e os estrógenos regulam a morfologia e a expressão de genes gliais (Garcia-Segura et al., 1996; Stone et al., 1998). Os estrógenos podem regular a formação de gliose reativa, inibindo a proliferação de astrócitos após injúria e o acúmulo de astrócitos reativos em áreas lesionadas do cérebro (Garcia-Estrada et al., 1993; 1999). Estes efeitos dos estrógenos na gliose reativa podem ser fatores contribuintes para regeneração neuronal, pois estes hormônios podem regular a produção de citocinas pelo tecido glial que poderiam causar morte dos neurônios.

As células gliais, principalmente os astrócitos, podem mediar os efeitos hormonais, pois podem produzir hormônios esteróides, incluindo estradiol. Estas células estão envolvidas na indução da enzima aromatase que é produtora de estrógenos e precursores andrógenos (Garcia-Segura et al., 2001).

#### **1.10. NEUROTOXICIDADE DO MeHg - SUSCEPTIBILIDADE SEXO-DEPENDENTE**

Alguns dados clínicos sugerem que as mulheres se recuperam melhor que os homens após um dano cerebral traumático (Wise, 2002). Concordando com esta observação, em vários modelos experimentais, os animais machos mostraram-se mais vulneráveis que as fêmeas às lesões neurais (Li et al., 1996; Alkayed et al., 1998). A diferença sexual nas respostas às diferentes formas de lesão cerebral pode ser, ao menos em parte, mediada por estrógenos, progesterona e testosterona. Embora alguns estudos apontem alguns efeitos da testosterona na regeneração neuronal (Yu, 1989), este hormônio pode ter um efeito negativo em algumas populações neuronais. Em um estudo realizado por Hawk e seus colaboradores (1998), foi observado que a testosterona aumentou a lesão induzida pela oclusão da artéria cerebral média em ratos machos castrados, enquanto que o tratamento com estradiol diminuiu a área isquêmica. Estas lesões estão associadas a sintomas motores e são altamente sexo-dependentes, mostrando uma maior susceptibilidade dos machos quando comparados às fêmeas (Nishino et al., 1998). Este efeito deletério da testosterona em alguns modelos de injúria cerebral pode ser secundário à sua conversão em dihidro-testosterona e sua ação no receptor endógeno. Estes efeitos negativos da testosterona também podem ser conseqüências da sua conversão em estradiol pela atividade local da enzima aromatase (Garcia-Segura et al., 2001).

Algumas evidências apontam para a possibilidade dos efeitos neurotóxicos do MeHg serem sexo-dependentes, sugerindo que os hormônios sexuais podem influenciar direta ou indiretamente tal toxicidade. Estudos em humanos mostram uma maior susceptibilidade de

meninos aos efeitos neurotóxicos do MeHg quando comparados com meninas da mesma idade (Marsh et al., 1987). Estudos em camundongos neonatos apontam para alterações celulares nos cerebelos dos machos expostos a uma baixa dose de MeHg, sendo que tais alterações somente foram observadas nas fêmeas quando expostas altas doses (Grant-Webster et al., 1992). Outros estudos em proles de ratos neonatos expostos a baixas doses de MeHg mostraram uma diminuição da atividade locomotora espontânea destes animais que persistiram na fase adulta, sendo que essa diminuição foi observada somente nos machos (Rossi et al., 1996).

Um estudo realizado por Hirayama e colaboradores (1986) demonstrou que o metabolismo e a eliminação de MeHg ocorre mais lentamente em machos do que em fêmeas e que a seqüência de eventos que levam à excreção urinária do MeHg pode ser controlada pelos hormônios sexuais. Estes autores observaram aumento do acúmulo renal e excreção urinária de mercúrio e uma diminuição dos níveis de Hg em no fígado, nos eritrócitos e no cérebro de fêmeas tratadas com propinato de testosterona. Neste mesmo estudo, análises de machos castrados e machos tratados com benzoato de estradiol revelaram que o turnover (síntese/degradação) da glutathiona total aos tecidos foi afetado significativamente pelos hormônios sexuais.

O MeHg tem uma alta afinidade por compostos tiolicos, tais como a GSH, e a formação de um complexo GSH-MeHg é de grande importância para o acúmulo renal de MeHg (Oliveira et al., 2006). O transporte e metabolismo da GSH e seus derivados pode ser um dos muitos fatores importantes para determinar a distribuição aos tecidos e a eliminação de MeHg em organismos afetados por este composto tóxico (Hirayama et al., 1986). A enzima  $\gamma$ -glutamil-transpeptidase é a única enzima que hidrolisa o resíduo  $\gamma$ -glutamil da GSH e seus derivados. Esta enzima está localizada exclusivamente na superfície externa da membrana plasmática e a degradação da GSH ocorre extracelularmente (Nishiyama et al., 1987). Há evidências de que a diferença na velocidade de eliminação do MeHg entre machos e fêmeas pode estar relacionada com a diferença na meia-vida tecidual da GSH entre os dois sexos (Hirayama, 1986).

A toxicidade do MeHg é mediada pelo estresse oxidativo e pode ser antagonizada por compostos antioxidantes e por estrógenos (Daré et al., 2000). Alguns antioxidantes que podem antagonizar os efeitos do estresse oxidativo, como a GSH, parecem ser influenciados pelos hormônios sexuais em roedores (Hirayama et al., 1987; Taskiran et al., 1997). Esse dimorfismo sexual na expressão dos sistemas de defesa antioxidante parece afetar a susceptibilidade aos efeitos neurotóxicos do MeHg de forma diferenciada em machos e fêmeas (Giménez-Llort et al., 2001).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Conforme mencionado anteriormente, parece haver uma maior resistência de fêmeas aos efeitos neurotóxicos do MeHg quando comparadas com machos. Além disso, tais efeitos parecem ser mediados, ao menos em parte, por estresse oxidativo. Desta forma, torna-se importante investigar se hormônios sexuais femininos (principalmente estrógenos) são capazes de modular os efeitos pró-oxidativos do MeHg no sistema nervoso central, correlacionando déficits motores com dano oxidativo cerebelar. A descoberta de uma possível relação entre hormônios sexuais femininos e neurotoxicidade induzida por MeHg certamente contribuirá para um melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares relacionados com os severos danos induzidos por este importante toxicante ambiental.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos neurotóxicos do MeHg e a possível susceptibilidade sexo-dependente a tal neurotoxicidade em camundongos, avaliando variáveis comportamentais relacionadas à atividade locomotora com variáveis bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo no cerebelo dos animais.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da exposição oral ao metilmercúrio sobre a atividade locomotora e o desempenho motor em camundongos machos e fêmeas, através dos testes do Rotarod e Campo Aberto.

- Avaliar os efeitos da exposição oral ao metilmercúrio sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo no cerebelo de camundongos machos e fêmeas;

- Avaliar o efeito da castração e da administração do hormônio  $17\beta$ -estradiol sobre os parâmetros bioquímicos e comportamentais acima citados, em camundongos machos expostos ao metilmercúrio;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais:**

Foram utilizados camundongos adultos (2 meses) Swiss adultos machos e fêmeas, pesando entre 35 e 45 g, mantidos numa sala com temperatura controlada de 24 +/- 2 °C, com livre acesso à comida (Ração para roedores - Nuvital, PR), em ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00-19:00 h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

### **4.2. Tratamento:**

Foram utilizados 36 camundongos, sendo que estes foram divididos em 6 grupos da seguinte forma:

- Grupo 1 (controle): animais machos que receberam uma injeção de salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias alternados e água de beber ad libitum, durante 21 dias;

- Grupo 2 (MeHg): animais machos que receberam uma injeção de salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias alternados e uma solução de metilmercúrio (40 mg/L) dissolvido na água de beber ad libitum, durante 21 dias;

- Grupo 3 MeHg + 17 $\beta$  estradiol): animais machos que receberam uma injeção do hormônio 17 $\beta$ -estradiol (dose 10  $\mu$ g/animal) dissolvido em salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias alternados e uma solução de metilmercúrio (40 mg/L) dissolvido na água de beber ad libitum, durante 21 dias;

- Grupo 4 (MeHg + castração): animais machos (MeHg + castração) que foram castrados duas semanas antes do início do tratamento e receberam uma injeção de salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias alternados e uma solução de metilmercúrio (40 mg/L) dissolvido na água de beber ad libitum, durante 21 dias;



- Grupo 5 (fêmeas controle): animais fêmeas (controle) receberam uma injeção de salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias consecutivos e água de beber ad libitum, durante 21 dias;

- Grupo 6 (animais fêmeas MeHg): receberam uma injeção de salina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, 10 mL/kg, pela via subcutânea) em dias alternados e uma solução de metilmercúrio (40 mg/L) dissolvido na água de beber ad libitum, durante 21 dias.

### **4.3. Testes comportamentais**

#### **4.3.1. Avaliação da atividade locomotora através do teste do campo aberto (Open Field)**

Este teste foi realizado para avaliação da atividade locomotora e foi baseado em um estudo prévio do nosso grupo (Farina et al., 2005). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa medindo 40x40x40 cm e subdividida em linhas formando 16 quadrantes (Figura 8), medindo 10x10 cm. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas durante um período de seis minutos foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora.



**Figura 8. Ilustração da caixa de Campo Aberto (open field).**

### 4.3.2. Rotarod

A coordenação motora foi avaliada pelo teste de Rotarod (Farina et al., 2005). O aparato consiste em uma barra com 2,5 cm de diâmetro, subdividida em quatro compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro (figura 9). A barra girava numa velocidade constante de 20 rotações por minuto. Foram realizadas três sessões onde se avaliou o tempo de permanência do animal no aparato (permanência na barra giratória), sendo o tempo máximo de 60 segundos. Apenas a última sessão foi considerada na análise, sendo que as duas seções iniciais serviram apenas como treino. O tempo de permanência na barra giratória foi indicativo de desempenho motor.



Figura 9. Ilustração do aparato de Rotaroad.

#### **4.4. Análises Bioquímicas**

##### **4.4.1. Preparação tecidual**

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram o cerebelo removido dicecado homogeneizado em 5 volumes de tampão HEPES 25 mM, pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4 graus centígrados, objetivando a obtenção do sobrenadante para a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase) e dos níveis de glutathione e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (produtos de peroxidação lipídica).

##### **4.4.2. Lipoperoxidação - Método Espectrofotométrico TBARS-MDA:**

A lipoperoxidação foi estimada pela detecção dos derivados dos lipoperoxídeos, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como malonildialdeído (MDA), que devido á peroxidação de lipídeos formou um produto de coloração rosa. Desta forma, neste estudo utilizamos o termo lipoperoxidação para nos referir a estas medidas. Os sobrenadantes teciduais foram incubados a 90 graus centígrados em um meio contendo 1,3 M de tampão acetato (pH 3,4), ácido tiobarbitúrico (0,27 M), o dodecil sulfato de sódio (8,1%). Após 1 hora, o material foi resfriado durante 15 minutos e a medida do complexo TBA-MDA (produto colorido formado = substância reativa ao TBA) foi feita no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm (Ohkawa et al; 1979).

##### **4.4.3 Determinação das concentrações de Glutathione Reduzida (GSH):**

Os grupamentos tióis não-proteicos (NPSH) nas amostras foram determinados usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). A amostra (100 µL do sobrenadante) foi misturado com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. Os NPSH foram quantificados pela adição de 150

$\mu\text{L}$  do sobrenadante em 425  $\mu\text{L}$  de TFK 1 M, pH 7,0 e 25  $\mu\text{L}$  de DTNB 10 mM. O monitoramento da concentração dos grupos tióis foi avaliando através da medida da absorbância em 412 nm devido ao produto resultante da reação da GSH com DTNB, que gerou o TNB de cor amarela (Ellman, 1959).

#### **4.4.4. Avaliação da atividade Glutathione Peroxidase (GPx):**

A GPx catalisa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como outros lipoperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato e produzindo glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathione redutase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm (Wendel, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,25 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 100 mM, GR 5 U/ mL e NADPH 0,1 mM. Adicionou-se, neste meio, a amostra (25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante) para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 2 minutos, a 340 nm. Ao adicionar o substrato (1 mM t-BOOH), a leitura foi realizada por mais 2 minutos. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições.

#### **4.4.5 Avaliação da atividade Glutathione Redutase (GR):**

A GR catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,25 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra (25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante), o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 2 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM a leitura foi realizada por 2 minutos adicionais e descontou-se o

consumo inespecífico de NADPH do decaimento por minuto obtido. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições.

#### **4.4.6. Dosagem de Proteínas:**

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.5. Análise Estatística:**

Foi efetuada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Duncan, quando apropriado. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

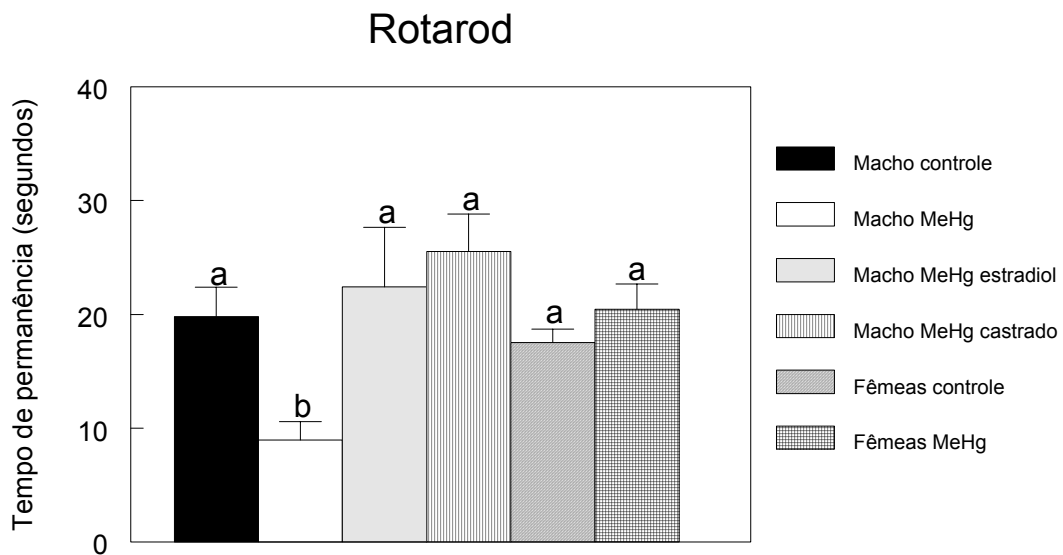
A ingesta líquida dos animais foi monitorada no intuito de detectar alguma possível diminuição nesta variável nos grupos expostos ao MeHg. Isto poderia ocorrer devido ao gosto metálico do composto, causando uma possível desidratação nestes animais. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas ingestas líquidas entre todos os grupos experimentais (Tabela 1).

Grupos	Ingesta líquida (ml/dia/ animal)
Machos controle	13,5 ± 0,7
Machos MeHg	12,4 ± 0,6
Machos MeHg 17 βestradiol	13,7 ± 0,4
Machos MeHg castrados	11,9 ± 0,7
Fêmeas controle	12,5 ± 0,6
Fêmeas MeHg	11,5 ± 0,7

**Tabela 1: Ingesta líquida dos animais durante o tratamento.** Os valores estão expressos como media ± desvio padrão. Não foram detectadas diferenças significativas através da análise de variância ( $p > 0,05$ ).

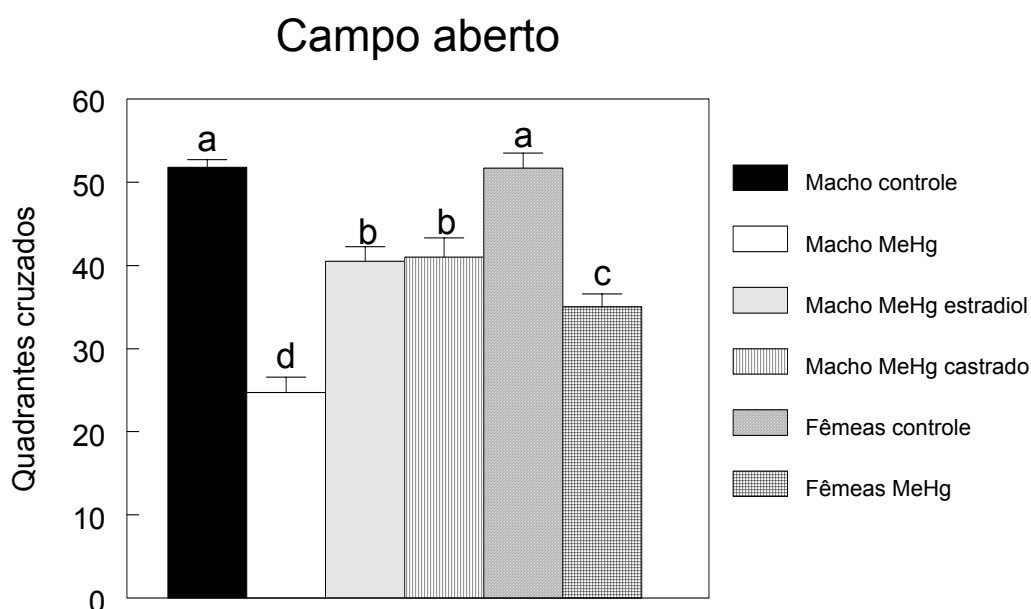
### 5.1. Testes Comportamentais

A coordenação motora dos animais foi avaliada pelo seu tempo de permanência na barra giratória do aparato de Rotarod. A Figura 10 mostra que o tratamento com MeHg não alterou a coordenação motora das fêmeas quando comparadas com fêmeas do grupo controle. Nos animais machos, a exposição ao MeHg promoveu uma diminuição da coordenação motora. Entretanto, este efeito não foi observado nos animais machos castrados e nos machos tratados com o hormônio 17 $\beta$  estradiol. Assim, o déficit na coordenação motora provocado pelo tratamento com MeHg durante 21 dias foi prevenido pela castração e pelo tratamento com o hormônio 17 $\beta$  estradiol



**Figura 10: Efeitos da administração oral de MeHg sobre o desempenho motor de camundongos machos e fêmeas.** O tempo de permanência dos animais no aparato é expresso em segundos e apresentado como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.

No intuito de avaliar a atividade locomotora dos animais, foi realizado o Teste do Campo Aberto (Figura 11). A análise de variância de uma via indicou que todos os grupos expostos ao MeHg durante 21 dias, apresentaram diminuição da atividade locomotora ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos grupos controle. Entretanto, esta diminuição mostrou-se menos acentuada nas fêmeas quando comparadas aos machos expostos ao MeHg. A castração e o tratamento com o hormônio  $17 \beta$  estradiol preveniram parcialmente os danos na atividade locomotora provocados pelo MeHg

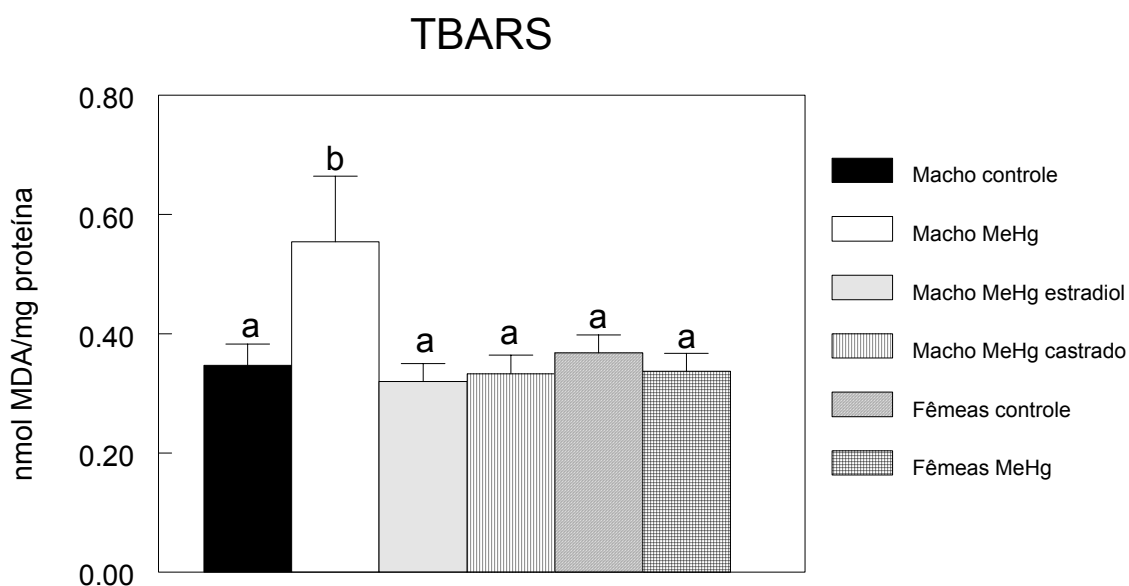


**Figura 11: Efeito da administração oral de MeHg sobre a locomoção de camundongos machos e fêmeas.** A atividade locomotora dos animais não é expressa em quadrantes cruzados e apresentada como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.



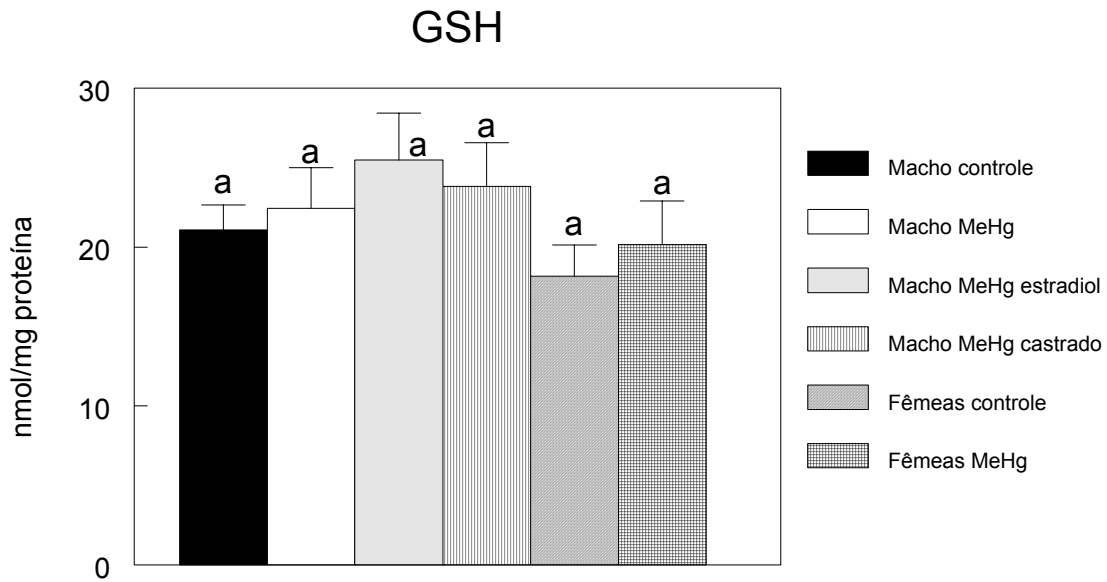
## 5.2. Análises Bioquímicas – Parâmetros relacionados com o Estresse Oxidativo

Os níveis cerebelares de produtos de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) são demonstrados na figura 12. Os resultados indicam que o tratamento com MeHg promoveu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de TBARS no cerebelo dos animais machos tratados com MeHg, sendo que este efeito não foi observado nas fêmeas. O aumento da peroxidação lipídica cerebelar foi prevenida pela castração e também pelo tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol nos machos



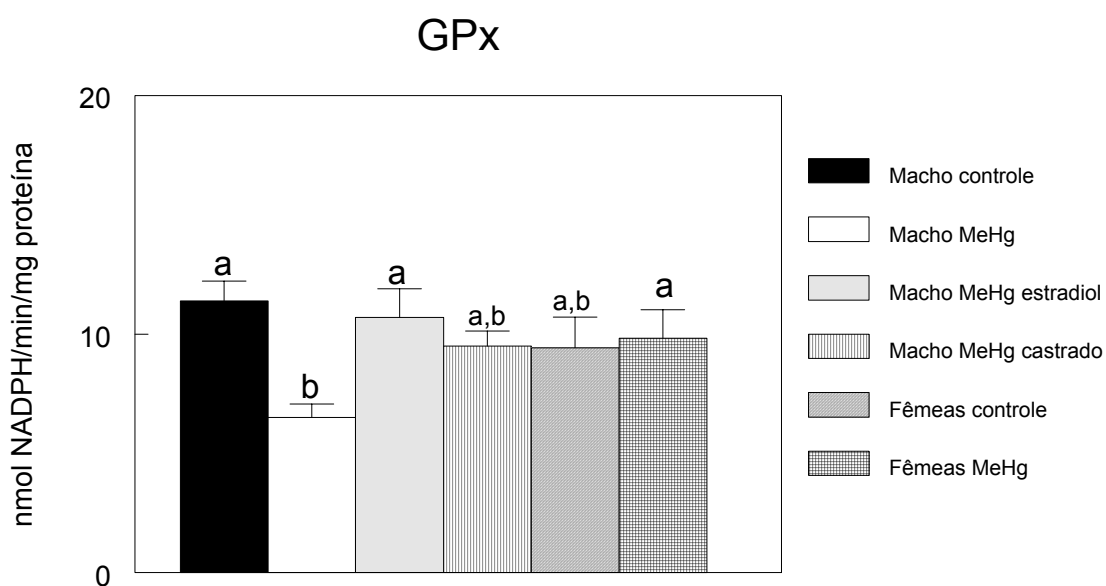
**Figura 12: Efeito da administração oral de MeHg sobre a peroxidação lipídica cerebelar.** Os níveis de TBARS são expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.

A figura 13 demonstra os níveis cerebelares de glutathione, medidos como grupos sulfidrílicos não-protéicos. Não houve diferenças significativas entre os grupos.



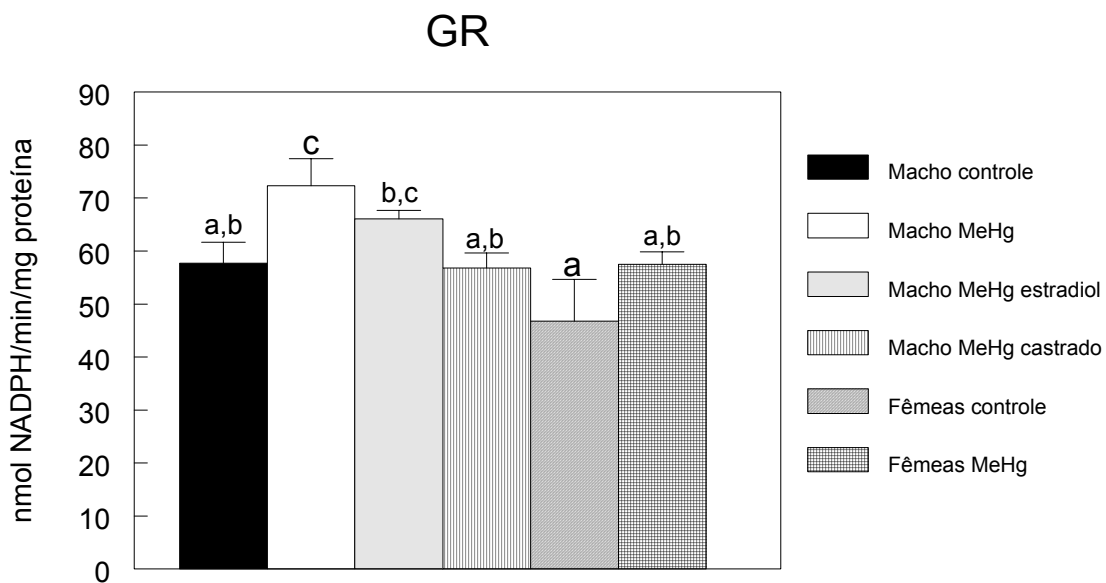
**Figura 13: Efeito da administração oral de MeHg sobre os níveis cerebelares de glutathione de camundongos machos e fêmeas.** Os níveis de glutathione (GSH) são expressos como nmol/mg de proteína e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

A atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) no cerebelo dos animais é demonstrada na figura 14. A atividade desta enzima mostrou-se significativamente diminuída ( $p < 0,05$ ) no cerebelo dos animais machos expostos ao MeHg, sendo que este efeito foi inibido pelo tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol e pela castração. As fêmeas expostas ao MeHg não mostraram diminuição da atividade da GPx cerebelar quando comparadas às fêmeas do grupo controle.



**Figura 14: Efeito da administração oral de MeHg sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase cerebelar de camundongos machos e fêmeas.** A atividade enzimática é expressa como nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.

A figura 15 demonstra a atividade da enzima glutatona redutase (GR) no cerebelo dos animais machos e fêmeas expostos ao MeHg. Os resultados indicam que a atividade da GR cerebelar foi aumentada de forma significativa ( $p < 0,05$ ) pelo tratamento com MeHg nos machos. Este fenômeno foi inibido apenas pela castração. As fêmeas expostas ao MeHg não mostraram alteração da atividade da GR cerebelar quando comparadas às fêmeas do grupo controle.



**Figura 15: Efeito da administração oral de MeHg sobre a atividade da enzima glutatona redutase cerebelar de camundongos machos e fêmeas.** A atividade enzimática é expressa como nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos pela ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados os efeitos da exposição ao metilmercúrio (MeHg) na atividade locomotora, coordenação motora, assim como na peroxidação lipídica, níveis de glutathione e atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione redutase no cerebelo de camundongos machos e fêmeas adultos. Foram comparadas as diferenças entre machos e fêmeas e avaliados os potenciais efeitos protetores da castração e da administração do hormônio sexual feminino  $17\beta$ -estradiol nos machos expostos ao MeHg.

Neste trabalho, o procedimento de análise da ingestão líquida foi efetuado para descartar uma possível diminuição de ingestão líquida em animais expostos ao MeHg devido ao gosto metálico e desagradável do composto. Ao analisarmos a ingestão líquida dos animais, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de água ingerida pelos mesmos. Podemos concluir que os resultados das análises comportamentais e bioquímicas não estão relacionados à diminuição do consumo de água ou desidratação dos animais, mas sim aos efeitos do tratamento com MeHg.

O efeito inibitório do MeHg na locomoção tem sido extensivamente reportado. De acordo com diversos estudos experimentais, a exposição ao MeHg está relacionada a déficits na locomoção e coordenação motora (Gimenez-Llort et al., 2001). Em estudos prévios do nosso laboratório, camundongos adultos apresentaram danos motores após exposição oral ao MeHg (Dietrich et al., 2005). Um estudo realizado por Franco e colaboradores (2006) mostrou que camundongos expostos ao MeHg no período lactacional apresentaram significativo prejuízo motor (avaliado no aparelho rotarod) e uma redução da atividade locomotora (avaliada no campo aberto). De acordo com estes dados, nossos resultados também mostram efeitos negativos da exposição ao MeHg nos parâmetros comportamentais e funcionais relacionados à performance motora. Os animais machos expostos ao MeHg apresentaram diminuição significativa na atividade locomotora no campo aberto, bem como déficit de coordenação motora no aparato do rotarod.

Diversos estudos apontam para o MeHg como um poderoso agente neurotóxico, que afeta principalmente as células do cerebelo (Murakami, 1972; Chang et al., 1981), região do cérebro responsável por diversas atividades relacionadas ao equilíbrio, coordenação motora, manutenção da postura e reações de endireitamento (Gowen & Miall, 2007). Alguns estudos em roedores mostram danos ou desenvolvimento anormal do cerebelo após tratamento com MeHg (Chang et al., 1977; Choi et al., 1981). Em outro estudo recente, análises histológicas detectaram deposição deste metal e alterações morfológicas nas regiões cortical e medular do cerebelo em embriões de *gallus domesticus* expostos ao MeHg. Quando estes animais já eram adultos, também houve diminuição das atividades exploratória e locomotora (Carvalho, 2007). Portanto, podemos sugerir que os danos locomotores induzidos pela exposição ao MeHg podem, ao menos em parte, estar relacionados aos danos cerebelares induzidos por este metal.

Existem diversas evidências mostrando que a diferença sexual nas respostas às diferentes formas de lesão cerebral podem ser, ao menos em parte mediada pelos hormônios sexuais, indicando a possibilidade dos efeitos neurotóxicos do MeHg serem sexo-dependentes (Hirayama et al., 1986). No presente estudo, no teste de Rotarod, o tempo de permanência dos animais no aparato foi diminuído somente nos animais machos tratados com MeHg quando comparados aos demais grupos, indicando que somente este grupo sofreu déficit na coordenação motora. Ao avaliarmos a atividade locomotora espontânea, observamos que todos os grupos tratados com MeHg apresentaram diminuição na locomoção, sendo que este efeito ocorreu de forma mais acentuada nos machos tratados com MeHg quando comparados aos demais grupos. Esta diminuição da locomoção foi parcialmente prevenida pela castração e pelo tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol, sugerindo que alterações hormonais (principalmente aquelas relacionadas aos hormônios esteróides sexuais) podem modular a susceptibilidade de camundongos aos efeitos deletérios do MeHg na capacidade motora e exploratória.

Estes resultados concordam com dados de estudos prévios em animais e humanos, os quais mostraram maior vulnerabilidade a lesões

neurais de machos, quando comparados às fêmeas (Li et al., 1996; Alkayed et al., 1998) e também com diversos estudos onde as fêmeas apresentaram uma menor susceptibilidade aos danos locomotores provocados pelo MeHg na atividade (Grant-Webster, 1992; Rossi et al., 1996). Alguns estudos também apontam efeitos negativos da testosterona e efeitos protetores da castração e do tratamento com estradiol na atividade locomotora em modelos animais (Hawk, 1998; Nishino, et al., 1998). Portanto, como os hormônios sexuais podem influenciar direta ou indiretamente esta toxicidade, podemos sugerir possíveis efeitos protetores dos estrógenos nos déficits de locomoção e coordenação motora induzidos pelo MeHg.

Como já citado anteriormente, vários mecanismos parecem estar envolvidos nos efeitos neurotóxicos do MeHg (Aschner et al., 2007). Muitos destes efeitos têm sido relacionados à excitotoxicidade e ao estresse oxidativo. O dano oxidativo e a lipoperoxidação das membranas podem ser causados pela toxicidade induzida pelo aumento dos níveis de aminoácidos excitatórios, como o glutamato (Choi, 1992; Behl et al., 1994). Em nosso estudo, foi observado um aumento dos níveis de TBARS, indicando a presença de derivados de lipoperóxidos e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos cerebelos de animais machos expostos ao MeHg. Estes dados concordam com resultados de vários estudos anteriores que sugerem que são geradas espécies reativas de oxigênio na presença deste metal, contribuindo para aumentar a excitotoxicidade (Allen et al., 2001). Estas espécies são altamente oxidantes e podem causar danos em proteínas, enzimas e DNA, causando também peroxidação das membranas celulares (Aschner et al., 2007).

Diversos estudos correlacionam a exposição ao MeHg com a diminuição dos níveis de GSH e da atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). Em um estudo realizado por Farina e colaboradores (2003), foi observada uma correlação negativa entre os níveis de TBARS e tióis não-protéicos no cérebro de roedores expostos ao MeHg. Houve também uma correlação negativa entre os níveis de TBARS e a atividade da enzima GPx neste tecido. Ou seja, o autor sugere que o aumento da peroxidação lipídica em animais expostos ao

MeHg está relacionado com a diminuição dos níveis totais de glutathiona e da atividade da enzima GPx, a qual detoxifica peróxidos endógenos e evita a peroxidação das membranas biológicas. Por outro lado, alguns trabalhos demonstram que o sistema antioxidante da glutathiona, ao ser ativado após insultos oxidativos, pode promover aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Em estudo realizado por Franco e colaboradores (2006), a exposição de camundongos adultos ao MeHg promoveu um aumento nos níveis de tióis não-protéicos (NPSH), bem como da atividade da enzima GR.

Em nosso estudo, as análises bioquímicas demonstraram aumento nos níveis de TBARS em animais machos expostos ao MeHg, porém, os níveis de glutathiona (medidos como NPSH) permaneceram inalterados em todos os grupos. Um resultado semelhante foi obtido por Manfroi e colaboradores (2004), ao avaliar os efeitos da exposição lactacional ao MeHg. Neste contexto, seria razoável supor que o aumento da síntese da GSH pode ser um dos mecanismos neuroprotetores contra a neurotoxicidade induzida pelo MeHg e que a manutenção nos níveis de NPSH seguida da exposição ao MeHg, observada em nosso estudo, pode estar relacionada ao aumento na síntese de glutathiona. Porém, a hipótese de que a manutenção nos níveis de NPSH seja um mecanismo compensatório contra o dano oxidativo induzido por MeHg no cerebelo de camundongos não pode ser confirmada neste trabalho, pois não existem dados que possam comprovar este fenômeno.

Ao avaliarmos os efeitos do MeHg na atividade das enzimas antioxidantes cerebelares, observamos uma diminuição da atividade da GPx e um aumento na atividade da GR nos animais machos. De acordo com dados da literatura, a diminuição da atividade da GPx é um fenômeno que comumente ocorre após a exposição ao MeHg (Farina et al., 2005, Franco et al., 2006). Como a GPx detoxifica peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, podemos sugerir que o aumento nos níveis de TBARS pode estar, ao menos em parte, relacionado à diminuição da atividade desta enzima. A exposição ao MeHg parece ter induzido parte do sistema antioxidante da glutathiona, aumentando a atividade enzimática da GR cerebelar. Este aumento pode representar uma resposta compensatória do



SNC contra o dano oxidativo para manter a homeostase da razão GSH/GSSG no cerebelo destes animais. Estes dados estão de acordo com estudos prévios (Farina et al., 2005).

Segundo dados encontrados na literatura, os hormônios esteróides são de suma importância para a manutenção da função cerebral normal (Behl, 1997). Como existem diversas evidências sugerindo diferenças entre machos e fêmeas nas respostas do SNC aos danos oxidativos, a atividade antioxidante destes hormônios, principalmente dos estrógenos, tem sido bastante investigada. Em estudo realizado por Behl e colaboradores (1995), foram demonstrados efeitos neuroprotetores do hormônio  $17\beta$ -estradiol em modelo de morte celular in vivo induzida pelo estresse oxidativo. Alguns estudos sugerem que, assim como os estrógenos, a testosterona também possui ação neuroprotetora. Segundo Simpkins (2001), este hormônio demonstrou efeitos neuroprotetores em modelos de morte celular por apoptose em células granulo-cerebelares. Por outro lado, diversos estudos demonstram efeitos negativos da testosterona em alguns tipos de células neuronais. Neste contexto, vários experimentos mostram efeitos positivos da castração em alguns tipos de injúria (Yang et al., 2002). Ao avaliar os efeitos dos hormônios esteróides na neurotoxicidade induzida pelo glutamato, Yang e colaboradores (2001) mostraram que este tipo de toxicidade foi significativamente aumentada pela exposição à testosterona. No mesmo experimento, a exposição ao hormônio  $17\beta$ -estradiol teve efeito contrário, diminuindo a toxicidade e aumentando a viabilidade celular.

Segundo dados da literatura, os estrógenos podem atenuar a peroxidação lipídica em vários modelos de toxicidade (Keller et al., 1997; Vedder et al., 1999). De acordo com estes dados, nossas análises bioquímicas mostraram que os níveis de TBARS foram mais altos nos machos expostos ao MeHg quando comparados com as fêmeas, indicando uma maior susceptibilidade dos camundongos deste sexo aos efeitos do MeHg na lipoperoxidação das membranas cerebelares. Estes efeitos foram prevenidos pela castração e pelo tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol, sugerindo que a diminuição dos níveis de testosterona e o tratamento com estrógenos também podem ter ação benéfica por proteger

as membranas celulares do cerebelo da lipoperoxidação induzida por este composto.

Alguns autores também sugerem que a capacidade protetora dos estrógenos pode ser aumentada pela presença de GSH no meio (Green et al., 1997), podendo haver uma interação sinérgica entre os estrógenos e a GSH ou outros antioxidantes endógenos. Apesar de não possuímos dados suficientes para comprovar que a ausência de alterações dos níveis cerebelares de NPSH entre machos e fêmeas - e também entre os animais castrados e os tratados com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol - seja um mecanismo compensatório do SNC contra o dano oxidativo, podemos sugerir que os efeitos neuroprotetores dos estrógenos na toxicidade induzida pelo MeHg podem estar relacionados, ao menos em parte, à ativação do sistema antioxidante da glutatona.

Os resultados da avaliação da atividade enzimática da GPx e da GR indicam que o tratamento com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol modulou a atividade destas enzimas durante a exposição ao MeHg em camundongos machos. O hormônio 17 $\beta$ -estradiol é um composto fenólico que apresenta similaridades com antioxidantes lipofílicos. Esta estrutura lipofílica, juntamente com grupamento fenólico, capacita este esteróide a detoxificar moléculas reativas de oxigênio (Behl, 1996). Isto sugere que os hormônios sexuais femininos (particularmente, o 17 $\beta$ -estradiol) estão envolvidos na proteção do SNC contra os danos causados pela exposição ao MeHg.

Ao analisarmos os efeitos da castração na atividade GPx e GR cerebelares, observamos que este procedimento pode prevenir a alteração da atividade destas enzimas em animais machos expostos ao MeHg, indicando que a testosterona pode estar envolvida no aumento do dano oxidativo no SNC em animais expostos a este xenobiótico.

Os mecanismos pelos quais os estrógenos exercem neuroproteção ainda não estão completamente esclarecidos (Garcia-Segura, et al., 2001). Porém, vários mecanismos parecem estar envolvidos nos efeitos neuroprotetores destes hormônios. No caso da neurotoxicidade induzida pelo MeHg, os mecanismos envolvidos nestes efeitos parecem estar relacionados à diminuição do estresse oxidativo e ao aumento das defesas antioxidantes (Behl et al., 1996; Keller et al., 1997).

O complexo formado pelos hormônios estrógenos e seus receptores associa-se a EREs (elementos responsivos aos estrógenos) e promove a ativação de genes anti-apoptóticos, aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2 (Garcia-Segura et al., 1998). Este parece ser um dos mecanismos envolvidos na neuroproteção induzida por estrógenos. Sabendo-se que expressão da proteína bcl-2 pode ser aumentada pela via AMPc-PKA-CREB (Ji et al., 1996), sugere-se que esta via também pode estar envolvida nos efeitos neuroprotetores dos estrógenos na toxicidade induzida pelo MeHg. Neste contexto, sabe-se que o aumento da fosforilação da CREB está relacionado ao aumento da sobrevivência neuronal e a diminuição da apoptose (Hanson et al, 1998; Campard et al., 1999). Como a CREB também pode se fosforilada pela via MAPK, podemos sugerir que a ação neuroprotetora dos estrógenos neste tipo de toxicidade também pode estar relacionada a esta via. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

A hiperativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA induzida pelo MeHg pode provocar a morte celular (Aschner et al., 2007). Estudos têm evidenciado que a GSH pode interagir com o sistema glutamatérgico, modulando o sítio redox deste tipo de receptores (Oja, 2000). Janaki e colaboradores (2000) evidenciaram que a liberação dos aminoácidos constituintes da GSH pode estar envolvida na neurotransmissão glutamatérgica, exercendo funções como modulação redox contra os efeitos da neurotoxicidade induzida pelo glutamato e proteção contra morte neuronal induzida pelo influxo de cálcio (Guo et al., 1992; Bains Shaw, 1997). Neste contexto, os estrógenos podem agir como neuroprotetores indiretamente, aumentando a síntese de GSH. Os estrógenos também podem agir como antagonistas do receptor NMDA, sendo que esta ação pode alterar os canais de cálcio, evitando o acúmulo intracelular deste íon prevenindo a morte celular (Weaver et al., 1996). Isto indica que este mecanismo também pode estar ligado à neuroproteção mediada pelos estrógenos nos efeitos neurotóxicos do MeHg.

Devido ao fato de existirem vários mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores dos estrógenos, tais como o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, a modulação da excitotoxicidade induzida por

aminoácidos excitatórios, alguns efeitos antioxidantes, entre outros, não podemos afirmar com exatidão quais são todos os mecanismos responsáveis pela proteção contra os efeitos neurotóxicos do MeHg em nosso modelo experimental. Entretanto, nossos resultados permitem afirmar que a neuroproteção induzida pela administração do hormônio  $17\beta$ -estradiol em camundongos machos ou a sua castração impede a ocorrência de certas injúrias oxidativas e comportamentais decorrentes da exposição ao MeHg. Sabendo que tal impedimento foi correlacionado com a proteção em nível comportamental, sugere-se que a proteção contra o dano oxidativo cerebelar foi responsável pela manutenção (mesmo que parcialmente) da integridade do desempenho motor dos animais. Esta hipótese é reforçada pelo fato das fêmeas terem apresentado menor susceptibilidade tanto em nível bioquímico quanto comportamental. Ainda, salienta-se que estes mecanismos não parecem agir de forma isolada, mas sim de maneira interligada, sugerindo que não um único mecanismo, mas uma cascata de reações pode estar relacionada à ação neuroprotetora dos estrógenos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg.

## 7. CONCLUSÕES FINAIS

Nossos resultados evidenciam que a exposição ao metilmercúrio pode promover alterações nos parâmetros bioquímicos e comportamentais em camundongos swiss. A exposição á este metal promoveu as seguintes alterações comportamentais:

- Diminuição da atividade locomotora espontânea em animais machos e fêmeas
- Diminuição da coordenação motora em animais machos;

Como estas alterações mostraram-se mais acentuadas nos machos que nas fêmeas podemos concluir que nesta espécie o sexo masculino apresenta uma maior vulnerabilidade aos efeitos neurotóxicos do MeHg na locomoção e coordenação motora. A prevenção destes efeitos foi observada em animais castrados e tratados com o hormônio  $17\beta$  estradiol, portanto podemos concluir que a diminuição dos níveis do hormônio testosterona ou a presença de hormônios sexuais femininos (particularmente o  $17\beta$ -estradiol) pode exercer efeitos protetores no dano motor induzido pelo MeHg.

De acordo com nossas análises bioquímicas podemos concluir que a exposição ao MeHg está relacionada á danos oxidativos como lipoperoxidação de membranas celulares e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes. Também podemos concluir que os efeitos do MeHg no SNC são sexo-dependentes e podem ser mediados pelos hormônios sexuais. Estes dados também sugerem que:

- O dano oxidativo pode promover ativação do sistema antioxidante da glutathiona, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes (ex: GR) como um mecanismo compensatório para manutenção da homeostase do status tiólico no SNC;

- As fêmeas apresentam uma maior resistência ao dano oxidativo quando comparadas aos machos.
- A depleção da testosterona e os hormônios sexuais femininos apresentam ação protetora na neurotoxicidade induzida pelo MeHg.
- Na neurotoxicidade induzida pelo MeHg, os mecanismos neuroprotetores dos estrógenos parecem estar relacionados à diminuição do estresse oxidativo e no aumento das defesas antioxidantes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre J, Aaseth J. (1982). *Biochemical Pharmacology*; 31: 685.
- Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Trystman RJ. (1998). Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*; 29: 159-165.
- Allen JW, Shanker G, Aschner M. (2001). Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Research* ; 894 (1):131-40.
- Ankley, G, Bechara EJ H. (2003). Research plan for endocrine disruptors. *Química Nova* vol.31(4): 625-631.
- Arimatsu Y, Hatanaka H. (1986). Estrogen treatment enhances survival of cultured fetal rat amygdala neurons in a defined medium. *Development Brain Research*; 26: 151-159.
- Aschner M, Clarkson TW. (1988): Distribution of mercuric 203 in pregnant rats and their fetuses following systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. *Teratology*; 38: 144-155.
- Aschner M, Mullaney KJ, Fehm MN, Wagoner DE Jr, Vitarella D. (1994). Astrocytes as potential modulators of mercuric chloride neurotoxicity. *Cell Molecular Neurobiology*; 14 (6): 637-52.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JBT, Farina M. (2007). Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20; 285-291.
- Azcoitia I, Fernandez-Galaz MC, Sierra A, Garcia-Segura LM. (1999). Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *Journal of Neuroscience*; 28: 699-710.
- Bains JS, Shaw CA. (1996) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research*; 25: 335-358.
- Bains JS, Shaw CA. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione on oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research*; 25: 335-358.
- Baird C. (2002). *Química Ambiental*, 2ª ed., Bookman, cap. 6 e 7.
- Bakir F, Damluji SF, Amim-Zaki L, Murthada M, Khalidi A, Al-Rawi NY, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq: an interuniversity report. *Science* 181: 230-241.
- Behl C, Skutella T, Lezoualzh F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology*; 51: 535-541.

- Behl C, Widmann M, Trapp T. (1995). 17  $\beta$ -estradiol protect neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochemistry Biophysical Research*; 216: 473-482.
- Bicknell RJ. (1998). Sex-steroid actions on neurotransmission. *Curr. Opin. Neurology*; 11: 667-671.
- Birkett A, Mihaich E, Stahl R,; Tillitt D, Colborn T, McMaster S, Miller R, Bantle J, Campbell P, Denslow N, Dickerson R, Folmar L, Fry M, Giesy J, Gray L.E, Guiney P, Hutchinson T, Kennedy S, Kramer V, LeBlanc G, Mayes M, Nimrod A, Patino R, Peterson R, Purdy R, Ringer R, Thomas P, Touart L van der, Kraak G, Zacharewsk T. (1998). *Environmental Toxicology Chem.* 17: 68.
- Blaustein JD, Lehman MN, Turcotte JC, Greene G. (1992). Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology*; 131: 281-190.
- Bogdanov MF, Ferrante RJ, Mueller G, Ramos LE, Martinou JC, Beal F. (1999). Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *Neuroscience Letters*; 282: 33-36.
- Brinton RD, Tran J, Proffitt P, Montoya M. (1997). 17  $\beta$  estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochemistry Research*; 22: 1339-1351.
- Brzoski AM, Pike ACW, Dauter Z. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptors. *Nature*; 753-758.
- Burbacher TM, Sackett GP, Mottet NK (1990). Methylmercury effects on the social behavior of *Macaca fascicularis* infants. *Neurotoxicology and Teratology*; 12 (1): 65-71.
- Camparpe PK, Crochemore C, René F, Monnier D, Loeffler JP. (1997). PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *Developmental Cellular Biology*; 16: 323-333.
- Carvalho MC. (2007). Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrio em *Gallus domesticus*. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina.
- Chang LW & Guo GL. (1998). Fetal Minamata disease: Congenital methylmercury poisoning, in: Silkler, WS & Chang LW (Eds.). *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, San Diego.
- Chang LW. (1995). Neurotoxic effects of mercury: A review. *Environmental Research* ; 14: 329-373.
- Chen S, Brinton RD. (1999). Progesterone regulates intracellular calcium concentrations in cultured rat hippocampal neurons. *Society Neuroscience Abstracts*; 25:2118.
- Choi BH, Cho KH, Lapham LW. (1981). Effects of methylmercury on human fetal neurons and astrocytes in vitro: a time-lapse cinematographic, phase and electron microscopic study. *Environmental Research*; 24 (1): 61-74.



- Choi BH, Yee S, Robles M.(1996).The effects of glutathione glycoside in methyl mercury poisoning. *Toxicology Applied Pharmacology*; 141 (2): 357-64.
- Chowen JA, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. (1992). Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*; 56: 895-901.
- Chowen JA, Torres-Aleman, Garcia-Segura LM. (1992). Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*; 56: 895-901.
- Clarkson TW. (1983). Mercury.*Annual Review Public Health.*; (4):375-380
- Clarkson T W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 34 (4): 369-403.
- Clarkson T W. (2002). The three faces of mercury. *Environmental health perspective* 110 (1):11-23.
- Clarkson TW, Magos I, Myers GL. (2003). The toxicology of mercury currents exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine* ; 349: 1731-1737.
- Cleary J, Roulet NT, Moore TR. (2005). Greenhouse gas emissions from Canadian peat extraction, 1990-2000: a life-cycle analysis *Ambio.*; 34(6):456-461.
- Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents.*Annual Review of Pharmacology Toxicology*; 44: 87-110.
- Cotman CW, Foster A, Lanthorn T. (1981). An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacology* ; 27:1-27.
- Dietrich MO, Mantese CE, Anjos G, Souza DO, Farina M. (2005). Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 169-175
- Dodes JE. (2001). The amalgam controversy. An evidency-basead-analysis. *Jada*; 5(132): 348-356.
- Dong L, Wang W, Wang F, Stoner M, Reed JC, Harigai M, Safe S. (1999). Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17 $\beta$  estradiol in breast cancer cells. *Journal of Biology Chemistry*; 274: 32,099-32,107.
- Dringen R, Kussmaul L, Guttere JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. (2000) Metabolim and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*; 62: 649-671.
- Elsner J, Hodel B, Suter KE, Oelke D, Ulbrich B, Schreiner, Cuomo V, Cagiano R, Rosengren LE, Karlsson JE (1988). Detection limits of different approaches in behavioral teratology, and correlation of effects with neurochemical parameters. *Neurotoxicology and Teratology* ; 10 (2):155-167.
- Ernst E e Coon CT (2001). Heavy metals in traditional chinese medicines: a Systematic review. *Clinique Pharmacology Therapy*; 70: 497-504.

- Farina M, Dahm KC, Schwalm FD, Brusque AM, Frizzo ME, Zeni G, Souza DO, Rocha JB. (2003). Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicological Sciences*; (1):135-40.
- Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos ARS.(2005). Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* ; 57 (11):1503-8.
- Farina M, Frizzo M E S, Soares F A, Schwalm FD, Dietrich MO, Zeni G, Souza DO. (2003). Ebselen protects against methylmercury –induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicology Letters* ;144: 351-57.
- Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG. (1994). NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 24; 368(6469): 335-339.
- Fonfria E, Daré E, Benelli E, Sunol C Ceccatelli S. (2001). Translocation of apoptosis-inducing factor cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *European Journal of Neuroscience* 16 :2013-2016.
- Franco JI, Brada HC, Nunes AKC, Ribas CM, Stringari J, Silva AP, Garcia SCG, Moro AM, Bohrer D, Santos ARS, Dafre AL, Farina M. (2006). Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicology and Teratology*, 20: 1-8.
- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairos AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environmental Research* 102 (1):22-28.
- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Moro AM, Bohrer D, Barros AV, Dafre AL, Santos ARS, Farina M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environmental Research* ; 102: 22-28.
- Garcia-Estrada J, Del Rio JÁ, S, Soriano E, Garcia-Segura LM. (1993). Gonadal hormones down regulate reactive gliosis and astrocytes proliferation after a penetrating b injury. *Brain Research*; 628: 271-278.
- Garcia-Estrada J, Luquin S, Fernandez A, Garcia-Segura LM. (1999). Dehydroepiandrosterone, pregnolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating by injury. *Journal Developmental Neuroscience*; 17: 145-151.
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Naftolin F. (1996). Endocrine glia: role of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Neuroendocrinology*; 17: 180-211.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez J, Hutchison JB. (1999). Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*; 89: 567-578.

- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*; 63: 29-60.
- Ghiselli, G, Jardim, W. F. (2005). Resumos da 28<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil.
- Gimenez-Llort L, Ahlbom E, Dare E, Vahter M. (2001). Prenatal exposure to methylmercury changes dopamine-modulated motor activity during early ontogeny: age and gender-dependent effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1; 9 (3): 61-70.
- Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gosdon HS. (1999). Immunophilin FK 506-binding protein 52 mediates the neurotrophic action of FK 506. *Journal of Pharmacology*; 289: 1202-1210.
- Goldey ES, O'Callaghan JP, Stanton ME, Barone S Jr, Crofton KM. (1995). Developmental neurotoxicity: evaluation of testing procedures with methylazoxymethanol and methylmercury. *Fundamental Applied Toxicology*; 24 (2): 290.
- Goldwater L J. (1936) From Hippocrates to Ramazini: early history of industrial medicine. *Annual. Medicine History* ;;8: 27-35.
- Gollalpudi L, Oblinger MM. (1999). Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated ER $\alpha$ -transfected PC 12 cells from apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*; 56: 471-481.
- Gollalpudi L, Oblinger MM. (1999). Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor: protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *Journal Neuroscience Research*; 56: 99-108.
- González B, Hernando R, Manso R. (2000). Anabolic steroid and gender-dependent modulation of cytosolic HSP70s in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Journal Steroids Biochemical Molecular Biology* ; 74: 63-71.
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B. (1996). Estrogens attenuate and androstosterone exacerbates excitatory, oxidative injury and amyloid  $\beta$  peptide toxicity in hippocampal neurons. *Neurochemistry*; 66: 1836-1844.
- Gowen E, Miall RC. (2007). The cerebellum and motor dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Cerebellum*; 6(3):268-79.
- Grandjean P, Weihe P, White RF. (1995). Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology* 16 (1): 27-33.
- Grandjean P, White RF, Weihe P, Jorgensen PJ (2003). Neurotoxicity risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Aliment. Pharmacol. Ther.* ; 3 :18- 23.
- Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. (1996). Estradiol protects against amyloid  $\beta$  peptide toxicity induced in SK-N-SH cells. *Neuroscience Letters*; 218: 165-168.

- Green OS, Gridley KE, Simpkins JW. (1998). Nuclear estrogen receptor –independent neuroprotection by estratrienes: A novel interaction with glutathione. *Neuroscience*; 84: 7-10.
- Green PS, Simpkins JW. (1999). Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *International Journal of Development Neuroscience* ;18: 347-358.
- Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. (1997). Low concentrations of estradiol reduce  $\beta$ -amyloid –induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Research*; 778: 158-165.
- Gu Q, Moss RL. (1996).  $\beta$ -estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *Journal of Neuroscience*; 16: 3620-3629.
- Guo N, McIntosh C, Shaw C. (1992). Glutathione: new candidate neuropeptide in central nervous system . *Neuroscience*; 51: 835-842.
- Guyton AC, Hall J. (2005). *Medical Physiology*, 11 Ed, 74: 903-917.
- Haliwell B, Gutteridge JMC. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. *Trends of Neuroscience*; 8: 22-26.
- Harbison RD, Jones MM, MacDonald JS, Pratt TH, Coates RL. (1977). Synthesis and pharmacological study of a polymer which selectively binds mercury. *Toxicology Applied Pharmacology* ; 42(3):445-454.
- Hawk T, Zhang YQ, Rajakumar G, Simpkins JW. (1998). Testosterone increases and estradiol decrease middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Research*; 796: 296-298.
- Hayashi T, Ishikawa T, Yamada K, Kuzuyuz M, Naito M, Iguchi A. (1994). Biohasic effect of estrogen on neuronal constitutive nitric oxide synthase via Ca-calmodulin dependent mechanism. *Biochemistry Biophysical Research*; 203: 1013-1019.
- Hirayama K, Yasutake A, Inque M. (1986). Effect of sex hormone on the fate of methylmercury and glutathione metabolism in mice. *Biochemical Pharmacology*; 36 (12): 1919-1924.
- Hoberman JM, Yesalis CE. (1995). The history of synthetic testosterone. *Science Ambiental*; 272:60-5.
- Hoffman DJ, Rattner B A, Burton Jr G.A, Cairns Jr AM. (2003). *Handbook of Ecotoxicology*; 2 ed., Lewis Publishers, section V, cap. 39.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepresors. *Molecular Endocrinology*; 10: 1167-1177.
- Hughes WH. (1957). A physiocochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. *Ann. NY Academy Science* 65: 4 54-60.

- Janaki R, Varga V, Saransaari P, Oja SS. (1993). Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters*; 156: 153-157.
- Ji L, Mochon E, Arcinas m, Boxer LM. (1996). CREB protein function as positive regulators of the translocated bcl-2 allele in the lymphomas. *Journal Biology Chemistry*; 271: 22(687) 22(691).
- Jordan CL. (1999). Glia as mediators of steroid hormone action on the nervous system: an overview. *Journal of Neurobiology*; 40: 434-445.
- Juarez BI, Martinez ML, Montante M, Dufour L, Garcia E, Jimenez-Capdeville ME. (2002). Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. *Neurotoxicology and Teratology*; 24 (6):767-71.
- Kajiwara Y, Yasutake A, Adachi T, Hirayama K. (1988) Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Archives of environmental contamination and Toxicology*; 70: 310- 314
- Keller JN, Germeyer A, Begley JG, Mattson MP. (1997). 17 $\beta$ -estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na/K/ATPase activity, glucose transport and glutamate transport induced by amyloid  $\beta$ -peptide and iron. *Neuroscience Research* 50: 522-530.
- Kobayashi Y, Shinozawa T. (1997). Effect of dibutyl cAMP and several reagents on apoptosis in PC12 cells induced by sialoglycopeptide from bovine brain. *Brain Research*; 778:309-317.
- Kuipper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat brain. *Hormonal Behavior*; 93: 5925-5930.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*; 5; 364 (6437) :535-7.
- Laguna A. (1955). Pedacio Dioscorides Anazarbeo. *Acerca de la Materia Medicinal y de los venenos mortiferos*; Libro V, Cap. LXLIX: Del Azogue 540-42.
- Lebel CP, Bondy SC. (1991). Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology*; 13 341-346.
- Li K, Futrell N, Tovar S, Wang LC, Schultz LR. (1996). Gender influences the magnitude of the inflammatory response within embolic cerebral infarcts in young rats. *Stroke*; 27: 498-503.
- Lintelmann, J, Katayama A., Kurihara N, Shore L, Wenzel A. (2003). Endocrine Disruptors in the environment. *Pure Applied Chemical*.; 75 (5): 631-681.
- Litwack G, Schimidt TJ. (1997). Biochemistry of hormones II: steroids hormones. In: Devlin TM, editor. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*; 7: 893-918.

- Lomaestro BM, Malone M. (1995). Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother.*; 29(12): 1263-73.
- Magos L, Brown AW, Sparrow S, Bailey E, Snowden RT, Skipp WR (1985). The comparative toxicology of ethyl-and methylmercury. *Archives of environmental contamination. Toxicology*; 57 (4): 260-7.
- Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, Abreu F, Oliveira A, Bizarro L, Rocha JB, Frizzo ME, Souza DO, Farina M. (2004). Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicological Sciences*; 81(1): 172-178.
- Marsh DO, Turner MD, Smith JC, Allen P, Richdale N. (1995) Fetal methylmercury study in a Peruvian fish-eating population. *Neurotoxicology* ; (4):717-726.
- Matsumoto A, Arai Y, Osanai M. (1991). Estrogen stimulates neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus in aged female rats. *Neuroscience Research* 1985; 2: 412-418.
- Matsumoto A, Arai Y. Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology*; 16: 25-40.
- McEwen BS, Alves SE (1985). Estrogen actions in the CNS. *Endocrinology Review*; 20: 279-307.
- McEwen BS, Parsons B. (1982). Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Annual Review Pharmacology*; 22 555-598.
- McEwen BS. (1996) Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptor. *Cell Molecular Biology* 16; 103- 116.
- McQueen JK, Wilson H, Fink G, Dekoski ST, Pollock BG, Mathis CA, Reynolds CF. (1997). Estradiol 17 beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and density of SERT-binding sites in female rat brain. *Brain Research*; 45: 13-23.
- Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. (1999). Steroid metabolism and effects in central and peripheral glial cells. *Journal of Neurobiology*; 40: 471-483.
- Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *Journal of Neuroscience*; 16: 595-604.
- Merry D, Korsmeyer SJ. (1997). Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annual Review Neuroscience*; 20: 245-267.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP. (2001). Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *Journal Complementar Neurology*; 429: 335-371.

- Moosman B, Behl C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Biochemical Molecular Biology*; 96: 8867-8872.
- Murakami U. (1972). Embryo-fetotoxic effect of some organic mercury compounds. *Annual Rep. Res. Institute Environmental Medicine of Nagoya University*; 19: 61-68.
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye C, Cernichiari E, Clarkson TW. (2000). Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Environmental Research*; 83 (3): 275-85.
- Nichols NR. (1999). Glial responses to steroids as marker of brain aging. *Journal of Neurobiology*; 40: 585-601.
- Ninomiya T, Hohmori H, Hashimoto K, Tsuruta K, Ekino S. (1995). Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: an epidemiological study of chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. *Environmental Research* 70: 47-50.
- Nishino H, Nakajima K, Fukuda A, Muramatsu CV, Sanberg PR. (1998). Estrogen protects against while testosterone exacerbates vulnerability of the lateral striatal artery to chemical hypoxia by 3-nitropropionic acid. *Neuroscience Research* 30: 303-312.
- Nishiyama S, Taguchi T, Onosaka S. (1987). Induction of zinc-thionein by estradiol and protective effects on inorganic mercury-induced renal toxicity. *Biochemical Pharmacology*; 36: 3387-3391.
- Oestreicher AB, De Graan PN, Gispens WH, Verhaagen J, Schrama LH. (1997). B-50, the growth associated protein-43 modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Progress in Neurobiology*; 53: 627-686.
- Oja SS, Janaki R, Varga V, Saransaari P. (2000). Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemical International*; 37: 299-306.
- Ojeda SR, Ma YJ. (1999). Glial-neuronal interactions in the neuroendocrine control of mammalian puberty: facilitatory effects of gonadal steroids. *Journal of Neurology*; 40: 528-540.
- Okamura-Ikeda K, Ikeda Y, Tanaka K. (1985). An essential cysteine residue located in the vicinity of the FAD-binding site in short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*; 260 (2): 1338-1345.
- Oliveira FT, Ferreira JR, Santos CC, Macedo EM, Rodrigues JÁ, Nascimento JL, Faro LF, Diniz DP. (2006) Estradiol reduces cumulative mercury and associated disturbances in the hypothalamus axis of ovariectomized rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 63: 488-493.
- Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Popella A. (2002). Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemistry Pharmacology*; 64: 1027-1035.

- Prfaff D, Keiner M. (1975). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *Journal Comportamental Neurology*; 151: 121-158.
- Puttfarcken PS, Manelli AM, Falduto MT, Getz GS, LaDu MJ. (1997). Effect of apolipoprotein E on neurite out-growth and  $\square$  amiloyd-induced toxicity in developing rat primary hippocampal primary culture. *Journal of Neurochemistry*; 68: 760-769.
- Rackman H. Pliny (1952). *Natural History Vol. 9*, (Haward University Press: Cambridge, MA, USA).
- Ramirez VD, Zheng J. (1996). Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front. Neuroendocrinology*; 17: 402-439.
- Rissanen A, Puolivali J, van Groen T, Rickkinen P. (1999). In mics tonic estrogem repalcement therapy improves non-spatial and spatial memory in a water maze task. *Neuroport*; 10: 1369-1372.
- Rosenberger J Petrovics G, Buzas B. (2001). Oxidative stress induces poorphanin FQ and proenkephalin gene expression in astrocytes trough p38-and ERK-MAP kinases and NF-kappaB. *Journal Neurocehmistry*; 79:35-44.
- Ross SH, Lindsay Y, Safrany ST, Lorenzo O, Villa F, Toth R, Clague MJ, Downes CP, Leslie NR. (2007). Differential redox regulation within the PTP superfamily. *Cell Signal.*; 19(7):1521-30.
- Rossi DJ, Slater NT (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronalmigration. *Neuropharmacology*. 32 (11): 1239-1248.
- Rossi AD, Ahlbom E, Ogren SO, Nicotera P, Ceccatelli S. (1997). Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. *Brain Research*; 17(3): 428-36.
- Rossi AD, Viviani B, Zhivotovsky B, Manzo L, Orrenius S, Vahter M, Nicotera P. (1997). Inorganic mercury modifies Ca<sup>2+</sup> signals, triggers apoptosis and potentiatesNMDA toxicity in cerebellar granule neurons. *Cell Death Differ.* ; 4 (4): 17-24.
- Rydel RE, Greene LA. (1988). CAMP analogs promote survival and neurite out-growth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*; 85: 1257-1261.
- Sanfeliu C, Sebastiá J, Cristofoli R, Farré ER. (2003). Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotoxicity Research*; 4: 283-306.
- Sarafian T, Verity (1991). Oxidative mechanisms underlying methylmercury neurotoxicity. *Int J Dev Neurosci*. 9(2): 147-53.
- Shimada K, Mitamura K, Higashi T. (2001). Gas chromatography and high performance liquid chromatography of naturals steroids. *J. Chromatography*; 920-934.



- Shinyashiki M, Kumagai Y, Nakajima H, Nagafune J, Homma-Takeda, Sagai M. (1998) Differential changes in rat brain nitric synthase in vivo and in vitro by methylmercury. *Brain Research*; 798: 147-155.
- Shufhrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. (1998). Regulation of progesterone receptor mRNA in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds an in situ hybridization study. *Endocrinology*; 139: 5649-5652.
- Shufhrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. (1998). Evidence for the colocalization of estrogen receptors - $\alpha$  in m RNA and estrogen receptor  $\alpha$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*; 159: 5267-5270.
- Simerly RB. (1990). Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends in Neuroscience*; 13: 104-110.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. (1999). The MAPK pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *Journal of Neuroscience*; 19: 2455-2463.
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. (1996). Estrogen protect primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience Letters*; 212: 13-16.
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. (1998) Modulation of bcl-2expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*; 9: 2565-2568.
- Singh M, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD. (1999). Estrogen-induced activation of MAPK in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *Journal of Neuroscience*; 9:1179-1188.
- Stringari J, Meotti FC, Souza DO, Santos AR, Farina M. (2006) Postnatal Methylmercury Exposure Induces Hyperlocomotor Activity and Cerebellar Oxidative Stress in Mice: Dependence on the Neurodevelopmental Periodics *Neurochem Res* (31) 563-569.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S. (2002). ER-X: a novel, plasma membrane-associated putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *Journal of Neuroscience*; 22: 8391-8401.
- US EPA : Health effects of mercury and mercury compounds. Mercury Study report to Congress 1997, vol. V EPA-452/R-97-007. (Environmental Protection Agency Washington DC, USA).
- US EPA: Water Quality Criterion for the protection of Human Health: Methylmercury EPA 0823-R-01-001 (Environmental Protection Agency Washington DC, USA).
- Vedder H, Anthes N, Stumm G, Behl C, Krieg JC. (1999). Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*; 72: 2531-2538.
- Vedder H, Anthes N, Stumm G, Wurz C, Behl C, Krieg JC. (1999). Estrogens hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of central nervous system. *Journal of Neurochemistry*; 72: 2531-2538.

- Watts J. (2001) Mercury poisoning victims could increase by 2000. *Lancet*; 358: 1349.
- Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. (1997). Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Research*; 761; 338-341.
- Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kowk GR, Melnerney E, Katzenellenbogen GS, Enmark E, Gustafsson JA, Kushner PJ. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Molecular Endocrinology*; 13: 1672-1685.
- WHO Environmental Health Criteria 1. Mercury International Program on Chemical Safety. (Geneva; World Health Organization, 1976).
- WHO Environmental Health Criteria 101: Methylmercury International Program on Chemical Safety . (Geneva; World Health Organization, 1990).
- WHO Environmental Health Criteria 88: Environmental aspects of mercury. International Programme of Chemical Safety (Geneva; World Health Organization, 1989).
- WHO Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury. International Program on Chemical Safety . (Geneva; World Health Organization, 1991).
- Wilson JC, Wu G, Tsai AL, Gerfen GJ. (1986). Inhibition of erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by activated oxygen through thiol- and lipid-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta.*; 862(1): 8-16.
- Williams CL, Satncel GM. (1999). Estrogenos e Progestogenos. In Hardman JG, Limbird LE. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 9 Ed. RJ Mc Graw-Hill., 1996 1045-1067.
- Wise PM. (2002). Estrogens and Neuroprotection. *Trends in Endocrinology and Metabolism*; 13 (6): 229-230.
- Yang S, Perez E, Cutriht J, Liu R, He Z, Simpkins JW. (2002). Testosterone increases neurotoxicity of glutamate in vitro and ischemia-reperfusion injury in an animal model. *Journal Applied Physiology*; 92: 195-202.
- Yee S., Choi BH. (1994). Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Neurotoxicology* ; 60: 188-196.
- Yee S., Choi BH. (1996). Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*; 10: 17-26.
- Yu WA. (1989). Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain stem motor nuclei of female rats. *Journal of Neuroscience*; 9: 3908-3914.
- Zauolyanov L, Green PS, Simpkins JW. (1999). Glutamate receptor requirement for neuronal cell death from anoxia-reoxygenation: an in vitro model for assessment of

the neuroprotective effects of estrogens. *Cellular and Molecular Neurobiology*; 19: 705-718.

MALAGUTTI, Keller S. EFEITOS NEUROTÓXICOS DO METILMERCÚRIO EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM CAMUNDONGOS: SUSCEPTIBILIDADE SEXO-DEPENDENTE E POTENCIAL EFEITO PROTETOR DOS ESTRÓGENOS. Florianópolis, 2007, 63 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Curso de Pós Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina.

Efeitos neurotóxicos do metilmercúrio sobre os parâmetros comportamentais (relacionados à locomoção) e bioquímicos (relacionados ao estresse oxidativo) em modelos experimentais com camundongos adultos. Susceptibilidade sexo-dependente e potencial efeito protetor dos estrógenos.

Palavras-chave: metilmercúrio, estresse oxidativo, estrógenos, estradiol, neurotoxicidade.