

DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES

EFEITOS CITOPROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla*) EM MODELO *IN VITRO* DE
EXPOSIÇÃO MERCURIAL

BELÉM
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES

EFEITOS CITOPROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla*) EM MODELO *IN VITRO* DE
EXPOSIÇÃO MERCURIAL

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração em Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências).

Orientadora: Professora Dra. Elizabeth Sumi Yamada.

Co-Orientador: Professor Dr. Edmar Tavares da Costa.

BELÉM
2009

DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES

EFEITOS CITOPROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla*) EM MODELO *IN VITRO* DE
EXPOSIÇÃO MERCURIAL

Dissertação submetida à aprovação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências), pelo Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientadora: Professora Dra. Elizabeth Sumi Yamada
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Co-Orientador: Professor Dr. Edmar Tavares da Costa
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca examinadora: Professora Dra. Maria Elena Crespo López (Titular)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Professor Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano (Titular)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Professor Dr. Wallace Gomes Leal (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 16 de dezembro de 2009

Aos meus pais,
por ajudarem a trilhar meu caminho...

Aos meus irmãos,
pelo companheirismo...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por se fazer presente em todos os momentos, transmitindo-me paz, força, tranqüilidade e sabedoria para que eu pudesse enfrentar todos os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Sousa Lopes e Vera Lúcia Favacho Lopes, **em especial**, que com amor, carinho e dedicação abriram as portas para o futuro e me impulsionaram a buscar um ideal. Agradeço a vocês com honra e dignidade.

Aos irmãos Douglas Lobato Lopes Neto e Danilo Luiz Favacho Lopes, pelo carinho e cumplicidade durante toda essa jornada.

Ao meu namorado Joelton Fernandes Fonseca, que por inúmeras vezes foi deixado de lado durante esta jornada e que, mesmo assim, com muito carinho, atenção e paciência nunca deixou de me apoiar e me incentivar nos momentos de aflição.

A minha orientadora, Elizabeth Sumi Yamada, a quem admiro muito pela excelente profissional que é.

Ao meu orientador, Edmar Tavares da Costa, pela amizade e por estar sempre disponível a me ajudar e aconselhar da melhor forma possível e pelo crescimento profissional.

Ao professor e amigo Arnaldo Jorge Martins Filho, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na minha vida científica e por nunca ter se negado a ajudar nos momentos em que precisei.

Aos mestrandos Ana Alice Pereira Batista, por toda ajuda que me deu durante a execução dos experimentos do meu trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental, Amanda Resende, Nilton Barreto, Patrick Lopes, Geovanny Lima e aos demais por todos os momentos, difíceis e agradáveis, que passamos juntos.

"Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do homo ludens: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão".

Jacques Barzun

RESUMO

A exposição a compostos mercuriais resulta em danos oxidativos em sistemas orgânicos diversos, embora afetando mais gravemente o sistema nervoso central. Este trabalho utilizou culturas primárias de células cerebelares a fim de investigar efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a neurodegeneração induzida por exposição ao metilmercúrio (MeHg). Culturas primárias cerebelares foram expostas a MeHg (10 e 100 nM, e 1-10 μ M) no 8º dia *in vitro*, por períodos variáveis de tempo (12 e 24 horas, 3 e 5 dias). A toxicidade associada à exposição ao MeHg foi avaliada em culturas mistas e semipuras cerebelares de ratos neonatos Wistar (P5-P7), através do ensaio de redução do MTT. Como esperado, nossos resultados mostraram que a exposição ao MeHg resulta em efeitos deletérios dependentes de concentração e tempos de exposição. Culturas semipuras de neurônios mostraram-se mais suscetíveis a estes efeitos do que culturas mistas neurônios/glia. A exposição concomitante a extrato aquoso obtido a partir de folhas de mogno, quimicamente constituído de compostos flavonóides e fenólicos com alta capacidade antioxidante, resultou em evidente proteção ante a perda celular induzida por MeHg, restaurando os valores de viabilidade celular para valores próximos aos encontrados em poços-controle. Estratégias de pré-exposição ao extrato de mogno resultaram em efeito mais discreto, enquanto que a pós-exposição não mostrou efeitos significativos ante a exposição ao MeHg. Estes resultados confirmam a capacidade deletéria e seletiva do MeHg sobre células cerebelares, ao mesmo tempo em que sugerem que estes efeitos parecem ser mediados por mecanismos oxidativos, a julgar pela capacidade de reverter estes efeitos com a utilização do extrato aquoso de folhas de mogno.

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that mercury exposure results in oxidative damages in several organic systems, specially and more prominently the central nervous system. We used cerebellar primary cultures to investigate the putative cytoprotective effect of an aqueous extract of mahogany leaves on the deleterious effects induced by methylmercury (MeHg) exposure. Primary mixed and semipure cerebellar cultures from 5-7 days neonates were exposed to MeHg (10 and 100 nM, 1-10 μ M) at day 8 *in vitro*, for different periods of time (12 and 24 hours, 3 and 5 days). The toxicity associated with the MeHg exposure was evaluated through the MTT reduction assay. As expected, our results showed that MeHg exposure resulted in deleterious effects both dose- and time-dependent. Semipure cultures were more susceptible to these effects than mixed ones. Co-administration of MeHg and mahogany extract, rich in flavonoids and phenolic compounds with high antioxidant properties, clearly protected the cultures from the cell loss induced by MeHg, restoring cell viability to the values found in the control group. Pre-exposure to the mahogany extract resulted in less prominent effect, while post-exposure had no protective effect at all. Our results confirm MeHg as a selective, toxicant compound to the cerebellar cells and at same time suggest a pro-oxidative mechanism for its effects, as assumed by the neuroprotective effect of a natural mix of antioxidant compounds.

SUMÁRIO

	RESUMO	vii
	ABSTRACT	viii
	LISTA DE FIGURAS	xi
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ACIDENTES ENVOLVENDO CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO.....	3
1.1.1	Contaminação por Mercúrio na Amazônia Brasileira	4
1.2	EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO.....	6
1.2.1	Interações Intracelulares de Compostos Mercuriais	11
1.2.2	Influência Glial na Neurotoxicidade Induzida por Mercúrio	12
1.2.3	Mecanismos Moleculares de Neurotoxicidade de Compostos Mercuriais	14
1.2.3.1	Interação com Grupamentos Sulfidrilas.....	14
1.2.3.2	Envolvimento de Mecanismos Excitotóxicos.....	15
1.2.3.3	Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	16
1.3	O PAPEL DE ANTIOXIDANTES NA REDUÇÃO DA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR COMPOSTOS MERCURIAIS.....	18
1.4	OBJETIVOS.....	22
1.4.1	Objetivo Geral	22
1.4.2	Objetivos Específicos	22
2	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1	ANIMAIS.....	23
2.2	CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE NEURÔNIOS/CÉLULAS DA GLIA E SEMIPURAS DE NEURÔNIOS.....	23
2.3	IMUNOCITOQUÍMICA.....	25
2.4	EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS MERCURIAIS E TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>Swietenia macrophylla</i>	26
2.4.1	Protocolo de Exposição das Culturas ao Cloreto de Metilmercúrio	26
2.4.2	Administração do Extrato Aquoso de Folhas de <i>Swietenia macrophylla</i>	27
2.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	29
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30

3	RESULTADOS	31
3.1	COMPOSIÇÃO CELULAR DE CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS E SEMIPURAS DERIVADAS DE CEREBELO.....	31
3.2	EFEITOS NEUROTÓXICOS DO METILMERCÚRIO SÃO DEPENDENTES DE CONCENTRAÇÃO E DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO.....	34
3.3	INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS CITOPROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO (<i>Swietenia macrophylla</i>) NESTE MODELO DE EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO.....	38
4	DISCUSSÃO	44
5	CONCLUSÕES	54
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas primárias cerebelares.....	27
Figura 2	Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas mistas com extrato aquoso de folhas de mogno.....	28
Figura 3	Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas com extrato aquoso de folhas de mogno no modelo de intoxicação mercurial.....	28
Figura 4	Fotomicrografia das culturas primárias derivadas de cerebelo.....	32
Figura 5	Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de cerebelo.....	33
Figura 6	Efeito do MeHg sobre culturas cerebelares submetidas à exposição aguda por 12 horas.....	35
Figura 7	Efeito do MeHg sobre culturas cerebelares submetidas à exposição aguda por 24 horas.....	35
Figura 8	Efeito do MeHg sobre culturas cerebelares submetidas à exposição subcrônica por 3 dias.....	37
Figura 9	Efeito do MeHg sobre culturas cerebelares submetidas à exposição subcrônica por 5 dias.....	37
Figura 10	Curva de concentração e de tempo de exposição ao extrato aquoso de folhas de mogno em culturas mistas.....	39
Figura 11	Efeito citoprotetor do extrato aquoso de folhas de mogno em culturas mistas expostas ao MeHg por 24 horas.....	42
Figura 12	Efeito citoprotetor do extrato aquoso de folhas de mogno em culturas mistas expostas ao MeHg por 3 dias.....	42
Figura 13	Efeito citoprotetor do extrato aquoso de folhas de mogno em culturas mistas em condições de pré- e pós-exposição no modelo de intoxicação mercurial.....	43

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal de cor prateada e o único encontrado em estado líquido à temperatura ambiente (OMS, 2000; AZEVEDO, 2003).

Existe em algumas formas químicas, incluindo o mercúrio elementar (mercúrio metálico, Hg^0), mercúrio inorgânico (sais e óxidos do íon mercuroso e de íon mercúrico) e mercúrio orgânico (derivados de alquil-, alcoxialquil- e arilmercuriais). Algumas destas formas possuem características altamente tóxicas quando em contato com o meio ambiente e/ou organismos (OMS, 2000; ALLEN *et al.*, 2002; AZEVEDO, 2003; GOCHFELD, 2003; FONFRÍA *et al.*, 2005).

O mercúrio é um elemento altamente distribuído nos vários compartimentos da natureza: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera; raramente encontrado livre na natureza e amplamente distribuído, em baixas concentrações, por toda a crosta terrestre (OMS, 2000; AZEVEDO, 2003; GOCHFELD, 2003).

A importância desta distribuição global dos compostos inorgânicos derivados do mercúrio está na tendência de serem biotransformados no ambiente aquático para compostos orgânicos muito mais estáveis (GOCHFELD, 2003). O mercúrio metálico (Hg^0), por exemplo, lançado na atmosfera pode, após oxidação a Hg^{2+} e transporte para rios e floresta, sofrer ação de bactérias e ser metilado, transformando-se em metilmercúrio (MeHg), forma mais tóxica para os seres vivos (AZEVEDO, 2003).

A forma orgânica desse metal tem uma estabilidade maior no organismo do que o mercúrio inorgânico e os processos capazes de desmetilar o metilmercúrio, transformando-o em Hg inorgânico, podem auxiliar na excreção do metal. Sua possível interferência nos processos de divisão celular pode resultar em problemas neurológicos graves e mesmo má formação cefálica (MICARONI *et al.*, 2000).

A distribuição do MeHg, ocorre através da corrente sanguínea para todos os tecidos, tendo facilidade para atravessar as barreiras hematoencefálica e placentária, o que facilita seu acúmulo no encéfalo e, mais grave ainda, no organismo fetal (ETO, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2000; OMS, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; SAKAMOTO *et al.*, 2002). Os rins retêm uma concentração elevada, embora a quantidade total de mercúrio depositada nos músculos possa ser maior. A relação de concentração de mercúrio encéfalo:sangue é aproximadamente de 5:1, enquanto que esta relação para a concentração cabelo:sangue é de 250:1 (OMS, 2000).

A exposição humana aos compostos mercuriais ocorre principalmente através do consumo de peixes de regiões contaminadas maciçamente por mercúrio (DAVIDSON *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 2000; AZEVEDO, 2003; PASSOS *et al.*, 2007), tais como aquelas em que ocorre a sua utilização em áreas de garimpo, um tipo de exposição ocupacional que representa elevado potencial para o desenvolvimento de intoxicação crônica dos habitantes, assim como dos próprios garimpeiros (AZEVEDO, 2003; PASSOS *et al.*, 2007).

Existem alguns fatores que contribuem para que o mercúrio seja considerado como um dos principais elementos tóxicos ao meio ambiente e ao homem: (1) a grande liberação de mercúrio inorgânico a partir de fontes naturais e antropogênicas; (2) a metilação do mercúrio inorgânico para MeHg e subsequente bioacumulação e biomagnificação, na cadeia alimentar, especialmente em peixes; e (3) a utilização, mesmo que em menor escala nos dias atuais, de amálgama dentário a base de mercúrio (PASSOS *et al.*, 2007; para revisão ver CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005).

1.1 ACIDENTES ENVOLVENDO CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO

O metilmercúrio é facilmente absorvido por peixes e outros animais aquáticos, o que provoca a deposição dessa substância química nos tecidos desses animais, a qual se acumula ao longo do tempo, atingindo, na cadeia biológica, concentrações bem maiores que as originalmente encontradas no ambiente (AZEVEDO, 2003).

Por volta da década de 1950, na Baía de Minamata, Japão, ocorreu o maior acidente ambiental com mercúrio, resultando em graves danos à saúde humana. Uma fábrica de produtos químicos produzia MeHg como subproduto da síntese de acetaldeído. Esta empresa japonesa utilizava ácido acético e cloreto de mercúrio para a produção de cloreto de vinila, despejando o MeHg diretamente na baía, levando a contaminação da biota aquática, principal fonte de alimento da população local (AZEVEDO, 2003).

Os resultados da exposição ocorrida neste episódio, resumidos com o nome de doença de Minamata, resultaram em diversos achados relacionados a funções neurais, tais como constrição do campo visual e outras anormalidades visuais, parestesia (perda da sensibilidade), ataxia cerebelar (falta de coordenação da atividade muscular voluntária), perda auditiva, fraqueza muscular, tremor e deterioração mental (ATCHISON & HARE, 1994; ETO, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2006).

Outra grande epidemia de envenenamento por mercúrio ocorreu no Iraque durante o inverno de 1971-1972 e representou uma oportunidade de se estudar os efeitos desta neurotoxina. O reconhecimento precoce do MeHg como a causa e a ação pública empregada pelas autoridades limitou a época de exposição a alguns meses, ainda assim resultando em milhares de casos de envenenamento por

compostos organomercuriais, cuja principal fonte de exposição foi através de grãos de sementes tratados com alquilmercúrio e que os fazendeiros utilizaram para fabricação de pão (AL-DAMLUJI, 1976; AL-TIKRITI & AL-MUFTI, 1976).

Os achados resultantes da análise dos acidentes em Minamata, no Iraque e em outras localidades, levantaram grande preocupação em saúde pública, a de que a exposição a baixos níveis de metilmercúrio a partir do consumo de peixes e outros alimentos poderia representar um risco súbito, não só ao SNC adulto, mas principalmente ao SNC fetal. Entretanto, nestes episódios houve envenenamento maciço de bacias hidrográficas relativamente pequenas e de outras fontes de alimentos daquelas populações em que as exposições foram substanciais. Em contraste, o consumo de peixes em regiões onde a bacia hidrográfica é extensa, como ocorre na região amazônica, por exemplo, resulta em exposição muito menor, diluída em um longo período de tempo. Não é conhecido, até o presente momento, como este paradigma de exposição ao mercúrio pode influenciar no desenvolvimento do sistema nervoso de populações dependentes desta fonte de alimentos.

1.1.1 Contaminação por Mercúrio na Amazônia Brasileira

Na região da Amazônia Brasileira, a poluição por mercúrio está diretamente relacionada às atividades de mineração de ouro (garimpos) que usam o mercúrio para aglutinar partículas finas de ouro com um processo de amalgamação (FIGUEIREDO, 2001). Para a separação do ouro, a amálgama é exposta ao calor fazendo com que o mercúrio utilizado seja transformado em vapor metálico. Este vapor de Hg^0 sofre oxidação voltando à atmosfera e depositando-se nos rios, onde sofre metilação, e acumulando-se conseqüentemente na biota marinha (AZEVEDO,

2003). A explosão dos garimpos de ouro ocorreu no início dos anos 1980 e a quantidade do mercúrio liberada na região amazônica foi estimada baseando-se na produção oficial de ouro, sendo liberado nessa época cerca de 1.400 toneladas de mercúrio (FIGUEIREDO, 2001).

Condizente com o exposto no parágrafo anterior existe atualmente grande preocupação acerca da poluição por mercúrio na região amazônica relacionada à exposição das populações ribeirinhas através do consumo de peixes. Na base do Rio Tapajós, no Estado do Pará, área em que mais de 50% dos garimpos da região Norte estavam concentrados nos anos 80 e 90, um estudo de Bidone e colaboradores (1997) apontaram que 27 espécimes de peixes estudados apresentaram concentrações de mercúrio mais elevadas do que $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Passos e colaboradores (2007) mostraram uma evidência de relação positiva entre o consumo de peixes e o conteúdo de mercúrio nas amostras de sangue e urina de sete comunidades ribeirinhas a margem do Rio Tapajós sem histórico de exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico ou através de amálgama dentário, cuja dieta está baseada no consumo de peixe.

Outros estudos comparativos entre populações ribeirinhas de diferentes regiões da Amazônia destacam a monitoração contínua de populações expostas e não-expostas, a avaliação da defesa antioxidante em combate a exposição ao mercúrio, além da validação das doses de referências para intoxicação de crianças por mercúrio que possam acarretar em prejuízo no desenvolvimento do sistema nervoso. Estes estudos são importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção acerca da contaminação por mercúrio na Amazônia (PINHEIRO *et al.*, 2006; 2007; 2008), principalmente levando-se em consideração que o mercúrio

continua sendo amplamente usado para separar ouro em jazidas e segue, assim, a poluir rios.

1.2 EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO

Muito embora causem efeitos lesivos em diversos tecidos do corpo, os derivados mercuriais possuem maior tropismo por elementos do SNC, especialmente em organismos em desenvolvimento, apesar de causarem danos específicos no sistema nervoso como um todo (central e periférico) (ETO, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; LIMKE *et al.*, 2004).

Em humanos adultos, os danos são seletivos a determinadas áreas do cérebro associado com funções sensoriais e de coordenação, particularmente neurônios do córtex visual e do cerebelo (OMS, 2000). O sistema nervoso periférico (SNP) também pode ser afetado, especialmente em doses elevadas, porém somente após o aparecimento dos efeitos no SNC (OMS, 2000).

Por outro lado, o encéfalo fetal também pode ser afetado mesmo quando a mãe não demonstra sinal de envenenamento, como visto nos casos ocorridos no Japão e Iraque (ETO, 2000; OMS, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001). Crianças iraquianas expostas *in utero* apresentaram deficiências no desenvolvimento, inclusive redução da fala e de funções motoras, sensoriais e autonômicas (LIMKE *et al.*, 2004). Desta forma, ao contrário da toxicidade em adultos, o envenenamento fetal causa um padrão específico de dano que depende da forma química, concentração e duração da exposição ao composto, bem como do estágio de desenvolvimento (MONNET-TSCHUDI *et al.*, 1996), tornando o período pré-natal o estágio de vida humana mais suscetível à intoxicação por compostos mercuriais.

Experimentos demonstram que a forma orgânica do mercúrio acumula-se em várias regiões do sistema nervoso central de ratos, tais como córtex, estriado, hipocampo, tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal. Em humanos e roedores existem indicações de que o sistema dopaminérgico seja vulnerável ao dano causado por este composto (GÖTZ *et al.*, 2002). Além disso, outros trabalhos, como o de Chapman & Chan (1999) e Passos e colaboradores (2007), afirmam que o metilmercúrio pode ser desmetilado e depositado nos tecidos na sua forma inorgânica, levantando a hipótese de que o composto inorgânico seja pelo menos parcialmente responsável pelos eventos que conduzem a neurotoxicidade.

Os correlatos clínicos provocados pela intoxicação através de derivados mercuriais podem surgir dentro de semanas ou mesmo meses após a exposição, sempre relacionados ao tipo de composto envolvido, concentração máxima no SNC e tempo de exposição ao mercúrio (OMS, 2000; AZEVEDO, 2003). Assim, a exposição a altas concentrações pode resultar em cegueira, surdez e retardo mental grave. Microscopicamente, observa-se desorganização da citoarquitetura do córtex cerebral devido à degeneração e redução do número destas células nervosas afetando todos os lobos. No cerebelo, é observada uma grave atrofia dos hemisférios (AZEVEDO, 2003). Exposição em baixas doses, por outro lado, pode produzir deficiência visual e auditiva, redução no desenvolvimento da fala e outros atrasos no desenvolvimento (CASTOLDI *et al.*, 2001). As exposições de longa duração, a baixas concentrações, relacionam-se com deficiências de atenção, memória e funções motoras, como redução da força e sensações musculares, parestesia e reflexos anormais, que podem estar relacionadas com a vulnerabilidade seletiva das células cerebelares (LIMKE *et al.*, 2004).

O quadro neurológico da intoxicação por compostos mercuriais inclui ataxia, disartrias (problemas na articulação das palavras), parestesia (especialmente nas mãos, pés e em torno da boca), perda da audição, além de constrição do campo visual, que pode evoluir para a cegueira, mudança comportamental, retardo mental, espasmos mioclônicos, padrões encefalográficos normais, hiperreflexia, excitação e uma síndrome semelhante à esclerose lateral amiotrófica (AZEVEDO, 2003).

As mudanças patológicas observadas no encéfalo da população atingida pela doença de Minamata ocorreram principalmente no córtex calcarino (área visual primária), além de alterações nos giros pós- e pré-central e lobo temporal. Pacientes expostos agudamente demonstraram degeneração secundária do trato piramidal e da parte central da substância branca do córtex cerebral (ETO, 2000).

Os sinais primários de intoxicação por mercúrio são consequentes a danos causados em áreas anatômicas do SNC relacionados com a perda de neurônios do córtex cerebral e células granulares do cerebelo.

Exames patológicos de pacientes envenenados com MeHg indicaram que o córtex cerebelar é preferencialmente afetado, com as células granulares bem mais suscetíveis do que as células de Purkinje. Esta suscetibilidade das células granulares pode estar relacionada com interações não específicas de mercúrio com proteínas celulares (FONFRÍA *et al.*, 2001) e alta densidade de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (*n*-metil-D-aspartato) (ASCHNER *et al.*, 2000), além da alta lipossolubilidade destes compostos e suas interações com grupos tióis. Contudo, estudos mostraram acúmulo de mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) no citoplasma de células de Purkinje, ausente nas células granulares do cerebelo, onde as mudanças morfológicas são mais proeminentes em resposta a exposição ao MeHg (ALLEN *et al.*, 2002), mostrando que os compostos mercuriais possuem

comportamentos diferentes dentro do organismo. Assim como sintomas causados por MeHg em adultos, crianças afetadas exibem severa atrofia do córtex cerebelar, com degeneração e virtual desaparecimento das células da camada granular (LIMKE *et al.*, 2004). Porém, estudos como o de Allen e colaboradores (2002) mostraram que, diferente dos casos em adultos, onde neurônios do córtex cerebelar permanecem relativamente não afetados, as crianças exibem um estreitamento da camada molecular cortical e redução no número de neurônios de Purkinje.

Estudos realizados em ratos e primatas expostos ao MeHg resultaram em altos níveis de Hg^{2+} no SNC, possivelmente como resultado direto da desmetilação de MeHg. Embora o principal depósito de Hg^{2+} tenha sido observado em astrócitos, neurônios do tálamo, do sulco calcarino e do cerebelo também exibiram depósitos (FENG *et al.*, 2004) que aumentaram com o prolongamento no tempo de exposição.

Um dado importante, que talvez ajude a explicar o comprometimento postural observado nos animais, refere-se às lesões cerebelares, caracterizadas por redução focal na densidade da população celular, na camada granular e espongiosa da camada molecular; as células de Purkinje apresentaram-se picnóticas e contraídas, deixando evidente um espaço vacuolar (ROEGGE *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram-se controversos, com degeneração apenas das células granulares do cerebelo, sem nenhum marcador associado à lesão nas células de Purkinje após exposição experimental de ratos ao MeHg (FONFRÍA *et al.*, 2001, *apud* NAGASHIMA *et al.*, 1997). Além disso, ratos tratados cronicamente com metilmercúrio exibiram um padrão similar de mudanças no cerebelo, mas o dano em neurônios corticais cerebrais não foi observado (ATCHISON & HARE, 1994).

Durante o início do período pós-natal o SNC é extremamente sensível aos agentes externos. A relação entre o déficit motor induzido pelo MeHg e os danos

cerebelares induzidos pelo mesmo composto é um fenômeno bem descrito em ratos, onde os déficits de coordenação foram observados em doses muito pequenas de mercúrio (SAKAMOTO *et al.*, 1993), considerando que o período neonatal é um estágio crítico para a neurotoxicidade do MeHg. Estes autores mostram ainda que o metilmercúrio afeta de forma diferenciada as fases do desenvolvimento pós-natal de ratos e que o acúmulo de mercúrio no encéfalo foi maior em ratos tratados a partir do 14º dia pós-natal do que a partir do 1º dia.

Stringari e colaboradores (2006) investigaram as fases críticas em que o mercúrio orgânico induz toxicidade cerebelar durante o período de amamentação em camundongos e encontraram atividade hiper-locomotora e níveis elevados de substâncias reativas derivadas de ácido tiobarbitúrico (TBARS do inglês "*thiobarbituric acid reactive substances*"), um marcador de peroxidação lipídica, nos animais expostos ao MeHg durante os períodos de 11 a 20 dias pós-natais. Os níveis das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no cerebelo também se encontravam diminuídas no período mais tardio da amamentação, indicando esta fase como um estágio de desenvolvimento crítico em que o cerebelo se torna um alvo vulnerável para os efeitos neurotóxicos pró-oxidativos do MeHg. Outro trabalho semelhante de Carvalho e colaboradores (2007) mostraram que a exposição ao metilmercúrio induziu déficit motor significativo (atividade motora em campo aberto e latência na queda do aparato de bastão giratório "*rotarod*" diminuídos). Porém, quando foram avaliados os níveis de glutatona cerebelar e tióis protéicos, não houve mudanças decorrentes da intoxicação por mercúrio; entretanto, os níveis de TBARS apresentavam-se aumentados nos animais expostos ao MeHg, bem como a atividade da glutatona peroxidase reduzida (CARVALHO *et al.*, 2007). Estes

resultados apontam os déficits motores e danos cerebelares causados pela exposição ao mercúrio orgânico em camundongos adultos.

Quanto aos mecanismos de ação do mercúrio no encéfalo, os estudos mostram-se inconclusivos. No entanto, estudos realizados em culturas de células do cerebelo sugerem que o mercúrio pode inibir o transporte de glutamato nessas células (FONFRÍA *et al.*, 2005).

1.2.1 Interações Intracelulares de Compostos Mercuriais

Intracelularmente, o MeHg associa-se a mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, membranas nucleares e lisossomos. Nas fibras nervosas, o mercúrio está localizado primariamente na bainha de mielina e nas mitocôndrias (ATCHISON & HARE, 1994). O mercúrio desregula a função das organelas, além de agir em receptores celulares levando ao aumento da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (SHENKER *et al.*, 2000). Esta desregulação na transição do cálcio leva, dentre outros efeitos, à inibição da migração de células granulares do cerebelo em desenvolvimento. Segundo a literatura pertinente, a neurotoxicidade dos compostos organomercuriais pode resultar de inúmeras interferências com processos críticos na célula, como por exemplo, na atividade mitocondrial, em propriedades da membrana celular ou na integridade do citoesqueleto (SHANKER *et al.*, 2004b; MORKEN *et al.*, 2005), além de ativar a liberação de moléculas pró-apoptóticas (ISSA *et al.*, 2003).

Além desses fatores, o mercúrio pode agir na liberação de neurotransmissores colinérgicos no SNC e SNP. Na junção neuromuscular, o efeito pré-sináptico é a redução na liberação de acetilcolina, enquanto que o efeito pós-sináptico pode estar relacionado à indução de morte neuronal no SNC (LIMKE *et al.*,

2004). Outros estudos relacionados com a liberação de dopamina e seus metabólitos em ratos tratados *in vivo* revelaram que tanto os compostos mercuriais orgânicos quanto inorgânicos produzem aumento significativo nos níveis extracelulares de dopamina estriatal (FARO *et al.*, 2000), o que poderia explicar os sintomas de excitabilidade neuronal observados na intoxicação mercurial (MEACHAM *et al.*, 2005).

1.2.2 Influência Glial na Neurotoxicidade Induzida por Mercúrio

Tem sido amplamente investigada a participação do componente glial sobre os processos neurodegenerativos advindos da exposição mercurial.

Com base na literatura, vários trabalhos sugerem que astrócitos apresentam um importante papel na neurotoxicidade mediada por compostos mercuriais (ASCHNER *et al.*, 2000). Interações entre estas células e os neurônios são evidentes nos processos em que os astrócitos conduzem à migração neuronal, à liberação de fatores neurotróficos, assim como se mostram imprescindíveis na função de alguns sistemas de neurotransmissores. Na neurotransmissão glutamatérgica, por exemplo, realizam tamponamento de glutamato do fluido extracelular e fornecem glutamina para a ressíntese desse neurotransmissor (ALLEN *et al.*, 2002). Outra interação entre astrócitos e neurônios inclui o papel obrigatório daqueles em fornecer moléculas precursoras para a síntese de glutathiona (GSH) neuronal (ALLEN *et al.*, 2002). Aschner e colaboradores (2000) afirmaram que o MeHg pode interferir em algumas destas funções, acumulando-se nos astrócitos e levando a efeitos negativos nos neurônios. Por exemplo, após a exposição crônica *in vivo* em primatas humanos e não-humanos, o mercúrio orgânico acumulou-se preferencialmente em astrócitos, e em menor proporção na

microglia, provavelmente devido estas fagocitarem células atingidas (ASCHNER *et al.*, 2000). Os mesmos autores afirmam ainda que o MeHg inibe especificamente a captação de glutamato em astrócitos, o que poderia resultar em concentrações excessivas de aminoácidos excitatórios no fluido extracelular. Em situações experimentais na ausência de glutamato, neurônios não foram afetados pela exposição aguda ao mercúrio, sugerindo que a disfunção neuronal é secundária aos distúrbios astrocíticos (ASCHNER *et al.*, 2000).

Por outro lado, Sanfeliu e colaboradores (2001) demonstraram que astrócitos humanos são mais resistentes a neurotoxicidade mediada por metilmercúrio do que neurônios. Esta tolerância por parte dos astrócitos pode estar relacionada à formação de moléculas antioxidantes, como as enzimas GSH peroxidase e catalase, bem como GSH, ácido ascórbico e vitamina E. O SNC apresenta altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e poucas moléculas antioxidantes, descrevendo uma condição em que estas moléculas não são suficientes para cobrir os níveis de EROs (SCHULZ *et al.*, 2000).

Estudos anteriores sugerem que neurônios são completamente dependentes de astrócitos para a obtenção de moléculas precursoras de GSH (DRINGEN, 2000; ALLEN *et al.*, 2002). O glutamato e a cistina, um precursor da GSH, necessitam do mesmo transportador para penetrar nos astrócitos, tornando possível que o aumento de glutamato extracelular induzido por MeHg promova a inibição do transporte de cistina em astrócitos, levando a redução do fornecimento de precursores para a síntese de GSH neuronal, abrindo caminho para o desenvolvimento de processos de neurotoxicidade (ASCHNER *et al.*, 2000).

1.2.3 Mecanismos de Neurotoxicidade dos Compostos Mercuriais

Inúmeros mecanismos e alvos moleculares podem estar relacionados ao processo de toxicidade do mercúrio, incluindo alterações na homeostase do cálcio (MARTY & ATCHISON, 1997; LIMKE & ATCHISON, 2002; LIMKE *et al.*, 2003; 2004), elevação da liberação espontânea de neurotransmissores (ATCHISON & HARE, 1994; ASCHNER *et al.*, 2000; GASSÓ *et al.*, 2000), geração de espécies reativas de oxigênio (SHANKER *et al.*, 2004a) e a indução da morte celular (KUNIMOTO, 1994; MARTY & ATCHISON, 1998; CASTOLDI *et al.*, 2001), que passamos a destacar nas seções seguintes.

1.2.3.1 Interação com Grupamentos Sulfidrilas

Os grupamentos tióis possuem papéis estruturais e funcionais fundamentais na química de proteína, estando situados principalmente em sítios catalíticos ativos de muitas enzimas (ASCHNER & SYVERSEN, 2005). Apresentam alta afinidade por compostos mercuriais, resultando em mecanismos de citotoxicidade específicos.

Esta alta afinidade do MeHg pelas formas aniônicas dos grupos sulfidrilas (-SH) torna proteínas e peptídeos portadores de cisteína, por exemplo, suscetíveis a modificações estruturais e funcionais (citoesqueleto, síntese de DNA, RNA e proteínas, por exemplo) e o mecanismo para tal pode estar relacionado com os efeitos neurotóxicos do mercúrio (ASCHNER *et al.*, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; ASCHNER & SYVERSERN, 2005; KAUR *et al.*, 2006).

1.2.3.2 Envolvimento de Mecanismos Excitotóxicos

Os compostos mercuriais inibem a captação de glutamato pelos astrócitos (ASCHNER *et al.*, 2000) e pelas células granulares do cerebelo (FONFRÍA *et al.*, 2005) além de estimular o seu efluxo, aumentando *in vivo* as concentrações de glutamato extracelular e expondo neurônios aos danos excitotóxicos (ADACHI & KUNIMOTO, 2005; ASCHNER & SYVERSEN, 2005).

A neurotoxicidade do MeHg, ao menos em parte, é mediada pela excitotoxicidade provocada pelo glutamato, com ativação de receptores NMDA (ADACHI & KUNIMOTO, 2005). Estudos utilizando antagonistas do receptor NMDA (MK-801) mostraram diminuição dos efeitos tóxicos em culturas de neurônios corticais (MIYAMOTO *et al.*, 2001).

A excitotoxicidade mediada pelo glutamato ocorre pela ligação do neurotransmissor ao receptor do tipo NMDA e, em menor extensão, a outros subtipos de receptores (MIYAMOTO *et al.*, 2001; ADACHI & KUNIMOTO, 2005). Como consequência da interação neurotransmissor/receptor há abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, com influxo maciço do íon e ativação de outras vias de sinalização que conduzem a liberação de Ca^{2+} de outros estoques intracelulares (por exemplo, retículo endoplasmático liso) (ASCHNER & SYVERSEN, 2005). Esta sobrecarga de cálcio pode levar a ativação de cascatas que culminam com a morte celular. A excitotoxicidade também vem sendo descrita como um mecanismo de neurotoxicidade por induzir a disfunção astrocítica e da microglia, na regulação da excitabilidade neuronal ao glutamato (MIYAMOTO *et al.*, 2001).

Em outro ponto, a maior disponibilidade de glutamato extracelular, que pode ser induzida pelo mercúrio, pode levar a ativação da óxido nítrico sintase

dependente de cálcio no neurônio, aumentando assim a concentração de óxido nítrico intracelular, com diminuição da energia (ATP) produzida, conduzindo à morte celular (SHANKER *et al.*, 2004b). A ativação de receptores NMDA conduz ao aumento da produção de ânions superóxidos e óxido nítrico, o que aumenta a síntese de peroxinitrito, um oxidante altamente citotóxico (MIYAMOTO *et al.*, 2001).

1.2.3.3 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido, radicais hidroxila, além de peróxido de hidrogênio apresentam propriedades que levam invariavelmente ao dano celular, sendo considerados desempenhar um papel fundamental na patogênese dos neurônios do SNC. Inúmeros estudos sugerem que os compostos mercuriais podem promover neurotoxicidade através de mecanismos dependentes da formação de EROs. Devido ao fato do encéfalo ser excepcionalmente sensível ao estresse oxidativo mediado por radicais livres, alguns antioxidantes como vitamina E e selênio promovem proteção contra a neurotoxicidade do MeHg *in vivo* (DRINGEN, 2000; STRINGARI *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007).

O MeHg causa aumento na formação de EROs *in vitro* (ALLEN *et al.*, 2002; DREIEM *et al.*, 2005; FONFRÍA *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2007). A combinação do aumento na formação de EROs e menor detoxificação dessas espécies pode agir sinergicamente, em animais jovens, e assim, conduzir ao maior dano celular, visto em animais jovens quando comparados a adultos (DREIEM *et al.*, 2005). O estresse oxidativo também parece estar envolvido na desregulação osmótica nos astrócitos, talvez por um mecanismo de inibição direta da captação do glutamato que provoca um desequilíbrio na homeostase da célula, conduzindo à

falha neuronal e ao efluxo de glutamato celular regulado pelo cloreto (FONFRÍA *et al.*, 2005).

Astrócitos que apresentam esgotamento dos níveis de GSH preferem cistina (ao invés de cisteína) para sua síntese de GSH e substituem cisteína por cistina durante a ressíntese de glutathione. Estas células liberam cisteína para a síntese de GSH neuronal e também servem como fonte de dipeptídeos cisteína-glicina (CysGly). Este dipeptídeo serve como um precursor para a síntese de GSH neuronal ou pela captação através da via direta de dipeptídeo, ou via geração de cisteína e glicina no fluido extracelular (DRINGEN, 1999). Assim, a síntese de GSH neuronal é exclusivamente dependente da cisteína gerada pelos astrócitos. Devido ao fato do glutamato e da cistina compartilharem o mesmo transportador, é possível que a concentração de glutamato extracelular aumentada induzida por MeHg iniba competitivamente o transporte de cistina para dentro dos astrócitos, diminuindo o fornecimento de cisteína para a síntese de GSH neuronal (ASCHNER *et al.*, 2000). Há evidências de que a redução dos níveis de GSH conduza à falha das funções mitocondriais, incluindo o metabolismo de energia, produção de ERO e eventual morte da célula. O efeito tóxico do MeHg aumenta quando os níveis intracelulares de GSH diminuem, e a toxicidade do composto é reduzida quando há um aumento nos níveis intracelulares de GSH (ALLEN *et al.*, 2002). Schulz e colaboradores (2000) mostraram que a redução de GSH mitocondrial e citoplasmática resulta em aumento da geração de ERO, desregulação do potencial transmembrana mitocondrial e perda rápida da função mitocondrial.

Ainda neste contexto, as espécies reativas de oxigênio podem ser formadas em resposta a ativação de receptores ativados por EAA através de produto do metabolismo da lipoxigenase do ácido araquidônico; em resposta a

elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pela ativação de receptores de glutamato ionotrópicos e metabotrópicos; bem como em resposta ao inchaço celular (ASCHNER *et al.*, 2000).

O MeHg causa esgotamento do conteúdo de GSH tanto em células neuronais quanto em astrócitos, porém os neurônios apresentam maior vulnerabilidade a perda de GSH, indicando a importância deste composto nos efeitos neuropatológicos do MeHg (KAUR *et al.*, 2006), uma vez que as células astrocíticas apresentam quantidades maiores de antioxidantes quando comparados aos neurônios (DRINGEN, 2000). Por fim, a produção de EROs pode também induzir a ativação de caspases e, conseqüentemente, morte celular, danos diretamente ligados à exposição organomercurial à cadeia oxidativa mitocondrial em linhagens de células não neuronais em cultura (KAUR *et al.*, 2006).

1.3 O PAPEL DE ANTIOXIDANTES NA REDUÇÃO DA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR COMPOSTOS MERCURIAIS

Como observado na revisão acima, o desenvolvimento de estresse oxidativo representa um dos principais mecanismos de toxicidade do mercúrio que conduzem a morte celular, em um efeito que tem sido bem estabelecido tanto em humanos como em animais de experimentação (CASTOLDI *et al.*, 2001; LIMKE & ATCHISON, 2002). Espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido, radicais hidroxila, além de peróxido de hidrogênio, apresentam propriedades que levam invariavelmente ao dano celular (DRINGEN, 2000).

Evidências das últimas décadas apontam também para o papel de metabólitos reativos de oxigênio como um mediador das lesões teciduais em alguns modelos animais de toxicidade. Nesse sentido, conseqüências bioquímicas e patológicas induzidas pelo mercúrio têm sido amplamente descritas na literatura,

pouco se sabendo, porém, sobre os mecanismos de defesa neuronal contra os danos causados pelos compostos mercuriais.

Diversas formas de neuroproteção contra os efeitos tóxicos causados por compostos mercuriais já foram investigadas, dentre elas a adição de antioxidantes *in vivo* e *in vitro*, tais como a vitamina E (USUKI *et al.*, 2001; BEYROUTY & CHAN, 2006), superóxido dismutase (SHANKER & ASCHNER, 2003), glutatona (ALLEN *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2006) e selênio (MORETTO *et al.*, 2005; BEYROUTY & CHAN, 2006; SAKAUE *et al.*, 2006).

O papel da vitamina E como antioxidante foi demonstrado pela proteção de astrócitos contra o estresse oxidativo provocado pela adição *in vitro* de metilmercúrio (SHANKER & ASCHNER, 2003). Além disso, a administração de vitamina E *in vivo*, associada ao selênio, na dieta de ratas fêmeas adultas pode provocar, além de redução do dano oxidativo, aumento na capacidade reprodutiva destes animais intoxicados com MeHg (BEYROUTY & CHAN, 2006).

A glutatona pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula. Os efeitos tóxicos do mercúrio são atribuídos, em grande parte, aos níveis elevados de EROs e a consequente redução da síntese de glutatona pode aumentar a toxicidade do composto mercurial (ALLEN *et al.*, 2001). Em acordo com esta proposição, alguns estudos têm mostrado que compostos organomercuriais diminuem os níveis de GSH e aumentam os níveis de peróxidos e TBARS no SNC de camundongos (FARINA *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2006)

Níveis elevados de glutatona, assim como de outros agentes antioxidantes, podem prevenir contra a redução da atividade de enzimas do sistema

de transporte de elétrons mitocondrial devido à retenção do metilmercúrio (USUKI *et al.*, 2001; SHANKER & ASCHNER, 2003).

Em função do interesse despertado por efeitos relacionados à geração de radicais livres e consequente aumento na carga de estresse oxidativo nas células-alvo da ação mercurial, tem havido um interesse cada vez maior em se investigar propriedades antioxidantes de compostos naturais como alternativas terapêuticas. Assim, Şener e colaboradores (2007) mostraram em modelo *in vivo* que o tratamento com extrato de ginkgo (*Ginkgo biloba*) promoveu proteção contra danos oxidativos induzidos pelo cloreto de mercúrio em órgãos como encéfalo, pulmão, fígado e rim. Utilizando ainda o extrato de *Ginkgo biloba*, Tunali-Akbay e colaboradores (2007) descreveram efeitos protetores contra danos oxidativos induzidos pelo mercúrio na atividade tromboplástica na aorta e em tecido cardíaco.

Em outro estudo, Sarwar Alam e colaboradores (2007) demonstraram que o extrato de *Eruca sativa* (rúcula) possui propriedades antioxidantes potentes e promoveu proteção contra danos oxidativos aos rins induzidos por cloreto de mercúrio. Embora ainda tímidas em termo de seu estudo e aproveitamento, são promissoras as pesquisas envolvendo a investigação de produtos naturais como fontes atrativas de estruturas químicas que carregam atividades biológicas potentes com perfis farmacológicos promissores.

Swietenia macrophylla, mais conhecida como mogno, da família das Meliáceas, está distribuída na América Central e parte tropical da América do Sul (BROWN *et al.*, 2003). A madeira é muito utilizada na produção de móveis pela facilidade com que é trabalhada, pela sua estabilidade e duração, além do seu aspecto, castanho-avermelhado brilhante, depois de polida; é também utilizada na produção de instrumentos musicais pelo seu timbre e ressonância sonora. Suas

folhas podem ser utilizadas como agente corante (MAHALE *et al.*, 2006), porém pouco se conhece acerca das potenciais fontes de componentes bioativos como antioxidantes deste vegetal.

Em estudo utilizando a camada delgada do caule de *S. macrophylla*, Falah e colaboradores (2008) isolaram compostos com forte poder antioxidante. No entanto, apesar do resultado promissor, poucos estudos estão disponíveis na literatura acerca das propriedades antioxidantes dos compostos derivados do mogno.

Análises preliminares, realizadas pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LabCrol), do Instituto de Química da Universidade Federal do Pará, utilizando Espectrofotometria de Massa – Cromatografia Líquida (LC-MS), demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonóides (tais como ácido gentísico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido p-hidróxi-benzóico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido sináptico, ácido cinâmico, 3-O- β -glicopiranosil quercetina, 3-O- β -raminopiranosilquercetina e 3-O- α -raminopiranosilkamferol) em amostra liofilizada obtida a partir de extrato bruto de folhas de mogno. A amostra liofilizada em questão, utilizada neste estudo, apresenta elevada capacidade antioxidante, como medida pelo teste TEAC (atividade antioxidante equivalente a trolox) e comparada com o teor em fenólicos totais (TP) (dados não publicados).

Tendo em vista o potencial dessa linha de pesquisa e a exigüidade de estudos relacionados ao tema, entendemos que seria interessante investigar possíveis efeitos neuroprotetores deste extrato aquoso de folhas de mogno, relacionados às suas propriedades antioxidantes, em um modelo de neurotoxicidade induzida por MeHg.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Geral

Utilizar um modelo de exposição mercurial em culturas primárias de células cerebelares, a fim de investigar possíveis efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) neste modelo.

1.4.2 Específicos

- Investigar os efeitos da exposição a diferentes concentrações e tempo de exposição do composto mercurial orgânico (cloreto de metilmercúrio) sobre a viabilidade celular de culturas primárias de células cerebelares de ratos neonatos da linhagem Wistar;

- Investigar a participação do componente glial na neurotoxicidade mercurial, ao comparar os efeitos do mercúrio em culturas semipuras de neurônios e culturas mistas de neurônios e células da glia;

- Investigar possíveis efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo de neurotoxicidade mercurial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, entre 5 e 7 dias de idade (P5-P7), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Pesquisa envolvendo Animais, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ANDERSEN *et al.*, 2004). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Pará.

2.2 CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE NEURÔNIOS/CÉLULAS DA GLIA E SEMIPURAS DE NEURÔNIOS

As culturas primárias de tecido cerebelar foram preparadas a partir do protocolo descrito por Ahlemeyer & Baumgart-Vogt (2005), para dissecação do cerebelo, com algumas modificações.

Cada animal utilizado nestes experimentos foi sacrificado por decapitação, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de Petri contendo álcool a 70%. Após a decapitação, foi realizado a dissecação do encéfalo, dentro da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de Petri com meio de dissecação estéril e gelado (solução tampão fosfato salina adicionada de tampão HEPES, glicose, antibióticos (penicilina/estreptomicina/fungizona), em pH 7,4 com osmolaridade final entre 320-335 mmol/Kg). Em seguida, o encéfalo foi transportado e manipulado em outra placa com meio de dissecação fresco e gelado, para reduzir os riscos de contaminação, seguido de microdissecação do cerebelo

(estereomicroscópio VWR com aumento de 45x). O cerebelo isolado foi então incubado por cerca de 20 minutos a 37°C em solução de tripsina-EDTA a 0,25% em solução livre de cálcio e magnésio (Invitrogen), para digestão enzimática e depois transferido para o meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Invitrogen) e gentilmente triturado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. O processo de trituração foi repetido com outra pipeta Pasteur flambada com metade do diâmetro da ponta original para finalização da trituração mecânica. As células contidas no sobrenadante foram plaqueadas a uma densidade aproximada de $3,5 \times 10^6$ células/ml de meio (um cerebelo por placa de 24 poços) em placas de cultura multi-poços cobertas por poli-L-lisina (50 µg/ml) e mantidas a 37°C com 5% CO₂ em atmosfera umidificada (umidade relativa do ar de 80%) na incubadora. A fim de assegurar maior uniformidade na densidade de células por poço, foram realizadas contagens em alguns experimentos, utilizando-se o método de exclusão por Azul Tripán. Esse método é baseado no princípio de que as células viáveis possuem membranas íntegras, enquanto que células não viáveis (mortas ou com a membrana danificada) absorvem o corante, logo aparecem coradas em azul.

As células foram plaqueadas em meio de cultura DMEM contendo antibióticos (penicilina/estreptomicina) e 25 mM de cloreto de potássio (KCl), sendo também suplementado de acordo com o tipo de cultura realizada. Culturas mistas de neurônios e células gliais foram mantidas em DMEM contendo 25 mM de KCl suplementado com soro fetal bovino (SFB) e soro de cavalo (SC), ambos a 10%. Para manutenção deste tipo de cultura foi adicionado a mesma composição de meio no quarto ou quinto dia *in vitro*. Em culturas semipuras de neurônios, o meio foi suplementado como citado acima para o primeiro dia. Após 2 dias, foi adicionado a este fenótipo de cultura um inibidor de crescimento glial, 5 µM de citosina-β-

arabinofurasídeo (Ara-C) (Sigma). No quinto dia *in vitro* o meio suplementado com Ara-C foi retirado e adicionado meio novo contendo apenas 2% de ambos os soros. Após oito dias *in vitro*, tanto em culturas mistas como semipuras o meio utilizado para os experimentos continha DMEM suplementado com antibióticos, 25 mM de KCl, 2% de SFB e 2% de SC.

2.3 IMUNOCITOQUÍMICA

Para caracterização fenotípica das culturas, as células foram plaqueadas em poços contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro recobertas com poli-L-lisina (50 µg/ml), onde foi feita imunocitoquímica de acordo com o protocolo descrito por Gao e colaboradores (2002), com modificações.

As células granulares cerebelares foram marcadas com o anticorpo contra proteína nuclear específica de neurônio (anti-Neu-N). Os astrócitos foram marcados contra a proteína acídica fibrilar glial, uma proteína do filamento intermediário restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP.

No oitavo dia de cultura, as lamínulas foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M aquecido (37°C) e fixadas com paraformaldeído a 4% por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com metanol e peróxido de hidrogênio. Após este procedimento, as células foram incubadas por 12 horas em temperatura ambiente com anticorpo primário diluídos em tampão fosfato 0,1 M com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de jumento, nas seguintes titulações: anti-Neu-N, 1:1.000; anti-GFAP, 1:1.000.

Após incubação com o anticorpo primário, as células foram incubadas por 2 horas em anticorpo secundário biotilado na titulação de 1:200 (tampão fosfato 0,1 M com 0,3% de Triton X-100). Após esta etapa, as lamínulas foram incubadas

por 1 hora com os reagentes do kit-ABC (avidina-biotina-peroxidase) diluídos de acordo com a sugestão do fabricante. A visualização do complexo formado foi feita através da incubação das lamínulas com peróxido de hidrogênio e DAB (3,3'-diaminobenzidina).

Após a marcação com os anticorpos especificados, as lamínulas foram submetidas ao processo de contra-coloração pelo método de Nissl. Em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas histológicas.

A captura de imagens foi feita em microscópio do modelo NIKON Labophot 2 com câmera digital de 3.2 MP.

2.4 EXPOSIÇÃO AO COMPOSTO MERCURIAL E TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Swietenia macrophylla*

Para estes experimentos foi utilizada a forma orgânica de mercúrio. Foi preparada uma solução estoque de 1 mM de cloreto de metilmercúrio (MeHg) preparada em água pura, e diluída adicionalmente em meio de cultura para solução de trabalho nas concentrações finais de 0,01 a 10 μ M em meio de cultura.

A fim de maximizar o efeito da exposição ao neurotóxico, para a adição do composto, desprezou-se o meio de cultura anterior e colocou-se um novo meio com a solução de mercúrio diluída. Não foram feitas trocas de meio de cultura durante o tratamento com metilmercúrio.

2.4.1 Protocolo de Exposição das Culturas ao Cloreto de Metilmercúrio

O tratamento com metilmercúrio consistiu na administração do composto em quatro condições para mimetizar exposições agudas e subcrônicas ao mercúrio, com a finalidade de ressaltar a curva dependente de tempo. Para tal, as células

foram cultivadas até o oitavo dia de cultura, onde estas foram submetidas a diferentes períodos de exposição. Na primeira e segunda condições, simulando exposições agudas, as células foram expostas por 12 e 24 horas, respectivamente; na terceira e quarta condições, em que se simulou exposições subcrônicas, as células foram expostas por 3 e 5 dias, respectivamente (Figura 1). Após o tratamento foi realizado o teste de viabilidade celular.

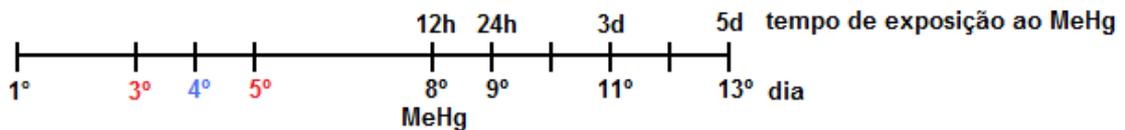


Figura 1. Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas. Números vermelhos significam trocas de meio em cultura semipura. Número azul, adição de meio em cultura mista. A partir do 8º dia, condições de exposição ao metilmercúrio.

2.4.2 Administração do Extrato Aquoso de Folhas de *Swietenia macrophylla*

O extrato aquoso de folhas de *Swietenia macrophylla* (mogno) foi cedido pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LabCrol) do Instituto de Química da Universidade Federal do Pará, obtido a partir de fracionamento para identificação de ácidos fenólicos e flavonóides.

Para estes experimentos foram utilizadas culturas mistas para obtenção de curva de concentração do extrato aquoso de folhas de mogno (concentrações finais variando entre 10 ng/ml e 200 µg/ml). Posteriormente, culturas mistas foram preparadas e expostas ao MeHg e tratamento adicional com o extrato aquoso de folhas de mogno nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml por 24 horas (condição aguda) e 3 dias (condição subcrônica) (Figura 2).

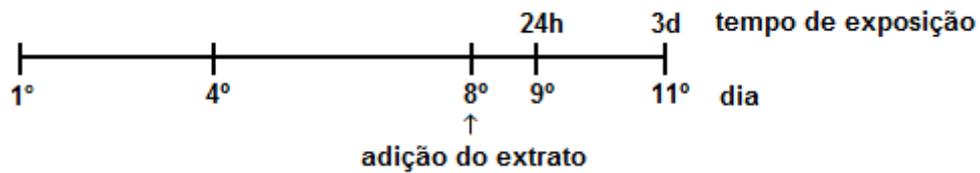


Figura 2. Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas mistas com extrato aquoso de folhas de mogno. Representação esquemática para curvas dependentes de tempo de exposição.

Neste modelo de neurotoxicidade induzido por metilmercúrio em células em culturas, investigamos possíveis efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno sob condições de pré- e pós-exposição (ambas nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) ao MeHg em condição subcrônica (Figura 3).

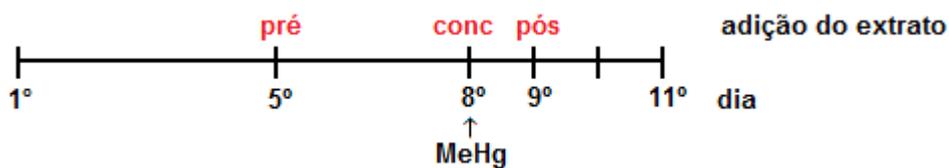


Figura 3. Cronograma ilustrativo do protocolo de tratamento das culturas com extrato aquoso de folhas de mogno no modelo de intoxicação mercurial, sob condições de pré-, pós- e exposição concomitante do extrato com MeHg. (pré = pré-exposição; conc = concomitante; pós = pós-exposição)

Nos experimentos com extrato aquoso de folhas de mogno foram feitos grupos-controle (poços tratados apenas com veículo, sem adição de mercúrio e/ou extrato aquoso de folhas de mogno); grupos-extrato (poços tratados com apenas extrato aquoso de folhas de mogno); grupos-mercúrio (poços tratados com mercúrio em uma concentração pré-estabelecida em nosso protocolo que causasse aproximadamente 50% de perda de viabilidade celular); grupos-teste (poços tratados com mercúrio e extrato aquoso de folhas de mogno).

2.5 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular são de extrema importância para diversas aplicações de rotina em biologia celular. Com a utilização do ensaio colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983) no 8º dia (exposição de 12 horas ao mercúrio), 9º dia (exposição de 24 horas a o mercúrio), 11º dia (exposição de 3 dias ao mercúrio) e 13º dia (exposição de 5 dias ao mercúrio) de cultura pôde-se determinar quantitativamente os efeitos citotóxicos mediados por este composto. Nos experimentos tratados com extrato aquoso de mogno, o ensaio de viabilidade celular foi realizado no 9º ou 11º dia. O método é baseado na adição de solução de MTT (*3-(4,5-cimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide*, 5 mg/ml) (Chemicon Inc., El Segundo, CA, USA) ao meio de cultura, 3-4 horas antes da leitura, para subsequente clivagem do sal de tetrazolium (cor amarelo) em cristais de formazan, de coloração púrpura, por células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan do MTT são então solubilizados pela adição de álcool isopropílico, e podem ser quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 578 nm. A absorbância resultante dos nossos experimentos representou a redução da atividade metabólica total, interpretada como redução no número de células viáveis ou vivas, e transformada para porcentagem de viabilidade celular.

Cada condição experimental foi apresentada em triplicatas de poços para cada experimento, resultante de 2 a 4 experimentos independentes. Os poços controle foram considerados como 100% de viabilidade e então comparados com os poços expostos naquele grupo. As médias foram descritas como média de erro padrão (\pm EP).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controle foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de um critério associada ao teste de Tukey. As diferenças entre os mesmos grupos experimentais de fenótipos de culturas diferentes foram analisadas pelo teste *t de Student*, onde foram adotados valores para $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. Ainda, utilizamos a estatística descritiva para obtenção de médias e erro padrão. Todas as análises foram realizadas no programa BioEstat, versão 5.0.

3 RESULTADOS

3.1 COMPOSIÇÃO CELULAR DE CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS E SEMIPURAS DERIVADAS DE CEREBELO

Para confirmarmos a capacidade de gerar, com a utilização de protocolos diferentes (ver Materiais e Métodos), culturas primárias derivadas de cerebelo com diferenças na composição de neurônios e células da glia, foram realizados experimentos de imunocitoquímica com anticorpos contra proteína nuclear específica de neurônios (Neu-N) e contra a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), específicos para marcar neurônios e astrócitos, respectivamente. Estes protocolos nos permitiram caracterizar fenotipicamente culturas mistas (neurônios/glia) e semipuras (com maior percentual de neurônios). Após a marcação com os anticorpos específicos foi realizada a contra-coloração pelo método de Nissl. O padrão imunocitoquímico das culturas foi obtido através da porcentagem do número de células marcadas imunocitoquimicamente (Neu-N ou GFAP) em relação ao número total de células, coradas pelo método de Nissl (Figura 4).

Assim, culturas mistas derivadas de tecido cerebelar apresentaram $50,34 \pm 5,49\%$ e $42,53 \pm 5,05\%$ de células imunorreativas para Neu-N e GFAP, respectivamente. Nas culturas doravante denominadas semipuras, a população celular apresentava $81,08 \pm 7,56\%$ e $10,63 \pm 5,58\%$ de células imunorreativas para Neu-N e GFAP, respectivamente (Figura 5).

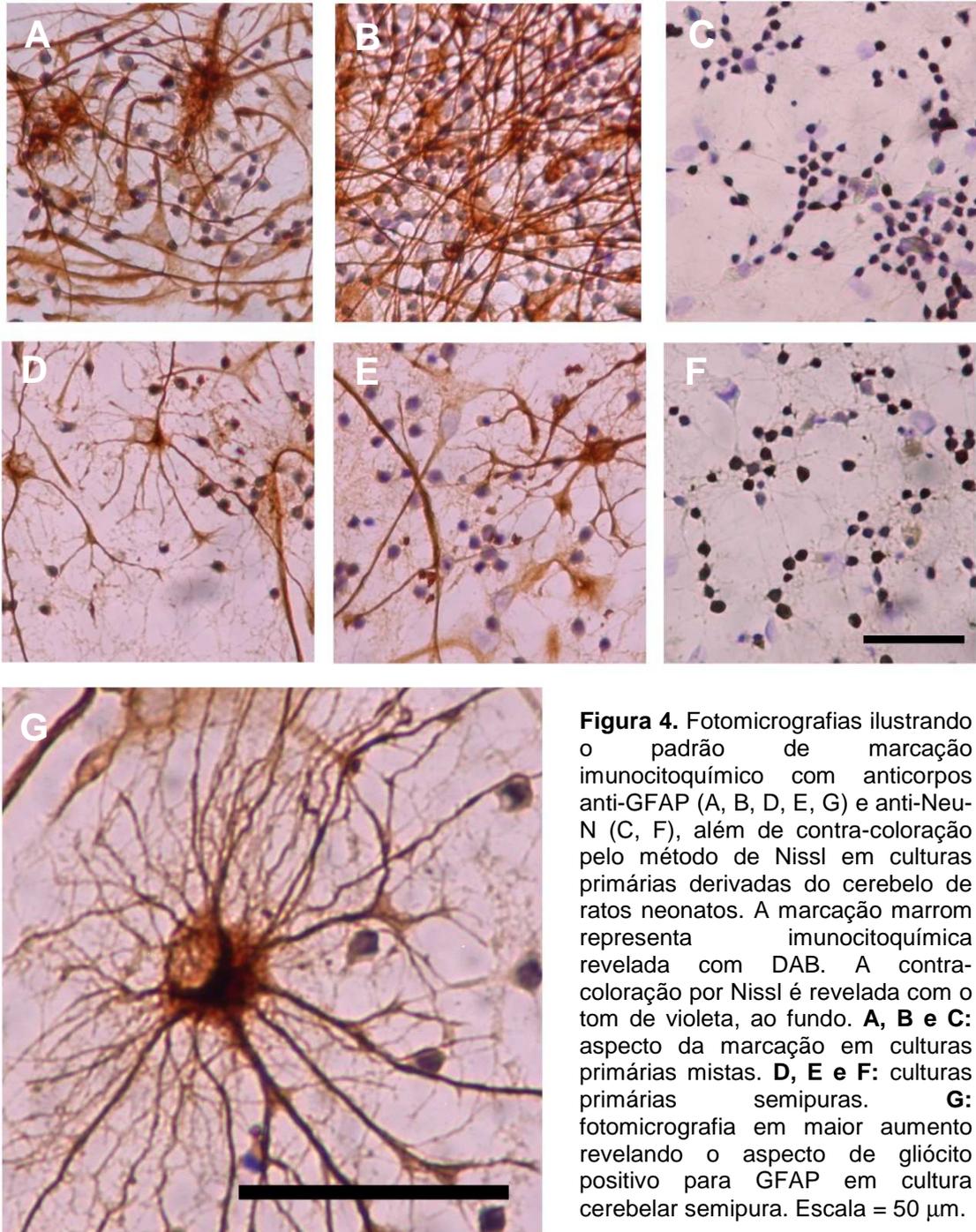


Figura 4. Fotomicrografias ilustrando o padrão de marcação imunocitoquímica com anticorpos anti-GFAP (A, B, D, E, G) e anti-Neu-N (C, F), além de contra-coloração pelo método de Nissl em culturas primárias derivadas do cerebelo de ratos neonatos. A marcação marrom representa imunocitoquímica revelada com DAB. A contra-coloração por Nissl é revelada com o tom de violeta, ao fundo. **A, B e C:** aspecto da marcação em culturas primárias mistas. **D, E e F:** culturas primárias semipuras. **G:** fotomicrografia em maior aumento revelando o aspecto de gliócito positivo para GFAP em cultura cerebelar semipura. Escala = 50 μ m.

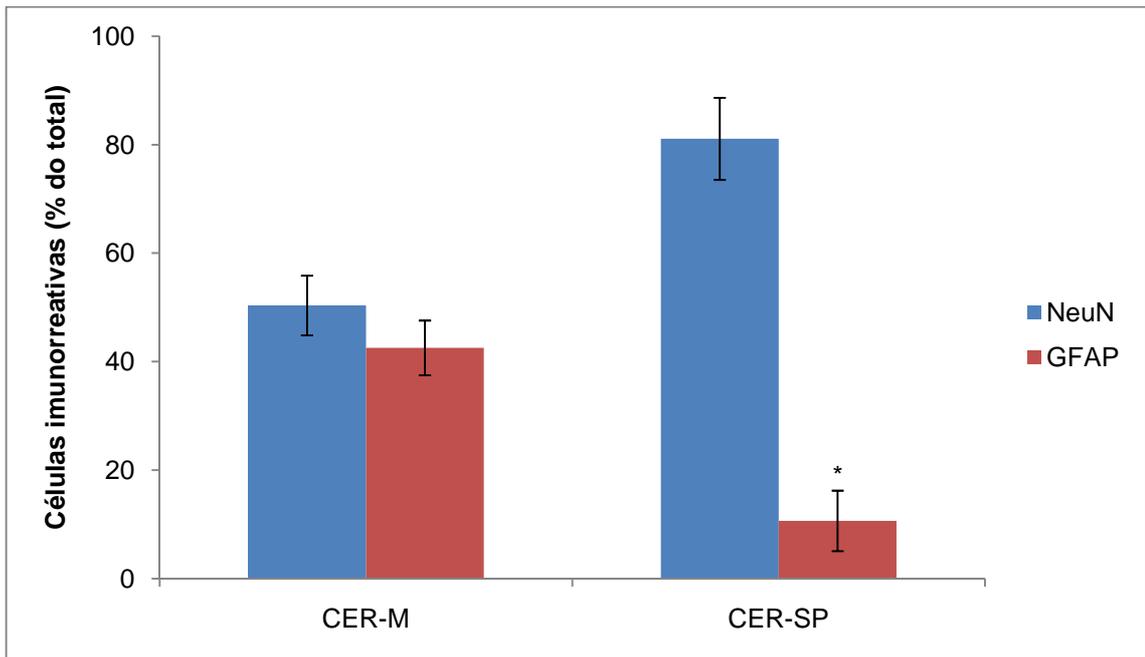


Figura 5. Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de cerebelo. CER-M, cerebelar mista; CER-SP, cerebelar semipura. Resultados expressos em número de células imunorreativas (% do total) \pm média erro padrão. * $p < 0,01$ em comparação ao grupo Neu-N.

3.2 EFEITOS NEUROTÓXICOS DO METILMERCÚRIO SÃO DEPENDENTES DE CONCENTRAÇÃO E DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO

A exposição aguda (12 e 24 horas) e subcrônica (3 e 5 dias) de células do cerebelo de ratos neonatos da linhagem Wistar ao metilmercúrio (MeHg) resultou em perda de viabilidade celular dependente de concentração e de tempo de exposição, sob nossas condições experimentais. Para nossos experimentos, a perda de viabilidade celular foi interpretada como morte neuronal.

Em experimentos com culturas mistas observamos, em exposição aguda por um período de 12 horas, redução significativa na viabilidade celular de 25,8%, 33,9%, 45,3% e 65,6% após exposição ao MeHg por 12 horas apenas nas maiores concentrações testadas (7, 8, 9 e 10 μM). Para o mesmo paradigma de exposição, culturas semipuras mostraram-se mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos do MeHg, com perda neuronal de 33%, 53,5%, 73,6%, 80,4%, 85,9%, 88,2%, 91%, 92,4% e 89,75% em relação aos experimentos-controle, a partir de 2 μM de MeHg (Figura 6).

Ainda se tratando de exposição aguda, intoxicação por 24 horas de culturas mistas mostraram redução na viabilidade celular a partir de 5 μM , com valores de 22,6%, 54,5%, 66,6%, 77,4%, 94,8% e 85,9% respectivamente para concentrações crescentes. Mais uma vez, culturas semipuras mostraram-se mais sensíveis à exposição mercurial, com diminuição na viabilidade celular para 84,3%, 46,7%, 18,6% e 7,2% a partir de 1 μM de MeHg, com efeito máximo em 4 μM , comparados aos experimentos-controle (Figura 7).

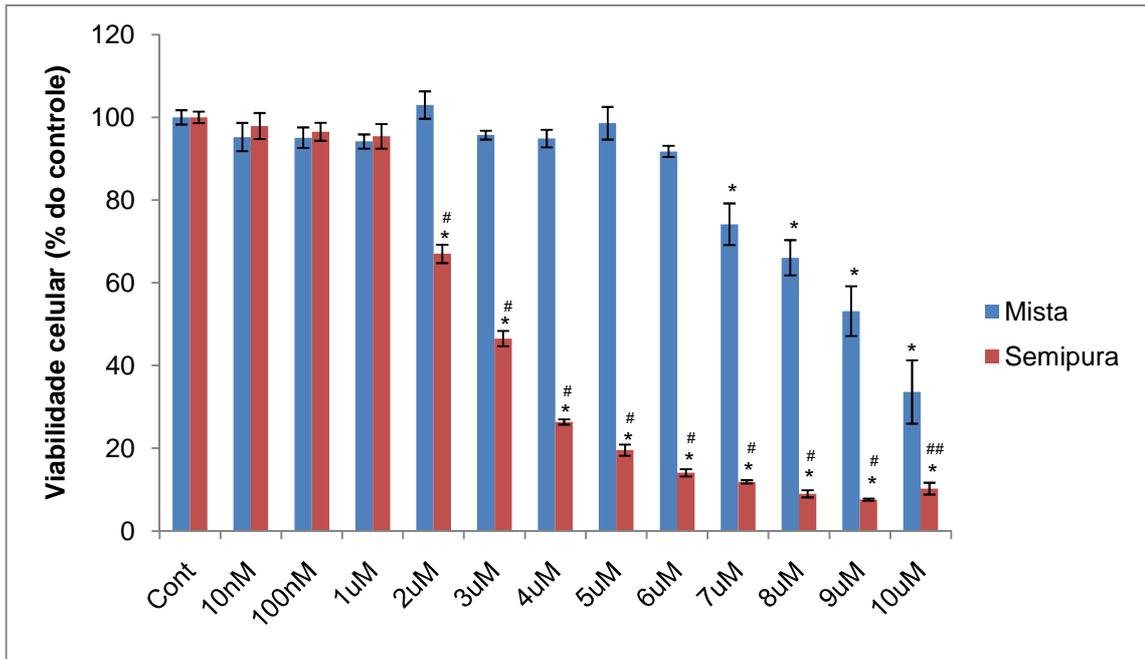


Figura 6. Efeito da administração de diferentes concentrações de MeHg em exposição aguda (12 horas) sobre a viabilidade celular de culturas mistas e semipuras derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em percentagem do grupo controle \pm média de erro padrão, a partir de 3 a 4 experimentos independentes. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA associada ao teste de Tukey); [#] $p < 0,01$ e ^{##} $p < 0,05$ comparação entre as mesmas concentrações do grupo de culturas mistas e semipuras (teste *t*). (Cont = controle)

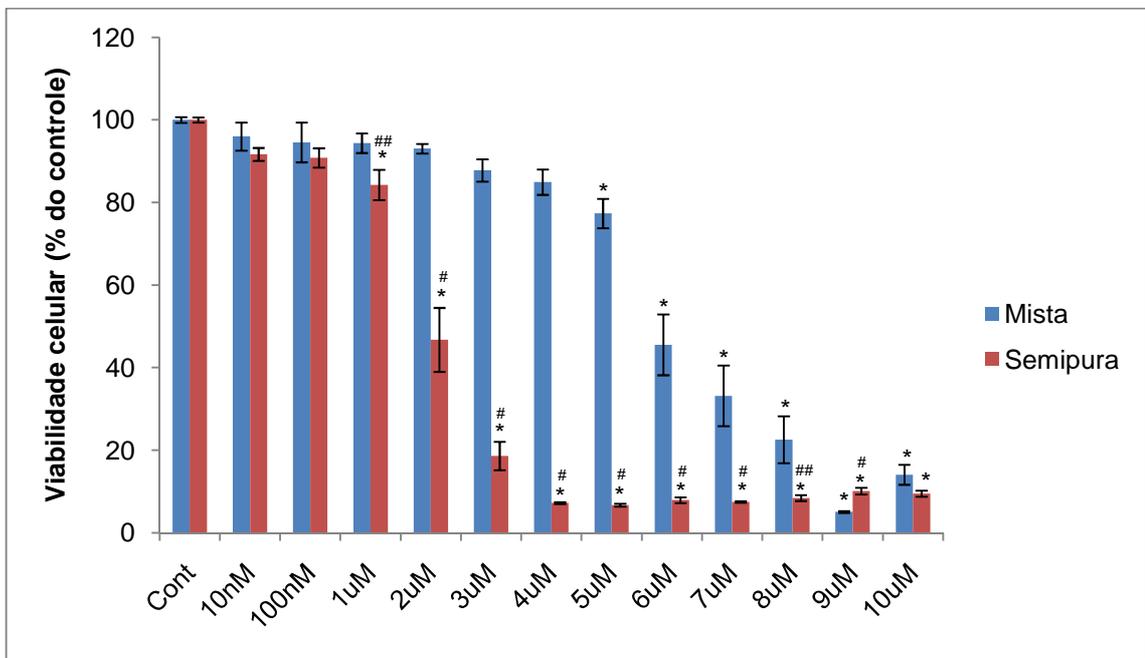


Figura 7. Efeito da administração de diferentes concentrações de MeHg em exposição aguda (24 horas) sobre a viabilidade celular de culturas mistas e semipuras derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA associada ao teste de Tukey); [#] $p < 0,01$ e ^{##} $p < 0,05$ comparação entre as mesmas concentrações do grupo de culturas mistas e semipuras (teste *t*).

A exposição subcrônica (3 dias) ao composto mercúrico em culturas mistas resultou em diminuição significativa da viabilidade celular para 70,5%, 72,2%, 54,7%, 42,3%, 18,65% a partir da concentração de 1 μM , em relação aos experimentos-controle, atingindo efeito máximo com 5 μM . Porém, mais uma vez, a exposição de cultura semipuras mostrou-se mais sensível ao efeito neurotóxico induzido pelo MeHg com perda neuronal significativa a partir da menor concentração testada (10 nM; 13,75%) até perda máxima de 94,4% com 4 μM (Figura 8).

Nos experimentos em que se promoveu exposição ao composto mercúrico por cinco dias, observou-se perda neuronal significativa a partir da menor concentração testada, que foi de 10 nM para ambos os fenótipos de cultura. Culturas mistas apresentaram perda celular progressiva de 20,35%, 24,1%, 47,7%, 77,1% e 94,3% para concentrações de 10 nM a 3 μM , sendo que esta perda celular foi mais evidente em culturas semipuras com valores de 14,2%, 33,8%, 61,2% e 90,95% para concentrações de 10 nM a 2 μM (Figura 9).

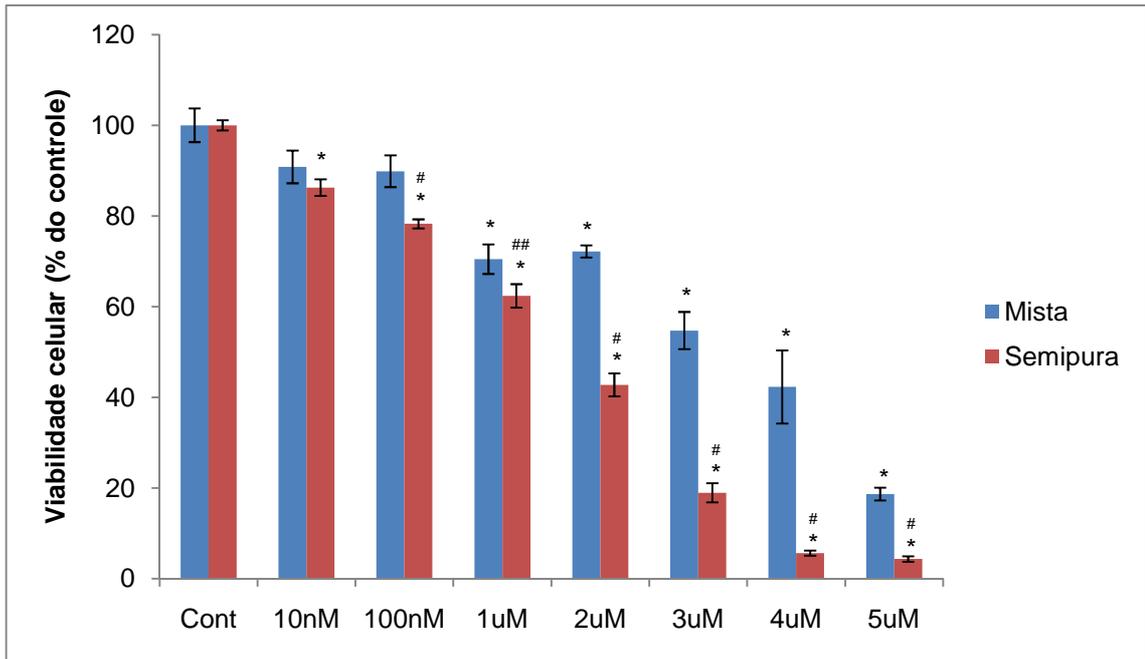


Figura 8. Efeito da administração de diferentes concentrações de MeHg em períodos de exposição subcrônica (3 dias) sobre a viabilidade celular de culturas mistas e semipuras derivadas de cerebello de ratos neonatos Wistar. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA associada ao teste de Tukey); # $p < 0,01$ e ## $p < 0,05$ comparação entre as mesmas concentrações do grupo de culturas mistas e semipuras (teste t).

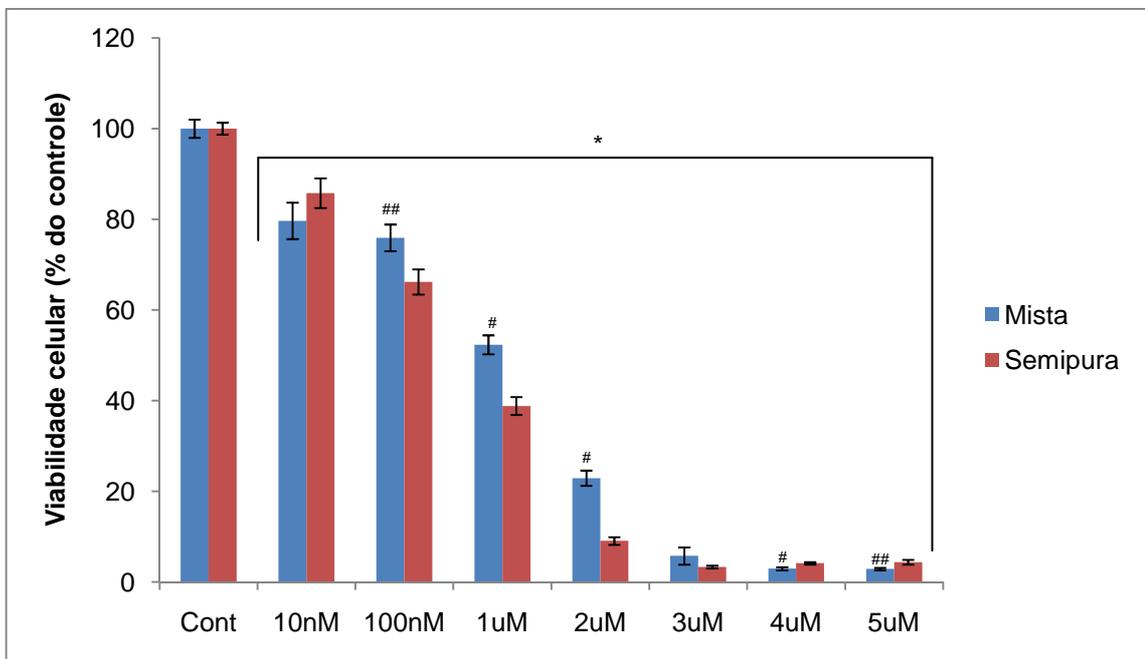


Figura 9. Efeito da administração de diferentes concentrações de MeHg em períodos de exposição subcrônica (5 dias) sobre a viabilidade celular de culturas mistas e semipuras derivadas de cerebello de ratos neonatos Wistar. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA associada ao teste de Tukey); # $p < 0,01$ e ## $p < 0,05$ comparação entre as mesmas concentrações do grupo de culturas mistas e semipuras (teste t).

3.3 INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS CITOPROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO (*Swietenia macrophylla*) NESTE MODELO DE EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

A exposição aguda (24 horas) e subcrônica (3 dias) de células do cerebelo de ratos da linhagem Wistar ao extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em concentrações crescentes, variando de 10 ng/ml a 200 µg/ml, resultou em proliferação celular, como demonstrado pela elevação nítida nos valores obtidos no ensaio colorimétrico do MTT, em padrão dependente de concentração, porém não dependente do tempo de exposição, sob nossas condições experimentais.

Em experimentos combinando exposição aguda em culturas mistas observamos aumento significativo nos valores de viabilidade celular de 21,1%, 33,9% e 55,6% nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/ml, respectivamente. Por outro lado, em exposição subcrônica houve redução na viabilidade celular de 15,65% e 20,3% em relação aos experimentos-controle, para 100 e 200 µg/ml, respectivamente (Figura 10).

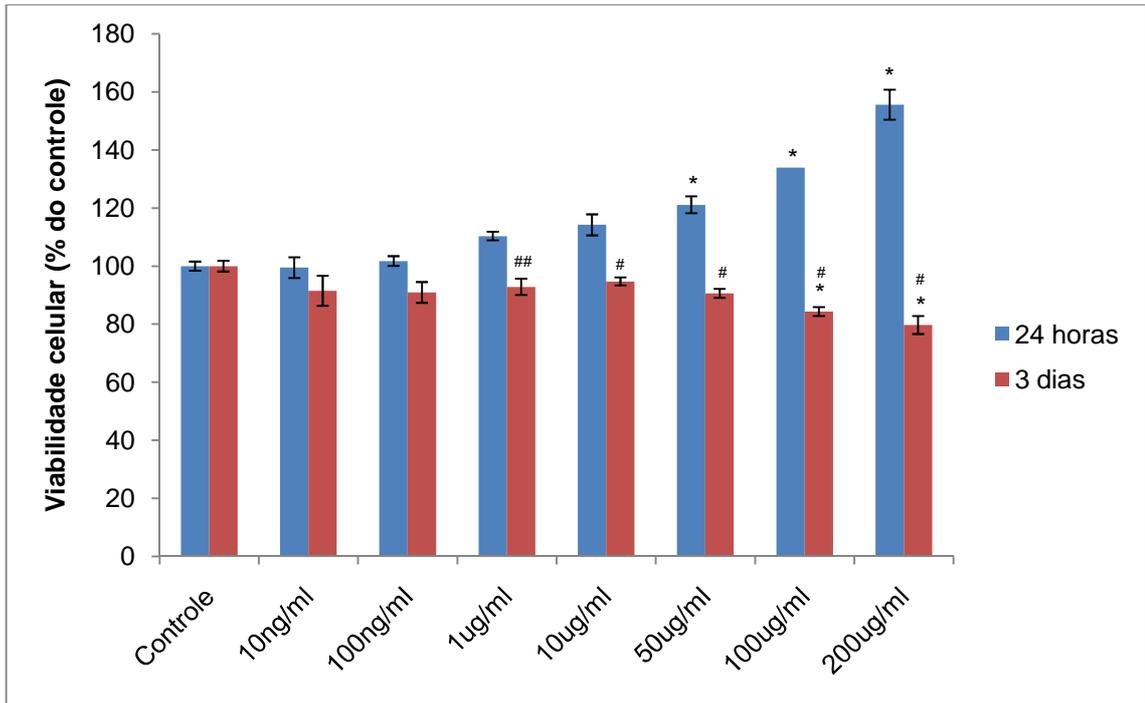


Figura 10. Efeito da administração de diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em períodos de exposição aguda (24 horas) e subcrônica (3 dias) sobre a viabilidade celular de culturas mistas derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em percentagem do grupo controle \pm média de erro padrão, a partir de 2 a 3 experimentos independentes. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA associada ao teste de Tukey). # $p < 0,01$ e ## $p < 0,05$ comparação entre as mesmas concentrações (teste t).

Com o objetivo de se testar a capacidade citoprotetora deste extrato rico em compostos fenólicos e flavonóides, considerando-se o importante efeito dos compostos mercuriais em promover estresse oxidativo em células do tecido nervoso, realizamos experimentos em que se adicionou às culturas mistas expostas ao MeHg diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de mogno.

Em experimentos-piloto, não foi observado efeito algum, quantitativo ou qualitativo, quando se adicionou concomitantemente o extrato aquoso de folhas de mogno (10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) a culturas expostas ao MeHg por 24 horas (6 μM , exposição aguda, Figura 11). Assim, os experimentos subseqüentes foram realizados com exposição subcrônica ao MeHg (3 μM de MeHg por 3 dias) e adição concomitante do extrato de mogno. De maneira surpreendente, este paradigma resultou em reversão dos efeitos citotóxicos induzidos por MeHg em todas as concentrações testadas, aumentando a viabilidade celular para valores próximos ao controle (Figura 12).

Em função destes experimentos iniciais, quando se verificou diferenças significantes nos efeitos do tratamento com o extrato de mogno, decidimos investigar que efeitos teria a pré-exposição e pós-exposição em relação à exposição ao MeHg.

Nos experimentos com pré-exposição ao extrato de mogno, observamos que houve modificação nos valores de viabilidade celular em relação ao grupo tratado apenas com MeHg (50,5%) em todas as concentrações testadas (71,6%, 79,1% e 66,5%, para 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de extrato). Porém, como a confirmar que os efeitos do extrato devem-se a características antioxidantes da mistura, que se beneficiam de estarem presentes antes ou mesmo durante a agressão por MeHg, em condições de pós-tratamento somente observamos alguma tendência de

proteção celular no grupo tratado com 50 µg/ml de extrato (65,2%) quando comparado ao grupo MeHg (52,4%) (Figura 13).

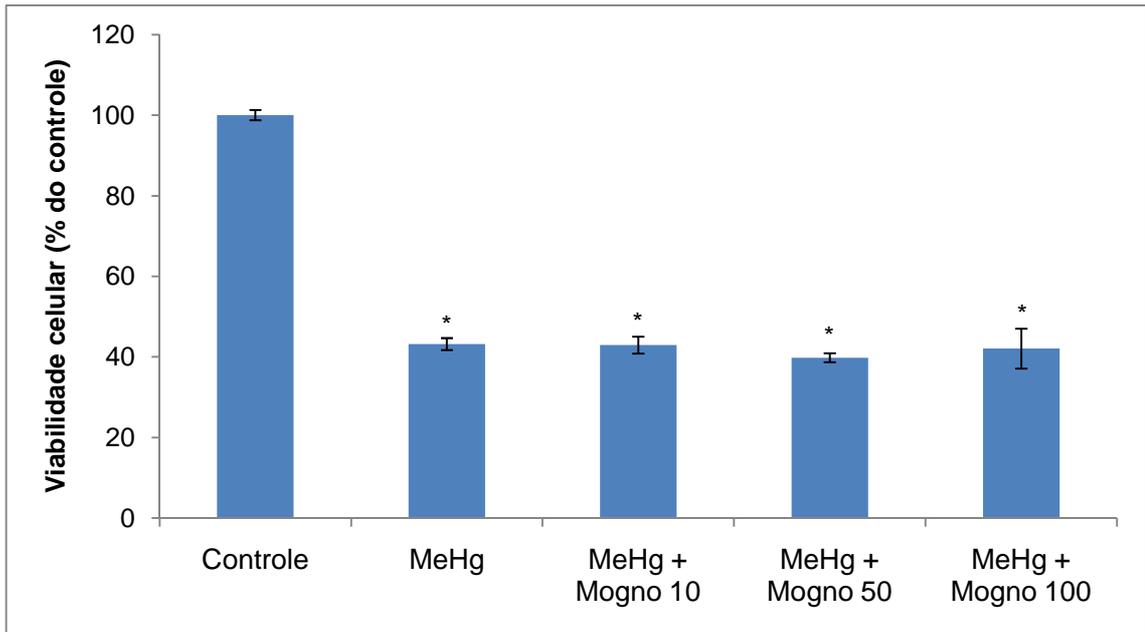


Figura 11. Efeito da administração do extrato aquoso de folhas de mogno sobre o efeito neurotóxico do MeHg em período de exposição aguda (24 horas) sobre a viabilidade celular de culturas mistas derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle \pm média de erro padrão, a partir de 2 a 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas analisadas por ANOVA associada ao teste de Tukey. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. (MeHg = metilmercúrio; Mogno 10 = extrato aquoso de folhas de mogno 10 $\mu\text{g/ml}$; Mogno 50 = extrato aquoso de folhas de mogno 50 $\mu\text{g/ml}$; Mogno 100 = extrato aquoso de folhas de mogno 100 $\mu\text{g/ml}$)

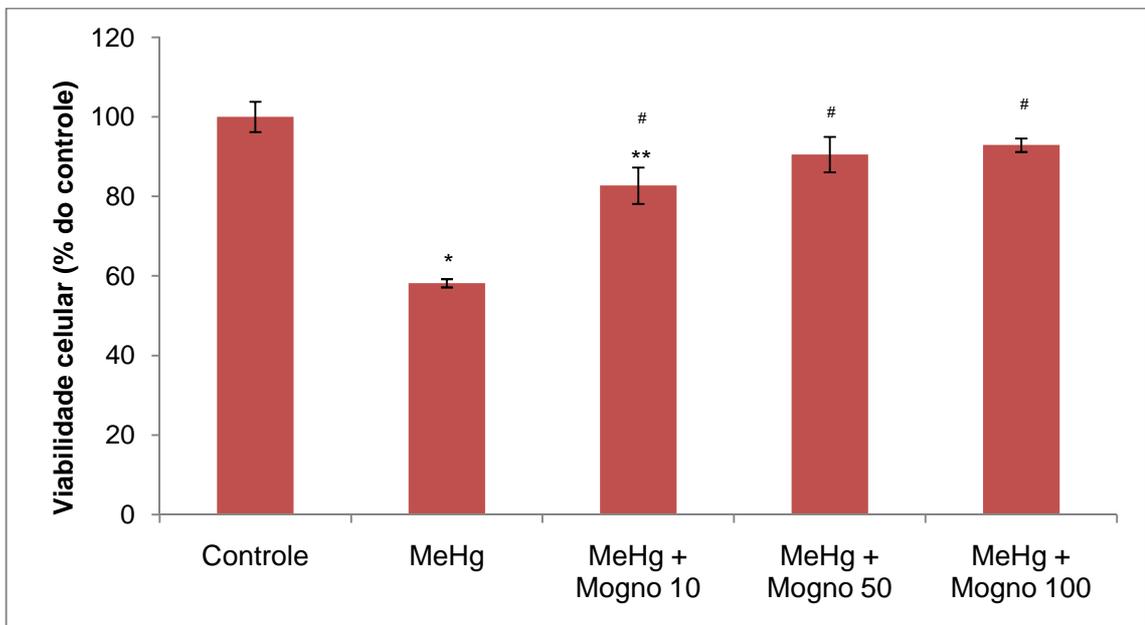


Figura 12. Efeito da administração do extrato aquoso de folhas de mogno sobre o efeito neurotóxico do MeHg em período de exposição subcrônica (3 dias) sobre a viabilidade celular de culturas mistas derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. Diferenças estatísticas analisadas por ANOVA associada ao teste de Tukey. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,01$ em relação ao grupo MeHg.

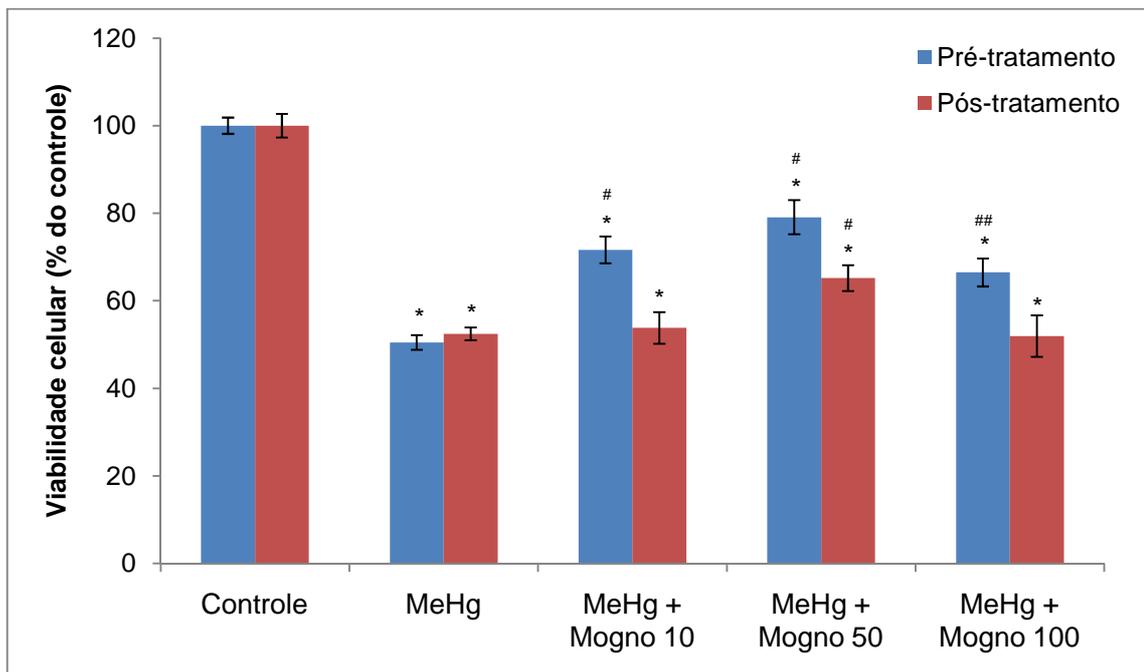


Figura 13. Efeito do pré- e pós-tratamento com extrato aquoso de folhas de mogno sobre o efeito neurotóxico do MeHg em período de exposição subcrônica (3 dias) sobre a viabilidade celular de culturas mistas derivadas de cerebelo de ratos neonatos Wistar. Diferenças estatísticas analisadas por ANOVA associada ao teste de Tukey. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,01$ e ## $p < 0,05$ em relação ao grupo MeHg.

4 DISCUSSÃO

Culturas neuronais primárias são modelos extremamente úteis na avaliação de respostas de células-alvo aos efeitos deletérios de substâncias neurotóxicas. Neste estudo, utilizamos o sistema de culturas *in vitro* como um modelo para avaliar o efeito do metilmercúrio sobre a viabilidade celular de culturas primárias derivadas do cerebelo de ratos neonatos Wistar.

O uso deste sistema com culturas primárias derivadas do cerebelo tem a pretensão de contribuir com a literatura especializada, considerando-se que a grande maioria dos trabalhos que enfocam a mesma temática foi feita utilizando-se linhagens celulares, que se por um lado garante maior reprodutibilidade de resultados, por outro pode levar a resultados de pouca aplicabilidade, talvez por não apresentarem estas células características naturais importantes para os processos de seletividade celular, observadas nos efeitos neurotóxicos do mercúrio. Além disso, avaliamos a utilização do extrato de mogno com propriedades antioxidantes como estratégias de proteção celular contra injúrias induzidas por metilmercúrio, principalmente levando-se em consideração que parte dos mecanismos celulares alterados por ação mercurial resultam em intenso estresse oxidativo nas células-alvo.

Consideráveis evidências disponíveis na literatura científica (ETO, 2000; FONFRÍA *et al.*, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; ALLEN *et al.*, 2002; LIMKE *et al.*, 2004) indicam uma ampla diversidade na natureza e na localização específica dos danos neurais causados pela exposição ao mercúrio, sugerindo que a patogenicidade deste composto depende de diversos fatores, que incluem a forma química do mercúrio, o período do desenvolvimento no qual a exposição ocorre,

diferenças na dosagem e duração da exposição ao mercúrio, além da maior ou menor suscetibilidade de tipos celulares do tecido nervoso a esta exposição.

De fato, culturas de células do cerebelo de ratos neonatos da linhagem Wistar mostraram-se suscetíveis aos efeitos deletérios do metilmercúrio (MeHg) de maneira dependente de concentração e de tempo de exposição, sob nossas condições experimentais (Figuras 6-9).

Em nosso estudo, a utilização de diferentes protocolos para a geração de culturas primárias teve o objetivo de investigar a ocorrência de interações entre neurônios e células da glia que poderiam interferir no efeito do metilmercúrio. Assim, sob condições experimentais já discriminadas, as culturas mistas mostraram-se mais resistentes ao efeito tóxico do MeHg quando comparadas a culturas semipuras, tanto em condições de intoxicação aguda quanto subcrônica, sugerindo que as células da glia podem estar desempenhando alguma função na redução da toxicidade induzida pelo mercúrio orgânico. Estes achados encontram-se de acordo com os experimentos realizados por Morken e colaboradores (2005) em camundongos, demonstrando que monoculturas de neurônios cerebelares acumularam mais MeHg e de forma mais rápida do que quando cultivados em presença de astrócitos sob as mesmas condições, mostrando ainda que astrócitos protegem os neurônios e ao mesmo tempo tornam-se alvos sensíveis ao MeHg, sugerindo um possível papel protetor dos astrócitos na neurotoxicidade induzida por MeHg.

Edwards e colaboradores (2006), através da utilização de sistemas de culturas primárias, mostraram que células de Purkinje parecem ser mais resistentes do que células granulares aos efeitos neurotóxicos do MeHg. Em exposição de 3 μM de MeHg não foi observada perda de viabilidade em células de Purkinje, enquanto

que nessa mesma concentração, apenas 40,6% de células granulares cerebelares estavam vivas após 24,5 horas (EDWARDS *et al.*, 2006). Estes achados estão de acordo com nossos resultados, pois encontramos resultados semelhantes em culturas semipuras cerebelares em concentrações de 2 μ M de MeHg para exposições de 24 horas (Figura 7).

Um achado notável está relacionado à mortalidade de células granulares cerebelares a baixas concentrações de metilmercúrio (KUNIMOTO, 1994; SAKAUE *et al.*, 2005; 2006; VENDRELL *et al.*, 2007). A elevada sensibilidade ao MeHg indica que este modelo *in vitro* é bastante útil para o estudo de toxicidade do MeHg em baixas concentrações, como evidenciado em nossas condições de intoxicação subcrônica. Em acordo com esses indícios, Sakaue e colaboradores (2005) observaram que a viabilidade de células granulares cerebelares após 48 horas de exposição ao metilmercúrio sofreu redução para 76 e 43% em relação ao controle para concentrações de 30 e 100 nM, respectivamente. Com a utilização de células B35 de neuroblastoma, o mesmo tratamento de 48 horas com metilmercúrio produziu redução significativa de viabilidade a partir de 300 nM (SAKAUE *et al.*, 2005). Utilizando ainda sistema de culturas primárias semipuras de células granulares cerebelares preparadas de ratos da linhagem Wistar, Sakaue e colaboradores (2006) encontraram que a diminuição na viabilidade celular era diretamente ligada ao aumento no acúmulo de mercúrio dentro de um período 24 horas de exposição. Nossos resultados são semelhantes a estes no que diz respeito à dependência de dose na toxicidade do MeHg, mesmo em pequenas concentrações como observado em tratamentos subcrônicos de 3 e 5 dias de exposição (Figuras 8 e 9).

Em modelos de culturas semipuras derivadas de cerebelo de camundongos NMRI, Vendrell e colaboradores (2007) mostraram que 100 nM de MeHg por 10 dias de exposição produziu perda de 50% na viabilidade celular, além de redução no conteúdo de glutamato intracelular e aumentos nos processos de peroxidação lipídica. Neste mesmo estudo, demonstraram que a exposição a 300 nM de MeHg foi suficiente para induzir morte celular via apoptose sem ativação de caspase 3 (VENDRELL *et al.*, 2007).

Estes dados refletem o grau de toxicidade dos compostos mercuriais mesmo quando se considera tipos celulares bastante diversos entre si, ao mesmo tempo em que mostram resultados com valores próximos dos valores encontrados em nosso estudo com a utilização de culturas primárias derivadas do cerebelo.

Em contrapartida, estudo conduzido por Marty & Atchison (1998) utilizando sistema *in vitro* de culturas de células granulares cerebelares de ratos Sprague-Dawley mostraram que 3,5 horas após exposição ao MeHg foi possível visualizar diminuição na viabilidade celular de 26 e 46% em relação aos valores controles para 0,5 e 1,0 μ M de MeHg, respectivamente; aumentando este percentual para 73% após 24,5 horas. Estes achados divergem dos nossos, provavelmente em função da densidade celular utilizadas naqueles experimentos em comparação aos nossos. Kaur e colaboradores (2007) ressaltam a importância de densidades celulares comparáveis para estudos de toxicidade induzida por MeHg, mostrando que em seus experimentos houve um aumento na atividade do MTT em culturas primárias de astrócitos cerebelares tratadas com MeHg quando plaqueadas em diferentes densidades.

Na neurofisiologia normal, são inúmeros os exemplos de interações entre astrócitos e neurônios. Entre estas, podemos citar a capacidade dos astrócitos em

permitir a migração neuronal durante o desenvolvimento, a liberação de fatores neurotróficos, assim como a capacidade de interferir na comunicação neuronal. Nesta última contribuição, os astrócitos estão diretamente envolvidos com a captação de glutamato, participando do “turnover” deste neurotransmissor para o neurônio. Outras interações entre astrócitos e neurônios incluem também o papel obrigatório dos astrócitos em fornecer moléculas precursoras para a síntese de glutamina neuronal, controle do pH extracelular e balanço iônico (ASCHNER *et al.*, 2000; ALLEN *et al.*, 2002).

Estudos como o de Sanfeliu e colaboradores (2001), ressaltam a importância nas relações entre astrócitos e neurônios, em que demonstram que astrócitos humanos são células mais resistentes a neurotoxicidade induzida por MeHg do que neurônios humanos ou células de neuroblastoma SH-SY5Y, aumentando a citotoxicidade com o aumento do tempo de exposição ao composto.

De acordo com esta proposição, alguns estudos mostram ainda a influência dos mecanismos de desmetilação do metilmercúrio dentro do organismo. Em experimentos realizados por Shapiro & Chan (2008), em modelo *in vitro* de astrócitos derivados do cerebelo de ratos Sprague-Dawley, o MeHg pode ser convertido à Hg inorgânico e a desmetilação aumenta com o estresse oxidativo. Neste contexto, Kaur e colaboradores (2007) descrevem que culturas de células cerebelares são mais vulneráveis às lesões oxidativas induzidas por MeHg do que culturas de células corticais, mostrando ainda que culturas de neurônios cerebelares tendem a ser mais sensíveis à esses insultos oxidativos do que culturas de astrócitos cerebelares.

Por outro lado, a inibição do transporte de glutamato no astrócito induzida pela toxicidade do MeHg aumenta a vulnerabilidade neuronal ao estresse oxidativo e

a ativação em excesso dos receptores do tipo NMDA conduz à morte celular (ALLEN *et al.*, 2002).

No cerebelo, as células de Purkinje, relativamente poupadas sob condições de exposição aguda ao MeHg (EDWARDS *et al.*, 2006), são resistentes à toxicidade associada a ativação de receptores de NMDA por glutamato (ASCHNER *et al.*, 2000), provavelmente por expressarem poucos receptores do tipo NMDA (MONAGHAN & COTMAN, 1985). Em contraste, células granulares cerebelares, primeiros alvos da neurodegeneração induzida por MeHg (EDWARDS *et al.*, 2006), expressam uma elevada densidade de receptores do tipo NMDA (MONAGHAN & COTMAN, 1985), mostrando que o excesso de glutamato desempenha um importante papel na neurotoxicidade mediada por MeHg.

Assim, é notório que as áreas do SNC adulto afetadas pelo MeHg, como as células granulares do cerebelo e córtex de associação visual, possuem elevados níveis de inervação glutamatérgica e receptores NMDA (MONAGHAN & COTMAN, 1985), que corroboram com a hipótese de que a neurotoxicidade mercurial é, pelo menos em parte, mediada por alterações na homeostase do glutamato.

Embora os danos tóxicos do MeHg possam ser mais prevalentes em neurônios, vários dados da literatura sugerem que o dano neuronal em resposta ao MeHg assemelham-se mais com uma disfunção dos astrócitos circunvizinhos no meio extracelular.

Dada a localização predominante do mercúrio dentro dos astrócitos, o papel aparente do glutamato na toxicidade do MeHg, e a importância dos astrócitos na manutenção da homeostase do glutamato, o transporte de glutamato e seu metabolismo tornam-se alvos para o estudo dos efeitos celulares do MeHg, assim

como os mecanismos que participam da liberação do glutamato a partir de neurônios.

A análise da literatura pertinente nos leva à constatação de que há um grande investimento em termos de número de estudos que investigam os mecanismos de neurotoxicidade associados a compostos mercuriais.

Deste esforço, apesar de ainda inconclusivos, resultaram diversas vias celulares e moleculares envolvidas no processo de toxicidade do metilmercúrio (ATCHISON & HARE, 1994; KUNIMOTO, 1994; MARTY & ATCHISON, 1997; 1998; ASCHNER *et al.*, 2000; GASSÓ *et al.*, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001; LIMKE & ATCHISON, 2002; LIMKE *et al.*, 2003; 2004; SHANKER *et al.*, 2004a).

Mecanismos que conduzem formação excessiva de radicais livres têm sido estimados como um dos fatores causais nos danos neurotóxicos associados à exposição ao mercúrio. Os avanços no entendimento de patologias neurodegenerativas constituem novas fontes de oportunidades para desenvolvimento de terapias neuroprotetoras. Diversas estratégias têm sido investigadas para prevenir danos pró-oxidativos celulares induzidos por espécies mercuriais. Estas respostas incluem a modulação de níveis celulares de glutathione, metalotioneínas e a adição de outras moléculas antioxidantes.

Como já explicitado anteriormente, o uso de antioxidantes naturais como alternativas terapêuticas vêm ganhando espaço na literatura especializada (YOU DIM *et al.*, 2002; AHLEMEYER & KRIEGLSTEIN, 2003; DAJAS *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; SILVA *et al.*, 2004; SARWAR ALAM *et al.*, 2007; ŞENER *et al.*, 2007; TUNALI-AKBAY *et al.*, 2007; OLIVERIA *et al.*, 2009). O exame químico preliminar do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) mostrou grande concentração de alguns ácidos fenólicos e flavonóides que podem ser os responsáveis pelas

atividades antioxidante e citoprotetora deste extrato (dados não publicados). Em nosso modelo experimental, os ensaios de viabilidade celular mostraram que o extrato aquoso de folhas de mogno possui efeitos citoprotetores contra injúrias oxidativas induzidas por metilmercúrio.

Em condições de exposição concomitante ao MeHg, o extrato de mogno aumentou a viabilidade celular mensurada para valores próximos aos controles, evidenciando o grande potencial citoprotetor contido no extrato em questão. Porém, em experimentos em que se realizou pré-exposição ao extrato, antes da exposição ao MeHg, estes efeitos, apesar de observados, não conseguiram alcançar valores estatisticamente semelhantes aos observados no grupo controle. Pode-se aventar a possibilidade de que há menor disponibilidade de compostos fenólicos e flavonóides no regime de pré-exposição a quando da exposição ao MeHg. Neste mesmo raciocínio, o extrato de mogno em condições de pós-exposição em culturas expostas ao MeHg não conseguiu reverter/bloquear os efeitos pró-oxidativos do referido neurotóxico.

A atividade de seqüestrar radicais é normalmente atribuída aos componentes fenólicos presentes em plantas (SARWAR ALAM *et al.*, 2007). Por outro lado, a classe dos flavonóides também tem sido associada com atividade antioxidante (PRIOR, 2003; ŞENER *et al.*, 2007) e robustas propriedades neuroprotetoras (YOU DIM *et al.*, 2002; AHLEMEYER & KRIEGLSTEIN, 2003; DAJAS *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; SILVA *et al.*, 2004). De fato, a formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente o estresse oxidativo representam as principais ameaças à homeostasia induzidas pelo MeHg. Dessa forma, a utilização do extrato aquoso de mogno com comprovada atividade antioxidante se

caracteriza como uma ferramenta útil neste modelo por seqüestrar, quelar e/ou inibir a formação de radicais livres.

São ainda bastante limitados os estudos explorando esta vertente. Como exemplo, Shanker & Aschner (2003), utilizando exposição ao MeHg em culturas primárias de astrócitos derivadas do córtex cerebral de ratos, observaram que a utilização de diversos antioxidantes promoveu reversão total do estresse oxidativo induzido por esta espécie mercurial (SHANKER & ASCHNER, 2003).

Também em culturas primárias de astrócitos, Shanker e colaboradores (2005) através de pré-tratamento com ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico, um agente conhecido por aumentar os níveis de glutathione, aboliu o aumento de ERO induzido por MeHg. Além disso, a utilização de antioxidantes como *n*-propil galato e catalase apresentaram efeitos protetores, total e parcial, respectivamente, quando associados ao tratamento com MeHg na formação de radicais livres (SHANKER *et al.*, 2005).

Nesse contexto, Kaur e colaboradores (2006) através da suplementação de culturas de astrócitos e culturas de neurônios derivadas de cerebelo de camundongos NMRI com N-acetil cisteína (NAC), um precursor de GSH, mostraram que houve proteção contra o insulto oxidativo induzido pelo MeHg em ambos os fenótipos de cultura. Ainda nestes experimentos, ensaios de viabilidade celular através do método do MTT confirmaram a eficácia da suplementação com NAC em atenuar a citotoxicidade induzida por MeHg tanto em culturas de astrócitos quando em culturas de neurônios.

Outros antioxidantes conhecidos são os derivados de selênio, utilizados como quelantes naturais de metais pesados (CHEN & BERRY, 2003). Sakaue e colaboradores (2006) mostraram reversão parcial e total, dependente de

concentração, na utilização de selenito de sódio em culturas primárias semipuras de células granulares cerebelares expostas ao MeHg por 48 horas. Outros estudos envolvendo culturas de células sugerem a proteção do selênio contra a apoptose induzida por mercúrio (FRISK *et al.*, 2003).

Todos estes estudos apontam para o importante efeito protetor dos índices intracelulares adequados de GSH, assim como os de antioxidantes contra os danos oxidativos mediados pelo MeHg em culturas celulares. Assim, a presença de ácidos fenólicos e flavonóides no extrato aquoso de folhas de mogno tornam esta planta atrativa na busca por estratégias neuroprotetoras no tratamento de indivíduos contaminados. No entanto, é importante considerar que o extrato é uma mistura de diferentes substâncias, então outros componentes podem também ser responsáveis por estes efeitos.

5 CONCLUSÕES

- Exposição de culturas primárias cerebelares ao metilmercúrio resultou em perda celular dependente de concentração e de tempo de exposição;

- Culturas semipuras de neurônios foram mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos do metilmercúrio, quando comparadas a culturas mistas, o que sugere o envolvimento de gliócitos, possivelmente como componente neuroprotetor, no efeito induzido pelo composto;

- O extrato aquoso de folhas de *Swietenia macrophylla* apresentou efeito citoprotetor parcial ou total, dependendo do paradigma de exposição, ante a neurotoxicidade induzida por MeHg em culturas mistas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI T. & KUNIMOTO M. Acute cytotoxic effects of mercuric compounds in cultured astrocytes prepared from cerebral hemisphere and cerebellum of newborn rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 28(12):2308-2311, 2005.
- AHLEMEYER B. & KRIEGLSTEIN J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 60(9):1779-1792, 2003.
- AHLEMEYER B. & BAUMGART-VOGT E. Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. **Journal of Neuroscience Methods**. 149:110-120, 2005.
- AL-DAMLUJI S.F. Organomercury poisoning in Iraq: History prior to the 1971-1972 outbreak. **Bulletin of World Health Organization**. 53(Suppl.):11-14, 1976.
- ALLEN J.W., SHANKER G., ASCHNER M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Research**. 894(1):131-40, 2001.
- ALLEN J.W., SHANKER G., TAN K.H., ASCHNER M. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. **Neurotoxicology**. 23:755-759, 2002.
- AL-TIKRITI K. & AL-MUFTI A.W. An outbreak of organomercury poisoning among Iraqi farmers. **Bulletin of World Health Organization**. 53(Suppl.):15-21, 1976.
- ANDERSEN M.L., D'ALMEIDA V., MI KO G., KAWAKAMI R., MARTINS P.J.F., MAGALHÃES L.E., TUFIK S. **Princípios étnicos e práticos do uso de**

animais de experimentação. São Paulo: Cromosete Gráfica e Editora, 2004.
179p.

ASCHNER M., YAO C.P., ALLEN J.W., TAN K.H. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International.** 37(2-3):199-206, 2000.

ASCHNER M. & SYVERSEN T. Methylmercury: Recent advances in the understanding of its neurotoxicity. **Therapeutic Drug Monitoring.** 27(3):278-283, 2005.

ATCHISON W.D. & HARE M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB Journal.** 8:622-629, 1994.

AZEVEDO F.A. **Toxicologia do Mercúrio.** São Paulo: RiMa, 2003. 292p.

BEYROUTY P. & CHAN H.M. Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. **Neurotoxicology and Teratology.** 28(1):49-58, 2006.

BIDONE E.D., CASTILHOS Z.C., CID DE SOUZA T.M., LACERDA L.D. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajós river basin, Pará State, Amazon, Brazil: A screening approach. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 59:194-201, 1997.

BROWN N., JENNINGS S., CLEMENTS T. The ecology, silviculture and biogeography of mahogany (*Swietenia macrophylla*): A critical review of the evidence. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.** 6:37-49, 2003.

- CARVALHO M.C., FRANCO J.L., GHIZONI H., KOBUS K., NAZARI E.M., ROCHA J.B., NOGUEIRA C.W., DAFRE A.L., MÜLLER Y.M., FARINA M. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. **Toxicology**. 239(3):195-203, 2007.
- CASTOLDI A.F., COCCINI T., CECCATELLI S., MANZO L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin**. 55(2):197-203, 2001.
- CHAPMAN L.A. & CHAN H.M. Inorganic mercury pre-exposures protect against methyl mercury toxicity in NSC-34 (neuron x spinal cord hybrid) cells. **Toxicology**. 132:167-178, 1999.
- CHEN J. & BERRY M.J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**. 86:1-12, 2003.
- CRESPO-LÓPEZ M.E., HERCULANO A.M., CORVELO T.C., NASCIMENTO J.L.M. Mercurio y neurotoxicidad. **Revista de Neurologia**. 40(7):441-447, 2005.
- DAJAS F., RIVERA F., BLASINA F., ARREDONDO F., ECHEVERRY C., LAFON L., MORQUIO A., HEIZEN H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. **Neurotoxicity Research**. 5(6):425-432, 2003.
- DAVIDSON P.W., MYERS G.J., COX C., AXTELL C., SHAMLAYE C., SLOANE-REEVES J., CERNICHIARI E., NEEDHAM L., CHOI A., WANG Y., BERLIN M., CLARKSON T.W. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: Outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. **JAMA**. 280(8):701-707, 1998.

- DREIEM A., GERTZ C.C., SEEGAL R.F. The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. **Toxicological Sciences**. 87(1):156-162, 2005.
- DRINGEN R., PFEIFFER B., HAMPRECHT B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. **The Journal of Neuroscience**. 19(1):562-569, 1999.
- DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**. 62:649-671, 2000.
- EDWARDS J.R., MARTY M.S., ATCHISON W.D. Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 208:222-232, 2005.
- ETO K. Minamata disease. **Neurophatology**. 20:S14-S19, 2000.
- FALAH S., SUZUKI T, KATAYAMA T. Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* bark and their antioxidant activity. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 11(16):2007-12, 2008.
- FARINA M., FRANCO J.L., RIBAS C.M., MEOTTI F.C., MISSAU F.C., PIZZOLATTI M.G., DAFRE A.L., SANTOS A.R. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 57(11):1503-8, 2005.

- FARO L.R.F., NASCIMENTO J.L.M., SAN JOSÉ J.M., ALFONSO M., DURAN R. Intrastratial administration of methylmercury increases in vivo dopamine release. **Neurochemical Research**. 25(2):225-229, 2000.
- FENG W., WANG M., LI B., LIU J., CHAI Z., ZHAO J., DENG G. Mercury and trace element distribution in organic tissues and regional brain of fetal rat after in utero and weaning exposure to low dose of inorganic mercury. **Toxicology Letters**. 152(3):223-34, 2004.
- FIGUEIREDO A.F. Distribuição de Mercúrio em Amostras Ambientais e Avaliação de Risco para a População de Cachoeira do Piriá, Nordeste do Estado do Pará. Dissertação de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, 2001.
- FONFRÍA E., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., SUÑOL C. Mercury interaction with the GABA_A receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. **Neuropharmacology**. 41:819-833, 2001.
- FONFRÍA E., VILARÓ M.T., BABOT Z., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., SUNÖL C. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. **Journal of Neuroscience Research**. 79(4):545-553, 2005.
- FRISK P., WESTER K., YAGOB A., LINDH U. Selenium protection against mercury-induced apoptosis and growth inhibition in cultured K-562 cells. **Biological Trace Elemental Research**. 92:105-114, 2003.
- GAO H.M., HONG J.S., ZHANG W., LIU B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience**. 22:782-790, 2002.

- GASSÓ S., SUNÖL C., SANFELIU C., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., CRISTÒFOL R.M.
Pharmacological characterization of the effects of methylmercury and mercuric chloride on spontaneous noradrenaline release from rat hippocampal slices. **Life Sciences**. 67(10):1219-1231, 2000.
- GOCHFELD M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology Environmental Safety**. 56:174-179, 2003.
- GÖTZ M.E., KOUTSILIERI E., RIEDERER P., CECCATELLI S., DARÉ E.
Methylmercury induces neurite degeneration in primary culture of mouse dopaminergic mesencephalic cells. **Journal of Neural Transmission**. 109(5-6):597-605, 2002.
- ISSA Y., WATTS D.C., DUXBURY A.J., BRUNTON P.A., WATSON M.B., WATERS C.M. Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3.13. **Biomaterials**. 24(6):981-987, 2003.
- KAUR P., ASCHNER M., SYVERSEN T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neurotoxicology**. 27(4):492-500, 2006.
- KAUR P., ASCHNER M., SYVERSEN T. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. **Toxicology**. 230:164-177, 2007.
- KUNIMOTO M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochemical Biophysical Research Communications**. 204(1):310-317, 1994.

- LIMKE T.L. & ATCHISON W.D. Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 178(1):52-61, 2002.
- LIMKE T.L., OTERO-MONTAÑEZ J.K.L., ATCHISON W.D. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 304(3):949-958, 2003.
- LIMKE T.L., HEIDEMANN S.R., ATCHISON W.D. Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? **Neurotoxicology**. 25(5):741-760, 2004.
- MAHALE G., MEDHA H., GOUDAR I. Dyeing silk with mahogany leave extract. **American Taxation Association Journal**. 17:72-75, 2006.
- MARTY M.S. & ATCHISON W.D. Pathways mediating Ca^{2+} entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 147(2):319-330, 1997.
- MARTY M.S. & ATCHISON W.D. Elevations of intracellular Ca^{2+} as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 150(1):98-105, 1998.
- MEACHAM C.A., FREUDENRICHA T.M., ANDERSONA W.L., SUIB L., LYONS-DARDENA T., BARONE JR. S., GILBERTA M.E., MUNDYA W.R., SHAFER T.J. Accumulation of methylmercury or polychlorinated biphenyls in in vitro

models of rat neuronal tissue. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 205:177-187, 2005.

MICARONI R.C.C.M., BUENO M.I.M.S., JARDIM W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**. 23(4):487-495, 2000.

MIYAMOTO K., NAKANISHI H., MORIGUCHI S., FUKUYAMA N., ETO K., WAKAMIYA J., MURAO K., ARIMURA K., OSAME M. Involvement of enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. **Brain Research**. 901(1-2):252-258, 2001.

MONAGHAN D.T. & COTMAN C.W. Distribution of N-Methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]Glutamate-binding Sites in Rat Brain. **The Journal of Neuroscience**. 5(11):2909-2919, 1985.

MONNET-TSCHUDI F., ZURICH M.G., HONEGGER P. Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat telencephalon. **Brain Research**. 741(1-2):52-59, 1996.

MORETTO M.B., FUNCHAL C., ZENI G., PESSOA-PUREUR R., ROCHA J.B.T. Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the *in vitro* phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. **Toxicological Sciences**. 2005.

- MORKEN T.S., SONNEWALD U., ASCHNER M., SYVERSEN T. Effects of Methylmercury on Primary Brain Cells in Mono- and Co-culture. **Toxicological Sciences**. 87(1):169-175, 2005.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65(1-2):55-63, 1983.
- MYERS G.W., DAVIDSON P.W., COX C., SHAMLAYE C., CERNICHIARI E., CLARKSON T.W. Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. **Environmental Research**. 83:275-285, 2000.
- OLIVERIA D.M., BARRETO B., DE ANDRADE D.V.G., SARACENO E., AON-BERTOLINO L., CAPANI F., EL BACHÁ R.S., GIRALDEZ L.D. Cytoprotective Effect of *Valeriana officinalis* Extract on an *In Vitro* Experimental Model of Parkinson Disease. **Neurochemical Research**. 34:215-220, 2009.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Chapter 6.9: Mercury. Air Quality Guidelines. Second Edition. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. 15p.
- PASSOS C.J.S., MERGLER D., LEMIRE M., FILLION M., GUIMARÃES J.R.D. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Science of the Total Environment**. 373:68-76, 2007.
- PINHEIRO M.C.N., OIKAWA T., VIEIRA J.L.F., GOMES M.S.V., GUIMARÃES G.A., CRESPO-LÓPEZ M.E., MULLER R.C.S., AMORAS W.W., RIBEIRO D.R.G., RODRIGUES A.R., CÔRTEZ M.I.T., SILVEIRA L.C.L. Comparative study of

human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 39:411-414, 2006.

PINHEIRO M.C.N., CRESPO-LÓPEZ M.E., VIEIRA J.L.F., OIKAWA T., GUIMARÃES G.A., ARAÚJO C.C., AMORAS W.W., RIBEIRO D.R.G., HERCULANO A.M., NASCIMENTO J.L.M., SILVEIRA L.C.L. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environment International.** 33(1):56-61, 2007.

PINHEIRO M.C.N., MACCHI B.M., VIEIRA J.L.F., OIKAWA T., AMORAS W.W., GUIMARÃES G.A., COSTA C.A., CRESPO-LÓPEZ M.E., HERCULANO A.M., SILVEIRA L.C.L., NASCIMENTO J.L.M. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research.** 107(1):53-9, 2008.

PRIOR R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage.

The American Journal of Clinical Nutrition. 78(Suppl. 3):570S–578S, 2003.

RAMIREZ G.B., CRUZ M.C., PAGULAYAN O., OSTREA E., DALISAY C. The Tagum study I: analysis and clinical correlates of mercury in maternal and cord blood, breast milk, meconium, and infants' hair. **Pediatrics.** 106(4):774-781, 2000.

ROEGGE C.S., MORRIS J.R., VILLAREAL S., WANG V.C., POWERS B.E., KLINTSOVA A.Y., GREENOUGH W.T., PESSAH I.N., SCHANTZ S.L. Purkinje cell and cerebellar effects following developmental exposure to PCBs and/or MeHg. **Neurotoxicology and Teratology.** 28(1):74-85, 2006.

- SAKAMOTO M., NAKANO A., KAJIWARA Y., NARUSE I., FUJISAKI T. Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. **Environmental Research.** 61(1):43-50, 1993.
- SAKAMOTO M., KAKITA A., OLIVEIRA R.B., PAN H.S., TAKAHASHI H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research.** 152:171-176, 2002.
- SAKAUE M., OKAZAKI M., HARA S. Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. **Toxicology.** 213:97-106, 2005.
- SAKAUE M., ADACHI T., OKAZAKI M., NAKAMURA H., MORI N., HARA S., SAKABE K. Effects of sodium selenite on methylmercury-induced cell death and on mercury accumulation in rat cerebellar neurons in primary culture. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 77(5):779-84, 2006.
- SARWAR ALAM M., KAUR G., JABBAR Z., JAVED K., ATHAR M. *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. **Food and Chemical Toxicology.** 45(6):910-20, 2007.
- SANFELIU C., SEBASTIÀ J., KIM S.U. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. **Neurotoxicology.** 22: 317-327, 2001.

- SCHULZ J.B., LINDENAU J., SEYFRIED J., DICHGANS J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry**. 267:4904-4911, 2000.
- ŞENER G., SEHIRLI O., TOZAN A., VELIOĞLU-OVUNÇ A., GEDIK N., OMURTAG G.Z. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**. 45(4):543-50, 2007.
- SHANKER G. & ASCHNER M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Brain Research. Molecular Brain Research**. 110(1):85-91, 2003.
- SHANKER G., ASCHNER J.L., SYVERSEN T., ASCHNER M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Molecular Brain Research**. 128(1):48-57, 2004a.
- SHANKER G., HAMPSON R.E., ASCHNER M. Methylmercury stimulates arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ expression in primary neuronal cultures. **Neurotoxicology**. 25(3):399-406, 2004b.
- SHANKER G., SYVERSEN T., ASCHNER J.L., ASCHNER M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Molecular Brain Research**. 137:11-22, 2005.
- SHAPIRO A.M., CHAN H.M. Characterization of demethylation of methylmercury in cultured astrocytes. **Chemosphere**. 74:112-118, 2008.

- SHENKER B.J., GUO T.L., SHAPIRO I.M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environmental Research.** 84(2):89-99, 2000.
- SILVA B.A., DIAS A.C.P., FERRERES F., MALVA J.O., OLIVEIRA C.R. Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on beta-amyloid-induced neurotoxicity. **Neurotoxicity Research.** 6(2):119-130, 2004.
- STRINGARI J., MEOTTI F.C., SOUZA D.O., SANTOS A.R., FARINA M. Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. **Neurochemical Research.** 31(4):563-9, 2006.
- TUNALI-AKBAY T., SENER G., SALVARLI H., SEHIRLI O., YARAT A. Protective effects of Ginkgo biloba extract against mercury(II)-induced cardiovascular oxidative damage in rats. **Phytotherapy Research.** 21(1):26-31, 2007.
- USUKI F., YASUTAKE A., UMEHARA F., TOKUNAGA H., MATSUMOTO M., ETO K., ISHIURA S., HIGUCHI I. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. **Neuroscience Letters.** 304:199-203, 2001.
- VENDRELL I., CARRASCAL M., VILARÓ M.T., ABIÁN J., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., SUÑOL C. Cell viability and proteomic analysis in cultured neurons exposed to methylmercury. **Human & Experimental Toxicology.** 26:263-272, 2007.
- YOUDIM K.A., SPENCER J.P., SCHROETER H., RICE-EVANS C. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. **Biological Chemistry.** 383(3-4):503-519, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)