

NILTON BARRETO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO SELENITO DE
SÓDIO SOBRE A NEUROTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO EM
DIFERENTES PERÍODOS DE DESENVOLVIMENTO DE RATOS
WISTAR

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração de 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

2011

NILTON BARRETO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO SELENITO DE
SÓDIO SOBRE A NEUROTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO EM
DIFERENTES PERÍODOS DE DESENVOLVIMENTO DE RATOS
WISTAR

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração de 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

2011

NILTON BARRETO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO SELENITO DE
SÓDIO SOBRE A NEUROTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO EM
DIFERENTES PERÍODOS DE DESENVOLVIMENTO DE RATOS
WISTAR

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:

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Elizabeth Sumi Yamada
ICB – UFPA
(orientadora)

Prof^o Dr. Edmar Tavares da Costa
ICB – UFPA
(Co-orientador)

Prof^o Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
ICB- UFPA

Prof^a Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
ICB – UFPA

"Somos aquilo que lembramos, somos aquilo que decidimos esquecer."
Norberto Bobbio

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nilton Luiz dos Santos e Maria Nércia Barreto dos Santos, por todo amor e oportunidade a mim proporcionados.

Às minhas irmãs, Nádia Barreto dos Santos e Neucy Barreto dos Santos, pela paciência e apoio durante esta caminhada.

À minha namorada Sâmia Maracaípe por toda ajuda, compreensão e amor durante esta trajetória.

À professora Elizabeth Sumi Yamada, pela profissional excelente que é e pela disposição e disponibilidade sempre.

Ao professor Edmar Tavares da Costa, pela confiança, incentivo, paciência e amizade durante esses seis anos.

Aos amigos do LaNEx, em especial a Gabriela Sampaio, Bruna Novaes, Nathalia Pontes, Arnaldo Martins e Geovanny Lima, por toda ajuda e companheirismo.

Aos meus pais por todo
incentivo e compreensão.

RESUMO

A exposição a compostos mercuriais resulta em danos oxidativos, afetando gravemente o sistema nervoso central, como observado em humanos e em modelos experimentais. Este trabalho utilizou ratos Wistar em diferentes períodos do neurodesenvolvimento a fim de investigar possíveis efeitos protetores do selênio (selenito de sódio) em um modelo *in vivo* de exposição ao metilmercúrio (MeHg). Os sujeitos (grupos de idades P1 e P21) receberam por amamentação ou via oral: veículo, Selênio (5ppm), MeHg (10ppm) ou Selênio (5ppm) mais MeHg (10ppm) durante 20 e 10 dias respectivamente (n = 8 por grupo). Após o tratamento, os ratos foram submetidos aos testes de campo aberto e labirinto aquático a fim de analisar déficits motores e de memória/aprendizagem, respectivamente. Para fins de análise histológica, foi realizada perfusão e imunohistoquímica para Neu-N. Com o objetivo de aferir possíveis efeitos deletérios sobre populações neuronais, foi feita contagem estereológica dos neurônios do hipocampo (camada polimórfica do giro denteado). Como resultado, foi observada redução significativa na atividade locomotora de neonatos (P1) mediante exposição ao MeHg. Além disso, nos grupos expostos ao MeHg (isoladamente ou associado ao selênio) verificou-se déficits de aprendizagem e memória. Já os animais P21 expostos ao MeHg apresentaram aumento na atividade locomotora, efeito abolido pela administração concomitante de selênio. Quando submetidos ao labirinto aquático, observou-se redução do tempo de latência apenas no grupo controle e naqueles animais expostos ao selênio. Como resultado das contagens estereológicas, observou-se diminuição do número de neurônios no hipocampo somente nos animais P21 expostos ao mercúrio. Os resultados obtidos sob estas condições experimentais mostraram que a exposição ao MeHg resultou em efeitos comportamentais diversos dependentes da idade dos sujeitos. A administração de selênio só foi capaz de interferir positivamente nos déficits locomotores observados em animais mais velhos. Além disso, foi observado que a administração de selênio não interferiu nos distúrbios comportamentais de memória/aprendizagem, tampouco na morte neuronal induzida por MeHg. Possíveis mecanismos associados a este padrão de proteção parcial por selênio, especialmente em estágios mais avançados de desenvolvimento neural ainda necessitam ser elucidados.

ABSTRACT

Exposure to mercury compounds results in oxidative damages, seriously affecting the central nervous system both in humans and in experimental models. We used Wistar rats at different stages of neuro-development in order to investigate potential protective effects of selenium (sodium selenite) in an *in vivo* model of exposure to methylmercury (MeHg). Subjects (age groups P1 and P21) were given lactational and orally, respectively: vehicle, Selenium (5ppm), MeHg (10 ppm) or selenium (5 ppm) plus MeHg (10 ppm) for 20 and 10 days respectively (n = 8 per group). After treatment, the rats were submitted to the following behavioral tests: open field and Morris water maze to examine motor deficits and memory/learning, respectively. After intracardiac perfusion we performed immunohistochemistry for Neu-N. In order to evaluate possible deleterious effects in neuronal populations, we counted neurons in the hippocampus (polymorphic layer). As a result, we found significant reduction in locomotor activity of neonates (P1) when exposed to MeHg. Besides, groups exposed to MeHg (alone or in association with selenium) showed learning/memory deficits. P21 animals treated with MeHg showed increase in locomotor activity, effect abolished by concomitant administration of selenium. When submitted to water maze, only subjects in the control and selenium groups showed reduction of the time latency. As assessed by stereological counting, we noticed reduction in the number of hippocampal neurons only in P21 animals exposed to MeHg. Combined, our results showed that MeHg exposure produces age-dependent behavioral effects. Also, despite other findings in the literature, under our experimental conditions administration of selenium was only able to interfere with motor deficits in older animals, besides not being able to interfere with memory/learning deficits nor the MeHg-induced neuronal death. Possible mechanisms associated with these partial protective properties of selenium in the later stages of neural development have yet to be elucidated.

SUMÁRIO

	RESUMO	vii
	ABSTRACT	viii
	LISTA DE FIGURAS.....	x
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL RELACIONADA AO MERCÚRIO.....	1
1.2	AÇÃO DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	3
1.3	INTERAÇÕES INTRACELULARES DE COMPOSTOS MERCURIAIS NO SNC.....	6
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	7
1.4.1	Selênio e neuroproteção.....	9
1.5	OBJETIVOS	12
1.5.1	GERAL	12
1.5.2	ESPECÍFICOS	12
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1	ANIMAIS.....	13
2.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	13
2.3	ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	13
2.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	13
2.5	PERFUSÃO.....	14
2.6	IMUNOHISTOQUÍMICA	15
2.7	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	16
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3	RESULTADOS	18
3.1	EFEITOS DO METILMERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA VARIAM DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO.....	18
3.2	AÇÃO DO METILMERCÚRIO SOBRE A MEMÓRIA E APRENDIZADO DE RATOS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO.....	19
3.3	CONTAGEM ESTEREOLÓGICA DE NEURÔNIOS DA CAMADA POLIMÓRFICA DO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO, DE RATOS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO.....	21
4	DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfil locomotor de ratos jovens tratados com MeHg por 20 dias.....	18
Figura 2	Perfil locomotor de ratos jovens tratados com MeHg por 10 dias ..	19
Figura 3	Avaliação do aprendizado de ratos jovens tratados por 20 dias	20
Figura 4	Avaliação do aprendizado de ratos jovens tratados por 10 dias	21
Figura 5	Caracterização imunohistoquímica das células da camada polimórfica do giro denteado do hipocampo de ratos jovens tratados por 20 dias.....	23
Figura 6	Avaliação estereológica das células da camada polimórfica do giro denteado do hipocampo de ratos jovens tratados por 20 dias..	24
Figura 7	Caracterização imunohistoquímica das células da camada polimórfica do giro denteado do hipocampo de ratos jovens tratados por 10 dias.....	25
Figura 8	Avaliação estereológica das células da camada polimórfica do giro denteado do hipocampo de ratos jovens tratados por 20 dias..	26

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal pesado amplamente distribuído no ambiente, envolvido em processos geológicos naturais, como em erupções vulcânicas e dissolução e volatilização de rochas. Como poluente, o mercúrio apresenta-se sob três formas químicas incluindo o mercúrio elementar (mercúrio metálico, Hg^0), mercúrio inorgânico (sais e óxidos do íon mercurioso e de íon mercúrico) e mercúrio orgânico (derivados de alquil-, alcoialquil- e arilmercuriais). Algumas destas formas possuem características altamente tóxicas quando em contato com o meio ambiente e/ou organismos (AGARWAL e BEHARI, 2007a; FRANCO *et al*, 2007; ALLEN *et al.*, 2002; AZEVEDO, 2003; GOCHFELD, 2003; FONFRÍA *et al.*, 2005).

Os compostos de mercúrio são liberados no ambiente por impactos ambientais naturais e antrópicos. A exposição humana ao mercúrio através da ingestão de alimentos contaminados tem sido associada a tragédias ambientais em diferentes partes do mundo, sendo decorrente, principalmente de atividades de industriais (AZEVEDO *et al.*, 2003).

1.1 A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL RELACIONADA AO MERCÚRIO

Este metal é fator causal de diversos episódios de envenenamento. Os maiores desastres em massa com reflexos pra a saúde humana ocorreram em Minamata e Nigata, Japão, em 1950 e 1960, respectivamente, por consumo de peixe (diariamente por longos períodos) proveniente de águas contaminadas com mercúrio despejado por uma fábrica de produtos químicos local, que produzia MeHg como subproduto da síntese de acetaldeído. Como resultado desta intoxicação, diversos sintomas foram relacionados a funções controladas pelo sistema nervoso, 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 (CASTOLDI *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2006).

Outro exemplo ocorreu no Iraque no início da década de 70, quando centenas de pessoas foram intoxicadas devido à ingestão de pão contaminado com um fungicida alquilmercurial. O reconhecimento precoce do causador limitou a exposição a alguns meses, mesmo assim o número de envenenamentos foi alto (MICARONI *et al.*, 2000; CASTOLDI *et al.*, 2001).

Estudos sobre o ciclo do mercúrio na região amazônica indicam que o desmatamento contribui de forma importante para a contaminação pelo metal. O Hg que se deposita no ecossistema terrestre tem grande afinidade com os oxihidróxidos de Alumínio (Al) e Ferro (Fe) que são carregados por lixiviação durante os períodos de chuvas para os rios. Durante esse período, a inundação da floresta fornece material orgânico que formam um ambiente favorável a metilação biótica e biodisponibilidade do Hg (SOUZA *et al.*, 2002).

Com a descoberta e exploração do ouro na Amazônia brasileira, houve intensa migração para as áreas de garimpo e conseqüentemente a manipulação de mercúrio metálico. Neste contexto, o mercúrio é incorporado à liga metálica a fim de separar o ouro de impurezas, ao fim, esta liga é aquecida para que o mercúrio (como é mais volátil) evapore e leve consigo as impurezas. O grande ônus deste processo está no fato de se provocar a evaporação do mercúrio, pois o mesmo é oxidado voltando à atmosfera e depositando-se nos rios, onde sofre metilação, e acumulando-se conseqüentemente na biota marinha, principal fonte de alimento das populações ribeirinhas (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).

Dentre as diversas formas do mercúrio, o metilmercúrio apresenta efeitos fisiológicos e bioquímicos importantes, bem estabelecidos em humanos e modelos animais, sendo considerada a mais tóxica. Esta toxicidade pode estar relacionada a presença do radical metil, o qual facilita a entrada do composto através das membranas lipídicas (CASTOLDI *et al.*, 2001; AARON & RING 2008). O metilmercúrio possui estabilidade maior no organismo do que o mercúrio inorgânico e os processos capazes de demetilar o metilmercúrio, transformando-o em Hg inorgânico, podem auxiliar na sua excreção. Sua possível interferência nos processos de divisão celular pode resultar em problemas neurológicos graves e mesmo má formação cefálica (MICARONI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2007).

A exposição humana a diversas formas de mercúrio, principalmente ao metilmercúrio, levantou grande preocupação em saúde pública, pois os casos em Minamata, Iraque, na Amazônia e em outras partes do mundo revelaram como a exposição prolongada a este metal pode ser deletéria ao SNC adulto, bem como no SNC em desenvolvimento. No entanto, poucos avanços foram conseguidos na tentativa de prevenir a liberação de mercúrio no ambiente, bem como na descoberta de terapias eficientes contra a intoxicação.

1.2 AÇÃO DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A intoxicação por mercúrio atinge o organismo de forma geral, acumulando-se em diversos órgãos, como o fígado, rins, pulmão e órgãos do sistema nervoso central e periférico (AGARWAL & BEHARI, 2006; AGARWAL &

BEHARI, 2007; FRANCO *et al.*, 2006). No SNC o mercúrio possui seletividade por algumas áreas, como hipocampo, cerebelo, córtex visual e córtex auditivo (CASTOLDI *et al.*, 2008). Carvalho e colaboradores em 2007, observaram que ratos expostos ao MeHg por 17 dias apresentaram déficits de equilíbrio. Por sua vez, Stringari e colaboradores em 2006, observaram aumento da atividade locomotora em camundongos expostos ao mercúrio. Falluel-Morel e colaboradores em 2007, observaram diminuição do aprendizado em animais tratados com MeHg.

Dentre as estruturas do sistema nervoso central, uma das mais afetadas pela intoxicação mercurial é o cerebelo, o qual está intimamente relacionado a regulação das funções motoras, como equilíbrio, regulação e início de movimentos. O córtex cerebelar pode ser dividido histologicamente em três camadas: camada molecular, a camada granular e a camada das células de purkinje. Destas três, a camada de células granulares apresenta maior vulnerabilidade ao mercúrio (WAKABAYASHI *et al.*, 1995). Entretanto, as evidências que relacionam a células de purkinje como alvos específicos da ação mercurial no cerebelo são controversas, já que o efeito sobre estas células pode ser secundário à ação mercurial (CARVALHO *et al.*, 2007; HIMI *et al.*, 1996) .

Há evidências de experimentos *in vivo* que demonstram serem as células cerebelares afetadas seletivamente por compostos mercuriais, de onde resultariam grande parte dos efeitos do MeHg sobre o sistema motor (CARVALHO *et al.* ,2007). De acordo com evidências recentes, a base molecular para estes efeitos poderia residir no sistema antioxidante de glutathiona cerebelar, como foi sugerido em estudos com camundongos lactentes intoxicados com MeHg, que revelaram aumento dos níveis de peróxidos no cerebelo, evidenciando ação deletéria trófica e os efeitos próoxidativos deste metal, reforçando a importância do sistema

antioxidante da glutathiona cerebelar contra estes efeitos moleculares. (MANFROI *et al.*, 2004; STRINGARI *et al.*, 2006).

No estriado, a ação do mercúrio pode aumentar a liberação de dopamina e diminuir os níveis extracelulares de DOPAC (ácido dihidroxifenilacético) e HVA (ácido homovanílico), evidenciando a pluralidade de áreas atingidas por este metal (FARO *et al.*, 2001). Experimentos utilizando sinaptossomos estriatais corroboram com esta ação sobre neurônios dopaminérgicos (DREIEM *et al.*, 2005). Contudo, o estriado não consiste uma área de ação primária dos compostos mercuriais.

O hipocampo é uma área responsável pela consolidação da memória e aprendizado e possui canais, enzimas e neurotransmissores pelos quais há tropismo mercurial, principalmente pelas células da camada granular de CA1 (Corno de Amon) e a camada polimórfica do giro denteado. Os mecanismos envolvidos na morte neuronal nestas áreas envolvem, desde desregulação de enzimas importantes como catalase e superóxido desmutase (SOD), até liberação abundante de neurotransmissores excitatórios e mecanismos de inflamação controversos (ação microglial e astrocítica) (FALLUEL-MOREL *et al.*, 2007; VICENTE *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2011).

Alguns estudos com humanos e animais indicaram que os estágios pré- e pós-natal inicial de desenvolvimento encefálico, podem representar um período de risco maior na exposição ao metal tóxico do que no estágio adulto, nestes foram utilizados animais neonatos, pois em roedores este é o período de maior sinaptogênese, o qual corresponde ao terceiro trimestre de gestação em humanos (SAKAMOTO *et al.*, 2002; 2004). A exposição pré-natal pode interferir na migração neuronal e reduzir a atividade mitótica dos neurônios do SNC, além de promover redução significativa nos níveis totais de enzimas antioxidantes (VICENTE *et al.*,

2004). Em alguns casos envolvendo crianças japonesas, houve redução no número de neurônios em todos os lobos do córtex cerebral, bem como uma desorganização do córtex resultando em degeneração neuronal (LIMKE *et al.*, 2004a).

1.3 INTERAÇÕES INTRACELULARES DE COMPOSTOS MERCURIAIS NO SNC

Um dos motivos que confundem a avaliação do risco dos compostos mercuriais é o grande número de alvos intracelulares potenciais no organismo. Intracelularmente, o MeHg associa-se a mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, membrana nuclear 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 homeostase do cálcio leva, dentre outros efeitos, à inibição da migração de células granulares do cerebelo em desenvolvimento (LIMKE *et al.*, 2004a).

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, como o citocromo c, com consequente ativação das caspases (ISSA *et al.*, 2003).

Os microtúbulos são os alvos principais do MeHg, afetando, conseqüentemente, o citoesqueleto e o ciclo celular, o que interfere na migração de neurônios pós-mitóticos durante a formação das camadas corticais do cérebro e

cerebelo, na extensão e estabilização de neuritos e no transporte axodendrítico (CASTOLDI *et al.*, 2001; GÖTZ *et al.*, 2002; ASCHNER & SYVERSEN, 2005).

Além desses fatores, o mercúrio pode agir na liberação de neurotransmissores colinérgicos no SNC e SNP. Na junção neuromuscular, o efeito pré-sináptico é provavelmente a redução na liberação de acetilcolina (LIMKE *et al.*, 2004a). Outros estudos *in vivo* relacionados com a liberação de neurotransmissores, 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). Diversos outros trabalhos têm demonstrado que a exposição mercurial promove liberação generalizada de neurotransmissores, tais como a acetilcolina, serotonina, dopamina e noradrenalina em culturas (FARO *et al.*, 2002; GASSÒ *et al.*, 2000; MIRZOIAN & LUETJE, 2002), além de modificar a resposta inibitória mediada pelo receptor GABA_A (FONFRIA *et al.*, 2001).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Alguns estudos indicam o estresse oxidativo como um mecanismo importante para a perda neuronal relacionada à exposição mercurial. Espécies reativas de oxigênio. Tais como o ânion superóxido (O₂⁻), radicais hidroxila (OH⁻), além de peróxido de hidrogênio, apresentam propriedades que levam invariavelmente a dano celular (DRINGEN, 2000). O efeito neuroprotetor de antioxidantes contra a toxicidade do composto dá suporte a esta hipótese (SANFELIU *et al.*, 2001).

Segundo, KAKITA e colaboradores 2000, a vulnerabilidade neuronal de

ratos aos efeitos pró-oxidativos do MeHg, varia de acordo com a área anatômica a ser analisada e a fase de desenvolvimento do animal. No SNC de ratos, o estágio pós-natal corresponde ao terceiro trimestre de gestação em humanos (SAKAMOTO *et al*, 2004).

Alguns antioxidantes, como a glutathiona, a vitamina E e o selênio podem promover proteção contra a neurotoxicidade do MeHg *in vivo* (DRINGEN, 2000). Kaur e colaboradores (2006) demonstraram que os neurônios são vulneráveis a perda de GSH induzida pelo MeHg, indicando que o status de GSH representa um fator chave nos efeitos neuropatológicos específicos e da célula ao composto.

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

Mais recentemente, têm sido investigadas propriedades de antioxidantes naturais, encontrados em folhas ou raízes com combinações de elevado teor de compostos flavonóides. Alguns estudos têm demonstrado que estes extratos vegetais, administrados como chás e infusões de ervas, ricos em compostos fenólicos, normalmente possuem capacidade antioxidante. Oliveira e colaboradores, em 2009, testaram o efeito citoprotetor de um extrato de *Valeriana officinalis* em um modelo experimental *in vitro* de doença de Parkinson. Vários estudos avaliaram o efeito citoprotetor após 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), glutathiona (ALLEN *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2006) e

selênio (MORETTO *et al.*, 2005; BEYROUTY & CHAN, 2006).

Um exemplo de compostos antioxidantes são os extratos aquosos do mogno, *Swietenia macrophylla*, um vegetal encontrado na amazônia, que em virtude das propriedades da sua madeira, possui grande valor econômico nos mercados nacional e internacional (GROGAN *et al.*, 2002). Alguns estudos recentes dão conta dos componentes antioxidantes das folhas deste vegetal, tais como: flavonóides, ácidos fenólicos e limonóides (KOJIMA, 1998; SOARES *et al.*, 2002).

Observa-se que a GSH possui a capacidade redutora que é determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína. Esta pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE SM, *et al.*, 1989). Alguns estudos têm mostrado que organomercuriais diminuem a atividade de GSH, assim aumentando os níveis de peróxidos e substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico no SNC de camundongos (ROCHA *et al.*, 2004; FARINA *et al.*, 2005).

1.4.1 Selênio e neuroproteção

O selênio (Se) é conhecido por afetar a distribuição do mercúrio e também reduzir a toxicidade de alguns xenobióticos, incluindo metais pesados, em modelos animais (AGARWAL & BEHARI, 2007b; ROONEY, 2007).

Há evidências de que o selênio no plasma forme um complexo com o mercúrio inorgânico, que então se liga a selenoproteína-P causando a redistribuição de mercúrio no organismo (GAILER *et al.*, 2000; AGARWAL & BEHARI, 2007a). Apesar de não ser bem compreendida, especula-se que a função desta proteína esteja relacionada a três funções diferentes: (1) defesa antioxidante; (2) papel no

transporte do selênio; (3) papel protetor como um quelante natural de metais pesados (CHEN & BERRY, 2003).

O selênio também possui afinidade constante com mercúrio, maior do que aquela dos compostos sulfidríla, razão pela qual a proteção oferecida pelo selenito de sódio na intoxicação por mercúrio tem sido atribuída à formação do complexo Hg-Se-S, que é considerado não tóxico (AGARWAL & BEHARI, 2007b).

Quando associado às proteínas, o selênio torna-se um componente enzimático com propriedades fisiológicas antioxidantes, agindo como um mimético da glutathione peroxidase (FLÓHE *et al.*, 1973). Compostos selenados, tais como o ebselen ([2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona]), têm demonstrado papel neuroprotetor contra a excitotoxicidade promovida por glutamato durante a exposição ao metilmercúrio em alguns modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (PORCIUNCULA *et al.*, 2001; FARINA *et al.*, 2003a).

De acordo com Ralston *et al.* (2007), o MeHg é responsável pelo sequestro de Se de selenoproteínas importantes (selenocisteína e selenometionina), bem como a inibição de selenoenzimas. Por outro lado, o mercúrio inorgânico é associado à diminuição da atividade de glutathione peroxidase (GPx), consequentemente aumentando os níveis de peróxido de hidrogênio e, como resultado final, levando a peroxidação lipídica. A diminuição destas selenoenzimas provocada pela toxicidade do mercúrio inclui danos causados por peróxidos, alteração do metabolismo da glutathione e interrupção nos processos regulatórios de transdução de sinal (RALSTON *et al.*, 2007; 2008). Outros estudos envolvendo culturas de células sugerem a proteção do selênio contra a apoptose induzida por mercúrio (FRISK, 2003).

Os níveis de GSH em ratos tratados com etanol diminuiram

significativamente, quando comparados com os controle e também com os ratos que receberam ebselen junto com etanol (JOHNSEN-SORIANO *et al.*, 2007), mostrando a influência dos compostos selenados nos níveis de proteínas e enzimas antioxidantes como, GSH e GPx, respectivamente.

A produção de radicais livres também pode induzir a ativação de caspases e morte celular, uma consequência bem conhecida do dano organomercurial à cadeia oxidativa mitocondrial em linhagens de células não nervosas em cultura (KAUR *et al.*, 2006). Estudos recentes com culturas de células sugerem a proteção do selênio contra a apoptose gerada pelo mercúrio (FRISK 2003).

A proteção oferecida pelos compostos de selênio na intoxicação mercurial pode atingir níveis macroscópicos importantes como, a redução dos efeitos motores causados pela diminuição da mielina e redução da massa muscular (PAMPHLETT *et al.*, 2005; RALSTON *et al.*, 2008).

Apesar de haver uma extensa literatura acerca dos efeitos neurotóxicos do MeHg, existem lacunas acerca dos mecanismos moleculares subjacentes a estes efeitos, que permitiriam a determinação de agentes envolvidos em processos de neuroproteção. Sendo assim, constitui-se pergunta experimental relevante a investigação de compostos capazes de reverter os efeitos deletérios de compostos mercuriais, tais como os compostos a base de selênio, que constituem o objetivo principal na proposição deste trabalho.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GERAL:

- Avaliar a ação da exposição mercurial em um modelo *in vivo*, a fim de investigar possíveis efeitos neuroprotetores do selenito de sódio.

1.5.2 ESPECÍFICOS:

- Investigar os efeitos comportamentais, locomoção e aprendizado, provocados pela exposição mercurial, em dois diferentes períodos de desenvolvimento;

- Determinar os efeitos da exposição de ratos Wistar ao MeHg, administrado por via oral, sobre a população de neurônios na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo, através de contagem estereológica;

- Investigar possíveis efeitos neuroprotetores da administração de selenito de sódio, neste modelo de exposição mercurial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA, mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro, com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética Em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - Parecer BIO020-10).

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Animais foram divididos em dois grupos experimentais, conforme o início do tratamento tenha ocorrido no 1º (P1) ou 21º (P21) dia pós-natal. Estes grupos, por sua vez, foram divididos em quatro subgrupos cada (N = 8): Controle, MeHg, Selenito de sódio e MeHg mais selenito de sódio, totalizando doze subgrupos experimentais.

2.3 ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES

O MeHg, e o selenito de sódio (Na_2SeO_3) foram dissolvidos em água, para administração por via oral. O grupo MeHg recebeu doses correspondentes a 10ppm e o grupo Na_2SeO_3 recebeu doses de 5ppm. O tratamento foi realizado de P1 a P21 (tratamento por amamentação) e de P21 a P31 (tratamento direto por via oral).

2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Nos dias seguintes ao término do tratamento, a fim de verificar os efeitos locomotores causados pela administração de MeHg sob os animais, os mesmos foram submetidos ao teste de campo aberto que consiste na disposição dos sujeitos em um recipiente cilíndrico (raio igual a 30 cm), para os animais P21, ou retangular (30x15cm), para os animais P1, cuja base está dividida em doze ou nove quadrantes respectivamente, durante seis minutos.

Também foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris, que consiste na disposição dos sujeitos em uma caixa d'água opaca (50 cm de raio), dividida em quatro quadrantes, estando uma plataforma de 8cm² escondida em um deles. O teste de labirinto aquático é realizado por meio de uma bateria de quatro tentativas, sendo dois minutos o tempo máximo para o encontro da plataforma, durante três dias. A diferença no tempo de latência em relação ao 1º dia de teste será utilizada para analisar a capacidade de aprendizagem de cada grupo.

Todos os testes foram gravados e os vídeos analisados pelo programa ANY MAZE stoeling.

2.5 PERFUSÃO

No dia subsequente aos testes comportamentais, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com quetamina:xilazina. A seguir foi realizada a perfusão através da cânula de polietileno inserida no ventrículo esquerdo, primeiramente com solução salina tamponada 9% por 5min, e então, solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (pH=7,2 a 7,4), durante 5min. Após este período, foi realizada craniotomia delicada para a retirada do encéfalo. O mesmo foi imerso em solução de sacarose 30% para a crioproteção. Após, houve secção em

criostato (Leica CM1850) a 60µm de espessura, sendo os cortes coletados serialmente. Posteriormente, os cortes foram pós-fixados em solução de paraformaldeído 2% e os espécimes foram submetidos à imunohistoquímica com o anticorpo Neu-N.

2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Todos os quarenta e oito animais tiveram secções reagidas para o reconhecimento da proteína nuclear neuronal (Neu-N). Primeiramente, as secções foram incubadas por 30 minutos em tampão borato 0,2M e pH 9,0 a 60°C. Houve três lavagens de 5 minutos em tampão fosfato 0,1M. Em seguida ocorreu incubação em Triton 3% durante 30 minutos, seguido de lavagem em tampão fosfato 0,1M. Logo após, foi realizada inativação da peroxidase endógena (com incubação das secções em H₂O₂), visto que a revelação do anticorpo é dependente de peróxido de hidrogênio. Em seguida os cortes histológicos foram embebidos em solução de leite desnatado 1%, a fim de evitar marcações inespecíficas e incubados no anticorpo primário (anti-Neu-N, mouse *waco purê chemical industries*, Ltd) na concentração de 1:1000, *overnigth*.

No dia seguinte os cortes foram colocados em solução contendo o anticorpo secundário biotilado anti-mouse IgG (VECTOR) diluído 1:200 em tampão fosfato 0,1M, durante duas horas. Logo após, foram incubados em solução de Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC, Vector Laboratories©, USA, 1:200) por uma hora.

As secções sofreram a revelação da peroxidase presente nos sítios de ligação antígeno-anticorpo em presença de Diamino Benzidina (DAB) e Níquel. A reação foi interrompida após os núcleos neuronais serem detectadas ao

microscópio óptico.

Por fim, as secções foram lavadas para retirar o excesso de DAB e montadas em lâminas pré-gelatinizadas, secadas a temperatura ambiente e posteriormente, desidratadas em álcool em várias concentrações (70, 80, 90, e 100%), para então serem diafanizados em xilol e cobertos com Entellan (Merck©) e lamínula.

2.7 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Para as análises do número de neurônios da camada polimórfica do giro denteado hipocampal, foi utilizado um microscópio óptico (Nikon), com placa motorizada (Prior) para transmissão de informação das três coordenadas espaciais (X,Y,Z) de cada ponto, sendo utilizado o programa *Stereologer*. Primeiramente, a área de interesse foi definida e delimitada com a objetiva de menor aumento (2x), sendo então pela objetiva de maior aumento (40x). A determinação do número de neurônios foi realizada por meio da distribuição aleatória e sistemática de blocos de contagem dentro de uma série de secções contidas na região de interesse. Os limites da região de interesse informam para o programa as três dimensões da caixa de contagem (largura, comprimento e altura, através dos eixos y, x e z, respectivamente), o espaçamento entre elas, e as zonas de guarda preenchendo um protocolo definido pelo próprio programa. O programa permite a definição de zonas de guarda de forma superpostas às superfícies de corte da fatia. Após estas definições, o programa exibe a disposição espacial das caixas para contagem em relação ao contorno da área de interesse a partir dos parâmetros preenchidos, ou seja, caixas de contagem foram geradas automaticamente pelo programa em cada um dos pontos de intersecção da sonda estereológica com o plano onde estava

situada a fatia. Há assim, um deslocamento em sequência automático da posição da lâmina para se iniciar uma nova contagem em uma nova caixa ao término de uma caixa antes indicada.

Finalizada a contagem de todas as caixas de cada secção, o programa fornece a estimativa do número total de células naquela secção, gerando dados estatísticos onde se incluem o número total de células identificadas e a estimativa total esperada para a secção associando-se a um coeficiente de erro. O coeficiente de erro indica se as dimensões, assim, como a quantidade de caixas de contagens foram adequados para a leitura dos valores médios relacionados ao número total de neurônios da camada em questão.

Para a estimativa do número total de neurônios de cada indivíduo empregou-se método do fracionador óptico (West *et al.*, 1991), multiplicando-se o número de objetos contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise das diferenças entre os grupos experimentais foi utilizada análise de variância (ANOVA) comparativa do teste de campo aberto, labirinto aquático e contagem estereológica, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey, onde foram adotados os valores para $p < 0,01$ como estatisticamente significativos. Para todos os parâmetros estatísticos utilizou-se o programa BioEstat, versão 5.0.

3. RESULTADOS

3.1 EFEITOS DO METILMERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA.

A fim de avaliar os efeitos do metilmercúrio sobre a atividade locomotora foi utilizado o teste de campo aberto, medindo o número de cruzamentos de quadrantes. Os perfis locomotores e efeitos protetores do composto selenado mostraram-se dependentes do estágio de desenvolvimento dos ratos da linhagem Wistar.

O animais tratados com MeHg a partir do primeiro dia de nascimento (P1) por 20 dias, apresentaram redução significativa de $74 \pm 16\%$ na atividade locomotora em relação ao grupo controle. O Selenito de Sódio não foi capaz de proteger contra a ação deletéria do metal, já que os animais tratados com o composto selenado e o metilmercúrio, concomitantemente, apresentaram diminuição locomotora significativa de $63 \pm 20\%$ em relação ao controle.

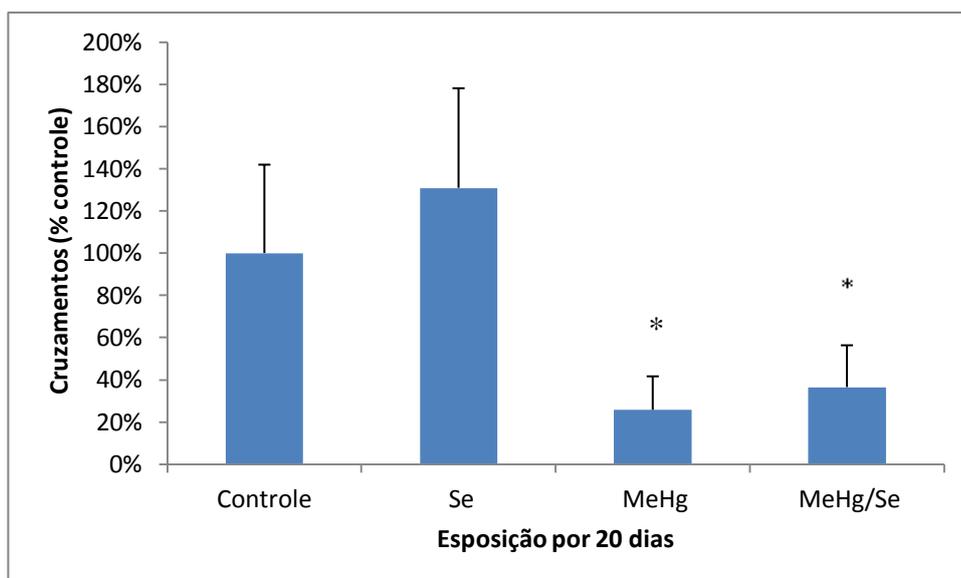


Figura 1. Perfil locomotor de ratos lactentes tratados com MeHg e Selenito de Sódio por 20 dias, a partir do nascimento. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi utilizado para medir a atividade locomotora. (*) $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

No grupo P21, no qual os animais foram tratados por 10 dias com selênio e MeHg, foram observados sintomas locomotores divergentes em relação aos animais mais jovens, visto que o grupo tratado apenas com MeHg apresentou aumento de $135\% \pm 32$ na locomoção, em relação ao controle. Também houve proteção promovida pela adição do composto de selênio à dieta (% de cruzamentos semelhantes ao controle). A administração de selenito de sódio sozinho, não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle (Figura 2).

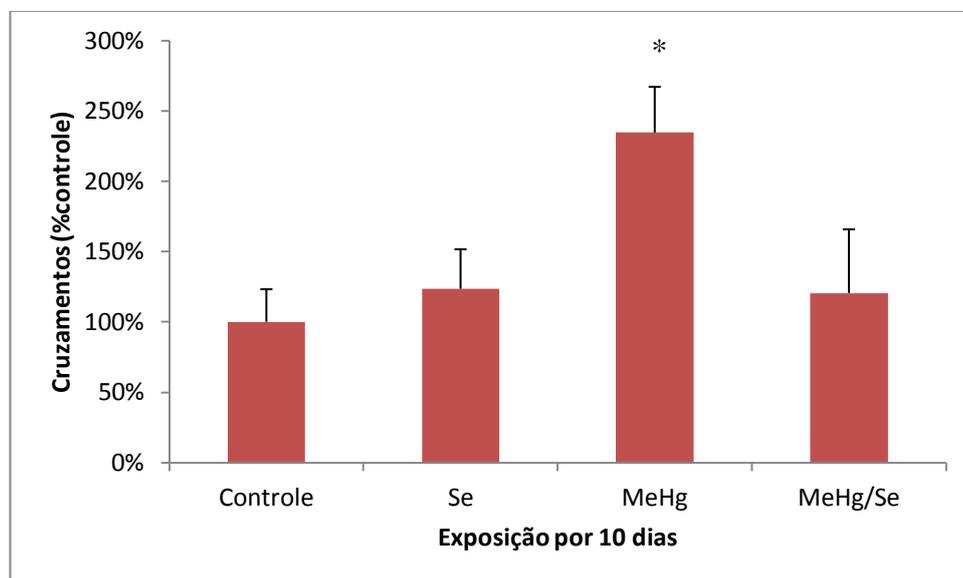


Figura 2. Perfil locomotor de ratos jovens tratados com MeHg e Selenito de Sódio por 10 dias, após o 21º dia de nascimento. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi utilizado para medir a atividade locomotora. (*) $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

3.2 AÇÃO DO METILMERCÚRIO SOBRE A MEMÓRIA E APRENDIZADO DE RATOS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO.

Os animais P1 tratados por 20 dias apresentaram declínio no tempo de latência em todos os grupos experimentais, como observado no teste do labirinto aquático de Morris, revelando que o MeHg, ao contrário da observação comum da literatura científica, não provocou efeitos sobre a cognição dos animais expostos (Figura 3).

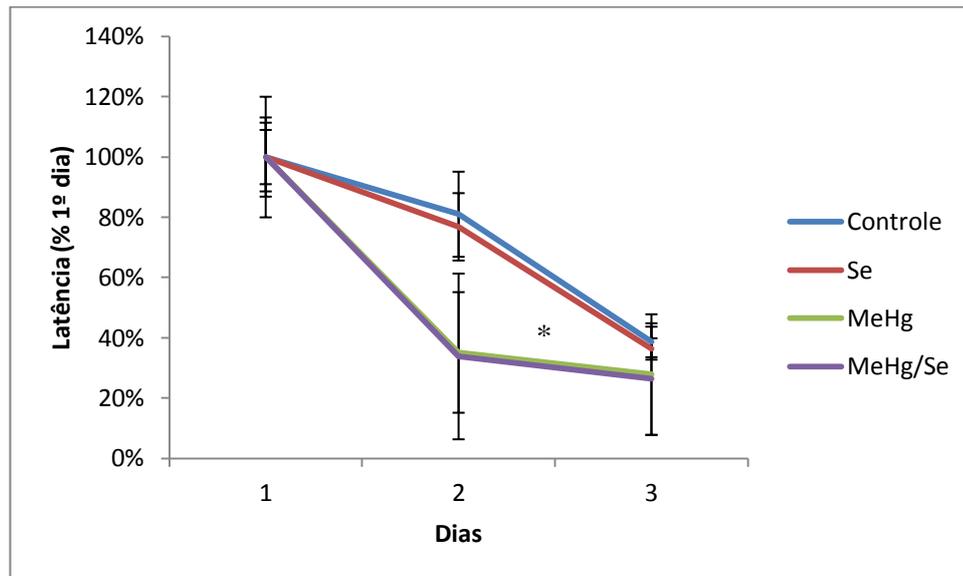


Figura 3. Avaliação do aprendizado de ratos lactentes tratados com MeHg e Selenito de Sódio por 20 dias, a partir do nascimento. A diminuição do tempo de latência foi utilizada para medir o aprendizado. (*) $p < 0,01$ em relação ao 1º dia de teste.

Os resultados obtidos com o grupo de animais P21, expostos por dez dias ao composto mercurial, no teste do labirinto aquático estão sumariados na figura 4, que mostra a variação dos tempos de latência ao longo dos três dias de teste. Em relação ao primeiro dia de teste, os animais do grupo controle apresentaram diminuição de $57 \pm 30\%$ no tempo de latência (tempo para encontrar a plataforma) no 3º dia de teste, indicando aprendizado normal. O grupo de Selenito de Sódio apresentou característica semelhante, com redução significativa no tempo de latência no 2º ($27 \pm 7\%$) e no 3º dia de teste ($64 \pm 22\%$). Por sua vez, o grupo intoxicado com MeHg não apresentou diminuição significativa em relação ao primeiro dia de teste (redução no 2º dia: $18 \pm 9\%$; redução no 3º dia: $6 \pm 10\%$), tal fato pode estar ligado a ação prejudicial do MeHg sobre áreas relacionadas à produção e modulação da memória e aprendizado, como o hipocampo, córtex entorrinal e cerebelo. Apesar de observar-se uma nítida tendência na redução da latência, o último grupo (Se+MeHg) apresentou perfil semelhante ao grupo tratado com MeHg

(redução no 2º dia: $25 \pm 17\%$; redução no 3º dia: $31 \pm 27\%$), mostrando que o Selenito de Sódio não foi capaz de proteger contra os efeitos observados no grupo exposto ao MeHg.

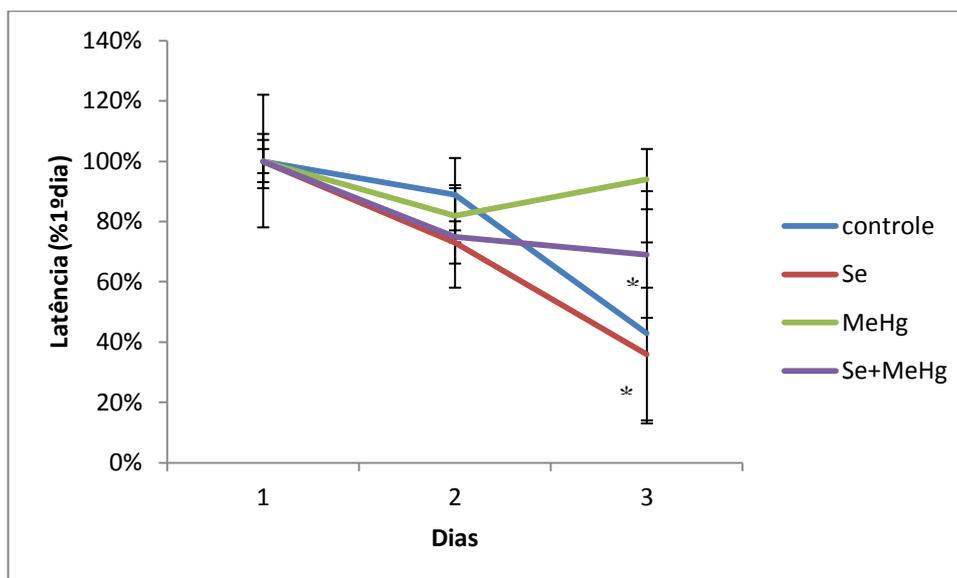


Figura 4. Avaliação do aprendizado de ratos jovens tratados com MeHg e Selenito de Sódio por 10 dias, após o 21º dia de nascimento. A diminuição do tempo de latência foi utilizada para medir o aprendizado. (*) $p < 0,01$ em relação ao 1º dia de teste.

3.3 CONTAGEM ESTEREOLÓGICA DE NEURÔNIOS DA CAMADA POLIMÓRFICA DO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO DE RATOS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO.

A fim de relacionar alguns dos efeitos comportamentais observados após a exposição ao MeHg com mudanças quantitativas na população de neurônios no hipocampo, foi realizada imunohistoquímica para anticorpo Neu-N associada à contagem estereológica na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo.

Quanto ao grupo experimental, no qual os animais foram tratados por 20 dias (P1), não se observou diferenças quantitativas na população de neurônios estudados em nenhum dos subgrupos, em relação ao grupo controle, corroborando com os resultados do labirinto aquático para este estágio de desenvolvimento,

quando não foram observados déficits comportamentais resultantes deste paradigma de exposição (Figuras 5 e 6).

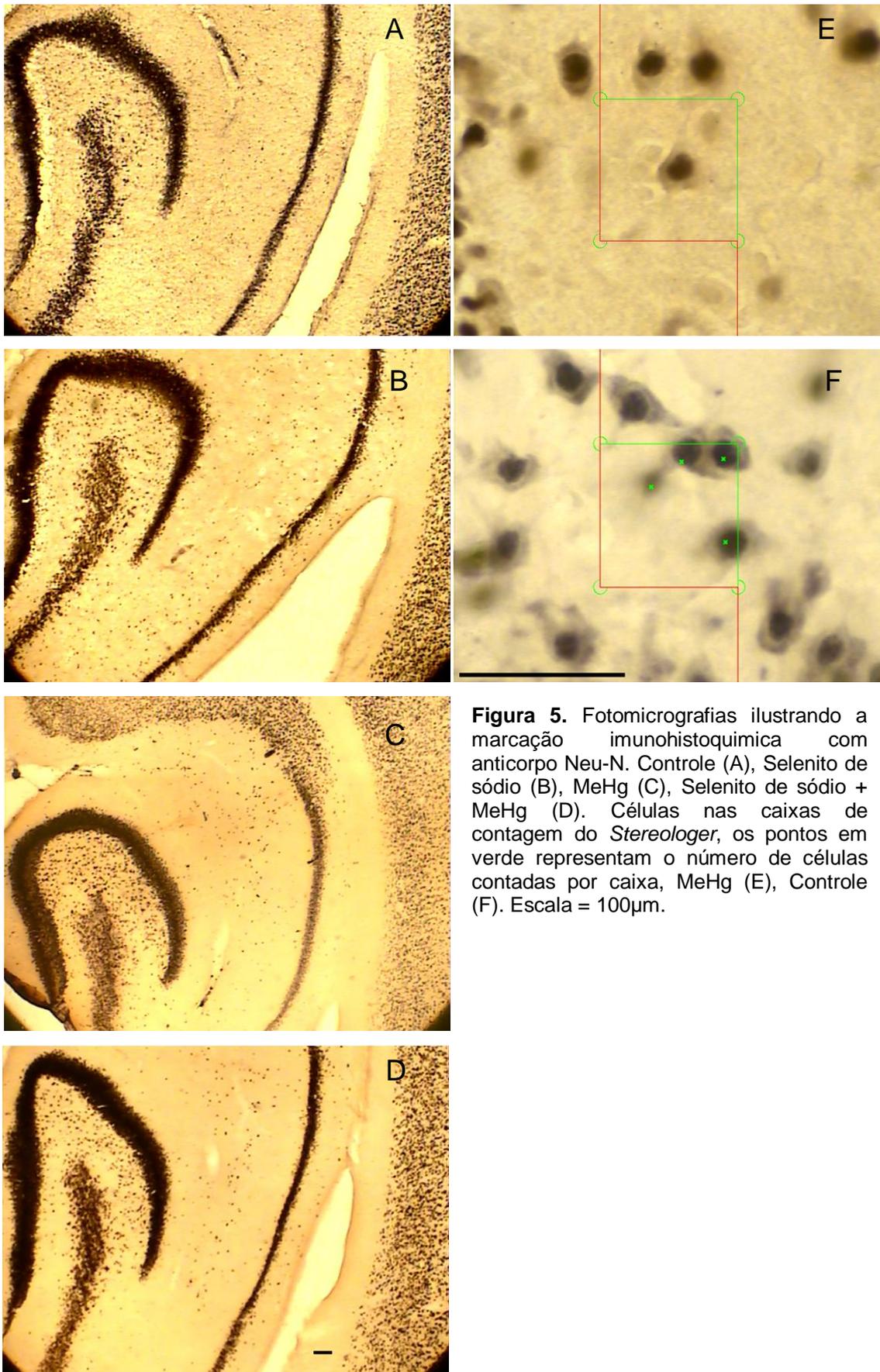


Figura 5. Fotomicrografias ilustrando a marcação imunohistoquímica com anticorpo Neu-N. Controle (A), Selenito de sódio (B), MeHg (C), Selenito de sódio + MeHg (D). Células nas caixas de contagem do *Stereologer*, os pontos em verde representam o número de células contadas por caixa, MeHg (E), Controle (F). Escala = 100 μ m.

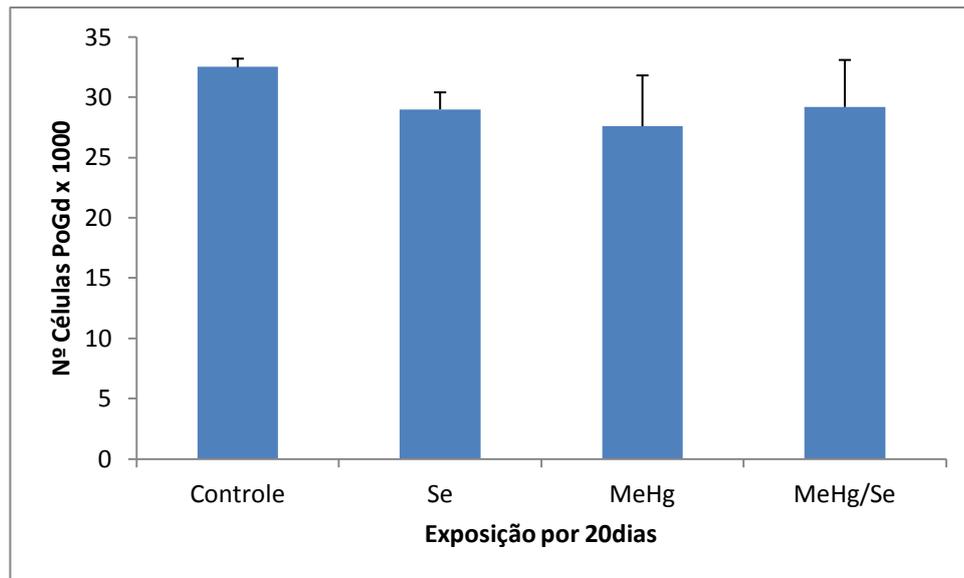


Figura 6. Efeito neurotóxico induzido por metilmercúrio por 20 dias sobre o número de células do giro denteado do hipocampo. Resultados expressos em relação ao grupo controle \pm média de desvio padrão.

A exposição de animais ao metilmercúrio por 10 dias (grupo P21), causou diminuição significativa de aproximadamente $13,6 \pm 1,62$ mil neurônios em relação ao grupo controle (34.333 ± 2.944), provavelmente como resultado da maior eficiência na transferência do composto mercurial por via oral. O grupo administrado com selenito de sódio apresentou aumento do número neuronal (35.857 ± 5.242), no entanto este não foi significativo em relação ao grupo controle. Já os animais que ingeriram MeHg juntamente com selenito de sódio, também apresentaram diminuição neuronal significativa em relação ao grupo controle, de aproximadamente $11,8 \pm 3,07$ mil (Figuras 7 e 8).

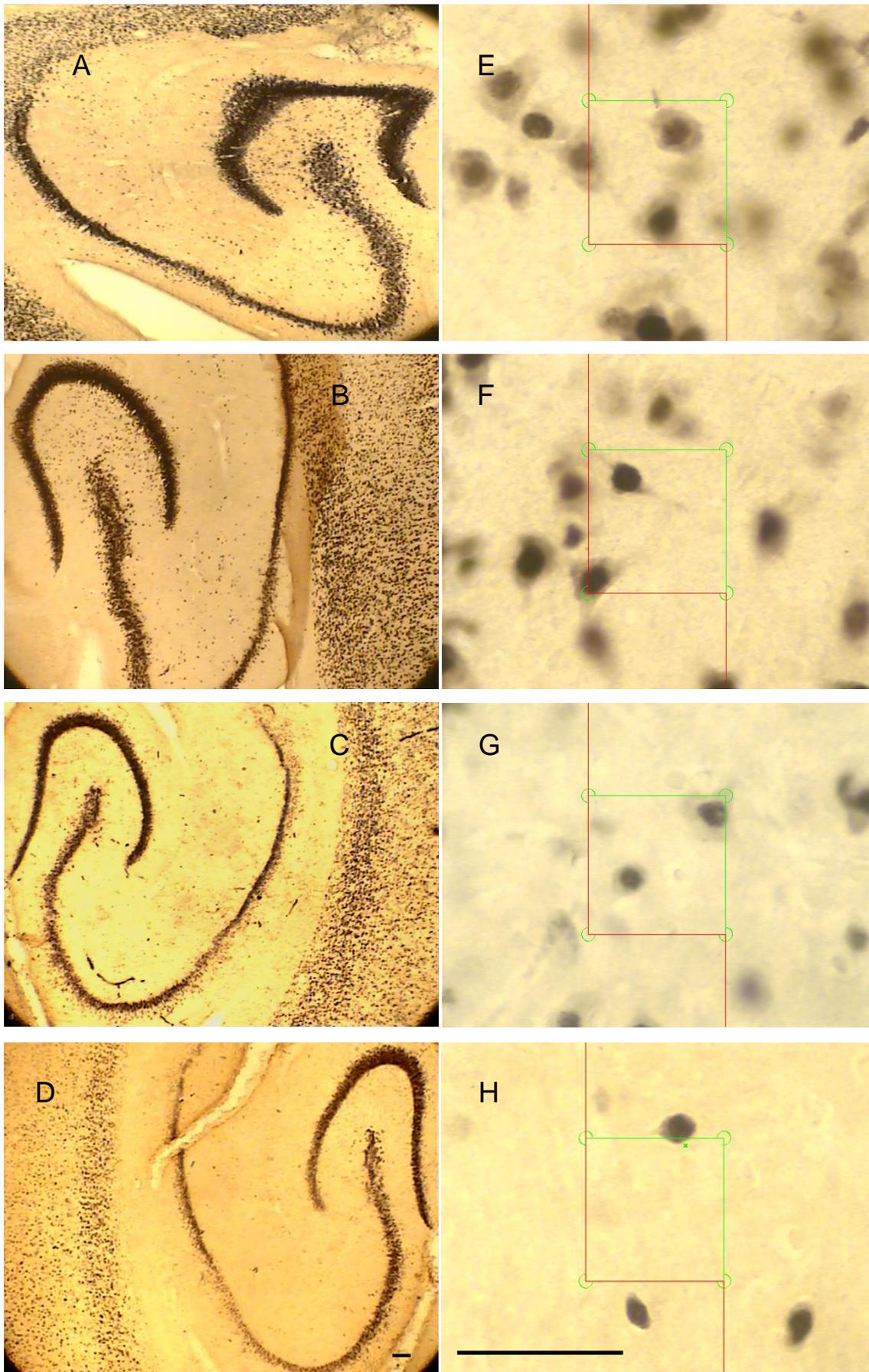


Figura 7. Fotofilmografias ilustrando a marcação imunohistoquímica com anticorpo Neu-N. Controle (A e E), Selenito de sódio (B e F), MeHg (C e F), Selenito de sódio + MeHg (D e H), Escala = 100µm.

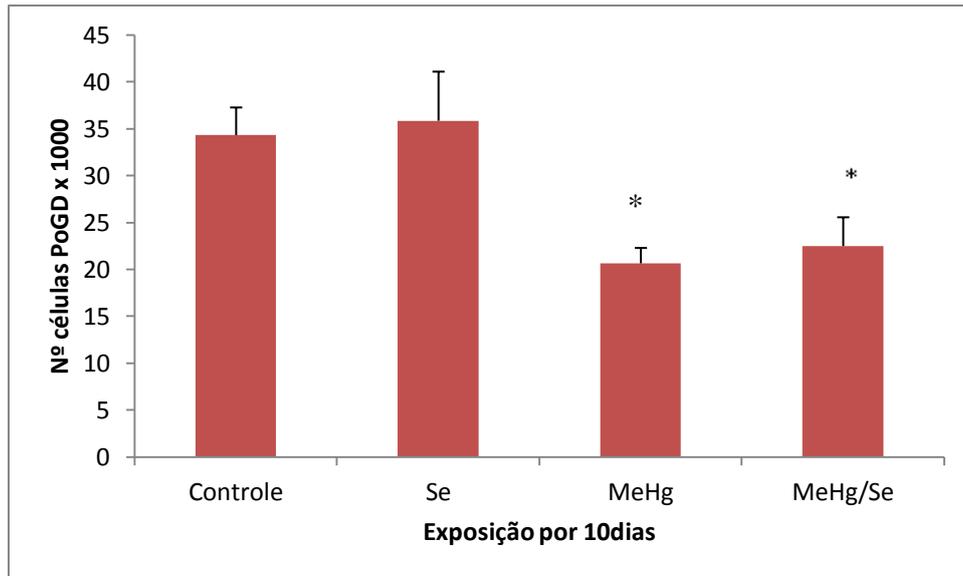


Figura 8. Efeito neurotóxico induzido por metilmercúrio por 20 dias sobre o número de células do giro denteado do hipocampo. Resultados expressos em relação ao grupo controle \pm média de desvio padrão. (*) $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

4 DISCUSSÃO

A utilização de modelos experimentais é uma alternativa eficaz para a avaliação dos efeitos deletérios de diversas toxinas. Os modelos animais, por sua vez, são bastante utilizados devido aos resultados semelhantes encontrados em humanos. Neste estudo, foram utilizados ratos da linhagem Wistar a fim de avaliar os efeitos comportamentais e sobre as células neuronais em um modelo experimental *in vivo* de exposição ao metilmercúrio (MeHg).

Na literatura, os modelos *in vivo* oferecem a oportunidade de estudo dos efeitos sistemáticos da intoxicação mercurial, mimetizando-os, mesmo que algumas vezes de forma restrita. Na indústria farmacêutica, este modelo é de suma importância antes dos testes de fármacos em humanos, além de sua utilidade em experimentos que visam o entendimento dos mecanismos celulares subjacentes à intoxicação mercurial.

Como resultado dos estudos realizados nesta área, observa-se elevada diversidade de efeitos creditados à exposição mercurial, seja em função do modelo experimental (*in vivo*, *in vitro*, uso de linhagens celulares, etc), tipo de exposição, tempo de exposição ou estágio de desenvolvimento animal, ver referências em CASTOLDI *et al.*, 2008. Estas variações contribuem para a diversidade de sintomas e de danos neurais, contribuindo para a dificuldade e necessidade de encontrar soluções para tal problema ambiental.

É bastante comum a observação de efeitos oxidativos na toxicidade associada ao MeHg, gerando como resultado distúrbios em organelas como mitocôndrias, complexo de golgi e retículo endoplasmático rugoso (CASTOLDI *et al.*,

2001). Nas mitocôndrias, os radicais livres atuam na membrana mitocondrial alterando a homeostase do cálcio, que por sua vez altera o potencial de membrana mitocondrial.

Neste estudo os animais tratados por dois períodos e fases de desenvolvimento diferentes, apresentaram perfis comportamentais e neuronais distintos, corroborando com achados da literatura, que enfatizam a dependência da idade e da fase do desenvolvimento para os achados resultantes desta exposição (REED *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2007). Inúmeras evidências (FRANCO *et al.*, 2006; MANFROI *et al.*, 2004, SAKAMOTO *et al.*, 2002; HIMI *et al.*, 1996) revelam que a exposição ao metilmercúrio é capaz de induzir um padrão de mudanças neuroquímicas e comportamentais em ratos jovens ao final do período de lactação. Entre estas alterações, a anorexia e os déficits motores despontam como as principais consequências da exposição a este metal.

Sob nossas condições experimentais, os animais intoxicados com MeHg por 20 dias (P1) por meio da lactação apresentaram déficits locomotores importantes, corroborando os achados de Franco e colaboradores (2007). Em nítido contraste, no entanto, paradigmas experimentais diversos mostraram que a exposição ao MeHg nesta fase inicial de desenvolvimento pode resultar em sintomas hiperlocomotores (STRINGARI *et al.*, 2006, GOULET *et al.*, 2003; MANFROI *et al.*, 2004).

Em geral, a observação de sintomas hiperlocomotores pode estar relacionado à susceptibilidade destes animais jovens a ação mercurial, resultante de peroxidação lipídica, liberação de óxido nítrico e desregulação de enzimas importantes para diminuição do estresse oxidativo, além da morte de células

granulares do cerebelo (CARVALHO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.* 2007; WAKABAYASHI *et al.*, 1995). Entretanto, a hipolocomoção, como observada em nestes experimentos, pode estar relacionada à concentração efetiva de mercúrio ou à sua efetiva transmissão pela amamentação, visto que o mercúrio inorgânico é transferido com mais eficiência pela lactação do que o mercúrio orgânico (SUNDBERG *et al.*, 1998). Desta forma, animais neonatos poderiam apresentar dificuldades no sistema de conversão de forma orgânica a inorgânica, resultando assim em diminuição de atividade locomotora, como observado nos testes de campo aberto (FRANCO *et al.*, 2006; MANFROI *et al.*, 2004)

O selenito de sódio, composto a base de selênio, amplamente utilizado em experimentos *in vivo* e *in vitro*, age como um antioxidante importante contra a intoxicação mercurial (AGARWAL & BEHARI, 2007a; AGARWAL & BEHARI, 2007b). Entretanto, Su e colaboradores (2008) demonstraram que o acúmulo de mercúrio pode ser aumentado quando há coadministração com selênio. Tendo em vista que animais jovens (1^o ao 20^o DPN) estão em pleno desenvolvimento do sistema nervoso, o selênio pode não ter sido capaz de reverter os efeitos do mercúrio.

No período de exposição de 10 dias (animais mais velhos, P21), o grupo intoxicado com MeHg apresentou sintomas hiperlocomotores. Stringari e colaboradores (2006), mostraram como o aumento da idade do animal resulta em efeitos hiperlocomotores em camundongos expostos de forma aguda ao MeHg. Este efeito, provavelmente, está ligado ao tempo de exposição, idade do animal e dose administrada, visto que, exposições por tempos prolongados e em pequenas doses podem gerar efeitos periféricos secundários, tais como desmielinização, atrofia muscular e diminuição da atividade locomotora (HEALTH *et al.*, 2007). Em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, fora do escopo deste

trabalho (SANTOS *et al.*, 2009), animais expostos por 30 dias (P21) ao MeHg apresentaram redução na atividade locomotora e equilíbrio, mostrando como a ação do metal é dependente do estágio de desenvolvimento e tempo de exposição.

No que diz respeito a influencia do mercúrio sobre a memória e aprendizado, nossos resultados são semelhantes a outros achados, em relação aos animais púberes. Os efeitos comportamentais da intoxicação mercurial não se restringem somente aos aspectos locomotores e de equilíbrio. Neonatos expostos ao mercúrio orgânico apresentaram diminuição nos níveis de GPx, triptofano, superóxido desmutase e catalase, no hipocampo. Tais alterações podem resultar em alterações na plasticidade sináptica (VICENTE *et al.*, 2004). Johnsen-Soriano e colaboradores (2007), em um modelo que combinava o estudo do estresse oxidativo como resultado de exposição ao etanol, demonstraram o aumento no tempo de latência em ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, mostrando de que forma a potenciação de longa duração (LTP, *Long-term potentiation*) pode ser afetada neste modelo. Em acordo com esses resultados, Falluel-Morel e colaboradores (2007) observaram o aumento no tempo de latência em ratos púberes intoxicados com mercúrio utilizando paradigmas semelhantes.

Estes efeitos moleculares da intoxicação mercurial, muitas vezes culminam com a morte celular. Dentre os tipos celulares mais afetados estão os astrócitos, envolvidos em inúmeras funções cruciais para o tecido neural, tais como a migração neuronal durante o desenvolvimento, a liberação de fatores neurotróficos, além da capacidade de interferir na comunicação neuronal, agindo na recaptção de glutamato e outros neurotransmissores. Outras interações entre astrócitos e neurônios incluem seu papel obrigatório no fornecimento de moléculas precursoras para a síntese de glutatona neuronal, controle do pH extracelular e

balanço iônico (SHANKER *et al.*, 2001; ASCHNER *et al.*, 2000). O mercúrio causa excitotoxicidade em virtude da inibição do transporte de glutamato pelo astrócito, aumentando a vulnerabilidade do neurônio aos radicais livres e ativação em excesso de receptores NMDA, culminando na morte celular (MORETTO *et al.*, 2005).

Falluel-Morel e colaboradores (2007) através intoxicação de ratos púberes, mostraram como o MeHg pode induzir morte celular acentuada na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo, por meio de vários eventos moleculares diferentes, desde a inibição da proliferação celular, bem como o aumento de enzimas pró-apoptóticas como caspase-3, culminando na diminuição da memória espacial.

Em contrapartida, Wakabayashi e colaboradores (1995) mostraram que a administração de MeHg em três estágios de desenvolvimento diferentes, provoca níveis diferentes de lesão. Neste, as lesões no hipocampo de ratos jovens são mais severas do que em ratos neonatos e adultos. Tais resultados estão em concordância com nossos achados.

Em nossos resultados, a contagem dos controles, foi semelhante ao encontrado por Miki e colaboradores (2005), com média de 34 mil neurônios na camada polimórfica do giro denteado do hipocampo. Neste contexto, a contagem estereológica se apresenta como ferramenta importante na avaliação qualitativa e quantitativa das lesões causadas por várias injúrias, por meio de extrapolação da estrutura tri-dimensional a partir de uma estrutura bi-dimensional. A contagem do número de neurônios no hipocampo de ratos entre 16 e 30 dias foi identificada em todas as suas subdivisões. Particularmente, no giro denteado foram contados 36.700 neurônios na região do hilo, e 483.000 células granulares na camada

granular (SLOMIANKA & WEST, 2005; MIKI *et al.*, 2005).

Estudos têm evidenciado que compostos organomercuriais são responsáveis pela diminuição dos níveis de GSH e aumento dos níveis de peróxidos e substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico no SNC de camundongos (FARINA *et al.*, 2005; MANFROI *et al.*, 2004). O MeHg atua na depleção de diversas enzimas anti-oxidantes importantes para a célula (CHEN & BERRY, 2003; FARINA *et al.*, 2003a; FRISK *et al.*, 2003), dentre as quais podem ser citadas a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GR), (FLOHÉ *et al.*, 1973; KAUR *et al.*, 2006). O selênio, por agir como mimético da GPx e fazer parte da composição química da GSH, tem sido investigado como um composto capaz de atenuar os mecanismos da intoxicação por MeHg (BEYROUTY & CHAN, 2006; AGARWAL & BEHARI, 2007b).

Mecanismos que conduzem a formação de radicais livres têm sido estimados como uma dos fatores causais nos danos associados à exposição ao mercúrio. Por isso, o uso de antioxidantes naturais e sintéticos apresenta-se como uma ferramenta importante, como um suporte para a modulação dos níveis celulares de glutathione, metalotioneínas e outras moléculas antioxidantes (REED *et al.*, 2006). Sendo assim, outros compostos antioxidantes estão sendo explorados, como o extrato das folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) que mostrou grande concentração de ácidos fenólicos e flavonóides, que podem ser os responsáveis pelas atividades antioxidante e citoprotetoras deste extrato.

O selênio possui efeitos comprovados como composto anti-oxidante, tanto como agente quelante de metais como substrato para a produção da glutathione. No entanto, é importante e necessário ter em mente que as diferenças de dose, tempo

de exposição, estágio de desenvolvimento animal e origem do selênio, são preponderantes para a sua eficácia. Neste estudo, ratificou-se a ação deletéria do metilmercúrio, principalmente, no que diz respeito a capacidade de locomoção e aprendizado dos animais mais velhos (P21), e como ao selênio interferiu de forma parcial, revertendo apenas os efeitos locomotores nestes animais. Sendo assim, faz-se importante o estudo de novas formas de exposição e utilização outros modelos experimentais, a fim de elucidar os mecanismos de ação mercurial e sua interação com compostos antioxidantes no desenvolvimento.

5 CONCLUSÕES

- Ratos da linhagem Wistar neonatos (P1) expostos ao MeHg por 20 dias apresentaram redução significativa na atividade locomotora em relação ao grupo controle. Em relação ao grupo de animais mais velhos (P21) tratados por 10 dias apresentou resultados nos testes comportamentais compatíveis com hiperlocomoção. Quanto ao aprendizado de memória espacial, somente este último grupo apresentou aumento no tempo de latência no labirinto aquático;

- A análise histológica demonstrou perda celular significativa na população de neurônios hipocâmpais (camada polimórfica do giro denteado) apenas no grupo de animais P21 tratados por 10 dias com MeHg, quando comparados ao grupo controle;

- Neste modelo experimental, a exposição ao MeHg resultou em efeitos neurotóxicos dependentes do período de desenvolvimento animal. A utilização de composto de selênio promoveu apenas proteção parcial em relação aos déficits locomotores observados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARON M. SHAPIRO, HING MAN CHAN. Characterization of demethylation of methylmercury in cultured astrocytes. **Chemosphere** **74**: 112–118. 2008.
- ALLEN, J. W., EI OGAYLI, H., ASCHNER, M., SYVERSEN, T., SONNEWALD, U. Methylmercury has a selective effect on mitochondria in cultured astrocytes in the presence of [U-C-13]glutamate. **Brain Research**. **908**: 149–154. 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.
- AGARWAL, R & BEHARI, J. R. Role of selenium in mercury intoxication in mice. **Industrial Health** **45(3)**: 388-395. 2007a.
- AGARWAL, R & BEHARI, J. R. Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **79(3)**: 306-310. 2007b.
- 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**: 292. 2003.
- BEYROUTY, P., CHAN, H. M. Co-consumption of selenium and vitamin E

- altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. **Neurotoxicology Teratolerance** **28**: 49–58. 2006.
- CARVALHO, M. C., FRANCO, J. L., GHIZONI, H., KOBUS, K., NAZARI, E. M., ROCHA, J. B. NOGUEIRA, C. W., DAFRE, A. L., MULLER, Y. M., FARINA, M. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficit and cerebellar toxicity in mice. **Toxicology** **239(3)**: 195-2003. 2007.
- CASTOLDI, A. F., COCCINI, T., CECCATELLI, S., MANZO L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin** **55(2)**: 197-203. 2001.
- CASTOLDI A. F., ONISHCHENKO N., JOHANSSON C., COCCINI T., RODA E., VAHTER M., CECCATELLI S., MANZO L. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** **51**: 215-259. 2008.
- CHEN, J. & BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry** **86**:1-12. 2003.
- DENEKE S.M., FANBURG B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol.** 257(4 Pt 1):L163-73. 1989.
- 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. **Prog Neurobiol**. 62(6):649-71. 2000.
- FALLUEL-MOREL, A. F., SOKOLOWSKI, K., SISTI, H. M., XIAOFENG, Z., SHORS, T. J., DICICCO-BLOM, E. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. **Journal of Neurochemistry** 10: 1471-4159. 2007.
- FARINA, M., DAHM, K. C. S., SCLWALM, F. D., BRUSQUE, A. M., FRIZZO, M. E. S., ZENI, G., SOUZA, D. O., ROCHA, J. B. T. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicology Science** 73: 135–140. 2003a.
- FARINA, M., FRANCO, J. L., RIBAS, C. M., MEOTTI, F.C., MISSAU, F. C., PIZZOLATTI, M. G. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of Pharmacology** 57:1503-1508. 2005.
- FARO, L. R. F., NASCIMENTO, J. L. M., ALFONSO, M., DURAN, R. *In Vivo* effects of inorganic mercury (HgCl₂) on striatal dopaminergic system. **Environmental Research** 48: 263-267. 2001.
- FARO, L. R. F., DO NASCIMENTO, J. L. M., ALFONSO, M., DURÁN, R. Protection of methylmercury effects on the in vivo dopamine release by NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology** 42: 612–618. 2002.

- 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. **Toxicol Lett.** **152**: (3):223-34. 2004
- FLOHÉ, L., GUNZLER, W. A., SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase a selenoenzyme. **Febs Letters** **32**: 132–134. 1973.
- 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., 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.
- FRANCO J.L., TEIXEIRA A., MEOTTI F.C., RIBAS C.M., STRINGARI J., GARCIAPOMBLUM S.C., MORO A.M., BOHRER D., BAIROS A.V., DAFRE A.L. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environ. Res.** 102. 2006.
- FRANCO, J. L., BRAGA, G. C., NUNES, A. K. C., RIBAS, C. M., STRINGARI, J., SILVA, A. P., POMBLUM, S. C. G., MORO, A. M., BOHRER, D., SANTOS, A. R. S., DAFRE, A. L., FARINA, M. Lactational exposure to inorganic Mercury: Evidence for neurotoxic effects. *Neurotoxicology and Teratology* 29: 360-367. 2007.
- FRISK, P., WESTER, K., YAGOB, A., LINDH, U. Selenium protection against mercury-induced apoptosis and growth inhibition in cultured K-562 cells,

Biology Trace Elemental Research **92**:105–114. 2003.

GAILER, J., GEORGE, G. N., PICKERING, I. J., MADDEN, S., PRINCE, R. C., YU, E. Y., DENTON, M. B., YOUNIS, H. S., APOSHIAN, H. V. Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. **Chemical Research in Toxicology** **13**:1135-1142. 2000.

GASSÓ, S., SUNÓL, 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 (56):597-605, 2002.

GROGAN S.P., AKLIN B., FRENZ M., BRUNNER T., SCHAFFNER T., MAINILVARLET P. In vitro model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage. **J Pathol**. 198(1):5-13. 2002.

HEATH J. C., BANNA K. M., REED M. N., PESEK E. F., COLE N., LI J., NEWLAND M. C. Dietary selenium protects against selected signs of aging and methylmercury Exposure. **NeuroToxicology** **31**: 169–179. 2010.

HIMI, T., IKEDA, M., SATO, I., YUASA, T., MUROTA, S. Purkinje cells Express neuronal nitric oxide synthase after methylmercury administration. **Brain**

Research 718: 189-192. 1996.

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.

JOHNSEN-SORIANO S., BOSCH-MORELL F., MIRANDA M., ASENSIO S., BARCIA J.M., ROMÁ J., MONFORT P., FELIPO V., ROMERO F.J. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. **Alcohol Clin Exp Res.** 31(3):486-92. 2007.

KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., SU, M., YONEOKA, Y., SAKAMOTO, M., IKUTA, TAKAHASHI, H. Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury. **Brain Research 859:** 233-239. 2000.

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.

KOJIMA N., ISHIBASHI H., OBATA K., KANDEL E.R. Higher seizure susceptibility and enhanced tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in fyn transgenic mice. **Learn Mem.** 5(6):429-445. 1998.

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., 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. 2004a.
- MANFROI, C. B., SCHWALM, V. C., ABREU, F., OLIVEIRA, A., BIZARRO, L., ROCHA, J. B., FRIZZO, M. E., SOUZA, D. O. FARINA, M. Maternal Milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicology Science 81**: 172-178. 2004.
- MEACHAM, C. A., FREUDENRICHA, T. M., ANDERSONA, W. L., SUIB, L., LYONS-DARDENA, T., BARONE, J. R. 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.
- MIKI T., SATRIOTOMO I., LI H.P., MATSUMOTO Y., GU H., YOKOYAMA T., LEE K.Y., BEDI K.S., TAKEUCHI Y. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. **Anat Sci Int 80(3)**:153-62. 2005.
- MIRZOIAN, A. & LUETJE, C. W. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. **Journal Pharmacology Experimental Therapy 302(2)**:560-567. 2002.
- MORETTO M.B., FUNCHAL C., SANTOS A.Q., GOTTFRIED C., BOFF B., ZENI G., PESSOA- PUREUR R., SOUZA D.O., WOFCHUK S., ROCHA J.B.T. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺. **Toxicology 214**: 57–66. 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.
- OLIVERIA D.M., BARRETO G., DE ANDRADE D.V., SARACENO E., AON-BERTOLINO L., CAPANI F., DOS SANTOS EL BACHÁ R., GIRALDEZ L.D. Cytoprotective effect of Valeriana officinalis extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. **Neurochem Res.** **34(2)**:215-20. 2009.
- PAMPHLETT R, EIDE R, DANSCHER G. Does selenium deficiency unmask mercury toxicity in motor neurons? **Neurotoxicol Teratol.** **27(2)**:241-4. 2005.
- PORCIÚNCULA, L. O., ROCHA, J. B. T., BOECK, C. R., VENDITE, D., SOUZA, D. O. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons, **Neuroscience Letters** **299**:217–220. 2001.
- RALSTON, N. V. C., BLACKWELL, J. L. 3rd, RAYMOND, L.J. Importance of molar ratios in selenium-dependent protection against methylmercury toxicity. **Biological Trace Elemental Research** **119**: 255-268. 2007.
- RALSTON, N. V. C., RALSTON, C. R., BLACKWELL, J. L. 3rd, RAYMOND, L. J. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. **Neurotoxicology** **29**: 802-811. 2008.
- REED M. N., BANNA K. M., DONLIN W. D., NEWLAND M. C. Effects of gestational exposure to methylmercury and dietary selenium on reinforcement efficacy in adulthood. **Neurotoxicology and Teratology** **30**. 29–37. 2008.

- REED M. N., PALETZ E. M., NEWLAND M. C. Gestational exposure to methylmercury and selenium: Effects on a spatial discrimination reversal in adulthood. **NeuroToxicology** **27**. 721–732. 2006.
- ROONEY, J. P. K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology** **234**:145-156. 2007.
- 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.
- SAKAMOTO, M., KAKITA, A., DE OLIVEIRA, R. B., SHENG PAN, H., TAKAHASHI, H. Dose- dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Brain Research** **152(2)**:171-6. 2004.
- SANFELIU C., SEBASTIÀ J., SU K. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. **Neurotoxicology**. 22(3):317-27. 2001.
- SHANKER G, ASCHNER M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. **J Neurosci Res** **1;66(5)**: 998-1002. 2001.
- SHANKER, G. & ASCHNER M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Molecular Brain Research** **110**: 85–91. 2003.
- 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.
- 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.

SLOMIANKA L., WEST M.J. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience****136(3)**:757-67. 2005

SOARES D.D., LIMA N.R., COIMBRA C.C., MARUBAYASHI U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 74(2):357-62. 2002.

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. **Neurochemistry Research** **31**: 563–569. 2006.

LI SU, MING WANG, SHU-TING YIN, HUI-LI WANG, LIANG CHEN, LI-GUANG SUN, DI-YUN RUAN. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 70: 483–489. 2008.

SUNDBERG J., JONSSON S., KARLSSON M.O., HALLEN I.P., OSKARSSON A. Kinetics of methylmercury and inorganic mercury in lactating and nonlactating mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol** **151**. 319–329.1998.

WAKABAYASHI k., KAKITA A., SAKAMOTO M., SU M., IWANAGA K., IKUTA F. Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. **Brain Research** **705**: 267-272. 1995.

- WEST M.J., SLOMIANKA L., GUNDERSEN H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec.** 231, 482–97.1991.
- USUKI, F., YASUTAKE, A., UMEHARA, F., TOKUNGA, H., MATSUMOTO, M., ETO K., ISHIURA, S., HIGUCHI, I. In vivo protection of water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. **Neuroscience Letters** 304:, 199– 203. 2001.
- VICENTE, E., BÔER, M., NETTO, C., FOCHESSATTO, C., DALMAZ, C., SIQUEIRA, I. R., GONÇALVES, C. A. Hippocampal antioxidant system in neonates from methylmercury-intoxicated rats. **Neurotoxicology and Teratology** 26: 817–823. 2004.
- YIN Z., LEE E., NI M., JIANG J, MILATOVIC D., RONGZHU L., FARINA M., ROCHA J. B.T., ASCHNER M. Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen. **NeuroToxicology** 32: 291–299. 2011.
- .