



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

FRANCISCO BRUNO TEIXEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO CRÔNICA COM MERCÚRIO  
INORGÂNICO.**

BELEM  
2016

FRANCISCO BRUNO TEIXEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO CRÔNICA COM MERCÚRIO  
INORGÂNICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM

2016

FRANCISCO BRUNO TEIXEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO CRÔNICA COM MERCÚRIO  
INORGÂNICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

\_\_\_\_\_ - Orientador

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

\_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elena Crespo López  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

*Aos meus pais João (in memoriam) e Zioneuda com carinho  
Ao Junior, Felipe e Nataniele, meus companheiros  
Vencemos mais uma etapa!*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as graças que concede em minha vida.

Ao meu papai **João de Deus Teixeira** (*in memoriam*), meu exemplo de vida. Obrigado por todo o apoio concedido, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela confiança e pelo amor que guardo em meu coração. Todo seu esforço será lembrado em gerações de nossa família. Você é o meu herói!

À minha mamãe **Maria Zioneuda**, minha guerreira. Obrigado pelo colo, pelo carinho, pelo incentivo e pelo abraço que nunca faltou durante minha vida acadêmica e que recebo sempre que retorno para casa. Você é a minha rainha!

Aos meus irmãos, **Junior**, **Felipe** e **Nataniele**, meus companheiros. Agradeço pela ajuda, pelos conselhos, pelo suporte e pelos momentos de descontração que me ofereceram.

A todos os **professores** que passaram seus conhecimentos para esta pessoa, que com toda admiração que possuí, tentará trilhar seus passos.

Ao prof. **Rafael Lima**, meu orientador e conselheiro acadêmico. Agradeço pela oportunidade que me concedeu durante o período de graduação, fazendo despertar em mim, o prazer pela pesquisa científica e pela vida acadêmica.

A todos os **integrantes do LABEF** (Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional) que me ajudaram a realizar essa obra.

Ao **programa** de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pela oportunidade de mestrado.

À **Universidade Federal do Pará**, símbolo que carregarei em meu braço direito eternamente.

Enfim, a **todos** que de forma direta ou indireta me ajudaram a escalar mais um morro em minha vida profissional, seja em sugestões, críticas, elogios, comentários, abraços, carinhos, julgamentos... Meu muito obrigado!

*Que Deus transforme minha gratidão em luz para guiar seus caminhos.*

*Transforme a cruz que tu carregas em uma arma,  
Quanto mais pesada for, mais forte tu serás  
E será sua cruz que te levará a vitória!*

## RESUMO

O mercúrio é um metal tóxico, que pode se apresentar no meio ambiente nas formas elementar, orgânica e inorgânica. O mercúrio inorgânico possui menor lipossolubilidade, e logo menor absorção no organismo e passagem na barreira hematoencefálica. Por este motivo, modelos de exposição que utilizam o mercúrio inorgânico em ratos e que busquem avaliar seus efeitos no sistema nervoso central são escassos, principalmente em indivíduos adultos. Diante disso, investigamos se o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), em um modelo de exposição crônica e em baixas concentrações é capaz de promover alterações motoras associadas a variáveis no balanço oxidativo, citotoxicidade celular e apoptose no córtex motor de ratos adultos. Para esta finalidade, ratos foram expostos por 45 dias em uma dose de 0.375 mg/kg/dia. Após este período, os animais foram submetidos à avaliação motora e em seguida coletado o córtex motor para mensuração de mercúrio depositado no parênquima neural, avaliação e quantificação de citotoxicidade celular e apoptose e avaliação do balanço oxidativo. Além disso, animais foram perfundidos para avaliação da densidade de neurônios maduros e astrócitos do córtex motor. Nossos resultados verificaram que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico promoveu diminuição do equilíbrio e da coordenação motora fina. Além disso, verificamos que este modelo de exposição promoveu a morte celular por citotoxicidade e indução de apoptose no córtex motor; diminuição do número de neurônios e de astrócitos, formação de depósitos de mercúrio e estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação e da concentração de nitritos e diminuição da capacidade antioxidante total. Assim, nossos resultados fornecem evidências que a exposição ao mercúrio inorgânico, mesmo diante de sua baixa capacidade de atravessar barreiras biológicas, ainda assim é capaz de induzir alterações motoras associadas a morte celular por citotoxicidade e apoptose e estresse oxidativo no córtex motor de ratos adultos.

**Palavras-chave:** Mercúrio, cloreto de mercúrio, morte celular, estresse oxidativo, córtex motor, apoptose

## ABSTRACT

Mercury is a highly toxic heavy metal, which can be found in organic and inorganic elemental forms in the environment. The inorganic mercury has lower liposolubility and consequently, lower absorption in the body, and lower passage through the blood brain barrier. For this reason, exposure models using inorganic mercury in rats to evaluate its effects in the central nervous system are rare, mainly in adults. Therefore, we investigate the potential of low concentration of mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ), in a chronic exposure model to promote motor changes associated to variables in the oxidative balance, cellular cytotoxicity and apoptosis in the motor cortex of adult rats. For this purpose, rats were exposed for 45 days to a dose of 0.375 mg/kg/day. After this period, the animals were submitted to motor evaluation and then were collected for measurement of total deposited mercury in neural parenquima, assessment and quantification of cellular cytotoxicity and apoptosis and evaluation of the oxidative balance. Furthermore, animals were perfused to evaluate the density of mature neurons and astrocytes of the motor cortex. It was observed that chronic exposure to inorganic mercury decreased balance and fine motor coordination. In addition, we found that this exposition model led to cytotoxicity and cell death by apoptosis, formation of deposits of mercury and oxidative stress evidenced by the increase of lipoperoxidation and the concentration of nitrites and decrease in total antioxidant capacity. Thus, our results provide evidence that a exposition to inorganic mercury, even before his lower capacity to cross the biology barriers, It is still capable to inducing motor changes associated to cell death and apoptosis and oxidative stress in the motor cortex of the adult rats.

**Keywords:** Mercury, mercury chloride, cell death, oxidative stress, motor cortex, apoptosis



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	Dimetilmercúrio
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
Hg	Mercúrio
$\text{Hg}^0$	Mercúrio Elementar
$\text{Hg}^{2+}$	Íon Mercúrico
$\text{Hg}_2^{2+}$	Íon Mercuroso
$\text{HgCl}_2$	Cloreto de Mercúrio
MeHg	Metilmercúrio
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 MERCÚRIO.....	10
1.2 ESPÉCIES DE MERCÚRIO.....	11
1.3 BIODISPONIBILIDADE DO MERCÚRIO.....	13
1.4 O MERCÚRIO NA AMAZÔNIA.....	14
1.5 TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO INORGÂNICO.....	15
1.6 TOXICOCINÉTICA DO CLORETO DE MERCÚRIO.....	17
1.7 O MERCÚRIO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	18
1.8 HIPÓTESE E DELINEAMENTO DA PERGUNTA EXPERIMENTAL	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3. ARTIGOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4. APÊNDICE 1.....</b>	<b>22</b>
<b>5. APÊNDICE 2.....</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>8. ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA.....</b>	<b>81</b>
<b>9. ANEXO 2 – PARECER CEPAE.....</b>	<b>94</b>
<b>10. ANEXO 3 – PROTOCOLOS.....</b>	<b>96</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1. MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) (do latim *hydrargirus*, prata líquida) é um metal pesado e está ranqueado como o terceiro elemento ou substância mais tóxica do planeta segundo a US Government Agency for Toxic Substances and Disease Registry (RICE et al., 2014). O mercúrio é um elemento que se encontra naturalmente na crosta terrestre. Ao longo do tempo, este elemento tem sido distribuído por todo o meio ambiente através de processos naturais, tais como a atividade vulcânica, incêndios, ressurgência oceânica, processos biológicos e movimento de rios, lagos e córregos (OMS, 2003, BERHOFT, 2012, RICE et al., 2014).

Desde a revolução industrial no final do século XVIII, as ações antrópicas tornaram-se um contributo significativo para a distribuição de mercúrio e seus compostos no meio ambiente (ATSDR, 1999; OMS, 2003). Desde o ano 2700 antes de Cristo, registros históricos demonstram que o elemento químico mercúrio é utilizado pela espécie humana. Neste período já era conhecido sua capacidade de conjugação com o ouro, entretanto, somente após a revolução industrial, o mercúrio passou a ser utilizado como matéria prima para diversos produtos industrializados, como na fabricação de lâmpadas e produtos farmacêuticos, o que levou ao aumento gradativo do despejo deste metal nos diversos ecossistemas. (ATSDR, 1999; CLIFTON, 2007, AL-BATANONY et al, 2013).

O solo e a água contaminados por mercúrio propiciam a entrada deste elemento na cadeia alimentar de animais (GOLDMAN & SHANON, 2001; DARVIDSON et al., 2004). Uma vez na cadeia alimentar, o mercúrio pode se bioacumular e permanecer por vários anos, causando efeitos adversos à saúde humana (HARADA et al., 2001). O mecanismo exato por qual o mercúrio entra na cadeia alimentar provavelmente varia entre os diversos ecossistemas (RICE et al., 2014).

A partir da década de 50, intensificaram-se as interações danosas entre a ação antrópica do mercúrio no meio ambiente e a própria saúde humana, quando foi relatada a morte de quarenta e oito pessoas na cidade de Minamata no Japão, devido à ingestão de peixes intoxicados com mercúrio advindos de águas poluídas por descargas industriais locais (MINISTÉRIO DO

MEIO AMBIENTE DO JAPÃO, 2013) e em outros países, como no Iraque na década de 70 com o óbito de 459 pessoas (SKERFVING & COPPLESTONE, 1971, CLARKSON et al., 1981).

## 1.2. ESPÉCIES DE MERCÚRIO

O mercúrio pode se apresentar no meio ambiente em três espécies: (i) mercúrio elementar ou mercúrio metálico (por exemplo, vapor de mercúrio -  $Hg^0$ ); (ii) mercúrio orgânico (por exemplo, o metilmercúrio – MeHg), o qual é a forma mais comum de intoxicação em humanos e (iii) o mercúrio inorgânico (por exemplo, o cloreto de mercúrio -  $HgCl_2$ ). O comportamento biológico, a farmacocinética e as manifestações clínicas após exposição humana varia entre essas formas de mercúrio e suas estruturas químicas (ATSDR, 1999, OMS, 2003, BERNHOFT, 2012).

O mercúrio em sua forma elementar é a espécie predominantemente liberada para a atmosfera na forma de vapor por processos naturais. Em temperatura ambiente, o mercúrio elementar se encontra em fase líquida e é a forma mais comumente conhecida pela população por estar presente em termômetros, lâmpadas incandescentes, esfigmomanômetros e outros produtos, os quais, durante a sua fabricação expõem os funcionários à inalação de vapores de mercúrio (GUZZI & LAPORTA, 2008, ATSDR, 1999, BERNHOFT, 2012, AL-BATANONY et al, 2013; RICE et al., 2014).

O mercúrio orgânico, ou composto organomercurial, são combinações resultantes da ligação entre o mercúrio e o carbono. Há um grande número de compostos orgânicos de mercúrio, no entanto, o organomercurial mais comumente encontrado no ambiente é o metilmercúrio (ATSDR, 1999; OMS, 2003). O metilmercúrio pode ser encontrado em ecossistemas aquáticos, onde é absorvido facilmente por microrganismos, adentrando-se assim na cadeia alimentar de peixes, onde este elemento se bioacumula. Por este fato, os peixes são a fonte primária de exposição de metilmercúrio nos seres humanos (CLARKSSON & MAGOS, 2006, RICE et al., 2014). Devido estas razões, é a espécie de mercúrio mais recorrente em estudos na literatura.

O trato gastrointestinal absorve entre 95% e 100% do metilmercúrio ingerido. Na corrente sanguínea, este composto pode se ligar em eritrócitos do

sangue onde será distribuído por todo o corpo. As fontes potenciais de mercúrio orgânico incluem a exposição a emissões de combustível fósseis, a incineração de lixo médico, termômetros, esfigmomanômetros, barômetros, luzes incandescentes, baterias e vários produtos comerciais que incluem produtos dermatológicos, sabões germicidas e vários medicamentos, (GOLDMAN & SHANON, 2001; GUZZI & LA PORTA, 2008).

Os compostos inorgânicos de mercúrio ocorrem quando o mercúrio se combina com elementos, tais como o cloro, o enxofre ou o oxigênio. Estes compostos são também chamados de sais de mercúrio. A maioria dos compostos de mercúrio inorgânico são pós ou cristais brancos, com exceção do sulfeto de mercúrio que se apresenta na cor vermelha (também conhecido como cinábrio) (ATSDR, 1999).

O mercúrio inorgânico se apresenta sob a forma catiônica, podendo se apresentar em sais monovalentes (íon mercurioso -  $\text{Hg}_2^{2+}$ ) ou bivalentes (íon mercúrico -  $\text{Hg}^{2+}$ ). Entre os vários compostos, encontram-se o cloreto de mercúrio, o cloreto mercurioso, e o sulfeto de mercúrio (ATSDR, 1999; OMS, 2003; BERHOFT, 2012).

Alguns compostos de mercúrio inorgânico são usados como antissépticos, fungicidas, e desinfetantes tópicos. O cloreto de mercúrio tem sido usado em cremes de clareamento da pele. Além disso, os compostos inorgânicos de mercúrio são usados em pequenas quantidades, como conservantes em algumas formulações de medicamentos e vacinas. O sulfeto de mercúrio é um dos corantes vermelhos mais utilizados em tintas para tatuagem (ATSDR, 1999; HUANG et al., 2011).

A forma natural de formação de mercúrio inorgânico se dá pela transformação de mercúrio elementar (vapor de mercúrio) em sais de mercúrio. O fenômeno ocorre quando uma pequena fração de mercúrio elementar é retirada da atmosfera durante os eventos de precipitação, podendo ocorrer uma oxidação do  $\text{Hg}^0$  para  $\text{Hg}^{2+}$  por reações oxidantes atmosféricas com elementos como o oxigênio, o ozônio e o cloro. Nesta nova forma, o mercúrio pode se ligar a outros íons e formar compostos inorgânicos de mercúrio possuindo assim, maior solubilidade e maior capacidade de precipitação (FITZGERALD, 1995; GOCHFELD, 2003)

As exposições ocupacionais são as principais causas de intoxicação com mercúrio inorgânico (HARADA et al., 2001; AL-BATANONY et al, 2013). No entanto, o contato com termômetros e afins, em solos contaminados e a alimentação com animais próxima ao topo da cadeia alimentar como peixes advindos de áreas contaminadas também são fontes de exposições com mercúrio inorgânico (OMS, 2003; HUANG et al., 2011, MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014).

A literatura sobre a intoxicação e a exposição com mercúrio inorgânico em humanos se mostra principalmente em relatos de casos clínicos. Os sintomas mais comumente relatados são náusea, desconforto abdominal, insônia, agressividade, fraqueza muscular e diarreia e como sinais geralmente se apresentam a febre, hipertensão arterial, hipocalemia, distúrbios renais, taquicardia e leucocitose (TRIUNFANTE et al., 2009; BENZ et al., 2011; BEASLEY et al., 2013).

### 1.3. BIODISPONIBILIDADE DO MERCÚRIO

O mercúrio é transportado no ambiente pelo ar e pela água, além de poder ser transportado por organismos biológicos sendo transmitido ao longo dos níveis tróficos da cadeia alimentar. Como mencionado anteriormente, existe uma grande variedade de formas químicas de mercúrio, isto concede a este elemento a capacidade de se converter dentro destas várias formas dependendo do ambiente em que se encontra e isso proporciona para o mercúrio a sua disseminação e permanência no ambiente (RICE et al., 2014).

O vapor de mercúrio elementar ( $Hg^0$ ) do solo e da água consegue entrar na atmosfera, onde pode ser transportado e redistribuído ao longo da superfície da Terra. A ressurgência oceânica e as erupções vulcânicas ajudam a trazer minerais de camadas profundas da Terra para a superfície. Desta forma, o mercúrio entra no ar na forma de vapor e posteriormente é convertido para forma iônica de  $Hg^{2+}$  (solúvel em água). Essa forma é rapidamente arrastada pelo vento e pela chuva chegando a se depositar no solo ou no sedimento do fundo das águas. No ambiente aquático o mercúrio pode ser novamente reduzido para a forma  $Hg^0$  e ser devolvido à atmosfera, ou pode incorporar-se ao sedimento aquático ficando na forma inativa de cinábrio ( $HgS$ ) (ATSDR, 1999; BOISCHIO & HENSHEL, 2000).

A ingestão de mercúrio elementar ou inorgânico por microrganismos aquáticos, principalmente bactérias anaeróbias sulforredutoras, resulta em um processo de metilação das formas solúveis de mercúrio em metilmercúrio, um composto bastante estável no ambiente. A partir disso, o mercúrio pode se bioacumular na cadeia alimentar de animais marinhos, perfazendo-se assim um ciclo biogeoquímico alternativo (MALM, 1998; MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014).

O mercúrio apresenta uma intensa capacidade de acúmulo biológico, assim a introdução deste metal no ambiente marinho promove o seu acúmulo nos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar, onde organismos que ocupam níveis mais elevados tendem a apresentar maior concentração de mercúrio em sua constituição (BRUINS et al., 2000, CLARKSON & MAGOS, 2006). Nos ecossistemas marinhos, os peixes podem armazenar grandes quantidades de mercúrio e promover fenômenos de intoxicação nos indivíduos que os consomem (HARADA et al., 2001; MINISTÉRIO DE SAÚDE DO JAPÃO, 2013; RICE et al., 2014).

#### 1.4. O MERCÚRIO NA AMAZÔNIA

A utilização do mercúrio na Amazônia foi introduzida na década de 80, período este que consistiu em processos desordenados de extrativismo mineral, principalmente na região do Baixo Tapajós. O mercúrio era utilizado em processos gávimétricos, que consistia na separação do ouro conjugado ao mercúrio de outros minerais. Este processo de exploração e aproveitamento do ouro ficou conhecido como garimpagem. O excesso de mercúrio utilizado neste processamento é liberado por procedimentos de lavagens ou por evaporação, fazendo que o mercúrio entre em contato direto com o ambiente, favorecendo o fenômeno de biotransformação na água e a sua dispersão na atmosfera (BOISCHIO & CERNICHIARI, 1998, BOISCHIO & HENSHEL, 2000).

No ambiente aquático, como foi mencionado anteriormente, o mercúrio sofre biotransformação por bactérias anaeróbias se estabelecendo neste ambiente na forma de MeHg (BERHOFT, 2012; RICE et al., 2014; MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014). No momento que o mercúrio adentra na cadeia alimentar marinha e passa a se acumular em níveis tróficos mais elevados, tal qual nos peixes, este elemento representa um risco para a

população ribeirinha local, visto que a principal fonte nutritiva proteica se dá pelo consumo desses animais neste ecossistema (MALM et al., 1998; HARADA et al., 2001; PINHEIRO et al., 2007, 2008).

Além da atividade garimpeira, fatores como o desmatamento, a erosão do solo e as represas de rios em hidrelétricas também contribuem para a liberação e o acúmulo de mercúrio na região Amazônica (MALM 1998; ROULET et al., 1998; BERZAS NEVADO et al. 2010). Pelas razões relatadas anteriormente, o mercúrio se tornou a fonte principal de poluição ambiental na Amazônia (BERZAS-NEVADO et al., 2010; CRESPO-LÓPEZ et al., 2011).

A região da bacia do rio Tapajós e do rio Madeira foram locais contaminados por mercúrio, sobretudo pela atividade garimpeira. As populações ribeirinhas destas regiões participaram de vários estudos de monitoramento quanto à contaminação de mercúrio em seres humanos. Análises realizadas em amostras de cabelo destas populações têm demonstrado diferenças de concentrações entre os indivíduos analisados, sendo maiores os valores encontrados naqueles que se alimentam mais comumente de peixes carnívoros (BOISCHIO & CERNICHIARI, 1998; MALM, 1998; ROULET et al., 1998; BOISCHIO & HENSHEL, 2000; BARBOSA et al., 2001; HARADA et al., 2001; PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007; SAMPAIO DA SILVA et al., 2009; CRESPO-LÓPEZ et al., 2011; MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014)

Uma linha de pesquisa que percorreu durante a maioria dos estudos relatados na literatura sobre a relação entre o mercúrio e a Amazônia focou-se principalmente na exposição de peixes e dos seres humanos ao metilmercúrio. No entanto, recentemente foi aberta uma discussão sobre os possíveis riscos do mercúrio inorgânico quando MARTÍN-DOIMEADIOS et al., (2014) relataram a presença desta espécie de mercúrio em peixes comumente encontrados na culinária da Amazônia advindos de regiões contaminadas por mercúrio (Rio Tapajós e hidrelétrica de Tucuruí).

#### 1.5. TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO INORGÂNICO

Segundo o Ministério da Saúde entre 1985 a 2003 o número de mortes provocadas pela intoxicação com mercúrio inorgânico no Brasil foi de aproximadamente 2500 pessoas. O uso agrícola de pesticidas que utilizaram



em sua composição o mercúrio inorgânico foi o principal contribuinte para estes números (GUTIERREZ et al., 2006).

O rim e o fígado são os principais órgãos-alvo para acumulação do mercúrio inorgânico. O cloreto de mercúrio induz lesão renal aguda e danos na hemodinâmica glomerular em humanos e em animais (FREITAS et al., 2012; PEIXOTO & PEREIRA, 2007; GADO & ALDAHMAH, 2013; JOSHI et al., 2014). No fígado pode ser observada morte celular acompanhada com esteatose (TREBUCOBICHET et al., 2013). Por estas características, o  $\text{HgCl}_2$  é comumente utilizado em doses agudas e concentradas como um indutor de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em animais de experimentação (ASLANTURK et al., 2014).

No trato gastrointestinal o  $\text{HgCl}_2$  causa corrosão nas paredes dos órgãos o que implica no aumento da permeabilidade de absorção deste mesmo elemento no organismo (BERHOFT, 2012).

No sistema cardiovascular, estudos experimentais demonstram que a exposição com cloreto de mercúrio provoca disfunção endotelial e vasoconstrição (DA CUNHA et al., 2000; GOLPON et al., 2003; WIGGERS et al., 2008; OMANWAR et al., 2011). A exposição ao mercúrio provoca estresse oxidativo nos vasos sanguíneos por perda seletiva do óxido nítrico (NO) mediador do relaxamento e pela persistência e/ou regulação positiva do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (OMANWAR et al., 2013).

Com relação ao sistema reprodutor, a literatura demonstra que o sistema masculino é mais suscetível em comparação ao feminino. A exposição crônica com cloreto de mercúrio causa toxicidade testicular devido à presença de necrose, desintegração de espermatófitos da membrana basal, edema grave no tecido intersticial dos testículos e diminuição da concentração plasmática de testosterona (EL-DESOKY et al., 2012; KALENDER et al., 2013). A exposição crônica com cloreto de mercúrio em ratas causa poucas modificações na liberação de hormônios no plasma sanguíneo e não afeta a ovulação e a implantação do zigoto na parede uterina, no entanto, este tóxico consegue atravessar a barreira placentária e causar danos ao feto (HEATH et al., 2009, CHEMIHI et al., 2012).

Os mecanismos moleculares pelos quais os metais tóxicos e logo o mercúrio, causam seus efeitos deletérios em vários sistemas, inclusive os

citados anteriormente, provavelmente está associada, pelo menos em parte, aos seus efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, as suas capacidades de contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a inibição das defesas antioxidantes resultando em estresse oxidativo (ASCHNER & ASCHNER, 1989, CLARKSON & MAGOS, 2006; RICE et al., 2014).

#### 1.6. TOXICOCINÉTICA DO CLORETO DE MERCÚRIO

A via oral é o principal caminho pelo qual o mercúrio inorgânico possui acesso ao organismo. Apenas 2% do contingente ingerido desta espécie de mercúrio são absorvidos inicialmente, embora se acredite que seu efeito corrosivo sobre o trato gastrointestinal possa aumentar a permeabilidade e, conseqüentemente, aumentar a sua absorção com a exposição prolongada. Devido a este efeito, a absorção deste elemento pode alcançar níveis de até 16% (OMS, 2003; BERHOFT, 2012). No organismo, a meia-vida do cloreto de mercúrio é de aproximadamente 41 dias (CLARKSSON, 1993; SYVERSEN & KAUR, 2012).

Embora se acredite que ocorra penetração do cloreto de mercúrio sobre a pele, os dados disponíveis na literatura sobre esta via de exposição ainda são insuficientes para fazer a comparação quantitativa com a via oral (BERHOFT, 2012), mesmo possuindo relatos de casos clínicos de intoxicação com esta substância pela via tópica (BENZ et al., 2011).

Após ser absorvido, o cloreto de mercúrio distribui-se na corrente sanguínea, concentrando-se principalmente no plasma sanguíneo, diferentemente das outras espécies de mercúrio que se concentram nos eritrócitos. Este fato ocorre devido os sais mercuriais serem hidrossolúveis em contraste com o mercúrio orgânico que é lipossolúvel (CLARKSON & MAGOS, 2006; OMS, 2003).

A quantidade de cloreto de mercúrio que atravessa a barreira hematoencefálica é muito baixa, devido a sua baixa solubilidade em lipídios. Além disso, o  $\text{HgCl}_2$  não atravessa eficientemente a barreira placentária, no entanto, a quantidade que consegue atravessar é suficiente para provocar danos morfológicos e funcionais nos fetos e nos indivíduos pós-natais, alcançando até mesmo o SNC pelo fato destes indivíduos neste período do

desenvolvimento serem mais suscetíveis aos efeitos deste tóxico devido à barreira hematoencefálica ainda estar em processo de maturação (CLARKSON & MAGOS, 2006, HUANG et al., 2011; CHEMIHI et al., 2012).

A excreção deste composto inorgânico se dá, em geral, pelas vias fecal e urinária. A eliminação pelos túbulos proximais é seguida por parcial reabsorção nos túbulos distais. A filtração glomerular é prejudicada em razão da formação de complexos mercuriais com proteínas, causando assim bioacumulação no rim. Já a eliminação fecal dos compostos mercuriais ocorre por via biliar. O mercúrio é também excretado em menor quantidade na saliva, no suor e no leite (OMS, 2003; SYVERSEN & KAUR, 2012).

### 1.7. O MERCÚRIO INORGÂNICO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A maioria dos relatos na literatura no que concerne a investigação entre a relação do mercúrio inorgânico e o sistema nervoso central (SNC) em comparação com as formas orgânicas é escassa. A justificativa pode estar no fato que o mercúrio inorgânico atravessa pobremente a barreira hematoencefálica, devido sua baixa lipossolubilidade, característica esta contrária às formas orgânicas de mercúrio (CLARKSON & MAGOS, 2006).

No processo de mecanismo de ação dos compostos orgânicos de mercúrio é bem mais esclarecido em comparação com forma inorgânica, sendo a espécie que sabidamente causa danos ao SNC. Possuindo como exemplo a cascata de fenômenos que ocorrem na exposição do metilmercúrio no SNC, após este composto ser absorvido pelo sistema gastrointestinal o metilmercúrio se combina com eritrócitos sendo distribuído por todo o corpo, alcançando o SNC (Clarkson & Magos, 2006; Berhoft, 2012; Rice et al., 2014).

Uma vez no SNC, após atravessar a barreira hematoencefálica o MeHg sofre um gradual processo de demetilação transformando-se em mercúrio inorgânico que é pouco lipossolúvel, o que favorece o seu acúmulo em grandes quantidades dentro das células do SNC. Os efeitos tóxicos induzidos pelo mercúrio no SNC são causados pelo aumento da produção de EROs promovendo alterações morfológicas e funcionais nas células nervosas, acompanhado com uma diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, devido este composto se ligar a grupos sulfidrilas (ASCHNER & ASCHNER, 1989; BERHOFT, 2012).

Organismos complexos possuem como mecanismo de proteção contra o mercúrio e outros metais pesados, um grupo de proteínas de baixo peso molecular e ricas em grupamentos de cisteína e sulfídricas denominadas de metalotioneínas. Estas proteínas ligam-se fortemente a metais pesados e a radicais livres, equilibrando com isso o ambiente celular e diminuindo os efeitos neurotóxicos destes compostos. RISING et al., (1995) demonstraram que astrócitos em cultura expressam metalotioneínas após intoxicação com mercúrio e cádmio, sendo que esta expressão diminui a ação tóxica causada por estes metais. Existem quatro isoformas conhecidas de metalotioneínas, sendo todas elas expressas no SNC (BAUMAN & KLASSEN, 1993, STANKOVIC et al., 2003).

O mecanismo molecular pelo qual o mercúrio inorgânico causa neurotoxicidade não está bem esclarecido, sobretudo no que concerne a passagem da barreira hematoencefálica. Um dos possíveis mecanismos foi proposto por Szumafiska et al., (1993) no qual o mercúrio inorgânico causa dano na atividade da Na/K ATPase na microcirculação do tecido cerebral.

A maioria dos estudos sobre a neurotoxicidade do mercúrio inorgânico são com modelos experimentais pré ou pós-natais, devido à imaturação da barreira hematoencefálica. A literatura reporta que as proles intoxicadas durante o período de gestação ou nos primeiros dias de vida possuíam alterações neurocomportamentais, neuromotoras e sensoriais. Associado a isso, verificou-se aumento do estresse oxidativo e presença de depósitos de mercúrio nos tecidos neuronais analisados (SCZÁZ et al., 2002; HUANG et al., 2011; CHEMIHI et al., 2012).

Um dos poucos estudos encontrados na literatura sobre a intoxicação com mercúrio inorgânico em animais adultos foi realizado por Mello-Carpes et al., (2013). Os resultados do estudo sugerem que uma exposição longa com baixas doses induz déficits de memória e danos na memória aversiva e na de reconhecimento.

## 1.8. HIPÓTESE E DELINEAMENTO DA PERGUNTA EXPERIMENTAL

Mediante os dados disponíveis na literatura consultada, modelos de exposição usando mercúrio inorgânico em ratos são escassos, e quando

utilizados, não se buscou avaliar em uma mesma investigação, os efeitos de uma baixa dose em um tempo prolongado, possíveis alterações na função e morfologia e bioquímica no SNC de organismos adultos. O que se encontra são pesquisas voltadas ao diagnóstico em proles pré e pós-natais, visto que o mesmo consegue atravessar a barreira placentária e a barreira hematoencefálica imatura.

Já está esclarecido na literatura que o ser humano é exposto ao mercúrio inorgânico tanto em sua vida cotidiana como em determinadas ocupações. Reconhecer os prováveis danos que esta espécie mercurial pode promover na saúde é de suma importância, visto que ainda utiliza-se esta espécie mercurial para fins industriais, com a provável noção que o mesmo é menos inócuo do que o mercúrio orgânico ou elementar (estes que são mais estudados).

Diante disso, este estudo parte da hipótese que o mercúrio inorgânico (no caso, o cloreto de mercúrio) em um modelo de exposição crônica e em baixas doses que simula o que ocorre em áreas contaminadas é capaz de promover depósitos de mercúrio no córtex motor, além de alterações motoras, teciduais e bioquímicas nesta região do SNC.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as alterações no córtex motor de ratos adultos submetidos a um modelo de exposição crônica com pequenas doses de mercúrio inorgânico.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o desempenho motor em animais expostos com mercúrio inorgânico;
- Avaliar o padrão neurodegenerativo (sobrevivência/densidade neuronal e astrocitária, citotoxicidade e indução de apoptose) desencadeados perante o modelo de exposição proposto;
- Determinar as concentrações de mercúrio depositadas no parênquima neural do córtex motor após período de exposição;
- Avaliar a bioquímica oxidativa no córtex motor de ratos expostos ao mercúrio inorgânico.

### **3. ARTIGOS**

Os resultados aqui apresentados foram publicados na revista *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Teixeira et al., 2014, 11, 9171-9185; doi:10.3390/ijerph110909171, fator de impacto 2.035, QUALIS B2 – APÊNDICE 1). Parte dos dados serão submetidos a revista *Biochemical Pharmacology* (fator de impacto 5.091, QUALIS A1 - APÊNDICE 2).

### **4. APÊNDICE 1**

Artigo intitulado “Evaluation of the Effects of Chronic Intoxication with Inorganic Mercury on Memory and Motor Control in Rats” publicado na revista *International Journal of Environmental Research and Public Health* ((Teixeira et al., 2014, 11, 9171-9185; doi:10.3390/ijerph110909171).

Article

## Evaluation of the Effects of Chronic Intoxication with Inorganic Mercury on Memory and Motor Control in Rats

Francisco B. Teixeira <sup>1</sup>, Rafael M. Fernandes <sup>1</sup>, Paulo M. A. Farias-Junior <sup>1</sup>, Natacha M. M. Costa <sup>1</sup>, Luanna M. P. Fernandes <sup>2</sup>, Luana N. S. Santana <sup>1</sup>, Ademir F. Silva-Junior <sup>1</sup>, Marcia C. F. Silva <sup>1</sup>, Cristiane S. F. Maia <sup>2</sup> and Rafael R. Lima <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará 66075-900 Belém-Pará Brazil; E-Mails: teixeira.f.bruno@gmail.com (F.B.T.); faelfernandes@gmail.com (R.M.F.); paulo.junior@ics.ufpa.br (P.M.A.F.-J.); natacha\_malu@hotmail.com (N.M.M.C.); luana\_inss@yahoo.com.br (L.N.S.S.); ademirjunior@ufpa.br (A.F.S.-J.); marciaf@ufpa.br (M.C.F.S.)

<sup>2</sup> Laboratory Pharmacology of Inflammation and Behavior, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará 66075-900 Belém-Pará Brazil; E-Mails: luannafe@hotmail.com (L.M.P.F.); crismaia@ufpa.br (C.S.F.M.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rafalima@ufpa.br or rafaelrodrigueslima@hotmail.com; Tel.: +55-91-3201-7102; Fax: +55-91-3201-7568.

*Received: 21 July 2014; in revised form: 19 August 2014 / Accepted: 28 August 2014 /*

*Published: 5 September 2014*

---

**Abstract:** The aims of this study were to evaluate whether chronic intoxication with mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>), in a low concentration over a long time, can be deposited in the central nervous tissue and to determine if this exposure induces motor and cognitive impairments. Twenty animals were intoxicated for 45 days at a dose of 0.375 mg/kg/day. After this period, the animals underwent a battery of behavioral tests, in a sequence of open field, social recognition, elevated T maze and rotarod tests. They were then sacrificed, their brains collected and the motor cortex and hippocampus dissected for quantification of mercury deposited. This study demonstrates that long-term chronic HgCl<sub>2</sub> intoxication in rats promotes functional damage. Exposure to HgCl<sub>2</sub> induced anxiety-related responses, short- and long-term memory impairments and motor deficits. Additionally, HgCl<sub>2</sub> accumulated in both the hippocampus and cortex of the brain with a higher affinity for the cortex.



**Keywords:** mercury; mercury chloride; toxicology

---

## 1. Introduction

Mercury is a heavy metal that can be found in the environment in three species: (i) elemental mercury or metallic mercury ( $\text{Hg}^0$ ); (ii) inorganic mercury (*i.e.*, mercuric chloride,  $\text{HgCl}_2$ ); and (iii) organic mercury (methylmercury, MeHg), which is the most common form of intoxication in humans. However, MeHg is gradually metabolized to inorganic mercury by intestinal microflora at a low rate per day [1].

Inorganic mercury has been used for many years in medications, teething powders, skin creams and germicidal solutions, exposing humans to its toxicological effects [2]. Paresthesia, fatigue, progressive weakness and neuropsychiatric disorders have been reported as nervous system symptoms related to inorganic mercury exposure [3,4].

Despite its low liposolubility, inorganic mercury can be detected in the brain, disrupting neuronal homeostasis [5]. The exact mechanism that underlies its accumulation in the nervous system, as well as its effects after chronic exposure are poorly understood. Szumafiska *et al.* [6] reported that disruption in Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels is a possible pathway for inorganic mercury absorption by the central nervous system (CNS).

Although organic mercury is the most important mercuric toxicant for humans and its effects have been extensively studied [7], more reactive mercuric inorganic compounds can accumulate in the body, inducing CNS damage [8]. Therefore, organic and inorganic mercury are the two principal chemical forms in the toxicology of mercury and its effects in the CNS.

The aim of the present study was to determine whether chronic inorganic mercury exposure during late adulthood induces motor and cognitive impairments. We also studied the content of mercury that crossed the blood-brain barrier and deposited in the hippocampus and cortex areas and correlated this with the behavioral responses observed.

## 2. Methods

### 2.1. Ethics Statement

The animal protocols used in this work were evaluated and approved by the Ethics Committee on Experimental Animals of the Federal University of Pará (Protocol BIO139-13). They are in accordance with NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and national law for laboratory experimentation (Law No. 18.611).

### 2.2. Animals and Experimental Groups

Male Wistar rats ( $n = 20$ ; 150 days old) were obtained from the Federal University of Pará (UFPA) and kept in collective cages (five animals per cage). Animals were maintained in a climate-controlled room on a 12-h reverse light/dark cycle (lights on 7:00 a.m.), with food and water *ad libitum*. The animals were orally administered (gavage) distilled water or mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) (dose of

0.375 mg/kg/day) over a period of 45 days (*i.e.*, until the 195th day of life), according to a procedure previously described by Szasz *et al.* [9]. A daily dose of HgCl<sub>2</sub> starting at 0.375 mg/kg/day reflects intoxication at low doses for long periods and the probability of human exposure levels in mercury contaminated areas [10].

### 2.3. Behavioral Assays

After 24 h of HgCl<sub>2</sub> or distilled water administration, animals were subjected to the room assay and acclimated for 1 h before the behavioral experiments, with attenuation of noise levels and low illumination (12 lux).

All animals performed a battery of behavioral tests, in a sequence of open field, social recognition, elevated T maze and rotarod tests with 60-min intervals.

### 2.4. Open Field

The animals were placed for 5 min in an open-field arena. The apparatus, made of wood covered with impermeable Formica, had a white floor of 100 × 100 cm (divided by black lines into 25 squares of 20 × 20 cm) and 40-cm high white walls. Each rat was placed at the center of the open field and free to explore the unfamiliar arena; the total number of squares crossed and rearing were measured [11]. The quadrant was considered crossed when the animal had four paws in the adjacent square.

### 2.5. Social Recognition

Short-term social memory was assessed with the social recognition task described by Dantzer *et al.* [12] and previously evaluated in our laboratory [13]. All juveniles (male Wistar rats of 25 days old) were isolated in individual cages for 20 min prior to the beginning of the experiment. The test consisted of two successive 5-min presentations separated by 30 min, where the juvenile rat was placed in the home cage of the adult rat. The time spent by the adult to investigate the juvenile (nosing, sniffing, grooming or pawing) during both presentations was measured. At the end of the first presentation, the juvenile was removed and kept in an individual cage during the delay period and reintroduced into the home cage of the same adult rat for the second presentation. According to Dantzer *et al.* [12], if the delay period is less than 40 min, the adult rats display recognition of this juvenile, as indicated by a significant reduction in the social investigation time during the second presentation. Time spent in social investigation by the adult rat was measured and then expressed for each animal as the ratio of the second exposure to the first exposure (ratio of investigation duration (RID)). A reduction in RID reflects a decrease in investigation behavior during the second encounter, demonstrating the recognition ability of the adult rat. This transformation was chosen in order to minimize day-to-day variations in the baseline of performance and to equalize variances among different groups [12,13].

### 2.6. Elevated T Maze (ETM) Test

The equipment originated consisted of a T-shaped wooden maze with two opposite open arms (50 × 10 cm) and one enclosed arm (50 × 10 × 40 cm), spreading out from a central platform of

10 × 10 cm, elevated to a height of 50 cm from the floor and internally painted with an impermeable dark epoxy resin to avoid urine impregnation.

In accordance with Takahashi *et al.* [14] and Maia *et al.* [15], each animal was placed at the end of the enclosed arm facing the open space. To measure inhibitory avoidance acquisition (learning function), rats were allowed to explore the enclosed arm of the maze as many times as necessary to comply with the avoidance criterion, which determined that animals should remain there for 300 s. When a rat placed all four paws onto one of the open arms, the trial ended, and the animal was returned to the arena for 30 s. After 24 h, the animals were subjected to two subsequent enclosed arm trials (called test (long-term memory) and retest (priming memory)), with a 30-s interval between trials. The number of trials required for inhibitory avoidance acquisition and avoidance latency test and retest was measured.

### 2.7. Rotarod Test

The rotarod apparatus (Insight Scientific Equipments, SP, Brazil) consists of a grooved metal roller (8 cm in diameter) and separated 9-cm wide compartments elevated 16 cm. As a part of the test procedure, animals were initially trained to maintain themselves on the rotating rod at 8 rotations per minute (RPM) for 2 min (habituation phase). Subsequently, after a period of 24 h, animals were evaluated for their ability to remain on the rotating rod for five successive trials of 3 min each, starting at 16 RPM and increasing to 20, 25, 28 and 37 RPM in the next sessions, respectively. The lapse of 60 s was maintained between each session (adapted from Sharma *et al.* [16]). The latency of the first fall and total number of falls at each session were measured.

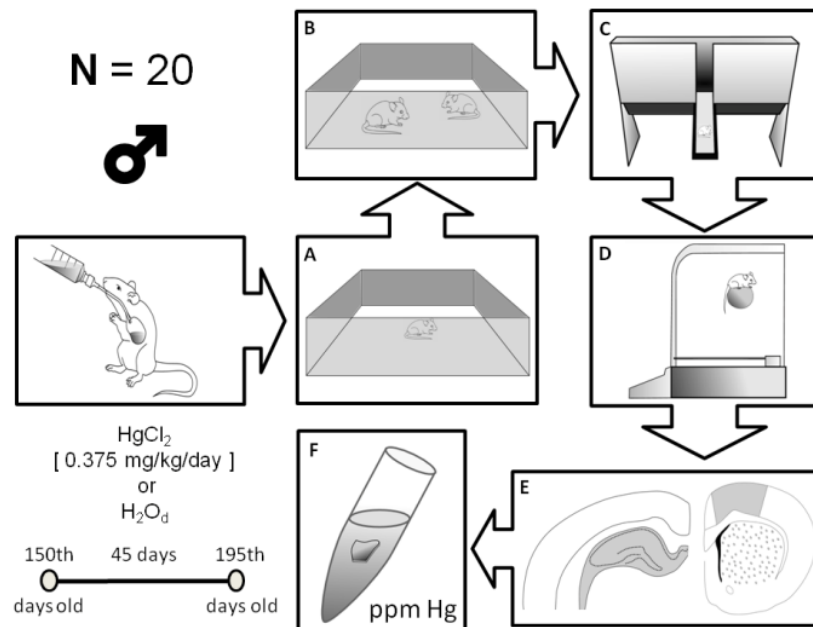
### 2.8. Mercury Measurements

After the behavioral assays, animals were sacrificed by cervical dislocation, and their brains were immediately removed. The hippocampus and cortex were removed and submitted to dry ice. Briefly, a homogenized sample was weighed (0.5 g maximum of wet weight) in a sample digestion bottle, and 1 mL of distilled water, 2 mL of nitric acid-perchloric acid 1 + 1 (HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>) and 5 mL of sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were sequentially added, followed by heat treatment on a hot plate (200–230 °C) for 30 min. The final volume (50 mL) was completed by distilled water. Then, the extracts were transferred to 0 and 1.0 mL of methylmercury-cysteine solution (0.10 µg Hg/ml) in two sample digestion bottles (corresponding to 0 and 0.10 µg Hg), and 1 mL of distilled water was added to only the former (the blank) followed by 2 mL of HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> (1 + 1) and 5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In order to obtain blank and standard test solutions for the measurement of total mercury, the same procedure for the sample test solution was followed. Total mercury content in the samples was estimated by wet digestion, reduction and cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) (Semi-automated Mercury Analyzer, model Hg-201, Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tokyo, Japan); the circulation-open air flow system was as previously described by Akagi *et al.* [17]. This involves the reduction of Hg<sup>2+</sup> ions in the sample test solution with stannous chloride to generate elemental mercury vapor (Hg<sup>0</sup>); and the insertion of mercury vapor into the photo-absorption cell for the measurement of absorbance at 253.7 nm. Mercury measurements were calculated by the following formula [17]: total mercury

concentration in the sample ( $\mu\text{g/g}$ ) =  $0.10 \mu\text{g} \times (\text{test sample} - \text{blank sample}) / (\text{standard sample} - \text{blank sample}) \times \text{dilution factor} \times 1 / \text{sample weight (g)} \times \text{ratio of wet weight/dry weight}$ .

All analyses were conducted in duplicates of the group tissue samples, and the values obtained ranged from a confidence interval of  $\pm 10\%$  ( $r: 0.9992$ ). The methodology is summarized in Figure 1.

**Figure 1.** Schematic representation of the experimental design utilized in the present study. (A) Open field; (B) social recognition apparatus; (C) elevated T maze; (D) rotarod; (E) hippocampus on the left and motor cortex on the right; (F) sample to measure mercury.



## 2.9. Statistical Analysis

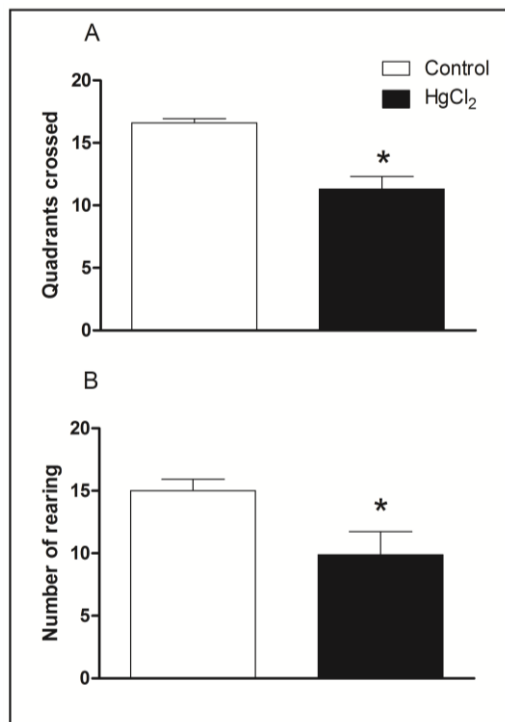
All values are expressed as the means  $\pm$  SEM ( $n = 10$  animals per group) for the behavioral assays. Statistical comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test for behavioral analyses and one-way ANOVA followed by Tukey's test for mercury measurements. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) software was used for all analyses.

## 3. Results

### 3.1. Chronic $\text{HgCl}_2$ Exposure during Late Adulthood Induces Deficits on Spontaneous Locomotor Activity in Rats

Figure 2 illustrates spontaneous locomotor activity evaluated in the open field arena by chronic  $\text{HgCl}_2$  exposure. The Student's *t*-tests revealed that  $\text{HgCl}_2$ -treated animals displayed a reduced locomotor activity in both horizontal and vertical exploration in the open field. The total number of squares crossed by  $\text{HgCl}_2$  group was lower than that of the control group ( $p < 0.05$ , Figure 2A). Chronic  $\text{HgCl}_2$  exposure also decreased the number of rearing in rats in the unfamiliar arena ( $p < 0.01$ , Figure 2B).

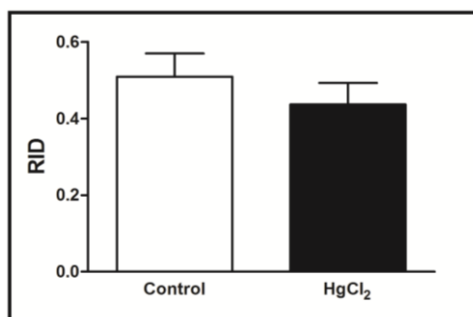
**Figure 2.** Effects of HgCl<sub>2</sub> administration (0.375 mg/kg/day) for 45 days on the locomotor activity of male Wistar rats evaluated in the open field (5 min). The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the: (A) total quadrants crossed; (B) number of rearing. \*  $p < 0.05$  compared to control group (Student's  $t$ -test).



### 3.2. Learning, Short- and Long-Term Memory Impairments Induced by Chronic HgCl<sub>2</sub> Exposure during Late Adulthood in Rats

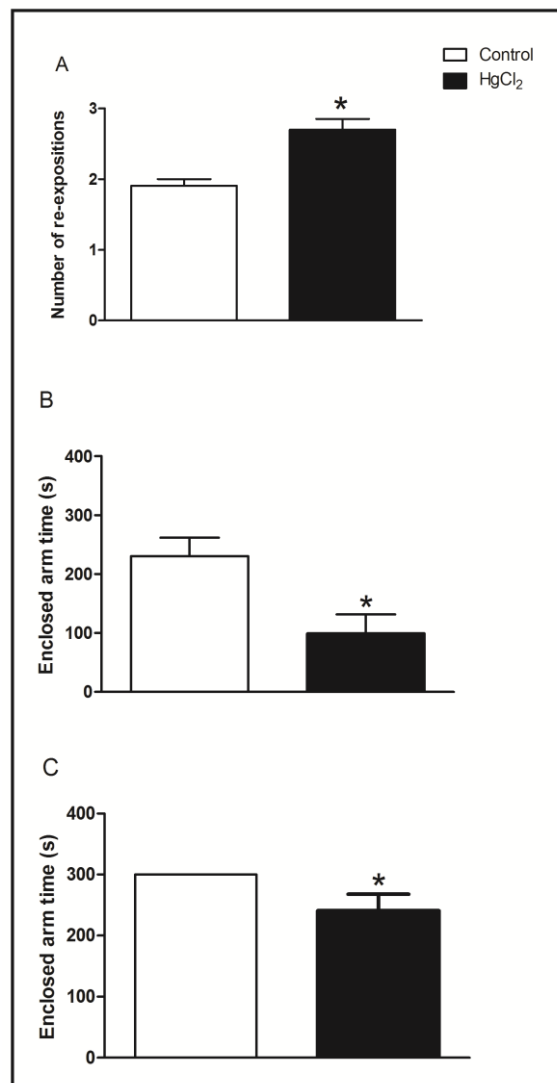
The effects of chronic HgCl<sub>2</sub> administration during senescence on the male rats' social recognition memory evaluated in the social recognition task are illustrated in Figure 3. The Student's  $t$ -test revealed that chronic HgCl<sub>2</sub> exposure during adulthood did not alter implicit social recognition ability ( $p > 0.05$ ), observed in RID when the same juvenile was re-exposed 30 min after the first encounter.

**Figure 3.** Effects of HgCl<sub>2</sub> administration (0.375 mg/kg/day) for 45 days on the social recognition memory of male Wistar rats. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of RIDs (ratio of investigation duration; *i.e.*, the ratio of the second exposure to the first exposure) when the same juvenile was re-exposed after an interval of 30 min.



The effects of chronic HgCl<sub>2</sub> administration during late adulthood on the learning, short- and long-term memory evaluated in the elevated T maze task are illustrated in Figure 4.

**Figure 4.** Effects HgCl<sub>2</sub> administration (0.375 mg/kg/day) for 45 days on the learning, short- and long-term memory of male Wistar rats evaluated in the elevated T maze (ETM) test. The results are expressed as the mean ± SEM of the: (A) number of re-expositions (learning function); (B) time in seconds in the enclosed arms for the first time test of long-term memory; and (C) time in seconds in the enclosed arms for the first time test of short-term memory. \*  $p < 0.05$  compared to control group (Student's *t*-test).



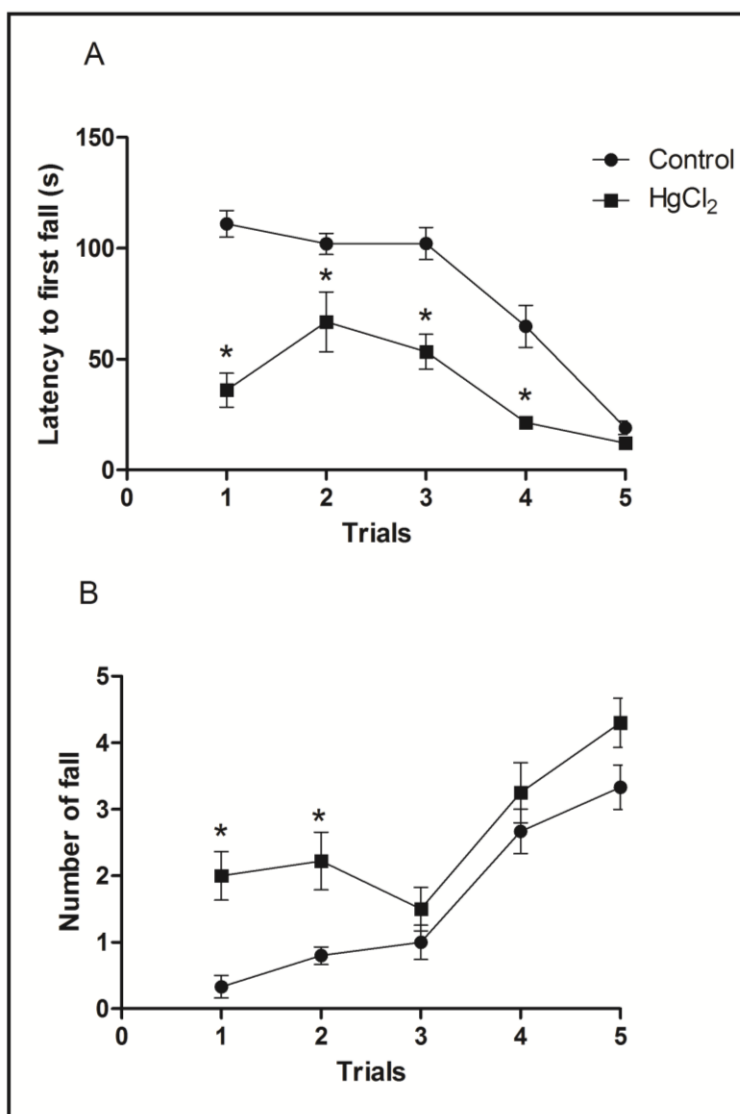
Statistical comparisons revealed that HgCl<sub>2</sub> administration during senescence induced a significant increase in the number of re-expositions to achieve inhibitory avoidance, indicating significant impairments to learning compared with the control group ( $p < 0.05$ , Figure 4A). Panel 4B represents the test and 4C the retest conducted 24 h after the exposures. In the test session related to long-term memory and the retest session related to short-term memory ( $p < 0.05$ ), the mercury-intoxicated group reduced enclosed-arm time compared to the control group. This indicates that intoxicated animals had damage in these two types of memory.

### 3.3. Chronic HgCl<sub>2</sub> Exposure during Late Adulthood Promotes Alterations in Motor Function

In order to evaluate balance and coordination, the animals were tested in the rotarod apparatus. During test sessions, animals were subjected five times to the gyrotory cylinder at increasing speeds (16, 20, 25, 28 and 37 RPM) with 60-s intervals between the sessions. The parameters observed were the latency and number until the first fall [16].

Figure 5A shows that the HgCl<sub>2</sub> group reduced the latency until the first fall at speeds of 16, 20, 25 and 28 RPM when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The latency of the intoxicated animals group was only restored in the last test session ( $p > 0.05$ ). The HgCl<sub>2</sub> group had an increased number of falls across the rotation increment in the two first sessions ( $p < 0.05$ ) when compared to the control group, which was recovered in the next rotation sessions ( $p > 0.05$ ) (Figure 5B).

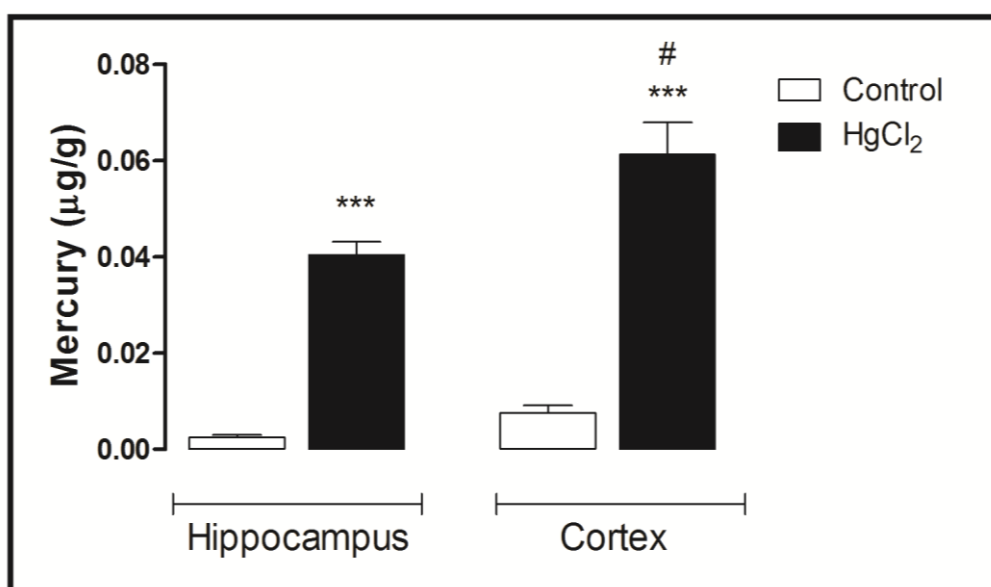
**Figure 5.** Effects of HgCl<sub>2</sub> administration (0.375 mg/kg/day) for 45 days on the motor function of male Wistar rats evaluated in the rotarod apparatus. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of the: (A) latency in seconds to the first fall; and (B) number of falls. \*  $p < 0.05$  compared to the control group (Student's *t*-test).



### 3.4. Mercury Deposition Is Higher in the Cortex than Hippocampus after Chronic Intoxication during Late Life in Rats

Figure 6 displays the mercury concentrations in the hippocampus and cortex of rats (after 45 days of intoxication). Note that the mercury concentration in the hippocampus and cortex is more than that in the control group. Indeed, ANOVA followed by Tukey's test indicates that the mercury concentration is higher in the cortex than in the hippocampus region ( $p < 0.001$ ).

**Figure 6.** Effects of  $\text{HgCl}_2$  administration (0.375 mg/kg/day) for 45 days on mercury ( $\mu\text{g/g}$ ) deposition in the cortex and hippocampus of male Wistar rats. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the control group; # compared cortex to hippocampus intoxicated groups (one-way ANOVA followed by Tukey's test).



## 4. Discussion

This study demonstrates, for the first time, that long-term chronic  $\text{HgCl}_2$  intoxication in rats during senescence promotes functional damage. Chronic  $\text{HgCl}_2$  exposure induced anxiety-related responses, short- and long-term memory impairments and motor deficits, as evaluated by different behavioral tests (open field, social recognition, elevated T maze and rotarod). Additionally, it was observed that  $\text{HgCl}_2$  accumulates in both the hippocampus and cortex regions, but has a higher affinity for the cortex.

During the last few years, our group has extensively studied the long-lasting consequences of mercury intoxication during the prenatal period [15,18,19]. In this work, our hypothesis was that inorganic mercury exposure during adulthood also promotes functional impairment.

Mercury is able to induce distinct neurotoxic effects that depend on its chemical form (organic compounds, elemental mercury vapor or inorganic salts) [19,20]. It is well documented that organic mercury easily crosses the blood-brain barrier (BBB), and inorganic mercury salts (*i.e.*,  $\text{HgCl}_2$ ) that are lipid insoluble, which could impede BBB penetration, are detected in the CNS following a single [21] or repeated *i.p.* administration [22]. These studies are in accordance with our results that detected



mercury in both the hippocampus (medium 0.04  $\mu\text{g/g}$ ) and cortex (medium 0.06  $\mu\text{g/g}$ ) of rat brains. Interestingly, our results highlight that mercury has a higher affinity for the cortex than the hippocampus.

The possible mechanism involved in  $\text{HgCl}_2$  transport through the BBB implies an indirect effect resulting from interference with the activities of cerebrovascular enzymes involved in BBB transport. In fact, Szumafiska *et al.* [6] showed the effect of acute doses of  $\text{HgCl}_2$  (6 mg/kg) on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity in the neuropil of all of the cerebral cortical layers, which impairs BBB ion movement across the membrane even after a single dose of inorganic mercury. In addition, Moller-Madsen [21] demonstrated that after i.p. administration of  $\text{HgCl}_2$ , mercury was detected in the cortical layer, but not after oral administration [23]. However, Pamphlett and Hum [24] detected mercury deposits in lower motor neurons, but not in corticomotor neurons after inorganic mercury intoxication in rodents. The uptake of mercury seems to be through striated muscle and neuromuscular junctions, and finally, it is retrogradely transported to lower motor neuron cell bodies by their axons [25].

Despite claims that  $\text{HgCl}_2$  concentrations under 1  $\mu\text{g/g}$  are not toxic to *in vitro* cultured CNS tissues [26,27], our results affirm that lower concentrations of  $\text{HgCl}_2$  induce behavioral and cognitive impairment.

In this sense, our current findings suggest that chronic  $\text{HgCl}_2$ -treated animals reduced locomotor exploratory activity in both horizontal and vertical exploration in the open field related to 0.06  $\mu\text{g/g}$  of mercury concentration in cortex tissue. In addition, in the forced motor task (rotarod apparatus), inorganic mercury induced motor learning and coordinating impairment, reducing the latency until the first fall during four sessions, which was restored only in the last phase of the test. In accordance with our results, neurodevelopmental studies demonstrated that exposure to  $\text{HgCl}_2$  in the early postnatal days induced impairments in motor function and muscular strength, as well as reductions of locomotor and exploratory activities [28,29]. On the contrary, Yasutake *et al.* [30] demonstrated that after three weeks of intracerebroventricular injection of inorganic mercury, rodents increased spontaneous locomotor activity in the open field apparatus, indicating that  $\text{Hg}^{2+}$ -induced hyperactivity was recovered three months after mercury exposure. These contradictory results may be explained by the administration protocol and age of the animals, since we adopted animals at 150 days old that were intoxicated until 195 days of life, which is mimetic of late adulthood and aged periods. It is well documented that ageing reduces motor performance and cognitive functions [31,32], which could be exacerbated by mercury poisoning.

The motor cortex has long been viewed to play an important role in fine motor control and fractionation of movement [33,34], sensorimotor integration and higher order cognitive-motor movements [35]. There are also other studies showing the role of motor cortex in the performance of behavioral tasks utilized in the current study [36–38], as well as showing that alterations on motor cortex can be associated with impaired spontaneous locomotion and incoordination in rodents [39–41].

Cognitive dysfunction was also observed in our work. Learning, short- and long-term memory were reduced in social recognition and T maze tests related to 0.04  $\mu\text{g/g}$  content of mercury in the hippocampus. Previous works have elucidated that distinct forms of memory are mediated by different CNS regions, such as the primary cortex (*i.e.*, prefrontal cortex-PFC) and limbic structures (*i.e.*, hippocampus). These forms can be classified as declarative or explicit, defined by the ability to recall past events deliberately, and are hippocampus-dependent; and non-declarative or procedural (also called implicit), defined by unconsciously performed skills (motor or cognitive) that are mainly

dependent on the striatum and cerebellum [42,43]. Of high importance, PFC plays a pivotal role, since it receives projections from both motor and sensory areas that are crucial for learning and is an intricate neuroanatomical correlation [44]. On the other hand, the hippocampus is involved in anxiety-like behaviors, as well as in memory and learning processes, as a result of its connections with other limbic areas involved in emotional behaviors [45,46]. Our results are in accordance with Yasutake and colleagues [30], which infer that acute doses of inorganic mercury induced cognitive damage in mice.

In the current chronic inorganic mercury intoxication protocol, we suggest that observed behavioral disabilities were related, at least in part, by the cortical and hippocampal mercury content that may interfere with local homeostasis. Considering the high bonding affinity between mercury and sulfur compounds (*i.e.*, thiol groups of proteins, peptides and amino acids), interactions of mercury compounds with proteins in the CNS may explain some of their effects on neurotransmission. Mercury micromolar concentrations inhibited cholinergic, glutamatergic, GABAergic and dopaminergic systems [47–51], affecting both behavior and cognition. It is well established that cognitive and motivational processes depend on the connections between PFC and limbic structures, which are dependent on the neurotransmitters cited above, and the hippocampus plays a key role in the functioning of these pathways [43].

## 5. Conclusions

In conclusion, our results provide new evidence that exposure to inorganic mercury during late adulthood induces motor and cognitive impairments associated with low mercury content in cortex and hippocampus structures. Of significance are the current findings indicating that even under *in vitro* cytotoxic effects, CNS micromolar concentrations of mercury induce behavioral and motor dysfunction after chronic exposure in late adulthood. The mechanisms involved in the observed neurobehavioral consequences include disruption to the blood brain barrier, mainly the damage activity of Na/K ATPase found in brain microvessels; however, the completed mechanism should be investigated in future research, but the present data provide promising evidence that inorganic mercury can also promote neurotoxic effects, even in the mature brain.

## Acknowledgments

The authors thank the Núcleo de Medicina Tropical, Federal University of Pará for allowing the use of their infrastructure for the quantification of mercury. Francisco Bruno Teixeira was supported by a Brazilian Government/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Francisco B. Teixeira, Marcia C. F. Silva, Cristiane S. F. Maia, Rafael R. Lima. Performed the experiments: Francisco B. Teixeira, Rafael M. Fernandes, Luana N. S. Santana, Luanna M. P. Fernandes, Natacha M. M. Costa, Paulo M. A. Farias-Junior, Ademir F. Silva-Junior. Analyzed the data: Francisco B. Teixeira,

Marcia C. F. Silva, Cristiane S. F. Maia, Rafael R. Lima. Contributed reagents/materials/analysis tools: Francisco B. Teixeira, Marcia C. F. Silva, Cristiane S. F. Maia, Rafael R. Lima. Wrote the paper: Francisco B. Teixeira, Marcia C. F. Silva, Cristiane S. F. Maia, Rafael R. Lima, Rafael M. Fernandes, Luana N. S. Santana, Luanna M. P. Fernandes, Natacha M. M. Costa, Paulo M. A. Farias-Junior, Ademir F. Silva-Junior.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Bernhoft, R.A. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. *J. Environ. Public Health* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/460508.
2. Goldman, L.R.; Shannon, M.W. American Academy of Pediatrics: Committee on Environmental Health Technical report: Mercury in the environment: Implications for pediatricians. *Pediatrics* **2001**, *108*, 197–205.
3. Dyll-Smith, D.J.; Scurry, J.P. Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. *Med. J. Aust.* **1990**, *153*, 409–415.
4. Weldon, M.M.; Smolinski, M.S.; Maroufi, A.; Hasty, B.W.; Gilliss, D.L.; Boulanger, L.L.; Dutton, R.J. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. *West. J. Med.* **2000**, *173*, 15–18.
5. Clarkson, T.W.; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 609–662.
6. Szumafiska, G.; Gadamski, R.; Albrecht, J. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: Histochemical demonstration with light and electron microscopy. *Acta Neuropathol.* **1993**, *86*, 65–70.
7. Rice, K.M.; Walker, E.M., Jr.; Gillette, M.W.C.; Blough, E.R. Environmental mercury and its toxic effects. *J. Prev. Med. Public Health* **2014**, *47*, 74–83.
8. Smith, J.C.; Allen, P.V.; Turner, M.D.; Most, B.; Fisher, H.L.; Hall, L.L. The kinetics of intravenously administered methylmercury in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *128*, 251–256.
9. Szasz, A.; Barna, B.; Gajda, Z.; Galbacs, G.; Kirsch-Volders, M.; Szente, M. Effects of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 197–206.
10. Huang, C.; Liu, S.; Hsu, C.; Lin-Shiau, S. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercury chloride in developing offspring mice. *Toxicol. Lett.* **2009**, *201*, 196–204.
11. Cai, L.; Yan, X.B.; Chen, X.N.; Meng, Q.Y.; Zhou, J.N. Chronic all-trans retinoic acid administration induced hyperactivity of HPA axis and behavioral changes in young rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2010**, *20*, 839–847.
12. Dantzer, R.; Bluthé, R.M.; Koob, G.F.; le Moal, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology* **1987**, *91*, 363–368.

13. Prediger, R.D.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.* **2005**, *159*, 197–205.
14. Takahashi, R.N.; Pamplona, F.A.; Fernandes, M.S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci. Lett.* **2005**, *380*, 270–275.
15. Maia, C.S.F.; Ferreira, V.M.; Diniz, J.S.; Carneiro, F.P.; de Sousa, J.B.; Costa, E.D.; Tomaz, C. Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav. Brain Res.* **2010**, *211*, 191–197.
16. Sharma, D.J.; Sunkaria, A.; Bal, A.; Bhutia, Y.D.; Vijayaraghavan, R.; Flora, S.J.S.; Gill, K.D. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *240*, 208–218.
17. Akagi, H. Analysis of methylmercury in fish and shellfish by dithizone extraction-gas chromatography. *Jpn. J. Hyg.* **1985**, *40*, 293.
18. Maia, C.S.F.; Ferreira, V.M.; Kahwage, R.L.; do Amaral, M.N.; Serra, R.B.; Santos, S.N.; Nascimento, J.L.M.; Rodrigues, L.G.; Trévia, N.; Picanço-Diniz, C.W. Adult brain nitrenergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury. *Acta Histochem.* **2010**, *112*, 583–591.
19. Maia, C.S.F.; Lucena, G.M.; Correa, P.B.; Serra, R.B.; Matos, R.W.; Menezes, F.C.; Santos, S.N.; Sousa, J.B.; Costa, E.T.; Ferreira, V.M.M. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology* **2009**, *30*, 23–30.
20. Gallagher, P.J.; Mitchell, J.; Wheal, H.V. Identity of ultrastructural effects of mercuric chloride and methyl mercury after intracerebral injection. *Toxicology* **1982**, *23*, 261–266.
21. Maier, W.E.; Costa, L.G. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase as a and marker, respectively, for neurotoxicity: Studies with chlordecone, organotins and mercury compounds. *Toxicol. Lett.* **1990**, *51*, 175–188.
22. Moller-Madsen, B. Localization of mercury in CNS of the rat. II. Intraperitoneal injection of methylmercuric chloride (CH<sub>3</sub>HgCl) and mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *103*, 303–323.
23. Moller-Madsen, B.; Danscher, G. Localization of mercury in CNS of the rat I. Mercuric Chloride (HgCl<sub>2</sub>) per os. *Environ. Res.* **1986**, *41*, 29–43.
24. Pamphlett, R.; Jew, S.K. Uptake of inorganic mercury by human locus ceruleus and corticomotor neurons: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* **2013**, *1*, doi:10.1186/2051-5960-1-13.
25. Arvidson, B. A review of axonal transport of metals. *Toxicology* **1994**, *88*, 1–14.
26. Brookes, N.; Kristt, D.A. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl<sub>2</sub> and methylmercury in astrocytes: Selectivity and reversibility. *J. Neurochem.* **1989**, *53*, 1228–1237.
27. Choi, B.H.; Kim, R.C. The comparative effects of methylmercuric chloride and mercuric chloride upon DNA synthesis in mouse fetal astrocytes *in vitro*. *Exp. Mol. Pathol.* **1984**, *41*, 371–376.
28. Franciscato, C.; Goulart, F.R.; Lovatto, N.M.; Duarte, F.A.; Flores, E.M.; Dressler, V.L.; Peixoto, N.C.; Pereira, M.E. ZnCl<sub>2</sub> exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl<sub>2</sub>. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2009**, *27*, 459–468.

29. Franco, J.L.; Braga, H.C.; Nunes, A.K.; Ribas, C.M.; Stringari, J.; Silva, A.P.; Garcia Pomblum, S.C.; Moro, A.M.; Bohrer, D.; Santos, A.R.; *et al.* Lactational exposure to inorganic mercury: Evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol. Teratol.* **2007**, *29*, 360–367.
30. Yasutake, A.; Marumoto, M.; Yoshida, M. Neurotoxic action of inorganic mercury injected in the intraventricular space of mouse cerebrum. *J. Toxicol. Sci.* **2010**, *35*, 767–771.
31. Skinner, H.B.; Barrack, R.L.; Cook, S.D. Age-related decline in proprioception. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1984**, *184*, 208–211.
32. Sturnieks, D.L.; St George, R.; Lord, S.R. Balance disorders in the elderly. *Neurophysiol. Clin.* **2008**, *38*, 467–478.
33. Asanuma, H. Cerebral cortical control of movement. *Physiologist* **1973**, *16*, 143–166.
34. Evarts, E.V.; Fromm, C.; Kroller, J.; Jennings, V.A. Motor cortex control of finely graded forces. *J. Neurophysiol.* **1983**, *49*, 1199–1215.
35. Sanes, J.N.; Donoghue, J.P. Plasticity and primary motor cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 393–415.
36. Stigger, F.; Lovatel, G.; Marques, M.; Bertoldi, K.; Moysés, F.; Elsner, V.; Siqueira, I.R.; Achaval, R.; Marcuzzo, S. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2013**, *31*, 820–827.
37. Carmel, J.B.; Martin, J.H. Motor cortex electrical stimulation augments sprouting of the corticospinal tract and promotes recovery of motor function. *Front. Integr. Neurosci.* **2014**, *8*, doi:10.3389/fnint.2014.00051.
38. Karl, T.; Pabst, R.; Von Hörsten, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2003**, *55*, 69–83.
39. Helfer, J.L.; Calizo, L.H.; Dong, W.K.; Goodlett, C.R.; Greenough, W.T.; Klintsova, A.Y. Binge-like postnatal alcohol exposure triggers cortical gliogenesis in adolescent rats. *J. Comp. Neurol.* **2009**, *514*, 259–271.
40. Oliveira, G.B.; Fontes, E.D.; de Carvalho, S.; da Silva, J.B.; Fernandes, L.M.; Oliveira, M.C.; Prediger, R.D.; Gomes-Leal, W.; Lima, R.R.; Maia, C.S. Mynocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. *Brain Res.* **2014**, *1561*, 23–34.
41. Teixeira, F.B.; Santana, L.N.; Bezerra, F.R.; de Carvalho, S.; Fontes-Júnior, E.A.; Prediger, R.D.; Crespo-López, M.E.; Maia, C.S.; Lima, R.R. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One* **2014**, *26*, doi:10.1371/journal.pone.0101074.
42. Packard, M.G.; McGaugh, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. *Behav. Neurosci.* **1992**, *106*, 439–446.
43. McDonald, R.J.; White, N.M. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* **1993**, *107*, 3–22.
44. Middleton, F.A.; Strick, P.L. Basal-ganglia “projections” to the prefrontal cortex of the primate. *Cereb. Cortex* **2002**, *12*, 926–935.

45. Moser, E.; Moser, M.B.; Andersen, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 3916–3925.
46. Bannerman, D.M.; Rawlins, J.N.; McHugh, S.B.; Deacon, R.M.; Yee, B.K.; Bast, T.; Zhang, W.N.; Pothuizen, H.H.; Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus: Memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* **2004**, *28*, 273–283.
47. Bondy, S.C.; Agrawal, A.K. The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Arch. Toxicol.* **1980**, *46*, 249–256.
48. Castoldi, A.F.; Candura, S.M.; Costa, P.; Manzo, L.; Costa, L.G. Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology* **1996**, *17*, 735–742.
49. Arakawa, O.; Nakahiro, M.; Narahashi, T. Mercury modulation of GABA-activated chloride channels and non-specific cation channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* **1991**, *551*, 58–63.
50. Rajanna, B.; Rajanna, S.; Hall, E.; Yallapragada, P.R. *In vitro* metal inhibition of N-methyl-d-aspartate specific glutamate receptor binding in neonatal and adult rat brain. *Drug Chem. Toxicol.* **1997**, *20*, 21–29.
51. Scheuhammer, A.M.; Cherian, M.G. Effects of heavy metal cations sulfhydryl reagents and other chemical agents on striatal D2 dopamine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 3405–3413.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 5. APÊNDICE 2

Artigo intitulado “A Exposição Crônica ao Mercúrio Inorgânico Promove Déficits Motores Associados à Morte Celular e Estresse Oxidativo no Córtex Motor de Ratos Adultos”, que corresponde a parte dos dados que serão submetidos a revista *Biochemical Pharmacology*.

A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO INORGÂNICO PROMOVE DÉFICITS  
MOTORES ASSOCIADOS À MORTE CELULAR E ESTRESSE OXDATIVO NO  
CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS

Francisco Bruno Teixeira<sup>1</sup>, Luana Ketlen Reis Leão<sup>1</sup>, Nathália Carolina Fernandes Fagundes<sup>1</sup>, Luana de Nazaré Silva da Santana<sup>1</sup>, Rafael Monteiro Fernandes<sup>1</sup>, Márcia Cristina Freitas da Silva<sup>1</sup>, Lilian Lund Amado<sup>2</sup>, Fernanda Espírito Santo Sagica<sup>3</sup>, Edivaldo Herculano Correa Oliveira<sup>3</sup>, Maria Elena Crespo-Lopez<sup>4</sup>, Cristiane Socorro Ferraz Maia<sup>5</sup>, Rafael Rodrigues Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil;

<sup>2</sup> Laboratório de Ecotoxicologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil;

<sup>3</sup> Laboratório de Cultura Celular e Citogenética, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil;

<sup>5</sup> Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Comportamento, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

\*Autor de Correspondência:

Rafael R. Lima, PhD

[rafalima@ufpa.br](mailto:rafalima@ufpa.br)

Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 66075-900, Belém- Pa- Brasil.



**Resumo**

O mercúrio é um metal tóxico que pode se apresentar no meio ambiente nas formas elementar, orgânica e inorgânica. O mercúrio inorgânico possui menor lipossolubilidade e logo menor absorção no organismo e passagem na barreira hematoencefálica. Por este motivo, modelos de exposição que utilizam o mercúrio inorgânico em ratos e que busquem avaliar seus efeitos no sistema nervoso central são raros, principalmente em indivíduos adultos. Diante disso, investigamos se o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), em um modelo de exposição crônica e em baixas concentrações é capaz de promover alterações motoras e desencadear estresse oxidativo, citotoxicidade celular e apoptose no córtex motor de ratos adultos. Para esta finalidade, ratos foram expostos por 45 dias em uma dose de 0.375 mg/kg/dia. Após este período, os animais foram submetidos à avaliação motora e em seguida, coletado o córtex motor para mensuração de mercúrio depositado no parênquima neural, avaliação e quantificação de citotoxicidade celular e apoptose e avaliação do balanço oxidativo. Além disso, foi realizada avaliação da densidade de neurônios maduros e astrócitos do córtex motor. Nossos resultados verificaram que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico promoveu diminuição do equilíbrio e da coordenação motora fina. Além disso, verificamos que este modelo de exposição promoveu a morte celular por citotoxicidade e indução de apoptose no córtex motor; diminuição do número de neurônios e de astrócitos; formação de depósitos de mercúrio e estresse oxidativo verificado pelo aumento da lipoperoxidação e da concentração de nitritos e diminuição da capacidade antioxidante total. Assim, nossos resultados fornecem evidências que a exposição ao mercúrio inorgânico, mesmo diante de sua baixa capacidade de atravessar barreiras biológicas, ainda assim é capaz de induzir alterações motoras associadas, morte celular por citotoxicidade e apoptose e estresse oxidativo no córtex motor de ratos adultos.

**Palavras-chave:** Mercúrio, cloreto de mercúrio, morte celular, estresse oxidativo, córtex motor, apoptose

## 1. Introdução

O mercúrio (Hg) é um metal pesado e está ranqueado como o terceiro elemento ou substância mais tóxica do planeta segundo a US Government Agency for Toxic Substances and Disease Registry [1]. Ele pode ser encontrado no meio ambiente em três espécies (i) mercúrio elementar ou mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ); (ii) mercúrio inorgânico (por exemplo, cloreto de mercúrio,  $\text{HgCl}_2$ ); e (iii) mercúrio orgânico (por exemplo, metilmercúrio, MeHg) [2].

Os compostos mercuriais são poluentes bioacumulativos e tóxicos, onde suas emissões antrópicas e naturais representam alto risco para a saúde humana, tornando-se assim uma preocupação global [3,4]. O mercúrio já é conhecido por induzir desastres de saúde pública como os que ocorreram na Baía de Minamata no Japão [5] e no Iraque [6,7].

As propriedades tóxicas, o comportamento biológico, a toxicocinética e as manifestações clínicas dos compostos de mercúrio estão diretamente relacionadas com as suas formas químicas [1,2]. O mercúrio orgânico é um dos tóxicos que possuem seus efeitos mais estudados na saúde humana [2]. Após ser ingerido, o mercúrio orgânico alcança a corrente sanguínea e atravessa a barreira hematoencefálica e em seguida é reduzido em mercúrio inorgânico, podendo assim, se depositar no sistema nervoso central [1,2]. Em contrapartida, o mercúrio inorgânico, devido sua baixa lipossolubilidade, e conseqüentemente, baixa absorção corporal e baixa passagem através da barreira hematoencefálica tem sido pouco estudado, principalmente em indivíduos adultos.

O mercúrio inorgânico tem sido utilizado por vários anos em medicações, cremes dermatológicos e soluções germicidas, expondo assim, o ser humano aos seus efeitos tóxicos. As exposições ocupacionais são as principais causas de intoxicação com mercúrio inorgânico [8]. A literatura sobre a intoxicação e a exposição com mercúrio inorgânico em humanos se mostra principalmente em relatos de casos clínicos [9,10,11].

O mercúrio inorgânico tem sido relatado como responsável por danos renais [12-15], hepáticos [16], no trato gastrointestinal [2], no sistema cardiovascular [17-20] e no sistema reprodutor [21,22]. Além disso, já é evidenciado que esta espécie mercurial atravessa a barreira placentária e causa alterações no feto [23,24].

A maioria dos estudos sobre a neurotoxicidade do mercúrio inorgânico são com modelos experimentais de diferentes etapas com o desenvolvimento cerebral (período gestacional, pré-nal ou pós-natal) [24,25,26], devido a imaturação da barreira hematoencefálica. No entanto, estudos em organismos adultos são escassos, [27,28].

Em nosso estudo anterior [28], verificamos que o mercúrio inorgânico é capaz de se depositar no parênquima neural e que este achado está associado a alterações funcionais. Nesta investigação, avaliamos as possíveis alterações que a exposição crônica com mercúrio inorgânico promove a nível comportamental, tecidual e bioquímico, a fim de propor os possíveis mecanismos e danos que este modelo pode proporcionar no organismo.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Declaração de Ética**

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEUA, Universidade Federal do Pará, Protocolo BIO139-13). Eles estão em conformidade com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e na legislação nacional para laboratório de experimentação [29].

### **2.2. Animais e Grupo Experimentais**

Ratos Wistar machos (n = 40; 90 dias de idade) foram obtidos a partir da Universidade Federal do Pará (UFPA) e mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola). Os animais foram mantidos em uma sala climatizada com ciclo de luz reverso claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00), com comida e água *ad libitum*. Água destilada ou cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) (dose de 0,375 mg/kg/dia) foram administrados por via oral (gavagem) ao longo de um período de 45 dias (ou seja, até o 135º dia de vida), de acordo com um procedimento anteriormente descrito por Teixeira et al. [28]. Os animais foram pesados semanalmente para ajuste de dose. O desenho experimental está sumarizado na figura 1.

### **2.3. Beam Walking Test**

A coordenação motora e o equilíbrio foram avaliados no teste do *beam walking*, que consiste em uma viga de madeira (100 cm) suspensa a 50 cm do chão, onde o

animal é colocado em uma posição inicial em uma extremidade da viga, onde na outra extremidade encontra-se uma plataforma segura (caixa fechada de 20 x 20 cm) a que os animais poderiam escapar. Inicialmente, os ratos foram aclimatados nas vigas de maior área de secção transversal (viga quadrada de 28 mm de diâmetro), limitando-se o tempo de 120 segundos para atravessar e alcançar a caixa. Depois, a fim de intensificar a dificuldade da tarefa, os animais foram submetidos a 2 tentativas (60s cada) em vigas quadradas (28, 12 e 5 mm de diâmetro) e circulares (28,17 e 11 mm de diâmetro), respectivamente [30]. Foram avaliados a latência (em segundos) para alcançar a caixa fechada e o número de falhas das patas traseiras [31].

Encerrado o teste comportamental os animais foram destinados a diferentes análises. 10 animais de cada grupo foram perfundidos e destinados a análise tecidual. Os outros 10 foram sacrificados por deslocamento, seus cérebros imediatamente removidos e o córtex motor dissecado e destinado às demais análises.

## **2.4. Avaliação Histológica**

### **2.4.1. Perfusão e Procedimentos Histológicos**

Após o teste motor, parte dos animais (n = 10 animais por grupo) foram profundamente anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg/kg, ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina a 0,9% heparinizada seguida por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M. A manipulação cirúrgica foi realizada somente após a abolição dos reflexos da córnea e da pata. Os cérebros foram removidos do crânio e pós-fixados durante 6 horas em solução de Bouin. Após esse período, os espécimes foram lavados com álcool a 50%, desidratados em soluções de álcool em concentrações progressivas, clarificados em xilol e embebidos em parafina.

### **2.4.2. Imunoistoquímica**

Secções de 5  $\mu$ m foram submetidas à análise imunoistoquímica. Os procedimentos de imunoistoquímica foram descritos em nossas investigações anteriores [32,33]. As amostras foram seccionadas em 5  $\mu$ m e colocadas em lâminas silanizadas. Em seguida, as lâminas foram desparafinadas em xilol e hidratadas em etanol em concentrações crescentes. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, seguida pelo bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de

hidrogênio a 3% em metanol por 20 min. As secções foram então lavadas em uma solução de PBS a 0,05% Tween durante 5 min por três vezes e incubadas com soro normal de cavalo a 10% em PBS(anti-NeuN) e soro de cabra (anti-GFAP) durante 1 h. Depois as secções foram então incubadas durante a noite com os anticorpos primários diluídos em PBS, anti-NeuN (1:500, Milipore, EUA) e anti-GFAP (1:1000, Sigma, EUA). Após este tempo, as secções foram lavadas em solução de PBS/Tween durante 5 min (3 vezes) e incubadas com os anticorpos secundários biotinizados *horse anti-mouse* (anti-NeuN) e *goat anti-rabbit* (GFAP) diluídos a 1:500 em PBS durante 2 h. As secções foram lavadas novamente durante 5 min (três vezes) e foram incubadas com o complexo avidina-biotina peroxidase (kit ABC, Vector Laboratories, EUA) durante 2 h. Por fim, as secções foram lavadas quatro vezes com PBS/Tween (5 min cada) e reveladas com Diaminobenzidine (DAB). Após a reação, os cortes foram lavados duas vezes em PB0.1M, desidratados e montados em lamínulas com Entellan (Merck, Alemanha).

#### 2.4.3. Análise Qualitativa e Quantitativa

Todas as secções foram inicialmente avaliadas por microscopia de luz. Imagens ilustrativas de todos os grupos experimentais foram obtidas com uma câmara digital acoplada a um microscópio. Utilizou-se cortes coronais contendo o córtex motor para contar o número de neurônios (células NeuN+) e astrócitos (células GFAP+) utilizando uma gradícula quadrada de  $0.0665\text{mm}^2$  acoplada a ocular do microscópio óptico (objetiva de 40x). Foi realizada a contagem de quatro campos por secção e duas secções por animal para os grupos controle e experimental. A metodologia detalhada da contagem encontra-se descrita em trabalhos publicados anteriormente [32,34,35].

### 2.5. Mensuração de Mercúrio Total

Para a mensuração de mercúrio, cada amostra de córtex motor foi pesada em um frasco de digestão (máximo 0,5 g de peso úmido), sendo adicionados 1 mL de água destilada, 2 mL de solução com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$  (em proporções iguais), e 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em sequência. A solução será aquecida em uma chapa elétrica a 200-230°C durante 30 minutos. O teor total de mercúrio nas amostras foi calculado por digestão, redução e espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CVAAS) (Semi-

automático Mercúrio Analyzer, modelo 201-Hg, SansoSeisakushoCo. Ltd., Tóquio, Japão) em sistema de fluxo de ar aberto como foi anteriormente descrito por Akagi et al. [36]. A metodologia detalhada desta análise encontra-se descrita em trabalho publicado anteriormente [28].

## **2.6 Avaliação e Quantificação da Citotoxicidade e Apoptose**

Nestas avaliações, as amostras de córtex motor foram tratadas com colagenase em concentrações de 2 mg/ml e 4 mg/ml, respectivamente, para dissociação do tecido e posteriormente armazenadas em 37° C durante 20 minutos e 40 minutos. Depois disso, 100 ml de solução, contendo as células isoladas foram adicionadas em microplacas de 96poços com 100 µl do sistema de reagentes Cytotox-glo™ ou Apotox-glo® (Promega). A leitura foi realizada em GloMax® (Promega, Holanda), de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram lidos no sistema de detecção GloMax®-Multi+ acoplado com o software Instinct®. Os resultados da quantificação foram expressos em porcentagens do número de célula em relação ao grupo controle.

## **2.7. Análise do Balanço Oxidativo**

### **2.7.1. Preparação das Amostras**

As amostras coletadas destinadas à análise bioquímica foram congeladas com nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em -80 °C. Em seguida, foram descongeladas e ressuspensas em Tris-HCl 20mM, pH 7,4, a 4°C e submetidas a disgregação sônica (concentração aproximada de 1 g/mL). O lisado foi armazenado a -80° C até o momento do processamento.

### **2.7.2. ACAP – Capacidade Antioxidante contra Radicais Peroxil**

A Capacidade Antioxidante contra Radicais Peroxil foi avaliada através da determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em amostras de tecido tratadas ou não com um gerador de radicais peroxil. A metodologia detalhada está descrita em Amado et al. [37]. 10 µl de sobrenadante de cada amostra foram expostas a um gerador de radicais peroxil (dicloridrato do 2,2'-azobis-[2-metilpropanoamidina] ABAP) com sonda fluorescente 2'7'diacetatodichlorofluoresceína (H2DCFDA) em uma concentração final de 40µM. Após isso, a microplaca foi colocada em um leitor de

fluorescência (Victor 2, Perkin Elmer), sendo realizadas leituras a cada 5 minutos durante 1 hora. Os resultados foram expressos de acordo com a diferença da área da unidade de fluorescência das curvas geradas da mesma amostra com e sem ABAP.

### 2.7.3. Dosagem de Nitrito

Uma alíquota de homogeneizado bruto foi centrifugado a 21000 g durante 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para analisar os níveis de nitrito como descrito em Green et al. [38]. Resumidamente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 min com reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% - 1:1). A absorvância foi medida a 550 nm em espectrofotômetro e comparada com o padrão de soluções de nitrito de sódio.

### 2.7.4. Ensaio da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada medindo os níveis de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxiacenos (4HDA) como detalhado anteriormente por Esterbauer e Cheeseman [39]. Resumidamente, uma alíquota de homogeneizado bruto foi centrifugado a 2500 g durante 30 min a 4°C, e o sobrenadante foi processado tal como descrito pelo kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical). Este kit possui um reagente cromógeno que reage com MDA e 4HDA a 45°C, originando um cromóforo estável com máxima absorvância em comprimento de onda de 586 nm. A absorvância foi medida em espectrofotômetro.

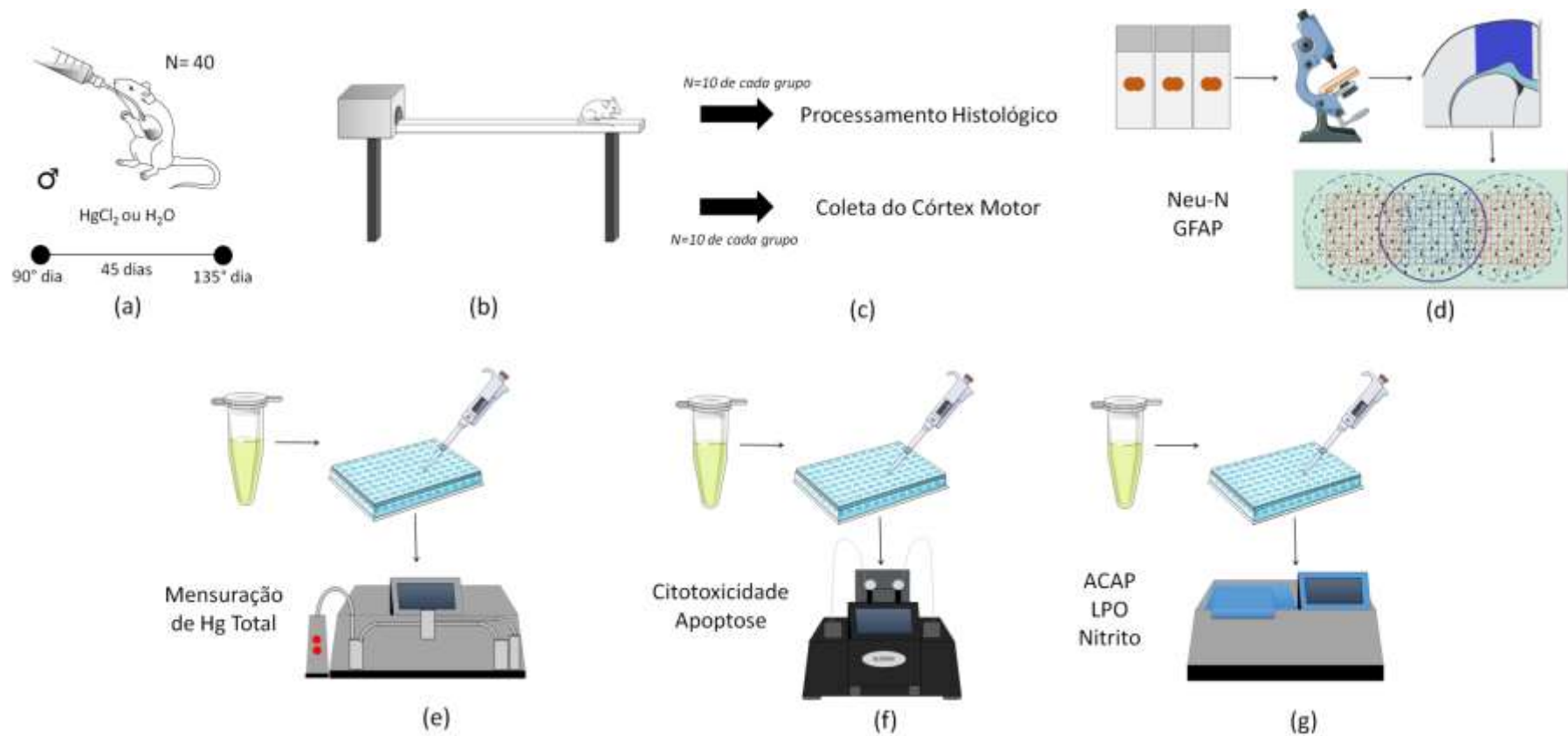
### 2.7.5. Ensaio de Concentração de Proteína

A quantidade de proteína nos sobrenadantes (usados para a determinação da peroxidação lipídica, níveis de nitrito e ACAP) foi realizada como descrito por Lowry et al. [40]. Assim, após correção para a concentração de proteína, os resultados de peroxidação lipídica, nitritos e ACAP foram expressos como percentagens da média do grupo controle.

## 2.8. Análise Estatística

Todos os dados foram tabulados, expressos em média  $\pm$  erro padrão (n=20 animais por grupo para os testes comportamentais e n=10 por grupo para outras análises) e analisados estatisticamente a sua normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para estatística comparativa entre grupos foi utilizado o teste *t* de *Student* para os dados normais e o teste de Mann-Whitney para os dados não normais. Além disso, foi realizado o teste de correlação de Pearson para os dados do balanço oxidativo no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>. O valor de  $p \leq 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. O software GraphPadPrism 5.0 (San Diego, CA, USA) foi usado para as análises estatísticas.



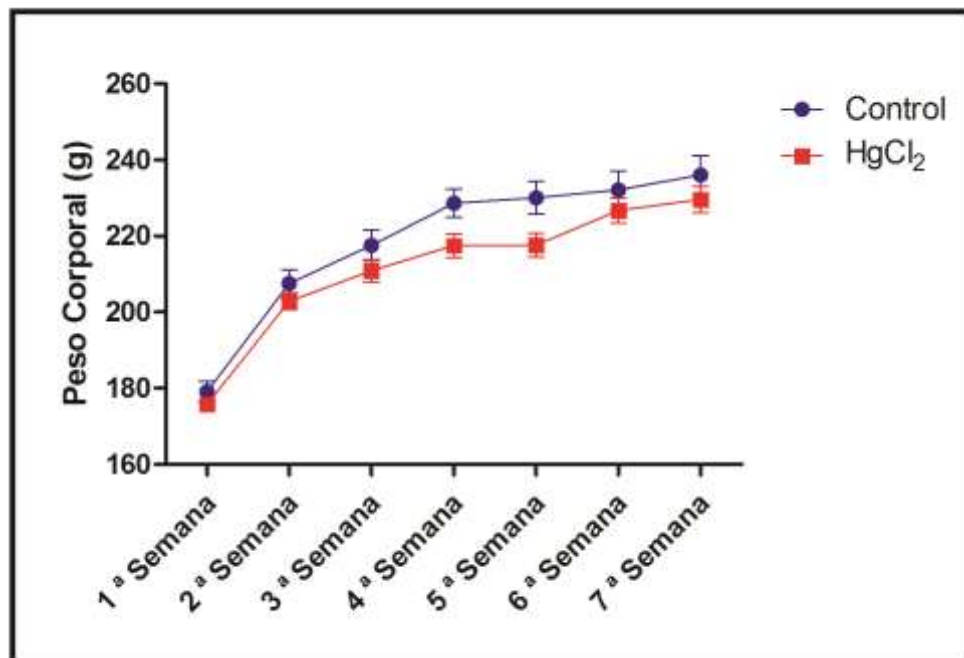


**Fig. 1:** Descrição da amostra e etapas experimentais. Animais, descrição da amostra e modelo de exposição ao HgCl<sub>2</sub>(a); teste motor do *Beam Walking* (b); divisão dos grupos experimentais, destinos dos animais para cada etapa de análise (c); etapas do processamento histológico e imunoistoquímico e análise das lâminas (d); ensaio para mensuração de mercúrio total (e); ensaio para quantificação e análise de morte celular (f); ensaios para balanço oxidativo tecidual (g).

### 3. Resultados

#### 3.1. Curva de peso dos animais

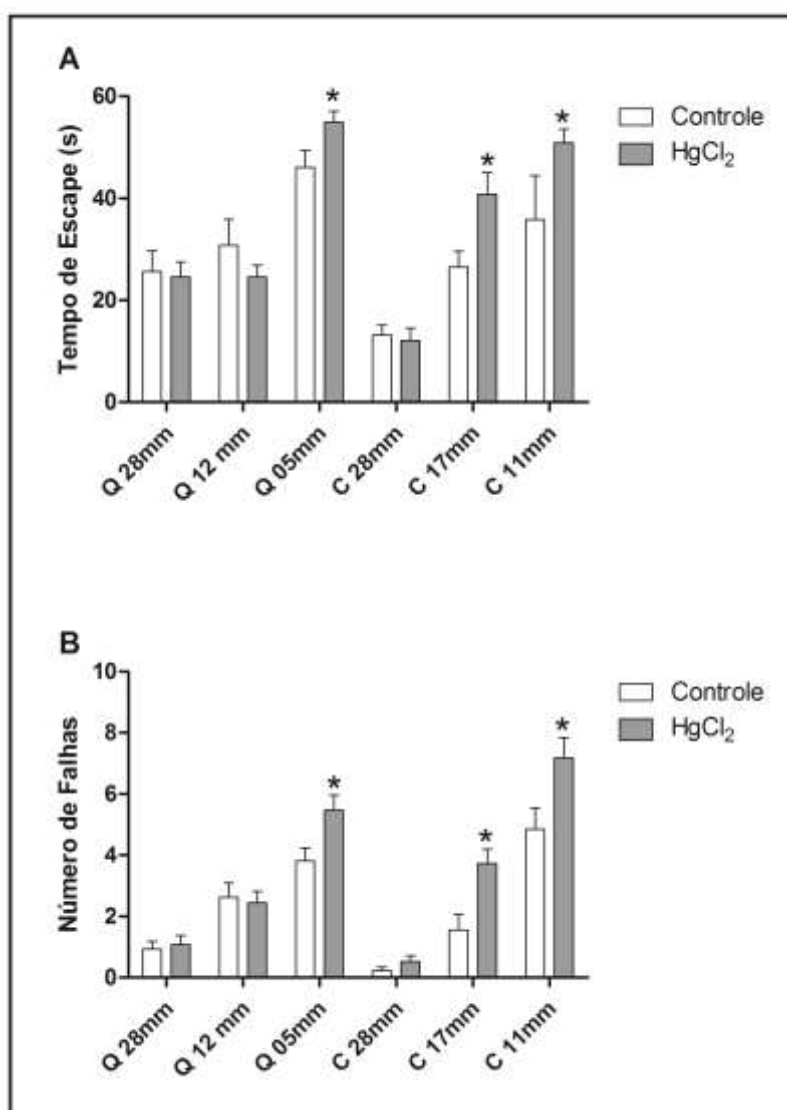
A exposição crônica com  $\text{HgCl}_2$  não alterou o peso corporal dos animais (Figura 2). Nenhuma morte foi observada durante o período de exposição.



**Fig. 2:** Efeitos da exposição crônica com  $\text{HgCl}_2$  sobre o peso corporal de ratos Wistar adultos (g). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão após análise do teste ANOVA *two-way*.

### 3.2. A exposição crônica com $\text{HgCl}_2$ durante a fase adulta promove déficits motores relacionados a coordenação motora fina e o equilíbrio

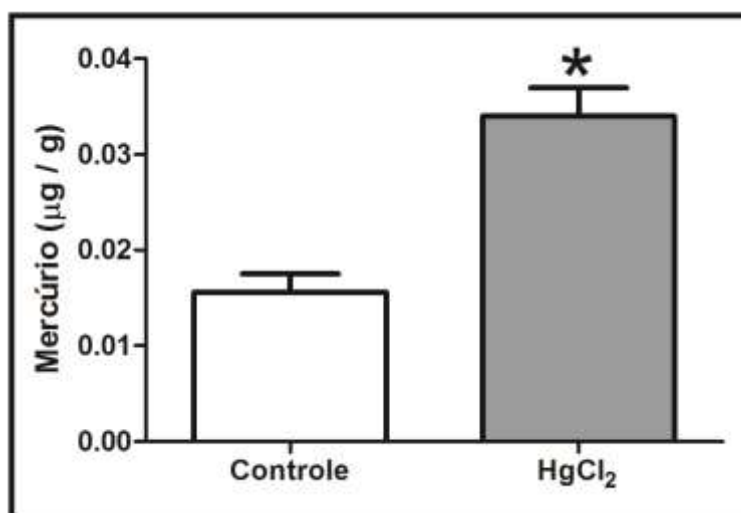
O grupo experimental exposto com mercúrio inorgânico apresentou diminuição do tempo de escape e aumento do número de falhas durante os desafios de vigas menores propostos pelo teste do *beam walking*, ou seja, na viga quadrada de 5mm (latência:  $p = 0.0351$  e número de falhas  $p = 0.0388$ ) e viga redonda de 17mm (latência:  $p = 0.0328$  e número de falhas  $p = 0.0061$ ) e 11mm (latência:  $p = 0.0418$  e número de falhas  $p = 0.0388$ ). Os resultados estão expressos na figura 3.



**Fig. 3:** Efeitos da exposição crônica com  $\text{HgCl}_2$  sobre a coordenação motora fina e o equilíbrio de ratos Wistar adultos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão do (A) tempo de escape (s) e (B) números de falhas. \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student).

### 3.3. A exposição crônica com $\text{HgCl}_2$ durante a fase adulta promove depósitos de mercúrio no córtex motor.

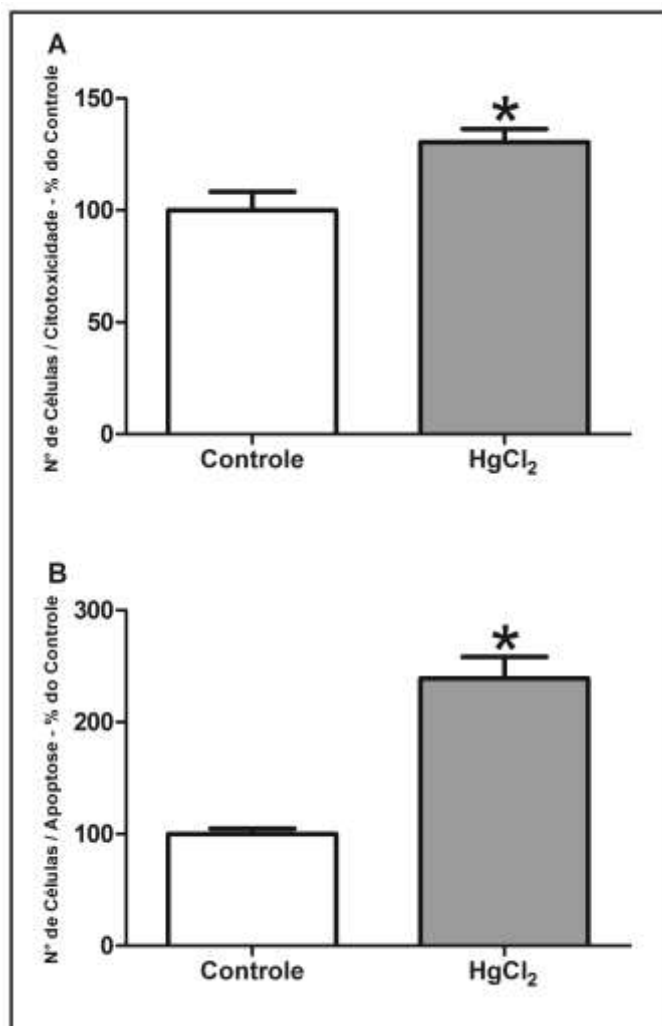
A figura 4 mostra que a exposição ao mercúrio inorgânico aumenta a concentração de mercúrio total depositado no parênquima neural do córtex motor dos animais expostos durante 45 dias ( $p = 0.049$ ).



**Fig. 4:** Efeitos da exposição crônica com  $\text{HgCl}_2$  sobre a formação de depósitos de mercúrio no parênquima neural no córtex motor de ratos Wistar adultos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student).

### 3.4. A exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> durante a fase adulta leva a morte celular por citotoxicidade e apoptose.

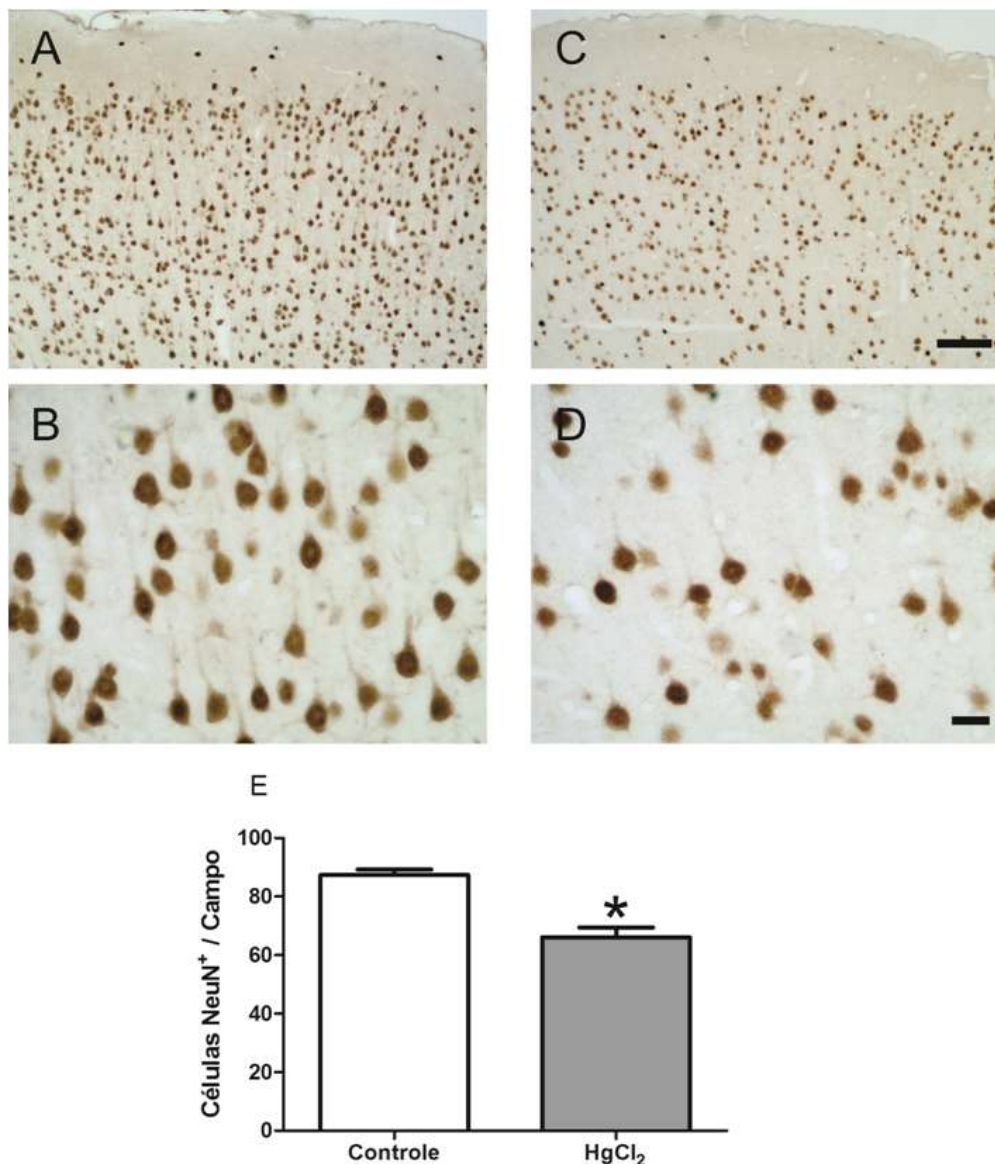
A exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> induziu citotoxicidade celular ( $p = 0.0294$ , figura 5A) e apoptose ( $p = 0.0077$ , figura 5B) no córtex motor. Estes resultados indicam que o mercúrio inorgânico promove morte celular no sistema nervoso central.



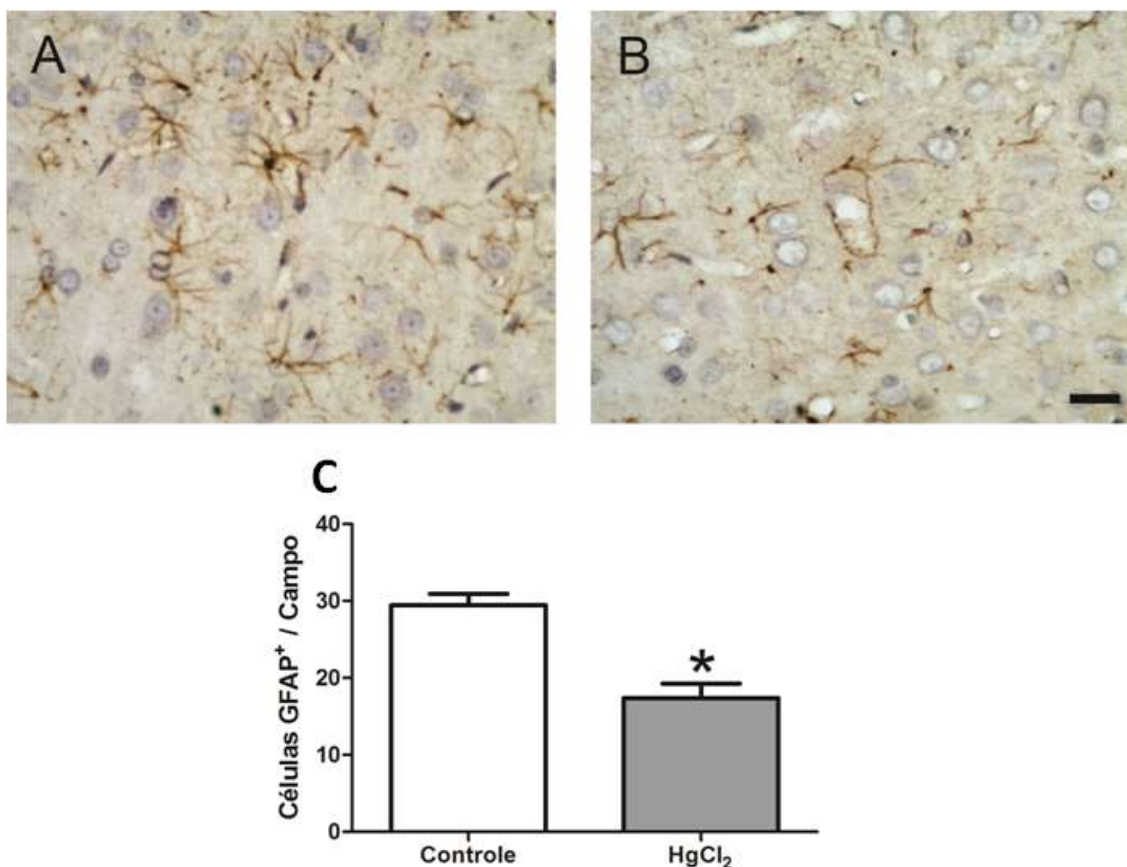
**Fig. 5:** Efeitos da exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> sobre a citotoxicidade e indução de apoptose no córtex motor de ratos Wistar adultos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão das (A) porcentagens do número de célula mortas por citotoxicidade em relação ao grupo controle e (B) das porcentagens do número de célula mortas por indução de apoptose em relação ao grupo controle. \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney).

### 3.5. A exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> durante a fase adulta promove morte neuronal e astrocitária.

A imunohistoquímica para neurônios maduros (NeuN, figura 6) e astrócitos (GFAP, figura 7) indicou que a exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> promoveu diminuição de células NeuN + ( $p = 0.0159$ , figura 6E) e GFAP+ ( $p = 0.0286$ , figura 7C).



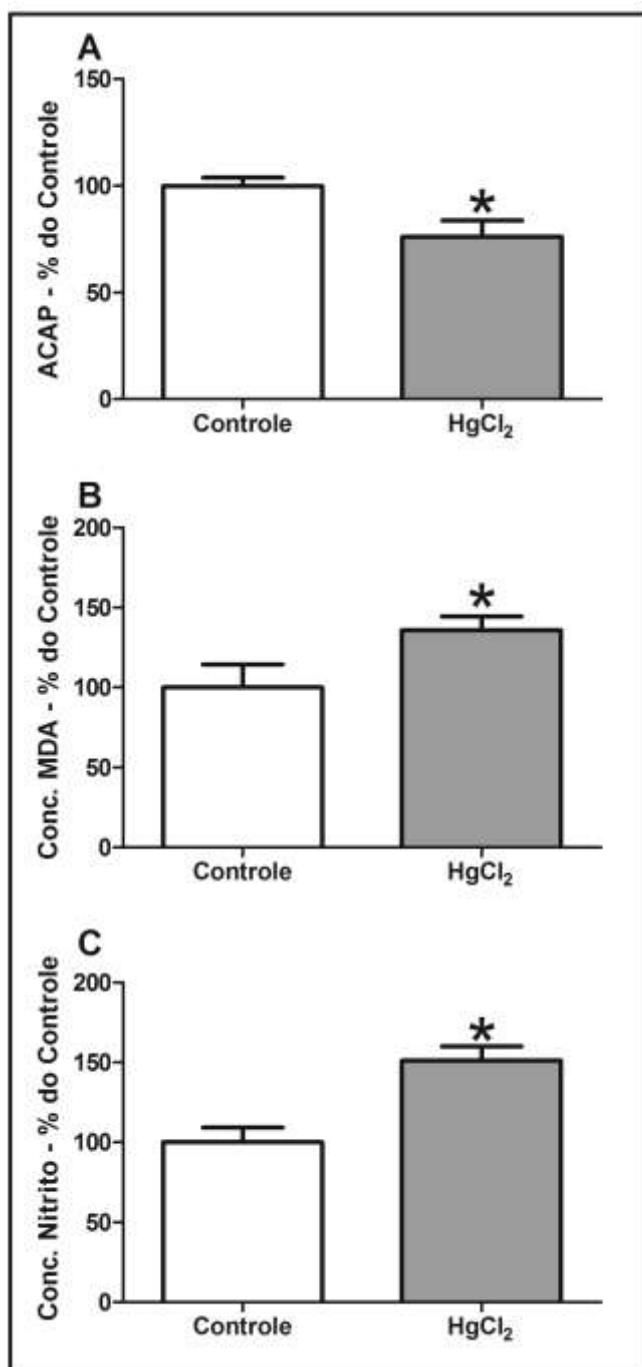
**Fig. 6:** Efeitos da exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> sobre a densidade neuronal no córtex motor de ratos Wistar adultos. (A) – (D) representam fotomicrografias do córtex motor marcado com NeuN dos animais controles (A) e (C) e dos animais expostos (B) e (D). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão do número de células contadas por campo (E). \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student).



**Fig. 7:** Efeitos da exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> sobre a densidade astrocitária no córtex motor de ratos Wistar adultos. (A) e (B) representam fotomicrografias do córtex motor marcado com GFAP dos animais controles (A) e dos animais expostos (B). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão do número de células contadas por campo (C). \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student).

### 3.6. A exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> durante a fase adulta promove estresse oxidativo.

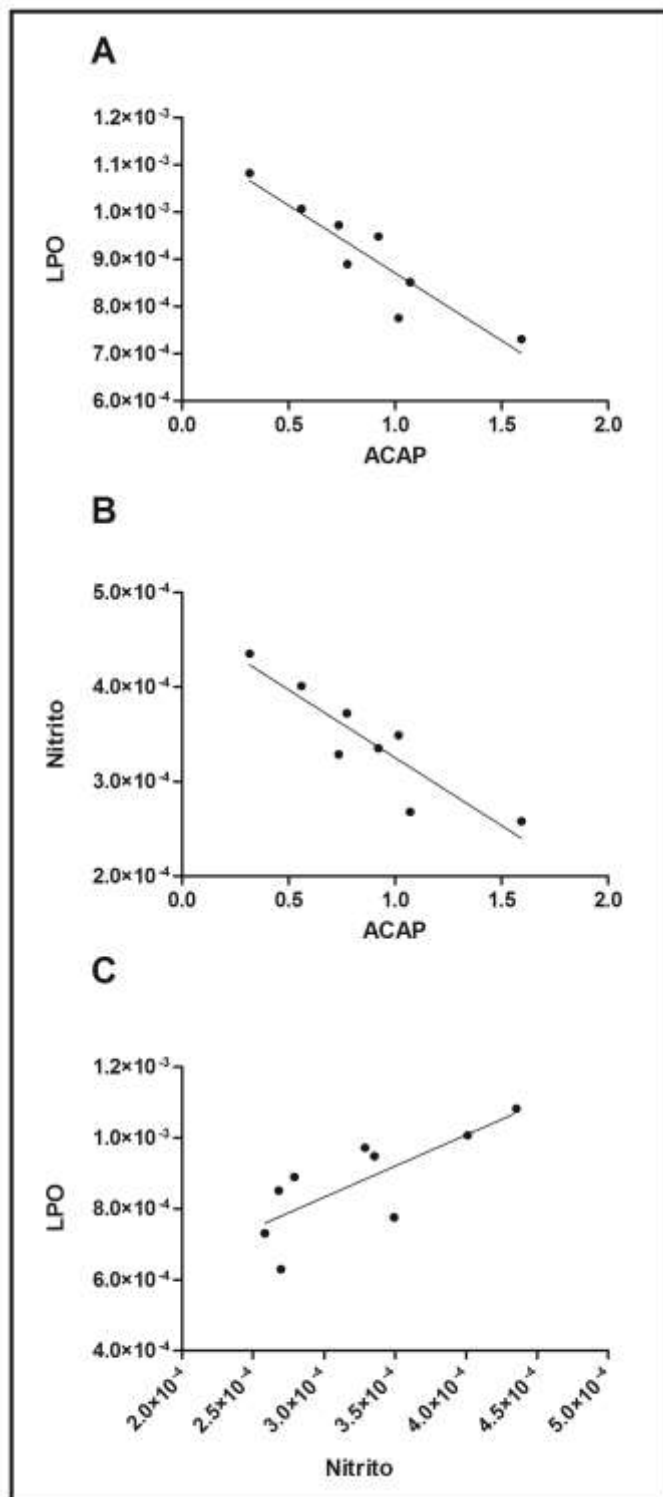
O modelo de exposição proposto diminui a capacidade antioxidante no córtex motor como evidenciado pela elevada diferença da área da unidade de fluorescência das curvas geradas com e sem ABAP, o que significa baixa competência em neutralizar os radicais peróxil ( $p = 0.0367$  – figura 8A). Além disso, a exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> aumentou os níveis de parâmetros pró-oxidantes no córtex motor de ratos, como foi evidenciado no aumento dos níveis de malondialdeído – indicador de peroxidação lipídica – ( $p = 0.0396$  – figura 8B) e dos níveis de nitrito – um marcador indireto da produção de óxido nítrico – ( $p = 0.0014$  – figura 8C).



**Fig. 8:** Efeitos da exposição crônica com HgCl<sub>2</sub> sobre o balanço oxidativo no córtex motor de ratos Wistar adultos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão das (A) porcentagens da diferença da área da unidade de fluorescência das curvas geradas da mesma amostra com e sem ABAP em relação ao grupo controle; (B) das porcentagens de miligrama por proteína de malondialdeído em relação ao grupo controle e (C) das porcentagens de miligrama por proteína de nitrito em relação ao grupo controle. \*  $p < 0.05$  em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student).



Constatou-se que há uma forte correlação negativa entre os mediadores pró-oxidantes avaliados (níveis de MDA e nitrito) e a capacidade antioxidante (ACAP) (MDA vs ACAP,  $p = 0.0012$ ,  $r^2 = 0.8450$  e figura 9A / Nitrito vs ACAP,  $p = 0.0024$ ,  $r^2 = 0.8090$  e figura 9B). Além disso, foi evidenciado que há uma moderada correlação positiva quando se avalia os níveis de nitrito e MDA ( $p = 0.0163$ ,  $r^2 = 0.5854$  e figura 9C).



**Fig. 9:** O aumento dos níveis de fatores pró-oxidantes está associado com o decréscimo da capacidade antioxidante total. Os resultados estão expressos pela intersecção entre os dados correlacionados. (A) Correlação negativa entre o ACAP e os níveis de malondialdeído; (B) Correlação negativa entre o ACAP e os níveis de nitrito e (C) Correlação positiva entre os níveis de malondialdeído e nitrito. A análise realizada pela correlação de Pearson.

#### 4. Discussão

Este estudo mostra, pela primeira vez, que a exposição crônica em baixas doses de mercúrio inorgânico em ratos adultos promove formação de depósitos de mercúrio no parênquima neural associados com estresse oxidativo e morte celular por citotoxicidade e indução de apoptose culminando por fim em danos motores

Estudos de exposição ao  $\text{HgCl}_2$  estão focados principalmente em fases específicas da vida, tais como o período pré e pós-natal [24,25,26], em doses agudas [12-16] e exposição crônica [22,23,41,42]. Entretanto, estudos sobre a exposição crônica e contínua são escassos [27,28]. Por este motivo, escolhemos esse desenho metodológico a fim de esclarecer os danos prováveis que o mercúrio inorgânico poderia promover no SNC. Assim, utilizou-se a espectrometria de absorção atômica a vapor frio para verificar se o mercúrio inorgânico administrado seria absorvido pelo organismo e se o mesmo consegue se depositar no parênquima neural. Este método representa um dos métodos mais sensíveis para mensurar essa situação [10,36].

A exposição crônica com cloreto de mercúrio promoveu formação de depósitos de mercúrio no córtex motor. A baixa lipossolubilidade do mercúrio inorgânico desfavorece a sua passagem na barreira hematoencefálica (BHE), especialmente em adultos [1,2]. A passagem do mercúrio inorgânico através da BHE em indivíduos pré e pós-natais já foi relatada em alguns estudos [24,25,26], no entanto, uma pesquisa anterior de nosso grupo demonstrou que a exposição a essa espécie mercurial promove depósitos de mercúrio no parênquima neuronal de ratos adultos [28].

Apenas 2% do contingente administrado por via oral desta espécie de mercúrio são absorvidos inicialmente, embora se acredite que seu efeito corrosivo sobre o trato gastrointestinal possa aumentar a permeabilidade e, conseqüentemente, aumentar a sua absorção com a exposição prolongada, podendo chegar a valores próximos a 16% [2]. Após ser absorvido, o cloreto de mercúrio distribui-se na corrente sanguínea, concentrando-se principalmente no plasma sanguíneo devido sua hidrossolubilidade, podendo também se aderir a grupos sulfidrilas em eritrócitos, ou em proteínas como as metalotioneínas ou a glutatona [43,44].

O mecanismo pelo qual o mercúrio inorgânico consegue atravessar a barreira hematoencefálica ainda encontra-se incerto. No entanto, um estudo que se focou a elucidar essa temática observou que o mercúrio inorgânico promove

interferências na atividade enzimática e afeta o movimento iônico na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase nas camadas do córtex cerebral [46], o que de fato poderia explicar o seu acúmulo no cérebro. Outra possibilidade que pode ser levantada seria através de transportadores de aminoácidos [2], particularmente o transportador de cisteína, o mesmo que o MeHg utiliza para atravessar para alcançar o parênquima neural [2,25,28], no entanto esta hipótese ainda não foi comprovada.

Em nosso estudo anterior [28] foi verificado que os animais expostos ao  $\text{HgCl}_2$  possuíam déficits motores identificados pelo teste do campo aberto e do rota rod. Assim, buscando-se avaliar o refinamento motor, a coordenação motora e o equilíbrio escolhemos o teste do *beam walking* [30,31]. Este teste motor possui como característica peculiar, a avaliação sutil do refinamento motor devido o aumento gradativo do desafio imposto ao animal em atravessar uma série de vigas estreitas, fato não encontrado em outro teste motor [30,31]. Isso se torna evidente aos observarmos nossos resultados que indicam que  $0.034\mu\text{g/g}$  de mercúrio no córtex motor está relacionada com a deficiência em tarefas que exigem maior refinamento motor, como foi evidenciado pelo fraco desempenho dos animais expostos nas vigas de menor diâmetro (quadrada de 5 cm e circular de 11 e 17cm).

A maioria dos estudos sobre a neurotoxicidade do mercúrio inorgânico são com modelos experimentais pré ou pós-natais, devido à imaturação da barreira hematoencefálica. A literatura reporta que as proles intoxicadas durante o período de gestação ou nos primeiros dias de vida possuíam alterações neurocomportamentais, neuromotoras e sensoriais [24,25,26]. Os poucos estudos acerca da intoxicação com mercúrio inorgânico em animais adultos indicam que uma exposição crônica induz déficits cognitivos relacionados a memória espacial, aversiva e de reconhecimento [27,28].

Já é conhecido na literatura que o mercúrio possui tropismo para determinadas regiões cerebrais, especialmente o hipocampo e o cerebelo [1,2]. O cerebelo é a área responsável pelo equilíbrio e pela coordenação motora fina [31], o que poderia sugerir que os resultados do teste motor encontrado neste estudo fossem atribuídos a danos cerebelares. No entanto, o córtex motor tem sido visto como uma região que desempenha um papel importante no controle motor fino e fracionamento do movimento, integração sensório-motora e movimentos cognitivo-motores de ordem superior [46-48]. Portanto, embora não se possa excluir o envolvimento de áreas

cerebrais adicionais (incluindo cerebelo e gânglios da base) nos resultados apresentados, não há dúvidas de que as alterações observadas no córtex motor contribuem, pelo menos em parte, para as deficiências motoras neste modelo de exposição ao mercúrio inorgânico.

Associado aos danos motores identificados no teste comportamental, verificou-se que os animais expostos possuíam diminuição da densidade neuronal e astrocitária. Vários estudos de toxicologia indicam que a diminuição da população desses dois tipos celulares são associados a dano funcional verificados em testes comportamentais [32,33,49,50]. Estudos *in vitro* demonstram que o mercúrio inorgânico promove morte celular em neurônios e astrócitos humanos, onde os neurônios são mais sensíveis em comparação com os astrócitos [51].

Além dos aspectos morfológicos verificados, nosso estudo indicou que o modelo de exposição *in vivo* proposto promove morte celular por citotoxicidade e indução de apoptose o que justifica a diminuição das duas populações celulares analisadas. Resultados semelhantes foram descritos em estudos *in vitro*, onde o mercúrio inorgânico em cultura de astrócitos e neurônios promoveram morte celular por citotoxicidade em ambos os tipos celulares [52] e em estudos *in vivo* onde se observou indução de apoptose [52].

O mercúrio inorgânico promove citotoxicidade por alterar a atividade da lactato desidrogenase e a integridade lisossomal e da membrana celular em neurônios e em astrócitos [51], além de diminuir os níveis de ATP intracelulares com consequente diminuição da atividade mitocondrial [53]. Diante disso, o mercúrio inorgânico promove morte celular por necrose, onde é acompanhado por edema citoplasmático e de organelas, seguida pela perda da integridade da membrana celular e consequente inflamação [54].

Vários estudos têm demonstrado evidências que o mercúrio inorgânico promove indução de apoptose em diferentes tipos celulares [52,54,55]. A apoptose é um mecanismo de destruição celular caracterizado por encolhimento celular, condensação nuclear e citoplasmática e processos de decomposição intracelular que mantêm a integridade da membrana plasmática [56]. Nosso ensaio de detecção de apoptose analisou a atividade da caspase 3 e 7, enzimas efetoras desse processo de morte celular. Em concordância com nossos dados, a literatura demonstra que o HgCl<sub>2</sub> aumenta a atividade de caspase-3 em células neurais [57].

Assim, buscando elucidar determinados mecanismos para os eventos de morte celular, nosso estudo avaliou o balanço oxidativo nas amostras de córtex motor. Evidenciou-se que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico promoveu aumento dos níveis de níveis de malondialdeído e nitritos e diminuição da capacidade antioxidante total promovendo o fenômeno do estresse oxidativo.

A neurotoxicidade induzida por mercúrio está relacionada à superprodução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e/ou pela redução do sistema de defesa antioxidante [41,52]. O cérebro contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas das células neuronais e é particularmente susceptível ao ataque de radicais livres e, portanto, à peroxidação lipídica [44,58]. Estudos anteriores têm documentado efeitos deletérios de metais pesados em humanos o qual induzem estresse oxidativo, peroxidação lipídica e declínio cognitivo [2,58] corroborando assim com nossos resultados.

Os presentes resultados mostram níveis elevados de peroxidação lipídica no córtex motor devido à exposição ao mercúrio inorgânico, indicando que a neurotoxicidade induzida pelo mercúrio é devido à superprodução de radicais livres e produtos lipídicos peroxidantes [41,44,52], indicado em nossos resultados pelo aumento dos níveis de nitrito e malondialdeído. O mercúrio produz dano oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio onde o aumento de seus níveis gera peroxidação lipídica e logo prejuízos na função metabólica, dano a membrana celular, morte celular e lesão tecidual no sistema nervoso [52], fato que é corroborado através da correlação positiva encontrada em nossos dados de fatores pró-oxidantes, onde o aumento dos níveis de nitrito está associado com o aumento da peroxidação lipídica.

Concomitante com o aumento dos níveis de nitrito e malondialdeído, o mercúrio inorgânico promoveu diminuição da capacidade antioxidante total. Já é conhecida a capacidade do mercúrio em inibir enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, a glutathione reductase, a superóxido dismutase e a catalase, devido sua capacidade de formar complexos tóxicos livres e protéicos, o que pode diminuir ou inibir a atividade enzimática [41,44,52,59]. A inibição dos fatores antioxidantes promove deficiência na defesa contra os radicais livres produzidos pelo mercúrio, fato que corrobora com a correlação negativa encontrada entre a capacidade antioxidante total e os fatores pró-

oxidantes avaliados. Além disso, a diminuição da atividade antioxidante pode ser resultado da modificação oxidativa dos genes que controlam estas enzimas [44,56].

Além disso, alguns estudos relataram que a intoxicação aguda ou crônica por mercúrio é caracterizada por uma inibição das atividades Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase neuronais. A inativação das atividades de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pode levar à despolarização parcial da membrana celular e da membrana interna da mitocôndria, permitindo a entrada excessiva de Ca<sup>2+</sup> nos neurônios e resultando em eventos tóxicos semelhantes à excitotoxicidade encontrada em doenças neurodegenerativas [61,62]. As alterações no potencial da membrana interna mitocondrial abrem o poro de transição da permeabilidade das mitocôndrias, o que leva à liberação de fatores apoptogênicos, tais como o citocromo c, componente do apoptossoma que ativa a cascata de caspases [44], além de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que também atuam alterando a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [63], confirmando assim os resultados encontrados em nosso modelo experimental.

Todos estes eventos bioquímicos encontrados em nosso estudo estão envolvidos na neurotoxicidade induzida por mercúrio, onde atuam em mecanismos de morte celular, que envolve a necrose e a indução de apoptose [44,63,64].

Diante do exposto, nossos resultados indicam a necessidade de medidas sociais, políticas ambientais e que visam o problema de intoxicação de mercúrio em populações que vivem em regiões contaminadas. Além disso, considerar alternativas na produção industrial que possam substituir o mercúrio inorgânico na composição ou durante a fabricação de produtos.

Em conclusão, podemos afirmar que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico em baixas doses durante a vida adulta promove alterações motoras relacionadas com a diminuição da densidade celular no córtex motor, estresse oxidativo, citotoxicidade e indução de apoptose. Estes dados quebram o paradigma de que mercúrio inorgânico apresenta baixa toxicidade ou mesmo inocuidade.

## Referências

1. K.M. Rice, E.M. Walker Jr, M. Wu, C. Gillette, E.R. Blough. Environmental mercury and its toxic effects. *J. Prev. Med. Public Health.* 47 (2014) 74-83.
2. R.A. Bernhoft. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *J. Environ. Public Health.* 2012 (2012) 460508.

3. A. Giang, N.E., Selin. Benefits of mercury controls for the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 113 (2016) 286-91.
4. S. Wang, Q. Lv, Y. Yang, L.H. Guo, B. Wan, X. Ren, H. Zhang. Arginine decarboxylase: A novel biological target of mercury compounds identified in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* 118 (2016) 109-120.
5. Ministry Of The Environment From Japan. Lessons from Minamata Disease and Mercury Management in Japan (2013).
6. T.W. Clarkson, L. Magos, C. Cox, M.A Greenwood, L. Amin-Zaki, M.A. Majeed, S.F. Al-Damluji. Tests of Efficacy of Antidotes for Removal of Methylmercury in Human Poisoning during the Iraq Outbreak. *J. Pharm. Exp. Ther.* (1981).
7. S.B. Skerfvingi, J.F. Copplestone. Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. *Bull. World Health Organ.* 54 (1976).
8. M.A. Al-Batanony, G.M. Abdel-Rasul, M.A. Abu-Salem, M.M. Al-Dalatony, H.K. Allam. Occupational exposure to mercury among workers in a fluorescent lamp factory, Quisna Industrial Zone, Egypt. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 4 (2013) 149-56.
9. D.M.G. Beasley, L.J. Schep, R.J. Slaughter, W.A. Temple, J.M. Michell. Full Recovery from a Potentially Lethal Dose of Mercuric Chloride. *J. Med. Toxicol.* 10 (2014) 40-44.
10. M.R. Benz, S.H. Lee, L. Kellner, C. Döhlemann, S. Berweck. Hyperintense lesions in brain MRI after exposure to a mercuric chloride-containing skin whitening cream. *Eur. J. Pediatr.* 170 (2011) 747-750.
11. P. Triunfante, M.E. Soares, A. Santos, S.T.H. Carmo, M.L. Bastos. Mercury fatal intoxication: Two case reports. *Forensic Science International* 184 (2009) e1-e6.
12. M.L. de Freitas, A.R. da Silva, S.S. Roman, R. Brandão. Effects of 4,4'-dichloro-diphenyl diselenide (ClPhSe)<sub>2</sub> on toxicity induced by mercuric chloride in mice: a comparative study with diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34 (2012) 985-94.



13. N.C. Peixoto, M.E. Pereira. Effectiveness of ZnCl<sub>2</sub> in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl<sub>2</sub> in newborn rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66 (2007) 441-6.
14. A.M. Gado, B.A. Aldahmash. Antioxidant effect of Arabic gum against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 1245-52.
15. D. Joshi, D.K. Mittal, S. Shukla, A.K. Srivastav, S.K. Srivastav. N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: a histopathological approach. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 28 (2014) 218-26.
16. M.S. Trebucovich, M.H. Hazelhoff, A.A. Chevalier, S. Passamonti, A.M. Brandoni, A.M. Torres. Protein expression of kidney and liver bilitranslocase in rats exposed to mercuric chloride--a potential tissular biomarker of toxicity. *Toxicol. Lett.* 225 (2014) 305-10.
17. S. Omanwar, K. Ravi, M. Fahim. Persistence of EDHF pathway and impairment of the nitric oxide pathway after chronic mercury chloride exposure in rats: mechanisms of endothelial dysfunction. *Hum. Exp. Toxicol.* 30 (2011) 1777–1784.
18. S. Omanwar, B. Saidullah, K. Ravi, M. Fahim. Vasorelaxant effects of mercury on rat thoracic aorta: The nitric oxide signaling mechanism. *Hum. Exp. Toxicol.* (2013) 1-7.
19. H.A. Golpon, A. Puchner, P. Barth, T. Welte, P.V. Wichert, C.O. Feddersen. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. *Toxicology* 192 (2003) 179–188.
20. V. Da Cunha, H.P. Souza, L.V. Rossoni, A.S. França, D.V. Vassallo. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (2000) 124–130.
21. G.E. El-Desoky, S.A. Bashandy, I.M. Alhazza, Z.A. Al-Othman, M.A. Aboul-Soud, K. Yusuf. Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. *PLoS One* 8 (2013) e59177.
22. S. Kalender, F.G. Uzun, F. Demir, M. Uzunhisarcıklı, A. Aslanturk. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* 55 (2013) 456-62.

23. J.C. Heath, Y. Abdelmageed, T.D. Braden, A.C. Nichols, D.A. Steffy. The effects of chronic mercuric chloride ingestion in female Sprague-Dawley rats on fertility and reproduction. *Food Chem Toxicol.* 47 (2009) 1600-5.
24. L. Chehimi, V. Roy, M. Jeljeli, M. Sakly. Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor development and later behaviour in rats. *Behav. Brain Res.* 234 (2012) 43-50.
25. C.F. Huang, S.H. Liu, C.J. Hsu, S.Y. Lin-Shiau. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicol. Lett.* 201 (2011) 196-204.
26. A. Szász, B. Barna, Z. Gajda, G. Galbác, M. Kirsch-Volders, M. Szenté. Effects of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. *Neurotoxicology* 23 (2002) 197-206.
27. P.B. Mello-Carpes, W. Barros, S. Borges, N. Alves, D. Rizzetti, F.M. Peçanha, D.V. Vassallo, G.A. Wiggers, I. Izquierdo. Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (2013) 468-72.
28. FB Teixeira, R.M. Fernandes, P.M. Farias-Junior, N.M. Costa, L.M. Fernandes, L.N. Santana, A.F. Silva-Junior, M.C. Silva, C.S. Maia, R.R. Lima. Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11 (2014) 9171-85.
29. National Research Council of the National Academies. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington, DC: The National Academy Press (2011) 1–246.
30. R.J. Carter, L.A. Lione, T. Humby, L. Mangiarini, A. Mahal, G.P. Bates, S.B. Dunnett, A.J. Morton. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.* 19 (1999) 3248-57.
31. T. Karl, R. Pabst, S. von Hörsten. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55 (2003) 69-83.
32. F.B. Teixeira, L.N. Santana, F.R. Bezerra, S. De Carvalho, E.A. Fontes-Júnior, R.D. Prediger, M.E. Crespo-López, C.S. Maia, R.R. Lima. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One.* 9 (2014) e101074.

33. A.C. Oliveira, M.C. Pereira, L.N. Santana, R.M. Fernandes, F.B. Teixeira, G.B. Oliveira, L.M. Fernandes, E.A. Fontes-Júnior, R.D. Prediger, M.E. Crespo-López, W. Gomes-Leal, R.R. Lima, C.S. Maia. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *J. Psychopharmacol.* 29 (2015) 712-24.
34. G.B. Oliveira, E.A. Fontes Jr, S. de Carvalho, J.B. da Silva, L.M. Fernandes, M.C. Oliveira, R.D. Prediger, W. Gomes-Leal, R.R. Lima, C.S. Maia. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. *Brain Res.* 1561(2014) 23–34.
35. E.A. Fontes-Júnior, C.S. Maia, L.M. Fernandes, W. Gomes-Leal, A. Costa-Malaquias, R.R. Lima, R.D. Prediger, M.E. Crespo-López. Chronic Alcohol Intoxication and Cortical Ischemia: Study of Their Comorbidity and the Protective Effects of Minocycline. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016 (2016) 1341453
36. H. Akagi. Analysis of methylmercury in fish and shellfish by dithizone extraction-gas chromatography. *Jpn. J. Hyg.* 40 (1985) 293.
37. L.L. Amado, M.L. Garcia, P.B. Ramos, R.F. Freitas, B. Zafalon, J.L. Ferreira, J.S. Yunes, J.M. Monserrat. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 2115-23.
38. L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131–138.
39. H. Esterbauer, K.H. Cheeseman. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4- hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
40. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
41. L.L. Gutierrez, N.G. Mazzotti, A.S. Araújo, R.B. Klipel, T.R. Fernandes, S.F. Llesuy, A. Belló-Klein. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 767-72.

42. A. Aslanturk, M. Uzunhisarcikli, S. Kalender, F. Demir. Sodium selenite and vitamin E in preventing mercuric chloride induced renal toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 70 (2014) 185-90.
43. T.W. Clarkson, L. Magos. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (2006) 609-62.
44. S. Ansar. Pretreatment with diallylsulphide modulates mercury-induced neurotoxicity in male rats. *Acta Biochim. Pol.* 62 (2015) 599-603.
45. G. Szumańska, R. Gadamski, J. Albrecht. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: histochemical demonstration with light and electron microscopy. *Acta Neuropathol.* 86 (1993) 65-70.
46. H. Asanuma. Cerebral cortical control of movement. *Physiologist* 16(1973) 143–166.
47. E.V. Evarts, C. Fromm, J. Kroller, V.A. Jennings. Motor cortex control of finely graded forces. *J. Neurophysiol.* 49(1983) 1199–1215.
48. J.N. Sanes, J.P. Donoghue. Plasticity and primary motor cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 23(2000) 393–415.
49. M.G. Flores-Montoya, J.M. Alvarez, C. Sobin. Olfactory recognition memory is disrupted in young mice with chronic low-level lead exposure. *Toxicol. Lett.* 236 (2015) 69-74.
50. S.N. Maodaa, A.A. Allam, J. Ajarem, M.A. Abdel-Maksoud, G.I. Al-Basher, Z.Y. Wang. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) juice against cadmium neurotoxicity in albino mice (*Mus musculus*). *Behav. Brain Funct.* 12 (2016) 6.
51. H. Lohren, L. Blagojevic, R. Fitkau, F. Ebert, S. Schildknecht, M. Leist, T. Schwerdtle. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 32 (2015) 200-8.
52. A.A.E. Moneim. The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. *Metab. Brain Dis.* 30 (2015) 935-42.

53. E. Fonfría, M.T. Vilaró, Z. Babot, E. Rodríguez-Farré, C. Suñol. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 79 (2005) 545-53.
54. S. Ceccatelli, E. Daré, M. Moors. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 188 (2010) 301-8.
55. J. Watanabe, T. Nakamachi, H. Ohtaki, A. Naganuma, S. Shioda, S. Nakajo, Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces caspase mediated-apoptosis in cultured neural progenitor cells. *J. Toxicol. Sci.* 38 (2013) 931–935.
56. S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (2003) 552-65.
57. T. Sumathi, C. Shobana, J. Christinal, C. Anusha. Protective effect of *Bacopa monniera* on methyl mercury-induced oxidative stress in cerebellum of rats. *Cell Mol. Neurobiol.* 32 (2012) 979-87.
58. G.M. Lucena, J.L. Franco, C.M. Ribas, M.S. Azevedo, F.C. Meotti, V.M. Gadotti, A.L. Dafre, A.R. Santos, M. Farina. *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101 (2007) 127-31.
59. C.L. Mieiro, M.E. Pereira, A.C. Duarte, M. Pacheco. Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*)--bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquat. Toxicol.* 103 (2011) 233-40.
60. M.S. Othman, G. Safwat, M. Aboulkhair, A.E. Abdel Moneim. The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem. Toxicol.* 69 (2014) 175-81.
61. Z. Xie, T. Cai. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 3 (2003) 157–168.
62. S.P. Yu. Na<sup>(+)</sup> K<sup>(+)</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1601–1609.
63. S.H. Kim, R.P. Sharma. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196(2004)47–57.

64. A. Nakaizumi, T. Horie, T. Kida, T. Kurimoto, T. Sugiyama, T. Ikeda, H. Oku. Nitric oxide potentiates TNF-alpha-induced neurotoxicity through suppression of NF-kappaB. *Cell Mol. Neurobiol.* 32(2012)95–106.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse

## **6. CONCLUSÕES**

Nossos resultados fornecem novas evidências de que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico, durante a idade adulta, induz alterações motoras associadas a depósitos de mercúrio no parênquima neural do córtex motor, diminuição da densidade celular, estresse oxidativo, citotoxicidade e indução de apoptose. Estes dados indicam que o mercúrio inorgânico apresenta toxicidade, mesmo quando administrados em baixa dose, devendo assim ser avaliado quanto a sua utilização industrial e cosmética, além de desenvolver programas de prevenção em áreas contaminadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BATANONY, M.A.; ABDEL-RASUL, G.M.; ABU-SALEM, M.A.; AL-DALATONY, M.M. & ALLAM, H.K. Occupational Exposure to Mercury among Workers in a Fluorescent Lamp Factory, Quisna Industrial Zone, Egypt. **Int. J. Occup. Environ. Med.**, v. 4, p. 149-156, 2013.

ASANUMA, H. Cerebral cortical control of movement. **Physiologist**v. 16, p. 143–166, 1973.

ASCHNER, M. & ASCHNER, J.L. Mercury Neurotoxicity: Mechanisms of Blood-Brain Barrier Transport. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 14, p. 169-176, 1990.

ASLANTURK, A; UZUNHISARCIKLI, A.; KALENDER, S. & DEMIR, FELIZ. Sodium selenite and vitamin E in preventing mercuric chloride induced renal toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology** v. 70, p. 185-190, 2014.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, Georgia, 1999.

BARBOSA, A.C.; JARDIM, W.; DÓREA, J.G.; FOSBERG, B. & SOUZA, J. Hair Mercury Speciation as a Function of Gender, Age, and Body Mass Index in Inhabitants of the Negro River Basin, Amazon, Brazil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**v. 40, p. 439–444, 2001.

BAUMAN, J.W and KLASSEN, C.D. Production of methallothionein and head-shock proteins in response to metals. **Fundamental Appl. Tox.**v. 21,p.15-22, 1993.



BEASLEY, D.M.G.; SCHEP, L.J.; SLAUGHTER, R.J.; TEMPLE, W. A. & MICHEL, J. M. Full Recovery from a Potentially Lethal Dose of Mercuric Chloride. **J. Med. Toxicol.** v. 10, p. 40-44, 2014.

BENZ, M.R.; LEE, S.H.; KELLNER, L.; DÖHLEMANN, C. & BERWECK, S. Hyperintense lesions in brain MRI after exposure to a mercuric chloride-containing skin whitening cream. **Eur. J. Pediatr.** v. 170, p. 747–750, 2011.

BERHOFT, R.A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. **J. Environ. Public Health.** ID 2012:460508, 2012.

BERZAS NEVADO, J.J.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.; BERNARDO, F.J.; MORENO, M.; HERCULANO, A.M.; DO NASCIMENTO, J.L. & CRESPO-LÓPEZ, M.E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environ. Int.** v. 36, p. 593–608, 2010.

BOISCHIO, A.A.P. & CERNICHIARI, E. Longitudinal Hair Mercury Concentration in Riverside Mothers along the Upper Madeira River (Brazil). **Environmental Research** v. 77, p. 79-83, 1998.

BOISCHIO, A.A.P. & HENSHEL, D.S. Linear Regression Models of Methyl Mercury Exposure during Prenatal and Early Postnatal Life among Riverside People along the Upper Madeira River, Amazon. **Environmental Research** v. 83, p. 150-161, 2000.

BRUINS, M.R.; KAPIL, S. & OEHME, F.W. Microbial Resistance to Metals in the Environment. **Environmental Research** v. 45, p. 198-207, 2000.

CRAMEL, J.B. & MARTIN, J.H. Motor cortex electrical stimulation augments sprouting of the corticospinal tract and promotes recovery of motor function. **Front. Integr. Neurosci.** v. 8, fnint.2014.00051, 2014.

CHEHIMI, L.; ROY, V.; JELJELI, M. & SAKLY, M. Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor development and later behaviour in rats. **Behavioural Brain Research** v.234,p. 43– 50, 2012.

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L.; COX, C.; GREENWOOD, M.A.; AMIN-ZAKI, L.; MAJEED, M. A. & AL-DAMLUJI, S.F. Tests of Efficacy of Antidotes for Removal of Methylmercury in Human Poisoning during the Iraq Outbreak. The **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, 1981.

CLARKSON, T.W. & MAGOS, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. **Critical Reviews in Toxicology** v. 36, p. 609–662, 2006.

CLIFTON, J.C. Mercury Exposure and Public Health. **Pediatr. Clin. N. Am.** v. 54 p. 237–269, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MACÊDO, G.L.; ARRIFANO, G.P.F.; PINHEIRO, M.CN.; NASCIMENTO, J.L.M. & HERCULANO, A.M. Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environment International** v. 37 n. 136–141, 2011.

DAVIDSON, P.W.; MYERS, G.J. & WEISS, B. Mercury Exposure and Child Development Outcomes. **Pediatrics** v. 113, p. 1023, 2004.

DA CUNHA, V.; SOUZA, H.P.; ROSSONI, L.V.; FRANÇA, A.S. & VASSALLO, D.V. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 39, p. 124–130, 2000.

EL-DESOKY, G.E.; BASHANDY, S.A; ALHAZZA, I.M.; AL-OTHMAN, Z.A; MOURAD, Z.A.; ABOUL-SOUD, A.M. & YUSUF, K. Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats. **Plos One** v. 8, ID. e59177, 2012.

EL-SHENAWY, S.M.A. & HASSAN, N.S.M. Comparative evaluation of the protective effect of selenium and garlic against liver and kidney damage induced by mercury chloride in the rats. **Pharmacological Reports** v. 60, p. 199-208, 2008.

EVARTS, E.V.; FROMM, C., KROLLER, J. & JENNINGS, V.A. Motor cortex control of finely graded forces. **J. Neurophysiol.** v. 49: p.1199–1215, 1983.

FREITAS, M.L.; DA SILVA, A.R.H.; ROMANB, S.S. & BRANDÃO, R. Effects of 4,4-dichloro-diphenyl diselenide (CIPhSe)<sub>2</sub> on toxicity induced by mercuric chloride in mice: A comparative study with diphenyldiselenide (PhSe)<sub>2</sub>. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.34, p. 985–994, 2012.

GADO, A.M. & ALDAHMAH, B.A. Antioxidant effect of Arabic gum against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. **Drug Design, Development and Therapy** v. 7, n.1245–1252, 2013.

GOLDMAN, L.R; SHANNON, M.W. & COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL HEALTH. Technical Report: Mercury in the Environment: Implications for Pediatricians. **Pediatrics** v.108, p.197, 2001.

GOLPON, H.A.; PUCHNER. A.; BARTH, P.; WELTE, T.; WICHERT, P.V. & FEDDERSEN, C.O. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. **Toxicology** v. 192, p.179–188, 2003.

GUTIERREZ, L.L.P.; MAZZOTTI,N.G.; ARAÚJO,A.S.R.; KLIPEL,R.B.; FERNANDES, T.R.G.; LLESUY, S.F. & BELLÓ-KLEIN, A. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 39, p. 767-772, 2006.

GUZZI, G.P. & LAPORTA, C.A.M. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology** v. 244, p. 1–12, 2008.

HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E.; PINHEIRO, M.C.N.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.A.; CARDOSO, B.S. KIZAKI, T. & OHNO, H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon Mercury level of head hair and health effect. **Environment International** v. 27 p. 285–290, 2001.

HEATH, J.C.; ABDELMAGEED, Y.; BRADEN, T.D.;NICHOLS,A.C.& STEFFY, D.A. The effects of chronic mercuric chloride ingestion in female Sprague–Dawley rats on fertility and reproduction. **Food and Chemical Toxicology** v. 47 p. 1600–1605, 2009.

HUANG, C.F.; LIUB,S.H.; HSUD,C.J. & LIN-SHIAUC,S.Y. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. **Toxicology Letters** v. 201, p. 196–204, 2011.

MELLO-CARPES, P.B.; BARROS, W.; BORGES, S.; ALVES, N.; RIZZETTI, D.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; WIGGERS, G.A. & IZQUIERDO, I. Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats. **Int. J. Devl. Neuroscience** v. 31, p. 468–472, 2013.

JOSHI, D.; MITTAL, D.K.; SHUKLA, S. & SRIVASTAV, A.K. Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethylmercury toxicity in male albino rats. **Experimental and Toxicologic Pathology** v.64, p.103–108, 2012.

JOSHI, D.; MITTAL, D.K.; SHUKLA, S., SRIVASTAV, A.K. & SRIVASTAV, S.K. N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: A histopathological approach. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** v. 28, p. 218–226, 2014.

KARL, T.; PABST, R. & VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Exp. Toxicol. Pathol.** v. 55, p. 69–83, 2003.

KALENDER, S.; UZUN, F.G.; DEMIR, F.; UZUNHISARCIKLI, M. & ASLANTURK, A. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. **Food and Chemical Toxicology** v. 55, p. 456–462, 2013.

LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SETEM, J. & MORATO, S. Thigmotactic responses in an open-field. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 41, p. 135-140, 2008.

MALM, O. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research** v. 77, p. 73-78, 1998.

MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.R.; BERZAS NEVADO, J.J.; BERNARDO, F.J.G.; MORENO, M.J.; ARRIFANO, G.P.F.; HERCULANO, A.M.; DO NASCIMENTO, J.L.M. & CRESPO-LÓPEZ, M.E. Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v. 21, p. 7466–7479, 2014.

MINISTRY OF THE ENVIRONMENT FROM JAPAN. Lessons from Minamata Disease and Mercury Management in Japan. 2013.

OMANWAR, S., RAVI K. & FAHIM, M. Persistence of EDHF pathway and impairment of the nitric oxide pathway after chronic mercury chloride exposure in rats: mechanisms of endothelial dysfunction. **Hum. Exp. Toxicol.**v. 30, p. 1777–1784, 2011

OMANWAR, S.; SAIDULLAH, B.; RAVI, K.& FAHIM, M. Vasorelaxant effects of mercury on rat thoracic aorta: The nitric oxide signaling mechanism. **Hum. Exp. Toxicol.** p. 1-7, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Elemental Mercury And Inorganic Mercury Compounds: Human Health Aspects. 2003.

PEIXOTO, N.C. & PEREIRA, M.E. Effectiveness of ZnCl<sub>2</sub> in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl<sub>2</sub> in newborn rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 66 p. 441–446, 2007.

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.; HERCULANO, A.M.; DO NASCIMENTO, J.L.M. & SILVEIRA, L.C.L. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environment International** v. 33,p. 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. & DO NASCIMENTO, J.L.M. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research** 107, 53–59, 2008.

RICE, K.M.; WALKER JR, E.M.; WU, M.; GILLETTE, C. & BLOUGH, E.R. Environmental Mercury and Its Toxic Effects. **J. Prev. Med. Public Health** v. 47, p. 74-83, 2014.

RISING, L.; VITARELLA, D.; KIMELBERG, H.K. and ASCHNER, M. Metallothionein induction in neonatal rat primary astrocyte cultures protects against methylmercury cytotoxicity. **Journal of Neurochemistry** v. 65,p. 1562-1568, 1995.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; RHEAULT, I.; TRAN, S.; DE FREITOS GOG, Y.G.; FARELLA, N.; SOUZA DO VALE, R.; SOUSA PASSOS, C.J.; DE JESUS DA SILVA E.; MERGLER, D. & AMORIM, M. Distribution and partition of total mercury in waters of the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon. **The Science of the Total Environment** v.213 p. 203-211, 1998.

SAMPAIO DA SILVA, D.; LUCOTTE, M.; PAQUET, S. & DAVIDSON, R. Influence of ecological factors and ofl and use on mercury levels in fish in the Tapajós Riverbasin, Amazon. **EnvironmentalResearch** v. 109, p. 432–446, 2009.

SANES, J.N. & DONOGHUE, J.P. Plasticity and primary motor cortex. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 23, p. 393–415, 2000.

SHARMA, D.J.; SUNKARIA, A.; BAL, A.; BHUTIA, Y.D.; VIJAYARAGHAVAN, R.; FLORA, S.J.S.; GILL, K.D. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 240, p. 208–218, 2009.

STANKOVIC, R.K.; LEE, V.; KEKIC, M.; HARPER, C. The expression and significance of metallothioneins in murine organs and tissues following mercury vapour exposure. **Toxicology Pathology** v. 31,p. 514-23, 2003.

STIGGER, F.; LOVATEL, G.; MARQUES, M.; BERTOLDI, K. & MOYSÉS, F. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. **Int. J. Dev.Neurosci.**v. 31,p. 820–827, 2013.

SKERFVINGI, S.B.& COPPLESTONE, J.F. Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. **Bull. World Health Organ.** v. 54,1976.

SYVERSENA, T. & KAUR P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**v.26, p. 215– 226, 2012.



SZÁSZ, A.; BARNA, B.; GAJDA, Z.; GALBÁCS, G.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SZENTE, M. Effects of Continuous Low-Dose Exposure to Organic and Inorganic Mercury During Development on Epileptogenicity in Rats. **Neuro Toxicology** v. 23 p. 197–206, 2002.

SZUMAFISKA, G.; GADAMSKI, R. & ALBRECHT, J. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: Histochemical demonstration with light and electron microscopy. **Acta Neuropathol.** v. 86, p. 65–70, 1993.

TRIUNFANTE, P.; SOARES, M.E.; SANTOS, A.; CARMO, S.T.H; BASTOS, M.L. Mercury fatal intoxication: Two case reports. **Forensic Science International** v.184, e1–e6, 2009.

## **8. ANEXO 1**

Encontra-se anexado as normas da revista *Biochemical Pharmacology* onde será submetido o Artigo intitulado “A Exposição Crônica ao Mercúrio Inorgânico Promove Déficits Motores Associados à Morte Celular e Estresse Oxidativo no Córtex Motor de Ratos Adultos”, que corresponde a parte dos dados encontrados nessa investigação.



### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.5</b>



ISSN: 0006-2952

### DESCRIPTION

*Biochemical Pharmacology* publishes original research findings, Commentaries and review articles related to the elucidation of cellular and tissue function(s) at the biochemical and molecular levels, the modification of cellular phenotype(s) by genetic, transcriptional/translational or drug/compound-induced modifications, as well as the pharmacodynamics and pharmacokinetics of xenobiotics and drugs, the latter including both small molecules and biologics.

The journal's target audience includes scientists engaged in the identification and study of the mechanisms of action of xenobiotics, biologics and drugs and in the drug discovery and development process.

All areas of cellular biology and cellular, tissue/organ and whole animal pharmacology fall within the scope of the journal. Drug classes covered include anti-infectives, anti-inflammatory agents, chemotherapeutics, cardiovascular, endocrinological, immunological, metabolic, neurological and psychiatric drugs, as well as research on drug metabolism and kinetics. While medicinal chemistry is a topic of complimentary interest, manuscripts in this area must contain sufficient biological data to characterize pharmacologically the compounds reported. Submissions describing work focused predominately on chemical synthesis and molecular modeling will not be considered for review.

While particular emphasis is placed on reporting the results of molecular and biochemical studies, research involving the use of tissue and animal models of human pathophysiology and toxicology is of interest to the extent that it helps define drug mechanisms of action, safety and efficacy.

Reports describing experiments conducted with natural product mixtures, plant or animal extracts will not be considered for publication unless the structures and concentrations of all component substances are known, and the agents can be easily obtained by others wishing to replicate the study.

The chemical structure of all novel compounds tested must be included in the submitted manuscript or be readily accessible in the published literature. References to structures in the patent literature must unambiguously identify a single molecular structure. All compounds, reagents, instrumentation and equipment employed in a study must be available from identified commercial suppliers, bio/pharmaceutical companies or from individuals holding legal rights to their use. Submissions will not be considered for publication if the chemical structures of tested compounds are not revealed, generally known, or accessible in the literature.

**Original research submissions must contain:** A rationale for the selection of the compound/drug for study as well as for the concentrations/doses employed. Quantities used for concentration- and dose-response experiments should vary logarithmically, e.g., 1, 3, 10, 30 mg/kg, 0.1, 1.0, 10, 100 nanomolar, etc. Justification must be provided for studying only a single concentration or dose of a compound, especially as it relates to reference standards and antagonists/modulators of receptors, enzymes and signaling pathways. Justification must also be provided for the selection of the statistical tests employed as they relate to the experimental design. It is expected that all findings have been subjected to rigorous quantitative analyses, with the calculation and reporting of IC50, Ki, EC50, etc., values. These must be derived from a minimum of three (3) separate and distinct experiments, with the replicates within any single experiment being averaged to obtain a single value for that experimental series. Manuscripts that fail to meet these criteria will be subject to rejection without peer-review.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy  
Biochemical Pharmacology and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy.

Please bookmark this URL: <http://www.elsevier.com/locate/biochempharm>

### **Benefits to authors**

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

## **AUDIENCE**

---

Pharmacologists, Biochemists, Toxicologists, Neuroscientists, Molecular and Cellular Biologists.

## **IMPACT FACTOR**

---

2015: 5.091 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## **ABSTRACTING AND INDEXING**

---

BIOSIS  
Elsevier BIOBASE  
Chemical Abstracts  
Current Contents/ASCA  
Current Contents/BIOMED Database  
Current Contents/Life Sciences  
Current Contents/SciSearch Database  
Current Contents/Science Citation Index  
MEDLINE®  
EMBASE  
PASCAL/CNRS  
Reference Update  
Scopus

## **EDITORIAL BOARD**

---

### ***Editor-in-Chief:***

**S.J. Enna**, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas, USA

### ***Editors:***

**J.G. Piette**, Université de Liège, Liège, Belgium

**K. Mullane**, Profectus Pharma Consulting, Inc., San Jose, California, USA

**Associate Editors:**

**R.A. Khalil**, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

**O. Leo**, Université Libre de Bruxelles (ULB), Charleroi, Belgium

**G. Viola**, University of Padova, Padova, Italy

**Review Editor:**

**M. Williams**, Northwestern University, Lake Forest, Illinois, USA

**Editorial Office:**

**Biochemical Pharmacology**, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Boulevard, Mail Stop 4016, Kansas City, KS 66160, Kansas, USA, Fax: +1-913-588-7373

**Managing Editor:**

**L. LeCount**

**Editorial Coordinator:**

**J. McNichols**

**Editorial Advisory Board****Antibiotics and Chemotherapeutics**

**R. Alfieri**, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy

**C. Bailly**, Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse, France

**D. Bassi**, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA

**S. Ceruti**, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

**B.S. Cummings**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA

**E. De Clercq**, KU Leuven, Leuven, Belgium

**M. Diederich**, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea

**J.-D. Docquier**, Università degli Studi di Siena, Siena, Italy

**M. Galleni**, Université de Liège, Liège, Belgium

**HP. Gerber**, Pfizer Biotherapeutics, Pearl River, New York, USA

**R. Ghosh**, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

**C. Giardina**, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA

**A. Giordano**, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, USA

**H.K. Ho**, National University of Singapore, Singapore, Singapore

**O. Handa**, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

**S.E. Kane**, City of Hope, Duarte, California, USA

**K. Kashfi**, City University of New York (CUNY), New York, New York, USA

**F.A.E. Kruyt**, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen, Netherlands

**F. Lezot**, Université de Nantes, Nantes, France

**I. Marzo**, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

**C. Michiels**, Université de Namur, Namur, Belgium

**J. Neyts**, KU Leuven, Leuven, Belgium

**S. Nock**, Cephalon, Inc., Redwood City, California, USA

**B.A. Ruggeri**, Cephalon, Inc., West Chester, Pennsylvania, USA

**G.L. Russo**, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino, Italy

**C. Schwartz**, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

**D.A. Skoufias**

**K.S.M. Smalley**, H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, Florida, USA

**F. Stossi**, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

**F. Takahashi-Yanaga**, Kyushu University, Fukuoka, Japan

**B.A. Teicher**, National Cancer Institute, Rockville, MD, USA

**K.D. Tew**, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA

**A. Therien**, Merck&Co. Inc., Kenilworth, New Jersey, USA

**J. Wang**, Shanghai Medicilon, Inc., Shanghai, China

**F. Zunino**, National Institute for the Study and Cure of Tumors, Milan, Italy

**Cardiovascular**

**J.Y.H. Chan**, Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan

**L. De Windt**, University of Maastricht, Maastricht, Netherlands

**C. de Wit**, Universität zu Lübeck, Lübeck, Germany

**G. Dusting**, University of Melbourne, East Melbourne, Victoria, Australia

**Y.-H. Feng**, Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, Maryland, USA

**B.M. Frey-von Matt**, Universitätsspital Bern, Bern, Switzerland

**D.J. Fulton**, Augusta University, Augusta, Georgia, USA

**F.G. Spinale**, University of South Carolina, Columbia, South Carolina, USA

**B. Staels**, Institut Pasteur, Lille, France

**A.H. Wagner**, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

**R.J. Winquist**, Xenon Pharmaceuticals Inc., Burnaby, British Columbia, Canada

### ***Metabolic Disorders and Endocrinology***

**N. Chattopadhyay**, Central Drug Research Institute, Lucknow, Uttar Pradesh, India

**Y. Kanai**, Osaka University, Suita-Shi, Japan

**A. Kowluru**, Wayne State University, Detroit, MI, USA

**N.H. Moniri**, Mercer University, Atlanta, Georgia, USA

**M.E. Poirot**, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

**A. Romani**, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA

**C.D. Sutherland**, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

### ***Inflammation and Immunopharmacology***

**M.J. Alcaraz**, Universitat de València, Valencia, Spain

**R. Beyaert**, Universiteit Gent, Gent (Zwijnaarde), Belgium

**A. Bowie**, Trinity College, Dublin, Ireland

**F. D'Acquisto**, William Harvey Research Institute, London, UK

**J. El Benna**, INSERM, Paris, France

**M.P. Fink**, University of California at Los Angeles (UCLA), Los Angeles, California, USA

**K.B. Glaser**, AbbVie, Inc., North Chicago, Illinois, USA

**J.P. Hardwick**, Northeastern Ohio University College of Medicine, Rootstown, Ohio, USA

**J.D. Imig**, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA

**J.-H. Lai**, Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan

**E. Lavelle**, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

**D. MacEwan**, University of Liverpool, Liverpool, England, UK

**C. Martini**, Università di Pisa, Pisa, Italy

**K. McCoy**, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

**J.J. Moreno**, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**M. Mousli**, University of Strasbourg, Strasbourg, France

**O. Stendahl**, Linköping University, Linköping, Sweden

**K. Suk**, Kyungpook National University, Daegu, South Korea

**D.R. Webb**, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

**O. Werz**, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

### ***Neuropharmacology***

**D.C. Bertrand**, HiQScreen Sàrl, Geneva, Switzerland

**B. Bettler**, Universität Basel, Basel, Switzerland

**R.A.J. Challiss**, University of Leicester, Leicester, UK

**S.H.H. Chan**, Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, Kaohsiung, Taiwan, ROC

**D. Fitzgerald**, University College Dublin, Belfield, Ireland

**C. Forray**, Lundbeck Research USA, Paramus, New Jersey, USA

**M.F. Jarvis**, AbbVie, North Chicago, Illinois, USA

**M.J. Marino**, Merk&Co Inc., West Point, Pennsylvania, USA

**P. McGonigle**, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

**P.J. McLaughlin**, Penn State University College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA

**H. Möhler**, Universität Zürich, Zürich, Switzerland

**W.H. Moos**, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, California, USA

**G. Perry**, University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas, USA

**R.D. Spealman**, Harvard Medical School, Belmont, Massachusetts, USA

**A.D. Wickenden**, Janssen Research&Development, San Diego, California, USA

**J.M. Witkin**, Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA

### ***Pharmacokinetics and Drug Metabolism***

**I. de Lannoy**, InterVivo Solutions, Mississauga, Ontario, Canada

**J.R. Idle**, Universität Bern, Bern, Switzerland

**K.-I. Inui**, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan

**H. Yamazaki**, Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

### ***Toxicology***

**K.W. Bock**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Germany

**B.J. Day**, National Jewish Medical and Research Center, Denver, Colorado, USA

**C. Schwartz**, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

**C. Schwartz**, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

**Q. Xu**, Nanjing University, Nanjing, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Biochemical Pharmacology* is an international peer reviewed journal devoted to publishing original research and invited reviews and commentaries on the interaction of chemical compounds with biological systems. Manuscripts describing experiments conducted with chemical mixtures, plant or animal extracts will not be considered for publication unless the chemical structures and precise concentrations of all substances are reported.

While particular emphasis is placed on reporting findings that relate to pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism of both small molecules and biologics at the biochemical and molecular levels, submissions in the areas of behavioral and physiological pharmacology and toxicology are considered if they describe studies directed at defining mechanisms of action. All areas related to the field of pharmacology are represented in the journal including, but not limited to, chemotherapy, neuropharmacology, inflammation/immunopharmacology, antimicrobials, behavioral, respiratory, gastrointestinal, cardiovascular and endocrine pharmacology and toxicology.

Reports describing *de novo* results of clinical studies and those that predominately or exclusively concern database mining and analysis and computational methodologies, e.g. CAMD, are outside the scope of the journal.

#### *Types of papers*

**(1) Full-length Research Papers.** *Biochemical Pharmacology* publishes original research on issues of relevance to the field of pharmacology.

**(2) Reviews and Commentaries.** These articles are by invitation only and provide the authors' views on a selected topic of interest to pharmacologists.

#### *Manuscript preparation and submission*

Provided below is detailed information on the scientific criteria and manuscript formatting required for an article to be considered for publication in *Biochemical Pharmacology*. The online submission process includes the Scientific Checklist (Table 1). Failure to complete the Checklist, or a lack of a response to any items on the Scientific Checklist, automatically disqualifies the work for consideration. Note especially items 1 - 4 as a negative response to any of these automatically disqualifies the report for consideration. See Mullane et al., *Guidelines for Manuscript Submission in the Peer-Reviewed Pharmacological Literature (Biochem. Pharmacol. 97:225-235, 2015; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003585>)* for a detailed discussion of the issues addressed in the Scientific Checklist.

#### *Scientific Checklist*

##### **Table 1. Scientific Submission Checklist**

*Please answer the following questions with "Yes", "No", or "Not applicable".*

##### **Formatting - The submission will automatically be rejected if these first four questions are not marked "yes"**

1. As *Biochemical Pharmacology* does NOT publish supplemental data with the exception of audio or video files, are all necessary data included in the body of the manuscript?
2. Are all tables and figures numbered and appropriately titled with descriptive legends that permit stand-alone interpretation?
3. Are all data shown in the figures and tables also shown in the text of the Results section and discussed in the Conclusions?
4. Does the e-mail address for the corresponding author indicate an affiliation with a research-based institution or has the author provided a separate statement written in English on institutional letterhead and signed by an official responsible for research activities for the institute verifying the affiliation listed by the corresponding author, along with the official's institutional e-mail contact information?

##### **Introduction**

5. Is there a clear statement with background describing the hypothesis being tested by this study?
6. Are the primary endpoints clearly described?

##### **Materials and Methods**

7. The sources of all study materials are clearly indicated and is it acknowledged that reports containing experiments conducted with chemical mixtures, plant or animal extracts are not considered for publication unless the chemical structures and precise concentrations of all substances are reported?
8. Is (are) the chemical structure(s) of any new compound(s) presented as a figure in the manuscript or referenced in the peer-reviewed literature?
9. Are the source(s) and passage number of cell lines indicated?
10. Were cell lines authenticated by you or the vendor?
11. If used, has the selectivity of antibodies and/or interference RNA been validated and is/are their source clearly indicated?
12. If used, has the species, strain, sex, weight and source of the animals been provided?
13. Is a statement included in the text indicating compliance with regulations on the ethical treatment of animals including the identification of the institutional committee that approved the experiments?
14. Is the rationale provided for the selection of concentrations, doses, route and frequency of compound administration?
15. Are quantified results (e.g., IC<sub>50</sub> and/or EC<sub>50</sub> values) of concentration- and dose-response experiments included in the manuscript?
16. If used, is the method of anesthesia described?
17. Are all group sizes approximately the same?
18. Were the criteria used for excluding any data from analysis determined prospectively and clearly stated?
19. Was the investigator responsible for data analysis blinded to which samples/animals represent control and treatment groups?
20. Is the exact sample size (*n*) for each experimental group/condition clearly indicated in the text and/or in the tables and figures?
21. Are the reported data displayed as the mean +/- standard deviation (SD) of three or more independent experimental replications?
22. Is the number of replicates used to generate an individual data point in each of the *independent* experiments clearly indicated and is it equal to or greater than 3?
23. Were the statistical tests used to analyze the primary endpoints predetermined as part of the experimental design?
24. Is the threshold for statistical significance (P value) clearly indicated?
25. Were the data normalized?
26. Were *post-hoc* tests used to assess the statistical significance among means?
27. Were human tissues or fluids used in this study?

### **Results**

28. If western blots are shown, are the following included: i) appropriate loading controls for each western blot, ii) replication data, iii) quantification, and iv) the results of a statistical analysis?
29. If PCR and RT-PCR are included, were MIQE guidelines followed?
30. Was a reference standard (positive or negative controls) included in the study to validate the experiment?

### **Discussion**

31. Are all the findings considered within the context of the hypothesis presented in the Introduction?
32. Are the primary conclusions and their implications clearly stated?
33. Are any secondary endpoints reported and are these sufficiently powered for appropriate statistical analysis?
34. Are the limitations of the current study or alternative interpretations of the findings clearly stated?

### **Conflict of Interest/Financial Support**

35. Indicate by checking the box at right that a conflict of interest statement is included in the manuscript
36. Indicate by checking the box at right that all organizations providing funding for this work are listed in Acknowledgements.

Please list any additional explanation(s) you feel may be necessary on the above questions:

### **BEFORE YOU BEGIN**



### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### **Declaration of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

### **Submission**

All articles must be in editable files (e.g. Word, LaTeX) and submitted online at <http://ees.elsevier.com/bcp>. Articles submitted as pdfs will not be processed.

### **Categories**

Authors must indicate on the title page which of the following categories best describes their work:

- Antibiotics and Chemotherapeutics
- Cardiovascular Pharmacology
- Gastrointestinal Pharmacology
- Inflammation and Immunopharmacology
- Metabolic Disorders and Endocrinology
- Neuropharmacology
- Pharmacokinetics and Drug Metabolism
- Pulmonary, Renal and Hepatic Pharmacology
- Toxicology

## **PREPARATION**

### **Manuscript preparation**

#### **Language**

Neither the Editorial Board nor the reviewers will provide detailed advice for improving the grammar and clarity of a manuscript, regardless of the scientific merit of the work. Authors are responsible for ensuring the article is written in clear English. Either American or British usage is accepted, but

not a combination of the two. Manuscripts lacking linguistic clarity or that are not prepared according to the style guidelines outlined below will not be considered for publication. Authors can have their manuscript language-edited. See [English Editing Services](#) under Useful Links below.

### **Use of Word Processing Software**

See [http://www.elsevier.com/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0003/91173/Brochure\\_UPP\\_April2015.pdf](http://www.elsevier.com/__data/assets/pdf_file/0003/91173/Brochure_UPP_April2015.pdf) for specific instructions about recommended programs for manuscript preparation, including directions about the placement of mathematical equations, tables and figures and the use of spell-check and grammar-check.

### **Article Layout**

Reports must be written in English with the pages numbered sequentially. The text must be double-spaced in single-column format with 1" or 25 mm margins. Size 12 (point) Times Roman or Arial font is preferred. The article must be divided into clearly defined sections. The required sections are Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and References. See Mullane et al., *Guidelines for Manuscript Submission in the Peer-Reviewed Pharmacological Literature (Biochem. Pharmacol.97:225-235, 2015; http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003585)* for a detailed discussion of the topics that must be covered in each section. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ), 1.2, etc. The abstract is not included in section numbering. This numbering should be used for internal cross-referencing in the text. Subsections may be assigned a brief heading that appears alone on a separate line.

### **Title and Abstract**

The article title should be concise but informative. All abbreviations must be spelled out fully when first mentioned in the abstract or body of the report.

### **Keywords**

Immediately following the abstract the authors must provide up to 6 keywords for indexing purposes. American spelling must be used, avoiding general and plural terms and multiple concepts. Only established abbreviations may be proposed as keywords.

#### *Chemical compounds*

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information.](#)

### **Compounds**

A list of all compounds cited in in the article must be provided immediately below the Keywords. This list will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database for display in *ScienceDirect* next to the online version of the article. Authors may include up to 10 names of compounds mentioned in the article. For each compound the author must provide the PubChem CID of the most relevant record. For example, Glutamic acid (PubChem CID:611). PubChem CIDs can be found through <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. The authors must follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds cited in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information on the compound database is available at <http://www.elsevier.com/PubChem>.

## Acknowledgments

Acknowledgments must be listed in a separate section at the end of the article before the references. The Acknowledgments should include the names of individuals, organizations and funding agencies that provided assistance in underwriting and reporting the work.

## Nomenclature and abbreviations

Receptor and ion channel nomenclature must conform to guidelines of the Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) (<http://www.guidetopharmacology.org/nomenclature.jsp>). Use only abbreviations that are generally accepted by the scientific community. Click [HERE](#) to view the full list of abbreviations that can be employed without definition. Drugs or other compounds should only be identified by their chemical or generic names. The source, including company name and location, for all chemicals, reagents, cell lines, tissue, and experimental animals must be provided in Materials and Methods.

## GenBank

GenBank accession numbers should be typed in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized. Example: a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**) In the final electronic version of the article, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases.

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly and numbered consecutively throughout the text. Indicate the position of footnotes in the text and list them separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

## Figure Legends

Illustrations must have a caption that is listed separately from the figure in the submitted version of the work. The caption should be self-explanatory without the need to reference the accompanying text. All symbols appearing on the illustration must be clearly defined in the figure legend.

## Tables

All tables must be numbered consecutively in Arabic numerals and cited in the text in their order of appearance. Table titles should be brief and descriptive. Tables should appear individually on separate pages in the submitted version of the work, together with a legend that includes sufficient information about the experimental protocol and results so the reader does not have to refer back to the text to understand the experimental protocol and findings. Tables should not have vertical lines, and the number of horizontal lines should be minimized.

## References

### *Citations in text*

Ensure that every reference cited in the text is present in the reference list, and vice versa. Unpublished results and personal communications should not appear in the reference list, but may be indicated in the text.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting for the initial submission. References can be in any style or format as long as they are consistent within the manuscript. Regardless of the format, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be shown. Use of DOI is encouraged.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager/>: Elsevier [Numeric, with titles]) and also others like EndNote (<http://endnote.com/downloads/style/biochemical-pharmacology>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles/>).

### **Institutional Email Address**

As of January 1st, 2016 manuscripts will not be considered for publication in *Biochemical Pharmacology* if the email address for the corresponding author does not reflect an affiliation with a research-based institution. Alternatively, the submission must include a separate statement in English on institutional letterhead signed by an official responsible for research activities for the institute from which the manuscript originates verifying the affiliation listed by the corresponding author, along with the official's institutional email contact information.

### **Graphical Abstract**

Authors asked to submit a revised version of the work for consideration must also supply a graphical abstract at that time. The graphical abstract, which will be displayed on the online Table of Contents, should provide a concise summary of the work in pictorial form designed to capture the attention of a wide audience and for compilation of databases. Graphical Abstract text should not exceed 30 words. The content of the graphical abstract should be kept within an area of 5 cm tall by 17 cm wide (landscape shape). Authors are encouraged to limit graphical abstracts to 189 pixels tall by 642 pixels wide to ensure the image and text will be legible when displayed online. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. See <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00062952/94/2> for examples of graphical abstracts.

### **Archival Material Requirement**

At the manuscript revision stage all authors must submit, together with the revised manuscript, a zip-file titled "Archival\_material.zip" that contains the original, uncropped and unedited photographs of all figures in the final article that represent gels, western blots, microscopic photos, etc. Failure to provide such original photographs will delay, or even preclude, publication in *Biochemical Pharmacology*.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases.](#)

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any

time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **Useful Links**

Listed below are links to sites that provide additional details on topics relating to the preparation and submission of manuscripts for publication in *Biochemical Pharmacology* as well as post-publication resources.

English Editing Services: <http://webshop.elsevier.com/languageediting>

Electronic

Artwork:

<https://www.elsevier.com/authors/author-schemas/artwork-and-media-instructions>

Reference Formatting: <http://endnote.com/downloads/style/biochemical-pharmacology>

Acceptable Abbreviations: [http://www.elsevier.com/\\_\\_data/promis\\_misc/bcp\\_abbreviations.pdf](http://www.elsevier.com/__data/promis_misc/bcp_abbreviations.pdf)

Audio/Video

Files:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions;>

<http://www.elsevier.com/audioslides>

Database Linking: <http://www.elsevier.com/databaselinking>

Tracking Accepted Articles: <http://www.elsevier.com/trackpaper.html>

Commercial Reprints: <https://www.elsevier.com/advertisers/our-services/commercial-reprints>

Permissions: <http://www.elsevier.com/permissions>

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

**9. ANEXO 2**

Encontra-se anexado o parecer do comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação





**PARECER BIO139-13**

**Projeto:** Avaliação das alterações em glândulas salivares e sistema nervoso de ratos intoxicados cronicamente com cloreto de mercúrio e metilmercúrio: análise motora, tecidual e de marcadores do estresse oxidativo

**Coordenador:** Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

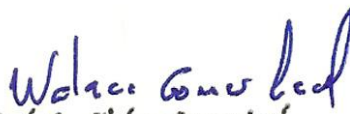
**Área Temática:** Neurociências

**Vigência:** 06/2013 a 07/2015

**Nº no CEPAE-UFPA:** 139-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 21 de junho de 2013

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFPA



## 10. ANEXO 3

Encontra-se anexado os protocolos utilizados nos experimentos realizados nessa investigação

### TAMPÃO FOSFATO / PB 0,4 (PH = 7.2 – 7.4)

➤ **Objetivo:** Solução de estoque, a qual se utiliza de base para preparo de outras soluções tampão.

➤ **Reagentes:**

- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>;
- ✓ Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O);
- ✓ Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O);

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Dois Beckers (plástico ou vidro) - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
- ✓ Proveta
- ✓ Agitador Magnético (Verificar ímã);
- ✓ PHmetro

➤ **Preparo (1 litro):**

**Solução A:** Acrescentar à 200 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 10,5g de Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) no primeiro Becker;

**Solução B:** Acrescentar à 800 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 114g de Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O) no segundo Becker.

Misturar as duas soluções e ajustar o PH (7.2 - 7.4).

➤ **Observações:**

Obs 1: Sempre se faz necessário a utilização de agitador magnético para homogeneizar a solução B.

Obs 2: Manter a solução em frasco fechado à temperatura ambiente, lacrado com filmito, sugere-se a utilização de garrafas.

**DILUIÇÃO DE TAMPÃO FOSFATO / PB 0,4 (PH = 7.2 – 7.4)**

➤ **Reagentes:**

- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>;
- ✓ Tampão Fosfato/ PB 0.4

➤ **Materiais e Equipamentos:**

✓ Um Becker (plástico ou vidro) - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.

✓ Proveta

➤ **Tampão Fosfato 0.2M**

Para o preparo de 1l: Diluir 500 ml de tampão fosfato 0.4M em 500 ml de água destilada.

➤ **Tampão Fosfato 0.1M**

Para o preparo de 1l: Diluir 250 ml de tampão fosfato 0.4M em 750 ml de água destilada.

➤ **Tampão Fosfato 0.05M**

Para o preparo de 1l: Diluir 500 ml de tampão fosfato 0.1M em 500ml de água destilada.

➤ **Tampão Fosfato Salina**

Para o preparo de 1l: Acrescentar 9 g de Cloreto de Sódio em 1L de tampão fosfato 0.1M.

➤ **Tampão Fosfato Salina Tween**

Para o preparo de 1l: Acrescentar 0,5 ml de tween 20% em 1l de tampão fosfato salina.

## TAMPÃO CITRATO

➤ **Reagentes:**

- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- ✓ Ácido Cítrico;
- ✓ NaOH.

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Um Becker de vidro - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
- ✓ Proveta;
- ✓ Agitador Magnético (Verificar ímã);

➤ **Preparo (500 mL):**

## HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NAOH) 2M

➤ **Reagentes:**

- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>;
- ✓ NaOH.

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Um Becker de vidro - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
- ✓ Proveta

➤ **Preparo (50 mL):**

- ✓ Adicionar 4g de NaOH em 50 mL de água destilada e agitar bem.

## PARAFORMALDEÍDO 4% (pH 7.2 – 7.4)

- **Objetivo:** Perfusão e pós-fixação
- **Reagentes:**
  - ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>;
  - ✓ Tampão fosfato 0.2M
  - ✓ Paraformaldeído (fórmula química);
  - ✓ Hidróxido de Sódio.
- **Materiais e Equipamentos:**
  - ✓ Um Becker de vidro - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
  - ✓ Proveta
  - ✓ Agitador Magnético (Verificar ímã);
  - ✓ Banho maria
- **Preparo (1 litro):**
  - ✓ Aquecer 500 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> em banho Maria até alcançar (70° C).
  - ✓ Adicionar 40 g de paraformaldeído na solução aquecida sob agitação
  - ✓ Adicionar NaOH micropérolas gradualmente até a solução homogeneizar (a com solução com aspecto leitoso tornará translúcida)
  - ✓ Após a mistura estar totalmente homogênea acrescentar o 500 mL de tampão fosfato 0,2M.

## SOLUÇÃO SALINA 0.9%

➤ **Reagentes:**

- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>;
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl)

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Um Becker (vidro ou plástico) - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
- ✓ Proveta

➤ **Preparo (1 litro):**

Adicionar 0.9 g de NaCl em 1 l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

➤ **Observações:**

Com o objetivo de perfusão, se faz necessário. acrescentar 1 mL de heparina 5.000UI/ mL por litro.

## SILANO

- **Objetivo:** Silanização de Lâminas
- **Reagentes:**
  - ✓ Silano;
  - ✓ Álcool 100%.
- **Materiais e Equipamentos:**
  - ✓ Um recipiente de vidro - verificar o volume de acordo com a quantidade de solução.
  - ✓ Proveta
  - ✓ Pipetador;
- **Preparo (200 mL):**

Adicionar 20 mL de silano em 180 mL de Etanol 100%.

## SILANIZAÇÃO

- **Materiais e Equipamentos:**
  - ✓ Solução de Silano a 10%;
  - ✓ 2 cubetas e 1 cesta de lâminas;
  - ✓ Água de Mili-Q;
- **Modo de silanização:**
  - ✓ Em uma cubeta de volume mínimo de 200 mL, colocar a solução de silano;
  - ✓ Em outra cubeta adicionar a água mili-Q
  - ✓ Dar cinco mergulhos lentos da cesta com lâminas na solução de silano;
  - ✓ Dar cinco mergulhos na cubeta de água mili-Q;
  - ✓ Secar em estufa a 36 °C;
  - ✓ Guardar em caixas com Silica Gel.

**SOLUÇÃO DE TRIS-HCL 20 MM, PH 7,4 (P.M.: 121,14 G/MOL;  
 FÓRMULA: C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)**

- ✓ Dissolver o Tris em 80% do volume pretendido com Água Destilada;
- ✓ Ajustar o pH para 7,4 (Usar somente HCl 35%);
- ✓ Adicionar Água Destilada até atingir o volume final pretendido;
- ✓ Conservar à 4°C.

**SOLUÇÃO DE N-METIL-2-FENILINDOL (SIGMA) 10,3 MM  
 (P.M.: 207,27 G/MOL; FÓRMULA: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N)**

- ✓ Estoque: Dissolver a massa de NMFI no volume desejado de Acetonitrila de acordo com a tabela abaixo:

Acetonitrila	NMFI	Acetonitrila	NMFI	Acetonitrila	NMFI
5 mL	0,01067 g	20 mL	0,0427 g	40 mL	0,0854 g
10 mL	0,02135 g	30 mL	0,06405 g	50 mL	0,10674 g

- ✓ Exemplo: Para preparar 40 mL de NMFI, dissolve-se 0,0854 g de NMFI em 40 mL de Acetonitrila;
- ✓ Ensaio: Diluir a solução de NMFI 10,3 mM em Metanol (1:3 = 1/4);

**NEDA = NAFTIETILENO 0,1%, 50 ML (P.M.:259,17 G/MOL;  
 FÓRMULA: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)**

- ✓ Pesar 0,05 g de Naftietileno;
- ✓ Adicionar 40 mL de Água Destilada e completar até 50 mL.

**SULFA = SULFANILAMIDA 1%, 50 ML (P.M.: 172,2G/MOL;  
FÓRMULA: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S)**

- ✓ Pesar 0,5 g de Sulfanilamida;
- ✓ Adicionar 40 mL de Ácido Fosfórico 5% e completar até 50 mL.

**SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO 0,1 MM, 10 ML (P.M.: 69  
G/MOL)**

- ✓ Pesar 69 mg de Nitrito de Sódio;
- ✓ Adicionar 10 mL de Água Destilada.

**CORANTE DE ENSAIO (BRADFORD)**

- ✓ Dissolver 100 mg de Coomassie blue G-250 em 50 mL 95% Etanol, ou Metanol (Se possível filtrar a solução);
- ✓ Adicionar 100 mL de Ácido Fosfórico (85%, p/v);
- ✓ Diluir até 1 litro com Água Destilada;
- ✓ A solução deve ser verde escuro/marrom claro, e ter um pH de 1.1. É estável em recipiente escuro à 4°C (Semanas).

**BSA (2MG/ML)**

- ✓ Dissolver 2 mg de BovineSerumAlbumine (BSA) em 1000 µL de Água Destilada;
- ✓ Fazer alíquotas da solução e estocar à 4°C.



## OPEN FIELD



### ➤ Avaliação

- ✓ A avaliação dos parâmetros do open Field é por meio de um software denominado de *Any maze*;
- ✓ Parâmetros não avaliados pelo software são o número de *rearing* (movimento vertical espontâneo) e tempo de *grooming* (autolimpeza), logo estes devem ser verificados e tabulados no momento do teste.

### ➤ Procedimentos

- ✓ Ajustar uma câmara de vídeo acima do aparato de modo que consiga observar todos os quatro ângulos da caixa de madeira com dimensões (100x100x40cm) e de forma equivalente (não pode estar torto);
- ✓ Colocar o animal no centro do aparato e contabilizar 5 min;
- ✓ Caso seja necessário contabilizar o número de *rearing* ou *grooming*, o avaliador deve estar o mais longe possível;
- ✓ Não deve haver nada que distraia o animal (luzes, ruídos, pessoas, etc).
- ✓ Após os 5 min, deve-se limpar o aparato com álcool 70.

## BEAM WALKING



### ➤ Avaliação

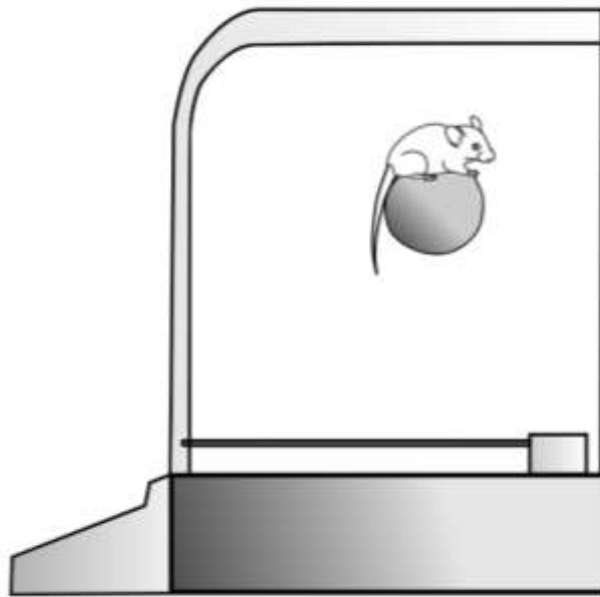
- ✓ A avaliação do *beam walking* é realizada no momento do teste.
- ✓ Os principais parâmetros são o número de escorregões das patas traseiras e o tempo de escape, ou seja, o tempo em o animal demora para percorrer a viga de madeira.
- ✓ **Procedimentos**

Neste teste, faz-se necessário o mínimo de dois colaboradores.

- ✓ O primeiro será o avaliador. Este ficará posicionado na extremidade livre da viga, voltado de frente para a abertura da casa, ou seja, observando a região posterior do animal, favorecendo sua observação das patas traseiras;
- ✓ O segundo irá posicionar os animais, limpar o aparato e outras atividades relacionadas;
- ✓ O *beam walking* possui seis vigas, sendo três quadradas e três circulares com diâmetros variados. Quadradas de 28 mm, 12 mm e 5 mm e circulares 28mm, 17mm e 11mm

- *Ambientação*
  - ✓ Colocar o animal coma cabeça voltada à extremidade livre na viga de maior diâmetro no período máximo de 120 s.
  - ✓ Caso o animal não vá em direção a casa, é permitido nesta fase ajudar o animal a reconhecê-la.
- *Teste.*
  - ✓ Colocar o animal voltado à extremidade livre na viga no período máximo de 60 s.
  - ✓ Permitir o descanso do animal durante 60 s.
  - ✓ Recolocar o animal em uma viga que demonstre outro desafio de maior dificuldade.
- *Vigas*
  - ✓ A sequência de vigas será: Quadrada de 28 mm, quadrada de xmm, quadrada de 5 mm, circular de 28 mm, circular de 17mm, circular de 11mm.
  - ✓ Ao término do teste de cada animal deve-se limpar o aparato com álcool 70.

## ROTA ROD



### ➤ Avaliação

- ✓ A avaliação do rota rod é realizada no momento do teste.
- ✓ Os principais parâmetros são o número de quedas e o tempo de latência para a primeira queda.

### ➤ Procedimentos

- ✓ Há dois protocolos possíveis para o rota Rod.
  - *Protocolo de velocidades constantes*
- ✓ Consiste em quatro etapas de 180 segundos (treino, teste 1, teste 2 e teste 3);
- ✓ Todos os teste possuirão a mesma velocidade, sendo esta escolhida pelo pesquisador (normalmente é 8 RPM ou 15 RPM).
  - *Protocolo de velocidades crescentes*

- ✓ Consiste em seis etapas de 180 segundos (pode ser diminuída a critério do pesquisador);
- ✓ As velocidades já são programas no aparato. Treino – 8 RPM, Teste 1 – 15 RPM, Teste 2 – 20 RPM, Teste 3 – 25 RPM, Teste 4 – 28 RPM, Teste 5 – 35 RPM.
  
- ✓ Neste teste é colocado o animal cuidadosamente sobre o cilindro giratório em movimento. Principalmente devido o possível engate das patas em um espaço entre o cilindro e a parede da baia.
- ✓ Contabiliza-se o tempo de latência até a primeira queda e o número de quedas em cada teste de 180 s.
- ✓ O rota Rod permite a realização de até 4 animais, pois o aparato possui 4 baias. Sugere-se realizar todos os animais em cada teste, para assim prosseguir para o próximo (principalmente em velocidades crescentes).
- ✓ Ao ligar o rota Rod o cilindro irá girar em 8RPM.
- ✓ Caso necessite aumentar a velocidade, deve-se ajustar a velocidade desejada no aparato e esperar um tempo mínimo para o mesmo girar na velocidade escolhida (isso é indicado por uma barra encontrada no leitor). Quando a barra estiver cheia, indica que o rota Rod está girando na velocidade desejada.
  
- ✓ Ao término de cada sessão limpar o aparato com álcool 70.

## AVALIAÇÕES DA BIOQUÍMICA OXIDATIVA

### ➤ **COLETA**

#### ➤ **Reagentes**

- ✓ Nitrogênio;
- ✓ Solução salina ou PBS

#### ➤ **Materiais e Equipamentos**

- ✓ Garrafa térmica
- ✓ Eppendorfs
- ✓ Placa de Gelo

#### ➤ **Procedimento**

- ✓ Sacrificar o animal por deslocamento cervical e imediatamente realizar a craniotomia;
- ✓ Colocar o encéfalo em um recipiente com solução salina gelada sobre uma placa de gelo e realizar a dissecação da área desejada;
- ✓ Colocar a amostra em um eppendorf identificado, tampar e despejar dentro de uma garrafa térmica com nitrogênio líquido;
- ✓ No término da coleta despejar todo o conteúdo da garrafa térmica dentro de um isopor;
- ✓ Guardar os eppendorfs com as amostras em um recipiente e armazenar em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## SONICAÇÃO

- **Preparo das amostras para dosagens de nitrito, peroxidação lipídica e proteína**
  - ✓ Descongelar o tecido de interesse em banho de gelo;
  - ✓ Adicionar de 500-700  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl);
  - ✓ Sonicar 2-3x por 10 segundos com 50% de potência;
  - ✓ Separar em eppendorfs devidamente identificados 20  $\mu\text{L}$  para dosagem de proteína;
  - ✓ Separar em eppendorfs devidamente identificados 200  $\mu\text{L}$  para dosagem de ACAP;
  - ✓ Congelar todas as amostras em  $-80^{\circ}\text{C}$  até que seja realizado as quantificações.

## DOSAGEM DE PROTEÍNA (Método de Bradford)

### ➤ Reagentes:

#### ✓ Corante de Ensaio:

1. Dissolver 100 mg de Coomassie blue G-250 em 50 mL de Etanol ou metanol (95%), preferencialmente filtrar a solução após o preparo;
2. Adicionar 100 mL de Ácido fosfórico (85% v/v);
3. Diluir até 1 L com água destilada;
4. A solução deve ser Verde escuro/Marrom claro, ter pH de 1,1 e estável em recipiente escuro à 4°C (Semanas).

#### ✓ BSA (2mg/mL)

1. Dissolver 2 mg de Bovine Serum Albumine (BSA) em 1000  $\mu$ L de água destilada;
2. Fazer alíquotas da solução e estocar à 4°C.

### ➤ Materiais e Equipamentos:

- ✓ Microplaca.
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro



➤ **Curva Padrão:**

Tubos	BSA [2 mg/mL]	Água Destilada ou Tampão	[BSA] µg/mL
<b>P4</b>	40 µL do estoque	20 µL	1500
<b>P3</b>	30 µL do P4	30 µL	750
<b>P2</b>	30 µL do P3	30 µL	375
<b>P1</b>	0µL	30 µL	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Aclimatar o corante de ensaio à temperatura ambiente, misturar por inversão antes do uso;
- ✓ Pipetar 5µL dos Padrões de BSA e Amostras nos poços da microplaca (96 poços), em triplicata;
- ✓ Adicionar 250 µL do corante de ensaio dentro de cada poço contendo padrão ou amostra;
- ✓ Encubar em temperatura ambiente por até 5 minutos (Não ultrapassar 1 hora);
- ✓ Preparar o espectrofotômetro para o comprimento de onda  $\lambda \approx 568 \text{ nm}$ , e quantificar as absorbâncias

## ANÁLISE DOS NÍVEIS DE NITRITO (Método de Griess)

### ➤ Reagentes:

- ✓ Solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (P.M.: 121,14 g/mol; Fórmula:  $C_4H_{11}NO_3$ )
  1. Dissolver o Tris em 80% do volume pretendido com Água destilada;
  2. Ajustar o pH para 7,4 (Usar somente HCl 35%);
  3. Adicionar água destilada até atingir o volume final pretendido;
  4. Conservar a 4°C.
  
- ✓ NEDA = Naftietileno 0,1%, 50 mL (P.M.:259,17 g/mol; Fórmula:  $C_{12}H_{14}N_2$ ):
  1. Pesar 0,05 g de Naftietileno;
  2. Adicionar 40 mL de água destilada até atingir o volume e completar até atingir 50 mL.
  
- ✓ SULFA = Sulfanilamida 1%, 50 mL (P.M.: 172,2g/mol; Fórmula:  $C_6H_8N_2O_2S$ ):
  1. Pesar 0,5 g de Sulfanilamida;
  2. Adicionar 40 mL de Ácido Fosfórico 5% e completar até 50 mL.
  
- ✓ Solução Estoque de Nitrito 0,1 mM, 10 mL (P.M.: 69 g/mol; Fórmula:  $NO_2^-$ ):

1. Pesar 69 mg de Nitrito de Sódio;
2. Adicionar 10 mL de água destilada.

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Microplaca.
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Centrífuga

➤ **Curva Padrão:**

Tubos	NO [100µM]	Água Destilada ou Tampão	[NO] µM
P5	20µL	80 µL	20
P4	15µL	85 µL	15
P3	10µL	90 µL	10
P2	5µL	95 µL	5
P1	0µL	100 µL	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Centrifugar a 14000 rpm por 10 min;
- ✓ Retirar o sobrenadante para o ensaio.
- ✓ Preparar eppendorfs, devidamente identificados de acordo com as amostras ou curva padrão;
- ✓ Adicionar 50 µL de NEDA nos poços da microplaca;
- ✓ Adicionar 50 µL de SULFA nos poços da microplaca;
- ✓ Adicionar 100 µL das amostras (Sobrenadante) ou padrão nos poços com o reagente de Griess;
- ✓ Aguardar tempo de incubação de 20 min em temperatura ambiente;
- ✓ Proceder à leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda  $\lambda \approx 550 \text{ nm}$

## ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (Método NMFI)

### ➤ Reagentes:

✓ Solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (P.M.: 121,14 g/mol; Fórmula:  $C_4H_{11}NO_3$ ):

1. Dissolver o Tris em 80% do volume pretendido com Água destilada;
2. Ajustar o pH para 7,4 (Usar somente HCl 35%);
3. Adicionar água destilada até atingir o volume final pretendido;
4. Conservar a 4°C.

✓ Solução de N-Metil-2-Fenilindol (Sigma) 10,3 mM (P.M.: 207,27 g/mol; Fórmula:  $C_{15}H_{13}N$ ):

1. Estoque: Dissolver a 0,0854 g de NMFI em 40 mL de Acetonitrila;
2. Ensaio: Diluir a solução de NMFI 10,3 mM em metanol (1:3 =  $\frac{1}{4}$ ).

✓ Ácido Metanosulfônico P.A

### ➤ Materiais e Equipamentos:

- ✓ Microplaca
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro

✓ Centrifuga

➤ **Curva Padrão:**

Tubos	MDA [200 $\eta$ mol/mL]	Água Destilada ou Tampão	[MDA] $\eta$ mol/mL
P5	80 $\mu$ L do estoque	120 $\mu$ L	80
P4	100 $\mu$ L do P5	100 $\mu$ L	40
P3	100 $\mu$ L do P4	100 $\mu$ L	20
P2	100 $\mu$ L do P3	100 $\mu$ L	10
P1	0 $\mu$ L	100 $\mu$ L	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Centrifugar a 5600 rpm (2700g) por 10 min;
- ✓ Retirar o sobrenadante para o ensaio
- ✓ Preparar eppendorfs, devidamente identificados de acordo com as amostras ou curva padrão;
- ✓ Adicionar aos eppendorfs 325  $\mu$ L de NMFI e 75  $\mu$ L do Ác. Metanossulfônico;
- ✓ Adicionar 100  $\mu$ L das amostras (sobrenadante) ou padrão;
- ✓ Aquecer em banho maria 45°C por 40 min;
- ✓ Proceder à leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda  $\lambda \approx 586 \eta$ m.

## CAPACIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA RADICAIS PEROXIL (ACAP)

### ➤ Informação geral:

- ✓ As espécies reativas de oxigênio (ERO) serão detectadas pela reação com o diacetato de 2', 7'diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA, Molecular Probes), essa reação produzirá um fluorocromo que será detectado utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525 nm para excitação e emissão.
- ✓ As leituras serão realizadas em fluorímetro com leitura de microplacas (Victor 2, Perkin Elmer).

### ➤ Reagentes:

- ✓ Tampão Tris;
- ✓ Kit de Proteínas Biureto;
- ✓ Água de MilliQ;
- ✓ Tampão de Reação:
  1. 0,3575g de HEPES (30mM);
  2. 0,7455g de KCl (200mM);
  3. 0,0102g de MgCl<sub>2</sub> (1mM).
  4. Dissolver em 50 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q e ajustar o pH em 7,20.
  
- ✓ Solução de H<sub>2</sub>DCF-DA (Fotossensível)
  1. Pesar 0,5mg de H<sub>2</sub>DCF-DA (16mM) dentro do eppendorf com as luzes apagadas e envolver em papel alumínio;
  2. Adicionar 4,275 ml de etanol 100%;
  3. Colocar o álcool no eppendorf e agitar em vórtex por 1 min.

✓ Solução de ABAP 4mM:

1. Pesar 0,00271g de ABAP (2,2' -azobis (2 metilpropionamidina) dihidroclorato) em eppendorf;
2. Adicionar 2,5mL de água Milli-Q e agitar em vórtex por 1 min.

➤ **Material e Equipamentos:**

- ✓ Micropipetas em todas as graduações;
- ✓ Ponteiras em todas as graduações;
- ✓ Micro Placa Transparente (Para Proteínas);
- ✓ Micro Placa Branca/Opaca (Para ACAP);
- ✓ Eppendorfs 1,5 mL e 0,5 mL;
- ✓ Recipiente para gelo.

➤ **Preparo do extrato de tecidos**

- Usar tampão de homogeneização Tris-HCl (20mM; pH 7,4; 4°C) na proporção adequada para o tipo de tecido;
- Realizar a desagregação sônica (concentração aproximada de 1 g/mL).
- Centrifugar e armazenar o sobrenadante em -80°C até o processamento.

➤ **Determinação da concentração de proteínas (Kit de Biureto)**

- ✓ 6.1. Colocar 700 µL de biureto em todos os eppendorfs;
- ✓ 6.2. Colocar 15 µL de tampão de homogeneização da GCL (só no branco);
- ✓ 6.3. Colocar 15 µL de padrão de proteínas - BSA (só no padrão);

- ✓ 6.4. Colocar 15  $\mu\text{L}$  de amostra nos eppendorfs das amostras;
- ✓ 6.5. Colocar 1 gota de NaOH em todos os eppendorfs;
- ✓ 6.5. Colocar 350  $\mu\text{L}$  de cada eppendorf nas poças correspondentes.
- ✓ Fazer a leitura da placa transparente.

➤ **Padronização do ACAP:**

Deve ser feita com amostras controles para as diluições de 0,5, 0,75 e 1 mg de proteína/ml, com o mesmo tampão usado para a homogeneização.

➤ **Montagem da microplaca (Placa Branca/Opaca)**

Só deve ser iniciada após o aparelho alcançar 37°C.

**PLACA SEM ABAP**

1. Colocar em todas as poças (poças de branco e de amostra) **127,5  $\mu\text{L}$**  do **tampão de reação**;
2. Colocar **10  $\mu\text{L}$**  de **tampão de homogeneização** nas poças de branco;
3. Colocar **10  $\mu\text{L}$**  de **amostra** já diluídas nas poças de amostra;
4. Colocar **7,5  $\mu\text{L}$**  de **H<sub>2</sub>O milliQ** em todas as poças (branco e de amostra);
5. Colocar a microplaca para ler no fluorímetro com leitor de microplaca (Victor 2 Parkin Elmer);
6. Após a leitura, anota-se o código do background;
7. Tirar a placa do fluorímetro para adicionar 10 $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>DCF em todas as poças (em ambiente escuro);
8. Deixar o aparelho ler durante 60 minutos.

**PLACA COM ABAP**

1. Colocar em todas as poças (poças de branco e de amostra) **127,5  $\mu\text{L}$**  do **tampão de reação**;



2. Colocar **10 µL** de **tampão de homogeneização** nas poças de branco;
3. Colocar **10 µL** de **amostra** nas poças de amostra;
4. Colocar **7,5 µL** de **ABAP** em todas as poças (branco e de amostra);
5. Colocar a microplaca para ler no fluorímetro com leitor de microplaca (Victor 2 Parkin Elmer);
6. Após a leitura, anota-se o código do background;
7. Tirar a placa do fluorímetro para adicionar 10µL de H<sub>2</sub>DCF em todas as poças (em ambiente escuro);
8. Deixar o aparelho ler durante 60 minutos.