



UFSM

Dissertação de Mestrado

**O Complexo Metilmercúrio-Cisteína Altera o Acúmulo de
Mercúrio em Diferentes Tecidos de Camundongos**

Daniel Henrique Roos

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**O Complexo Metilmercúrio-Cisteína Altera o Acúmulo de
Mercúrio em Diferentes Órgãos de Camundongos**

por

Daniel Henrique Roos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica
Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

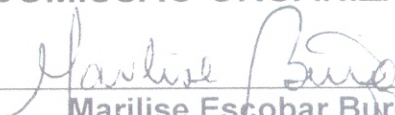
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado.

**O Complexo Metilmercúrio-Cisteína Altera o Acúmulo de
Mercúrio em Diferentes Tecidos de Camundongo**

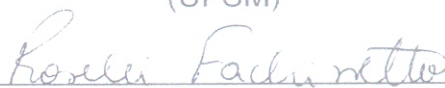
Elaborada por
Daniel Henrique Roos

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

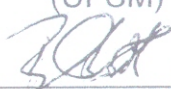
COMISSÃO ORGANIZADORA



Marilise Escobar Bürger
(Presidente/ Orientador)
(UFSM)



Roselei Fachinetto
(UFSM)



Bernardo Baldisserotto
(UFSM)

Santa Maria, 26 de março de 2009.

*“A certeza é a sabedoria dos tolos incapazes
de imaginar outra forma de pensar”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar forças para seguir meu caminho.

Em especial a Brisa, pela ajuda, dedicação, paciência e carinho.

À minha família, que sempre me incentivou para o aperfeiçoamento do meu conhecimento e acreditou em meu trabalho.

Aos meus orientadores Prof. João Batista Teixeira da Rocha e Prof^ª. Marilise Burger, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Além de minha gratidão, admiro-os por seu caráter e sua sabedoria na área de Bioquímica.

Ao Prof. Gilson Zeni, Prof^ª. Cristina Wayne Nogueira e a Prof^ª. Nilda Barbosa pelos seus conhecimentos e exemplo de dedicação, e aos integrantes de seus laboratórios, pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

Aos colegas de laboratório, Cássia, Jéssie, Carol, Thiago, Cristiane, Alessandra, Danúbia, Rose, Daiana, Daiane e Romaiana que muitas vezes tiveram que me agüentar falando bobagens por horas a fio. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Aos membros da “Super Liga”, Robson (Mega-Mancha), Gustavo (Mandíbula), Juliano (Super-Naso), Matheus (Espinhoso), Rafael (Big-Fat), Félix e também ao eterno aspirante Alessandro. Agradeço-os pela amizade e conhecimento compartilhado.

Aos colegas de laboratório que tomaram outros rumos, pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários Angélica, Márcia e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

O COMPLEXO METILMERCÚRIO-CISTEÍNA ALTERA O ACÚMULO DE MERCÚRIO EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGO

AUTOR: Daniel Henrique Roos
ORIENTADORA: Marilise Escobar Burger
CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, Março de 2009.

O metilmercúrio (MeHg) é relatado por ter vários efeitos deletérios sobre tecidos de vertebrados, principalmente no sistema nervoso central, e parte desses efeitos está relacionado a sua capacidade de interagir com grupos sulfidrílicos encontrados em proteínas. O MeHg reage com tióis de baixo e alto peso molecular no sangue e outros tecidos permitindo, em alguns casos uma melhor absorção e captação de mercúrio pelo tecido. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi examinar os efeitos da administração do complexo MeHg-Cisteína (MeHg-Cys) na captação de mercúrio sobre áreas cerebrais, fígado e rim; e analisar possíveis mudanças comportamentais associadas ao acúmulo de mercúrio em camundongos adultos. Camundongos machos *Swiss albino* foram divididos em quatro grupos: Controle (1 mL de água destilada), MeHg (2 mg/kg), Cys (2 mg/kg) e Complexo MeHg-Cys (2 mg/kg concentração equimolar). Todos os animais receberam uma injeção (i.p. por dia) durante 60 dias consecutivos. A parte inicial dos experimentos foi designada para analisar possíveis mudanças neuro-comportamentais (desempenho locomotor e/ou atividade exploratória) causadas pelos tratamentos. A administração do MeHg ou do complexo MeHg-Cys reduziu significativamente a atividade locomotora total dos camundongos adultos quando comparado ao grupo controle. Em contraste à atividade locomotora, a frequência de levantar-se (rearing) diminuiu apenas no grupo que recebeu MeHg. A parte final dos experimentos foi designada para determinar a concentração de mercúrio nas áreas cerebrais (córtex e cerebelo), fígado e rins dos camundongos tratados. O MeHg aumentou significativamente a concentração de mercúrio em todos os tecidos analisados, quando comparado ao grupo controle. O acúmulo de mercúrio sobre as áreas cerebrais e fígado foi acentuadamente aumentado nos animais que receberam o complexo MeHg-Cys, quando comparado ao grupo que recebeu apenas MeHg. Entretanto, a concentração de mercúrio encontrada no rim foi menor no grupo tratado com o complexo MeHg-Cys quando comparado ao grupo tratado apenas com MeHg. Concluindo, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que o tratamento com o complexo MeHg-Cys permite maior absorção e captação de mercúrio pelos tecidos cerebrais e hepático, do que o tratamento apenas com MeHg. Além disso, esse estudo reforça a idéia que o MeHg causa prejuízo na performance motora e atividade exploratória dos animais e também sugere que diferentes formas de exposição ao MeHg afetam a sua distribuição nos tecidos de camundongos, bem como pode levar a conseqüências neuro-comportamentais distintas.

Palavras-chave: *Metilmercúrio, Cisteína, Comportamento*

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

COMPLEX METHILMERCURY – CYSTEINE ALTERS MERCURY ACCUMULATION IN DIFFERENT TISSUES OF MICE

AUTHOR: Daniel Henrique Roos

ADVISOR: Marilise Escobar Burger

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, March 2009

Methylmercury (MeHg) is related to several deleterious effects on the vertebrate tissues, mainly on central nervous system, and part of these effects are through of interaction with sulfhydryl group found in cellular proteins. MeHg interacts with low and high molecular weight thiols in the blood and tissues and this fact, in some cases will allow a better absorption and tissue uptake of mercury. In this regard, the purpose of this study was to examine the effect of MeHg-Cysteine (MeHg-Cys) complex administration on cerebral areas, liver and kidney on Hg-uptake and to analyze possible behavioral changes associated with mercury accumulation in adult's mice. Adult male *Swiss albino* mice were divided into four groups; control (1 mL/Kg distilled water), MeHg (2 mg/kg), Cys (2 mg/kg) and MeHg-Cys complex (2 mg/kg equimolar concentration). All the animals received one injection per day (i.p.), for 60 consecutives days. The initial set of experiments was designed to analyze possible neurobehavioral changes (locomotor performance and/or exploratory activity) caused by treatments. Administration of MeHg or MeHg-Cys complex caused a significant reduction on total locomotor activity in adult's mice, when compared to control group. In contrast to locomotor activity, rearing frequency was decreased only in MeHg group. The final set of experiments was designed to determine the mercury concentration into the brain areas (cortex and cerebellum), liver and kidney in adult's mice. Treatment with MeHg significantly increased mercury concentrations in all tissues analyzed, when compared to control group. The accumulation of mercury on cerebral areas and in liver was further increased in animals treated with MeHg-Cys complex, when compared to MeHg alone group. However, the concentration of mercury found in kidney was lower in the MeHg-Cys treated group, than in the group treated only with MeHg. In conclusion, the present study shows, for the first time, that treatment with MeHg-Cys complex allow better absorption and tissue uptake of mercury than the treatment with MeHg alone, in the cerebral areas and in liver of mice. Furthermore, this study reinforces the view that MeHg causes impairment in motor performance and exploratory activity and suggests that the different forms of MeHg exposure affect its distribution in the tissues of mice, as well as, it can leads to the distinct neurobehavioral consequences.

Keywords: Methylmercury, Cysteine, Behavior

LISTA DE FIGURAS

1. Revisão bibliográfica

Figura 1. Estrutura química da cisteína (A); e cistina (B) 10

Artigo

Figure 1. Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on locomotor activity; squares crossed (A) and exploratory activity; rearings (B). 34

Figure 2. Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on tissue Hg-uptake; cortex (A) and cerebellum (B). 35

Figure 3. Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on tissue Hg-uptake; liver (A) and kidney (B). 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Emissão de mercúrio no Brasil por ano 5

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca - Cálcio

CH_3^- - Metilcarboânion

$(\text{CH}_3)_2 \text{Hg}$ - Dimetilmercúrio

$\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ - Etilmercúrio

Cys – Cisteína

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GGT - γ -Glutamyl Transpeptidase

GSH – Glutathione

Hg^0 – Mercúrio Metálico

HgS – Sulfeto de Mercúrio

i.p. – Intraperitoneal

MeHg – Metilmercúrio

MeHg-Cys – Complexo Metilmercúrio-Cisteína

Na - Sódio

NMDA - N-metil D-aspartato

O_2^- - Superóxido

SH – Grupo Sulfidrílico

SH - Tiol

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
APRESENTAÇÃO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.1. Mercúrio	3
2.1.2. Formas de Mercúrio	3
2.1.1.2. Mercúrio Metálico	3
2.1.1.3. Mercúrio Inorgânico	3
2.1.1.4. Mercúrio Orgânico	4
2.1.2. Exposição ao Metilmercúrio	4
2.1.3. Toxicidade do Metilmercúrio:	6
2.1.4. Metilmercúrio e Mudanças Comportamentais	8
2.1.5. Transporte e Acúmulo de Metilmercúrio	9
2.2. Cisteína	10
2.2.1. Estrutura Molecular e Características Químicas da Cisteína	10
2.2.2. Propriedades bioquímicas da cisteína	10
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. MANUSCRITO	13
4.1. Complex Methilmercury–Cysteine Alters Mercury Accumulation in Different Tissues of Mice: Neurobehavioral Changes	14
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	40

7. PERSPECTIVAS	41
8. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação. Os resultados que fazem parte da mesma estão apresentados sob a forma de artigo e encontram-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos futuros referentes a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

O MeHg é um reconhecido poluente ambiental que, nas últimas décadas, causou contaminação e intoxicação humana em várias partes do mundo, como por exemplo em Minamata, no Japão e também no Iraque. (Robertson e Orrenius, 2000; Gochfeld, 2003). No Brasil, estudos têm evidenciado que várias espécies de peixes carnívoros da Amazônia apresentam altos níveis de MeHg (Malm, 1998; Pinheiro e cols., 2003). Conseqüentemente, comunidades ribeirinhas localizadas próximas a áreas de garimpo, sofrem exposição crônica a níveis relativamente elevados de MeHg em sua dieta, que é rica em peixes (Pinheiro e cols., 2003). Neste contexto, estudos epidemiológicos apontam para déficits neurológicos em comunidades pesqueiras que possuem uma dieta baseada no consumo de peixes (Granjean e cols., 1997; Clarkson e cols., 2003).

O MeHg afeta uma variedade de funções celulares, podendo causar danos em muitos órgãos e sistemas, particularmente, no sistema nervoso central (Chang, 1980; Clarkson, 1997). O mecanismo de ação envolvido na toxicidade do MeHg ainda não está completamente compreendido, entretanto, a alta afinidade do composto por grupos sulfidrílicos, parece exercer um papel central em seus efeitos tóxicos (Simpson, 1961; Bach e Weibel, 1976; Rooney, 2007).

No sangue, praticamente todo o MeHg encontra-se ligado a albumina, glutathione (GSH) ou cisteína (Cys) (Hirayama e cols., 1980; Yasutake e cols., 1991; Allena e cols., 2001). Essas formas conjugadas de mercúrio circulam facilmente pela corrente sanguínea e em alguns casos permitem uma melhor absorção e captação do mercúrio pelos tecidos (Hirayama, 1975; 1980; 1985). De acordo com esse fato, dados da literatura indicam que o complexo metilmercúrio-L-cisteína (MeHg-Cys) pode facilitar o transporte de MeHg para vários tecidos. Experimentos *in vivo* revelam que o transporte de MeHg é aumentado após a formação de complexo(s) com a Cys (Hirayama, 1980; Aschner e Clarkson, 1988; Kerper e cols., 1992), provavelmente via transportador de aminoácidos neutros (Aschner e Clarkson, 1988). Assim L-Cys pode modular o acúmulo de MeHg no cérebro e outros órgãos.

A alta afinidade do MeHg pelo grupo tiol da Cys tem sido indicada como responsável, pelo menos em parte, pela diminuição dos níveis intracelulares de GSH. De acordo com essa afirmativa, estudos têm mostrado que a exposição ao MeHg causa uma

significante depleção nos níveis de GSH em astrócitos. (Allena e cols., 2001). A GSH é o principal antioxidante endógeno em mamíferos, constituindo aproximadamente 90% dos tióis não protéicos intracelulares (Anderson e Meister, 1983). Dessa forma, a depleção da GSH induzida pelo MeHg pode facilitar o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Farina e cols., 2003; Chang, 2007) e esse fato pode contribuir para a citotoxicidade induzida pelo MeHg.

A exposição ao MeHg causa severos déficits na atividade locomotora tanto em humanos como em animais experimentais. Danos locomotores caracterizados como “Síndrome do Chapeleiro Maluco” foram observados em humanos contaminados com MeHg em Minamata e no Iraque (Robertson e Orrenius, 2000; Gochfeld, 2003). Em ratos, esses distúrbios são mais pronunciados na fase de desenvolvimento (Franco e cols., 2007). Alguns estudos com modelos experimentais têm sugerido que a toxicidade neuro-comportamental induzida pela exposição ao MeHg parece estar associada à distúrbios no status tiol cerebral (Barros e cols., 2006; Freitas e cols., 2009).

Como mencionado anteriormente, dados da literatura indicam que a Cys pode aumentar a captação de MeHg no cérebro (Hirayama, 1980; Aschner e Clarkson, 1988; Kerper e cols., 1992). No entanto, poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o efeito simultâneo da exposição ao complexo MeHg-Cys ou ao MeHg sobre a distribuição e o acúmulo de mercúrio no cérebro e sobre a atividade locomotora em animais experimentais. Considerando tais aspectos, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar estes parâmetros com a finalidade de obter maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de distribuição e acúmulo deste toxicante nos tecidos, bem como sobre seus efeitos sobre possíveis alterações neuro-comportamentais em camundongos. Além disso, a presente investigação visa oferecer maior conhecimento para futuros estudos clínicos na busca de estratégias terapêuticas para os casos de intoxicação por MeHg.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Mercúrio

2.1.1 Formas de mercúrio

2.1.1.2 Mercúrio metálico:

O mercúrio metálico ou mercúrio elementar (Hg^0) é utilizado em grande escala na indústria, sendo empregado na confecção de termômetros, amálgama dental, no processo de purificação do ouro explorado pelo garimpo, e em uma variedade de outros produtos de uso industrial e doméstico. Contudo, apesar do mercúrio metálico ser pouco absorvido por ingestão, ele tem uma alta capacidade de volatilização em temperatura ambiente, formando uma atmosfera de vapor de mercúrio a qual é facilmente absorvida pelos pulmões. Uma vez absorvida, essa forma lipossolúvel de mercúrio (Hg^0) pode atravessar a barreira hematoencefálica, a barreira placentária e as membranas biológicas onde pode ser oxidada à Hg^{2+} em uma reação que envolve a enzima catalase e o peróxido de hidrogênio. A forma inorgânica de mercúrio (Hg^{2+}) pode permanecer por vários anos no cérebro e outros tecidos, caracterizando assim o mercúrio como elemento bioacumulativo (Hargreaves e cols., 1988; Takeuchi e cols., 1989 ; Opitez cols., 1996; Braunwald e cols., 2001).

2.1.1.3 Mercúrio inorgânico:

O mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), como mencionado anteriormente, pode ser formado a partir do mercúrio metálico ou pela conversão de formas orgânicas de mercúrio a formas inorgânicas (Hg^{2+} e Hg^+) (Wood e cols., 1968). Entretanto, ele também é utilizado na forma iônica pela indústria, podendo ser encontrado em cosméticos, produtos de limpeza e outros produtos domésticos (Ozuah, 2000). Essa forma de mercúrio é facilmente absorvida por ingestão ou através da pele (Clarkson, 2002). Porém, relativamente pouco Hg^{2+} atravessa a barreira encefálica ou até mesmo as membranas biológicas, sendo assim excretado através da urina e/ou fezes (Takeuchi e cols., 1989). Devido a essa dificuldade de atravessar as membranas biológicas, a forma inorgânica de mercúrio tem como principal sítio de toxicidade o meio extracelular, bem como as membranas celulares (Friberg e Mottet, 1989).

2.1.1.4 Mercúrio orgânico:

A principal forma orgânica de mercúrio encontrada na natureza é o MeHg, principalmente proveniente da metilação do mercúrio metálico liberado pela indústria nos rios e córregos. O mercúrio metálico pode ser biometilado por bactérias metalogênicas em um processo relativamente simples: Uma vez presente no meio ambiente, o mercúrio elementar pode ser facilmente incorporado por bactérias e organismos unicelulares, sendo então ionizado como anteriormente mencionado. No entanto, o mercúrio iônico é prejudicial a essas bactérias, que tentam eliminá-lo através da metilação, transformando-o em MeHg que por ser lipossolúvel é mais facilmente eliminado por organismos unicelulares (Wasserman e cols., 2001). A metilação do mercúrio ocorre pela transferência de um ou dois grupos metilcarboânions (CH_3^-) ao mercúrio inorgânico, e a vitamina B₁₂ (metilcobalamina) um derivado do metilcorrinoíde, a única coenzima reconhecida como possível doadora do grupo metil para o Hg^{2+} (Wood, 1974). Outra forma de mercúrio orgânico é o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$), o qual está presente no timerosal (Mertiolate®), medicamento de uso tópico utilizado como anti-séptico (Braunwald e cols., 2001), cuja industrialização e dispensação foram recentemente proibidas. Também existe o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), uma forma “supertóxica” de Hg encontrada quase que exclusivamente em laboratório, que é absorvido facilmente através da pele. Porém, de um modo geral as formas orgânicas de mercúrio não têm boa absorção cutânea, sendo melhores absorvidas por inalação e ingestão (Braunwald e cols., 2001).

2.1.2 Exposição ao metilmercúrio:

O mercúrio é naturalmente liberado no meio ambiente por erupções vulcânicas e pelo desgaste da crosta terrestre, no entanto esse mercúrio geralmente está ligado ao enxofre na forma de sulfeto de mercúrio (HgS). Esse composto é bastante estável e pouco reativo, e desta forma não é considerado tóxico (Chuuu e cols., 2007). Devido a essas características químicas o sulfeto de mercúrio tem sido utilizado por mais de 2000 anos como sedativo pela medicina chinesa (Yeoh e cols., 1986).

A maioria do mercúrio liberado no meio ambiente é de origem antropogênica, por detritos industriais, principalmente o garimpo de ouro (Lacerda, 1997). No Brasil, estima-se

que aproximadamente 100 a 200 toneladas de mercúrio sejam despejadas no ambiente anualmente (Lacerda, 1997). A tabela abaixo mostra a emissão de mercúrio no Brasil por ano.

Tabela 1. Comparação entre as emissões antropogênicas de mercúrio para a atmosfera no Brasil, baseado em Lacerda (1996)¹ levando em consideração a situação em 1990.

Setor	Parâmetros de produção/consumo	Parâmetros de emissão para a atmosfera	Emissão (t.ano ⁻¹)	% do total
Produção de cloro	25.7 tHg.yr ⁻¹	45%	11.65	10.1
Produção de soda	125 gHg.t ⁻¹ KOH	45%	0.37	0.3
Tintas & pigmentos	34.3 tHg.yr ⁻¹	1%	0.34	0.3
Eleto-eletrônico	9.1 tHg.yr ⁻¹	0.2%	0.02	<0.1
Combustão de carvão	27.2 x 10 ⁶ MJ.yr ⁻¹	0.13 µgHg.MJ ⁻¹	0.01	<0.1
Combustão de óleo	28.3 x 10 ⁶ MJ.yr ⁻¹	0.33 µgHg.MJ ⁻¹	0.01	<0.1
Combustão de biomassa	4.8 x 10 ⁶ MJ.yr ⁻¹	0.03 g.t ⁻¹	0.12	0.1
Pirometalurgia Pb	62.023 t.yr ⁻¹	2- 4 gHg.tPb ⁻¹	0.19	
Zn	163.000 t.yr ⁻¹	8-45 gHg.tZn ⁻¹	4.30	3.9
Cd	197 t.yr ⁻¹	8-45 gHg.tCd ⁻¹	0.05	
Produção de aço e ferro	15 x 10 ⁷ t.yr ⁻¹	0.08gHg.t ⁻¹	12	10.4
Queimadas	11.100 km ² .yr ⁻¹	7.8 gHg.ha ⁻¹	8.7	7.5
Garimpos de ouro	87 tAu.yr ⁻¹	0.92 tHg.tAu ⁻¹	77.9	67.3
Total	-	-	115.7	100

Sabendo-se que a maioria do mercúrio liberado no ambiente é metilado e incorporado na base da cadeia alimentar (bactérias metalogênicas) pelo processo anteriormente mencionado, o mercúrio representa um sério risco ambiental. Uma vez que esse elemento se acumula na cadeia alimentar aquática através de um fenômeno chamado bioamplificação, ou seja, a concentração do metal aumenta à medida que ele avança os níveis tróficos (Boening, 2000). Portanto, por ter a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos do organismo, o metilmercúrio poderá ser encontrado em peixes predadores da extremidade da cadeia alimentar em concentrações elevadas (0,546 µgHg/g de peixe), e culminar finalmente na dieta humana (Malm, 1998; Boening, 2000; Pinheiro e cols., 2003). Na região do rio Tapajós, onde o consumo de peixe é a principal fonte de alimento diária, os níveis de exposição ao metilmercúrio, medidos em raiz de cabelo, variam de alguns µg/g até mais de 150 µg/g (Malm, 1998; Pinheiro e cols., 2003). O patamar a partir do qual os primeiros sinais clínicos e sintomas de contaminação mercurial ocorrem é de 50 µg/g (IPCS., 1990).

Um dos casos mais famosos de contaminação por MeHg ocorreu na baía de Minamata, Japão na década de 50. A companhia Chisso Fertiliser descartava metilmercúrio, um subproduto do processo de produção de acetoaldeído, levando a contaminação de peixes, posteriormente pescados e consumidos pela população local (Oyake e cols., 1966; Bakir e cols., 1973; Watanabe e Satoh, 1996).

Na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação de agricultores e familiares que utilizavam grãos tratados com fungicidas a base de etil e metilmercúrio na preparação de pão caseiro. Particularmente no Iraque, 6.530 pessoas foram hospitalizadas e 459 mortes foram relacionadas diretamente com a exposição ao MeHg no país (Watanabe e Satoh, 1996; Oyake e cols., 1966; Bakir e cols., 1973).

2.1.3 Toxicidade do metilmercúrio:

Como relatado anteriormente, o MeHg é um conhecido poluente ambiental que nas ultimas décadas causou contaminação e intoxicação em diferentes locais do mundo. O MeHg afeta uma variedade de funções celulares, podendo causar danos em muitos órgãos e tecidos, bem como em: Células pulmonares de humanos e animais (Reichl e cols., 2001), ais monócitos e linfócitos de humanos (Insug e cols., 1997; Shenker e cols., 1997), células β pancreáticas (Chen e cols., 2006), tecido renal e hepático (Freitas e cols., 2009), entre muitos outros. No entanto, o sistema nervoso central parece ser o alvo principal do MeHg, sendo o cerebelo e os lobos temporais as áreas específicas mais afetadas (Freitas e cols., 2009).

O exato mecanismo pelo qual o MeHg causa citotoxicidade ainda não está completamente esclarecido. Porém, vários trabalhos sugerem que as diversas disfunções celulares causadas pelo MeHg estejam associadas a sua alta afinidade por grupos sulfidrílicos (SH) (Simpon, 1961; Bach e Weibel, 1976; Rooney, 2007), dessa forma causando diversas disfunções celulares, como por exemplo: (a) depleção de glutatona (GSH); A GSH é um tri-peptídeo que contém cisteína, um aminoácido que possui grupo sulfidrílico, onde provavelmente o MeHg se liga (Rooney, 2007). A GSH é o principal antioxidante endógeno em mamíferos, cuja diminuição em seus níveis causa um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), os quais promovem várias disfunções

celulares (Shanker e cols., 2005); (b) inativação de enzimas; várias enzimas possuem no seu sítio ativo grupos sulfidrílicos onde o MeHg pode ligar-se inativando ou diminuindo a atividade das mesmas, assim deprimindo o metabolismo enzimático/celular (Zheng e cols., 2003); (c) dano no DNA; o MeHg é reportado por causar fragmentação no DNA e causar a ativação de fatores apoptóticos (caspases) (Nishioku e cols., 2001); (d) inativação de proteínas transportadoras: várias proteínas transportadoras que contêm grupos (SH) podem ser alvo do MeHg como o caso da γ -glutamil transpeptidase (GGT), que realiza o transporte de cisteína no sistema nervoso, um precursor da síntese de GSH (Allen e cols., 2003). Outro importante exemplo de inativação de transportadores pelo MeHg é o caso dos transportadores de glutamato (GLT1 e GLAST), que contêm respectivamente, nove e três resíduos de cisteína em seqüência (Pines e cols., 1992; Aschner e cols., 2000); (e) disfunção em organelas celulares: o MeHg causa disfunção em uma série de organelas celulares, tais como mitocôndrias (Seegal e cols., 2007) e retículo endoplasmático (Limke e cols., 2003).

Apesar de tais fenômenos de cito/neurotoxicidade representarem eventos distintos, parece haver uma relação entre eles. De fato, o MeHg leva a um aumento de glutamato na fenda sináptica, provavelmente por diminuir a captação do glutamato pelos astrócitos (Aschner e cols., 2000). Tal fato leva a uma super ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-aspartato (NMDA), que, por conseguinte, gera um aumento do influxo de Ca^{2+} e Na^+ intracelular (Choi, 1992).

A citotoxicidade do Ca^{2+} , por sua vez, pode levar à disfunção mitocondrial, já que um aumento na entrada do Ca^{2+} celular leva à captação do excesso de Ca^{2+} pela mitocôndria, causando despolarização e inchaço mitocondrial. Estes fatores podem contribuir para uma elevação dos níveis de ERO, alteração da homeostase mitocondrial (Seegal e cols., 2007) e, conseqüentemente causar apoptose/morte celular. Por outro lado, recentes estudos com culturas neuronais indicam que o MeHg causa uma liberação primária dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, seguido por um influxo de Ca^{2+} extracelular (Limke e cols., 2003, Joshua e cols., 2005). Nesse caso, agentes quelantes de cálcio atenuaram a morte neuronal (Marty e Atchison, 1998).

Além disso, os radicais livres, tais como algumas EROs, podem causar dano oxidativo direto na mitocôndria, levando à redução da atividade enzimática e comprometendo a funcionalidade mitocondrial (Radi e cols., 2002; Galindo e cols., 2003). Os radicais livres

também podem ser produzidos pela mitocôndria através da fuga de elétrons da cadeia respiratória para o oxigênio, formando ânion superóxido O_2^- (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Finalmente, todos esses eventos isolados ou interligados podem culminar com perda neuronal e contribuir para o aparecimento de várias patologias relacionadas à contaminação com o MeHg, como esclerose lateral, Alzheimer, esclerose múltipla e Parkinson (Clarkson, 2002; Mutter e cols., 2004).

2.1.4 Metilmercúrio e mudanças comportamentais:

A exposição ao MeHg durante a fase do desenvolvimento resulta em prejuízo na migração das células granulares e prejuízo na sinaptogênese, os quais causam uma desordem na arquitetura cerebelar (Choi, 1978). Já a exposição ao MeHg pós-desenvolvimento, resulta em danos mais específicos que levam à perda dos grânulos cerebelares do interior do grânulo cerebelar (Atchison, 2005). Essas evidências de um modo geral explicam o porquê das mudanças comportamentais em jovens serem mais acentuadas que em adultos (Atchison, 2005). A exposição a baixas doses de MeHg, particularmente em indivíduos jovens, pode provocar súbito prejuízo motor, deficiência na linguagem, problemas de aprendizagem, déficit de atenção e dificuldades na realização de tarefas (Grandjean, 1997). Todos esses sintomas estão relacionados à disfunção cerebelar, sendo também observados em jovens com neoplasia cerebelar ou com síndromes associadas à degeneração das células granulares do cerebelo (Levisohn, 2000; Riva e Giorgi, 2000). Tais dados, sugerem uma correlação entre baixas doses de exposição ao MeHg e alterações súbitas de comportamento, de origem cerebelar (Sarnati e Alcala, 1980). Distúrbios locomotores também são observados em animais de laboratório expostos a altas doses de MeHg (5 mg/kg/dia) e igualmente associados a patologias cerebelares (Sacamoto, 1996). Assim os efeitos do MeHg em células cerebelares podem provocar um grande espectro de sintomas neurológicos que podem ser observados por mudanças comportamentais.

2.1.5 Transporte e acúmulo de metilmercúrio:

Desde a década de 70 se sabe que 99% do MeHg que circula no plasma sanguíneo está ligado à albumina, GSH e L-cisteína. O restante do MeHg (1%), acredita-se que esteja ligado a “tióis difusos” no meio, por exemplo, tióis de baixo peso molecular que são transportados através das membranas celulares (Clarkson, 1972; Lorscheider e cols., 1995). Recentes trabalhos ressaltam para um fenômeno conhecido como “mimetismo molecular” e citam vários exemplos de tióis de baixo peso molecular que ligam-se a diferentes metais pesados, entre eles o Hg. Ligados a esses tióis, os metais pesados têm maior facilidade de entrar em vários tipos celulares, via mimetismo molecular (Bridges e Zalups, 2005; Yin e cols., 2008). “O mimetismo molecular refere-se ao fenômeno pelo qual íons metálicos, com grupos nucleofílicos ligam-se em certas biomoléculas, resultando na formação de complexos organo-metal que podem comportar-se ou servir como estruturas homólogas de outras biomoléculas endógenas” (Bridges e Zalups, 2005).

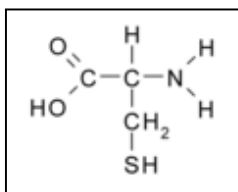
Baseado nesse fenômeno, alguns trabalhos sugerem que o complexo metilmercúrio-L-cisteína (MeHg-Cys) é um mimético do aminoácido metionina, dessa forma podendo atravessar as biomembranas via transportador de aminoácidos neutros (sistema L) (Aschner e Clarkson, 1988; Mokrzan e cols., 1995). O aminoácido metionina é um substrato endógeno do transportador de aminoácidos neutros do tipo-L1 (LAT1) (Aschner e Clarkson, 1988; Aschner e cols., 1990; Mokrzan e cols., 1995). O LAT1 transporta preferencialmente aminoácidos de cadeia aromática ou ramificada, tais como: leucina, isoleucina, valina fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina e metionina (Kanai e cols., 1998; Yanagida e cols., 2001) Tem sido proposto que o LAT1 funciona como o maior sistema de transporte de aminoácidos, presente na barreira encefálica, sendo bem expressado nos endotélios capilares (Matsuo e cols., 2000). Em experimentos *in vitro* Yin e cols. 2008, recentemente demonstraram que o complexo MeHg-Cys é eficientemente transportado pelo sistema LAT1, facilitando assim o transporte e o acúmulo de MeHg em diferentes órgãos e tecidos. De acordo com esses dados, trabalhos têm indicado que a cisteína pode aumentar a captação de MeHg em vários tecidos, *in vivo* (Hirayama, 1980; Aschner e Clarkson, 1988; Kerper e cols., 1992). Entretanto, o mecanismo envolvido e a exata distribuição do MeHg acumulado, ainda não estão completamente esclarecidos.

2.2 Cisteína

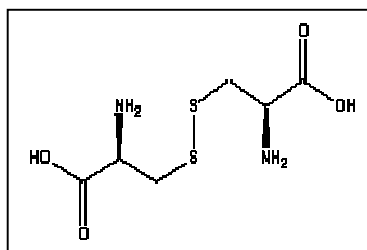
2.2.1 Estrutura molecular e características químicas da cisteína:

A cisteína ou (ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou ácido 3-tiol-2-amino-propanóico) possui um grupo tiol na sua cadeia lateral e é principalmente encontrado em proteínas e no tripeptídeo GSH. Quando exposto ao ar, e sob determinadas condições fisiológicas (incluindo no interior de proteínas), a cisteína pode oxidar-se formando cistina, a qual é composta por duas cisteínas unidas por uma ligação dissulfeto. As figuras abaixo mostram a estrutura da cisteína (A) e cistina (B), respectivamente.

A



B



O grupo tiol da Cys possui caráter nucleofílico e como o pK_a deste grupo é de 10,8, a sua atividade química pode ser regulada pelo ambiente em que se encontra.

2.2.2 Propriedades bioquímicas da cisteína:

A cisteína (Cys) é um importante precursor da GSH, dessa forma a concentração intracelular de Cys é um fator determinante na síntese da GSH (Bannai, 1984). Entretanto como a Cys é rapidamente oxidada para cistina, encontra-se predominantemente cistina no plasma sanguíneo (Sagara e cols. 1993; Jeffrey e cols., 2001). Dentro das células a cistina pode ser reduzida novamente à Cys, dessa maneira o próprio transportador de cistina é essencial para manter os níveis intracelulares de Cys e conseqüentemente a concentração de GSH (Bannai, 1984; Connor e cols., 1995).

Tem sido reportado que a suplementação na dieta com aminoácidos que contenham grupos sulfidrílicos é capaz de melhorar o status antioxidante em tecidos de ratos (Chow,

1979; Saravanan e cols., 1995). A manutenção dos níveis de tiol pela Cys promove proteção do sistema hepático contra certos agentes tóxicos (Numan e cols., 1990); reduz os níveis de peroxidação lipídica induzidos pelo inseticida endrina e pela hiperoxalúria (Numan e cols., 1990) e também durante hiperoxalúria (Saravanan e cols., 1995). No entanto, trabalhos sobre o efeito direto da Cys sobre o sistema antioxidante e seus reflexos em parâmetros comportamentais são escassos ou inexistentes. Assim, torna-se importante a realização de experimentos que venham a elucidar e contribuir para um melhor entendimento acerca de seus efeitos metabólicos e comportamentais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi de analisar o efeito da administração do complexo MeHg-Cys na captação e distribuição de mercúrio em tecido cerebral, hepático e renal; bem como, associar o acúmulo de mercúrio a possíveis alterações neuro-comportamentais em camundongos adultos.

3.2 Objetivos específicos

1 – Analisar o possível efeito da administração de (via i.p.) MeHg e do complexo MeHg-Cys sobre a captação e distribuição de mercúrio em diferentes tecidos de camundongos:

2 - Investigar o(s) possível(is) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o MeHg é distribuído e acumulado em diferentes tecidos de camundongos:

3 – Avaliar as possíveis alterações neuro-comportamentais causadas pelo acúmulo de mercúrio em camundongos:

4 – Investigar as possíveis alterações neuro-comportamentais causadas pela administração de Cys em camundongos:

4. MANUSCRITO

Os resultados que constituem esta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão dos Resultados” e “Referências Bibliográficas”, encontram-se no próprio manuscrito. O Manuscrito está disposto na forma como foi submetido para a revista científica selecionada.

Manuscrito**Complex Methylmercury – Cysteine Alters Mercury Accumulation in
Different Tissues of Mice: Neurobehavioral Changes**

Daniel Henrique Roos^a, Robson Luiz Puntel^b, Thiago Henrique Logokensk^a, Rafael Porto Ineu^a, Denise Bohrer^a, Marilise E. Burger^c, Marcelo Farina^d, Michael Aschner^e, Nilda B. Vargas Barbosa^a e João Batista T. Rocha ^{*a}.

Submetido à Toxicology

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.

^b Centro de Ciências, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, CEP 97087-600, Brazil.

^c Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS - Brasil

^d Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^e Department of Pediatrics, B-3307 Medical Center North, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232-2495, USA

*Correspondence should be sent to:

João Batista Teixeira da Rocha

Universidade Federal de Santa Maria

Departamento de Química

Avenida Roraima, Prédio 18

CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Fone: 55-55 3220 8140

Fax: 55-55 3220 8978

E-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br

Abstract

Methylmercury (MeHg) is related to several deleterious effects on the vertebrate tissues, principally on central nervous system, and part of these effects are through of its interaction with sulfhydryl group found in low and high molecular weight thiols. MeHg interacts with low and high molecular weight thiols in the blood and tissues and this fact, in some cases will allow a better absorption and tissue uptake of mercury. In this regard, the purpose of this study was to examine the effect of MeHg-Cysteine (MeHg-Cys) complex administration on cerebral areas, liver and kidney on Hg-uptake and to analyze possible behavioral changes associated with mercury accumulation in adult's mice. Adult male *Swiss albino* mice were divided into four groups: control (1 mL/kg distilled water), MeHg (2 mg/kg), Cys (2 mg/kg) and MeHg-Cys complex (2 mg/kg equimolar concentration). All the animals were administered (i.p. one injection per day) for 60 consecutive days. The initial set of experiments was designed to analyze possible neurobehavioral changes (locomotor performance and/or exploratory activity) caused by treatments. Administration of MeHg or MeHg-Cys complex caused a significant reduction on total locomotor activity in adult's mice, when compared to control group. In contrast to locomotor activity, rearing frequency was decreased only in MeHg group. The final set of experiments was designed to determine the mercury concentration into the brain areas (cortex and cerebellum), liver and kidney in adult's mice. Treatment with MeHg significantly increased mercury concentrations in all tissues analyzed, when compared to control group. The accumulation of mercury on cerebral areas and in liver was further increased in animals that received MeHg-Cys, when compared with MeHg alone group. However, the concentration of mercury found in kidney was decreased in the group treated with MeHg-Cys when compared to the group treated only with MeHg. Concluding, the present study shows, for the first time, that treatment with MeHg-Cys complex allow better absorption and tissue uptake of mercury than the treatment with MeHg alone, in the cerebral areas and in liver of mice. Furthermore, this study reinforces the view that MeHg causes impairment in motor performance and exploratory activity and suggests that the different forms of MeHg affect its distribution in the tissues of mice, as well as, it can leads to the distinct neurobehavioral consequences.

Keywords: Methylmercury, Cysteine, Behavior

1- Introduction

Mercury is a toxic metal that caused in the last decades serious episodes of environmental contamination and human intoxication in the world (Gochfeld, 2003; Robertson and Orrenius, 2000). In the nature, elemental mercury undergoes a series of transforming reactions and can be converted to organic forms, principally methylmercury (MeHg) (Gochfeld, 2003). Regarding its toxicity in humans, MeHg is a highly dangerous mercury compound, being able to bioaccumulate through the food chain to reach human populations (Gochfeld, 2003). Accordingly, studies in Amazon (Brazil), showed high MeHg level in carnivore fish (Malm., 1998; Pinheiro e cols., 2003) thus, riverside communities located downstream to the gold mining areas suffer a chronic exposure to relatively high levels of methylmercury in their fish-rich diet (Pinheiro *et al.*, 2003).

Exposure to MeHg produces intense neurological dysfunctions after accumulation in the brain tissues and other organs (Bowie *et al.*, 1998). Although, the precise mechanism(s) by which MeHg exerts its toxic effects are still not fully understood. However, several investigators have demonstrated that its high affinity for SH groups can have a central role in its toxicity (Bach and Weibel, 1976; Simpon, 1961; Rooney, 2007).

In blood, nearly all MeHg is found bound to albumin, glutathione (GSH) and L-cystine (L-Cys) (Hirayama *et al.*, 1991; Yasutake *et al.*, 1991 Allena *et al.*, 2001). These conjugated forms of MeHg can determine its fate in the body, and in some cases they can allow a better absorption and tissue uptake of Hg (Hirayama 1975; Hirayama 1980; Hirayama 1985). In line with this, literature data have indicated that MeHg conjugate with L-Cys (MeHg–Cys) may be a driving force in the MeHg transport into various tissues. *In vivo* experiments revealed that MeHg transport

into the brain can be markedly enhanced after formation of complex(es) with L-Cys (Hirayama 1980; Aschner and Clarkson, 1988; Kerper *et al.*, 1992), throughout of neutral amino acid transport system (Aschner and Clarkson, 1988). Thus, L-Cys can modulate accumulation of MeHg into the brain and other organs.

This high affinity of MeHg by the thiol group of cysteine is responsible at least in part, by the decrease in the intracellular GSH levels (Allena *et al.*, 2001). GSH is the major antioxidant in mammalian cells constituting nearly 90% of the intracellular non-protein thiols (Anderson and Meister, 1983). Therefore, MeHg-induce GSH depletion and can facilitate the reactive oxygen species (ROS) formation (Chang 2007; Farina *et al.*, 2003) and this fact may contribute to MeHg-induced cytotoxicity.

MeHg-exposures causes impairments in the motor performance of both developing and mature rodents (Franco *et al.*, 2007), which was also a common manifestation observed on humans exposed to MeHg in tragic cases of MeHg poisoning outbreaks in Minamata (Japan) and Iraq (Gochfeld., 2003; Robertson e Orrenius., 2000). The neurobehavioral toxicity of MeHg may be related, at least in part, to disruption of thiol status which can be observed in the cerebrum and cerebellum of MeHg-poisoned animals (Barros *et al.*, 2006, Freitas *et al.*, 2009).

As pointed out above, literature data have indicated that cysteine can increase brain MeHg uptake after forming a stable methionine analog (Hirayama 1980; Aschner and Clarkson, 1988; Kerper *et al.*, 1992); however, to the best of our knowledge, there are no reports about Hg distribution in brain and locomotor activity after the simultaneous exposure to either MeHg-Cys complex or MeHg in mice. Moreover there are no data comparing the neurotoxicity of MeHg-Cys with

the MeHg that enters in the tissues via methionine transport system. In this regard, the purpose of this study was to examine the effect of MeHg-Cys complex administration on cortico-cerebral, cerebellar, hepatic, as well as, renal Hg-uptake and possible behavioral changes associated with Hg accumulation in adult's mice.

2. Materials and methods

2.1. – *Animals and treatments*

Adult male *Swiss albino* mice from our own breeding colony (25–35 g) were used. Groups of six animals were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (22–25°C) and on a 12 h-light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

The animals (24) were divided into four groups (n=6): (C) Control animals (1mL/Kg distilled water); (MeHg) Methylmercury group (2mg/Kg); (Cys) Cysteine group (2mg/Kg), or (MeHg - Cys) Methylmercury plus Cysteine (2mg/Kg, the molar ratio cystein:MeHg was 1 and the stoicheometric reaction between cystein and MeHg was confirmed using Ellman's reagent). All the animals were administered (i.p. one injection per day) for 60 consecutives days.

3 - *Behavior tests*

Behavioral observations were performed in a separated room; that had no interference of noise or human activity. The locomotor activity and exploration behavior were analyzed 24 hour after the last administration, in sessions of 2 min using an open - field box (56 cm x 42 cm x 40 cm) with the floor divided into 12 squares (Pereira *et al.*, 1992). The number of squares crossed with the four paws (crossings) and the number of rearings were used as measures of locomotor activity and exploration activities, respectively.

4 - Tissue preparation

After the behavioral tests, the animals were killed by decapitation and the kidney and liver were rapidly removed and homogenized in saline 0.9% (1/5 and 1/10 w/v, respectively). The brain was removed and divided in the longitudinal fissure in two [hemispheres](#). Cortex and cerebellum were isolated from the right [hemisphere](#) and used, after homogenization in saline 0,9% (1/10 w/v), for mercury quantification.

5 - Mercury quantification

Homogenates of kidney, liver and brain were used to quantification of total mercury, carried out by Cold Vapour-Atomic Fluorescence Spectrometry accordingly to method described by Bergdahl and collaborates (1998). Total Hg concentration was determined after acid digestion with HNO₃, H₂O₂, H₂SO₄ and perchloric acid.

6- Statistical Analysis

Data were analyzed by two way ANOVA, followed, when appropriate by Duncan's post hoc test. Differences between groups were considered to be significant when $P < 0.05$. Data were expressed as mean \pm SEM.

7 - Results

7.1 – Behavioral tests

Administrations of MeHg or MeHg-Cys complex caused a significant reduction in total locomotor activity of adult mice (crossing number in the open field). Surprisingly, Cys by itself produced a decrease in crossing scores (Figure 1A). (Figure 1A). With respects to the exploratory activity, rearing frequency was decreased only in the MeHg group (Figure 1B).

7.2 - Concentrations of Hg in brain areas, liver and kidney of mice

Treatment with MeHg alone caused a significant increase on Hg concentrations, when compared to control group in all tissues analyzed. The accumulation of Hg on cerebral areas (Figure 2A; 2B) and in liver (Figure 3A) was further increased in animals that received MeHg–Cys complex, when compared to MeHg alone group. For cortex and cerebellum the increase was in the range of approximately 50 - 40 % (respectively), whereas in liver the increase was of about 250%. Conversely to cerebral and hepatic tissues, the concentration of Hg found in kidney (Figure 3B) was lower in the group treated with MeHg-Cys complex (about 55%), than in the group treated only with MeHg.

8 - Discussion

The neurotoxicant MeHg is a highly reactive compound, which readily reaches an equilibrium state as complexes with free thiol groups in the body. It is likely that these MeHg-thiol complexes are the main forms by which MeHg is transported into tissues and organs (Rocha *et al.*, 1993; Ballatori *et al.*, 2002 ; Stringari *et al.*, 2008). In this regard, the present study showed that mice treated with equimolar concentration of MeHg-Cys (after reaction), presented additional increase in the Hg accumulation on cerebral areas and in liver, when compared to MeHg alone group. This finding may suggest that MeHg is transported into the brain and liver with its Cys conjugates, through of neutral amino acid transport system (LATs) (Adachi 2006; Simmons-Willis *et al.* 2002). The MeHg-Cys complex is structurally similar to the amino acid L-methionine, a substrate for the L system, and this carrier may be involved in MeHg uptake (Kerper *et al.*, 1992). Furthermore, studies have demonstrated that oocytes expressing LAT1-4F2hc or LAT2-4F2hc accumulated more MeHg when it is administered as the L-cysteine complex than when administered alone (Simmons-Willis *et al.*, 2002). Similarly, a recent study with CHO-k1 cells also demonstrated that the amino acid carrier, LAT1 efficiently transports MeHg across cell membranes. Over-expression of LAT1 in these cells was associated with enhanced uptake of MeHg when treated with L-cysteine (Yin *et al.*, 2008). In contrast, knock-down of LAT1 decreased the uptake of L-cysteine-conjugated MeHg and attenuated the effects of MeHg on decrease of viability (Yin *et al.*, 2008), suggesting a direct relation between, LAT1 transporter expression and the carry of MeHg-Cys complex through of cellular membranes.

Our data also show that the greater concentration of Hg was found in liver when compared with the brain areas and renal tissue. These results can be related

to the fact of liver to be the central organ of protein metabolism and receives amino acids preceding from the intestinal absorption and deriving from others organs and systems (Duarte., 2003). Therefore, LAT1 transporter is highly expressed in this organ (Kanai *et al.*, 1998). Surprisingly, our results show that Hg concentrations found in the kidney of mice treated with MeHg - Cys complex was lower than in mice treated with MeHg alone. This fact might be due the urinary Hg excretion (Hirayama *et al.*, 1991), since the major part of MeHg is eliminated in urine conjugated with Cys (Yasutake *et al.*, 1991). Similar experiments with MeHg - *N*-Acetylcysteine (NAC) complex showed an increase in the urinary excretion rate of methylmercury in a dose-dependent manner in Wistar rats (Madejczyk *et al* 2007). However, as well as occur with some amino acids (Duarte, 2003), the stable methionine analog (MeHg-Cys complex), can be redistributed from the kidney for other organs, such as the liver.

Another important issue in our study was the behavioral changes observed by MeHg or MeHg - Cys complex treatments. Taking together, our data showed that MeHg or MeHg - Cys complex, decreased locomotor and exploratory activities in the mice (Figures 1A and 1B, respectively). These results, at least in part, reflect the neurological damage induced by MeHg or MeHg-Cys complex exposure and reinforce the view that MeHg cause impairment in motor performance and exploratory activity (Farina *et al* 2005; Carvalho *et al* 2007). However, the effect of MeHg and MeHg-cysteine complex in rearing frequency was distinct. In fact, only MeHg exposure caused a significant reduction in rearing, indicating that the neurobehavioral consequences of MeHg can vary depending on whether it is

bound to cysteine or not. The high affinity of MeHg by the thiol group can be responsible for these neurobehavioral changes observed in the group that received MeHg alone. However, to the best of our knowledge, few or nothing is known about the neurobehavioral toxicology of MeHg-Cys complex. Thus, these results suggest singular neurobehavioral toxicology for both administration of MeHg (conjugated with Cys or MeHg alone), at least on exploratory activity.

In the present study, the behavioral effects of MeHg-Cys complex exposure indicate that, although MeHg enters the central nervous system yet complexed with a thiol-containing molecule, it is likely able to interact with other sulfhydryl molecules, probably due to exchanges from the Cys thiol group to other (more nucleophilic) thiols. In this regard, both glutathione and sulfhydryl containing proteins could be able to participate in such exchange reactions. Interestingly, selenoproteins, which have been proposed as important molecular targets related to mercurial-induced toxicity (Farina *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008), probably present higher affinity for Hg when compared to thiolic proteins (due to the lower pKa of selenols when compared to thiols). So, selenoproteins are also molecules likely related to the exchange of MeHg from MeHg-Cys complex to other molecular targets, probably involved on MeHg-induced behavioral changes.

In conclusion, the present study shows, for the first time, that the treatment with MeHg-Cys complex allows better Hg absorption and tissue (cerebral cortex, cerebellum and liver) uptake than the treatment with MeHg alone, in mice. Furthermore, this study reinforces the view that MeHg causes impairment in motor performance and exploratory activity and suggests that the different forms of MeHg

exposure affect its distribution in the tissues of mice, as well as, it can leads to the distinct neurobehavioral consequences.

References

Adachi T. (2006). Characteristic effect of L-methionine on tissue distribution of methylmercury in mice. *Journal of Health Science*. 52(2) 174-179.

Allena J. W., Shankera G., Aschner M. (2001). Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Research*. 894 131–140.

Anderson M. E., Meister A. (1983). Transport and direct utilization of gamma-glutamylcysteine for glutathione synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80 707-711.

Aschner M., Clarkson T. W. (1998). Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. *Brain Research*. 9 462-31.

Aschner M., Syversen. T. (2005). Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Therapeutic Drug Monitoring*. 27 278-283.

Bach R.D. and Weibel A.T. (1976). Nuclear Magnetic Resonance Studies on Anion - Exchanges Reactions of Alkylmercury Mercaptides. [Journal of the American Chemical Society](#). 98 6241-6249.

Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspectives*. 110 Suppl 5, 689-694.

Barros V., Dafre A. L., Santos A. R. S., Farina M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environmental Research*. 102 22–28.

Bergdahl I. A., Schutz A., Ahlqwist M., Bengtsson, C., Lapidus L., Lissner L., Hulten B. (1992). Methylmercury and inorganic mercury in serum—correlation to fish consumption and dental amalgam in a cohort of women born in 1922. *Environmental Research*. 77 20-24.

Bowie C., Hill A., Murray V., (1998). The effect of a lindane and mercury polluting incident on the health of a community: the Somerton Health Survey. *Public Health*. 112 249-255.

Carvalho M. C., Franco J. L., Ghizoni H., Kobus K., Nazari E. M., Rocha J. B. T., Nogueira C. W., Dafre A. L., Muller Y. M. R., Farina M. (2007). Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology*. 239 195-203.

Carvalho C. M., Chew E. H., Hashemy S. I., Lu J., Holmgren A. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *Journal Biological Chemistri*. 283 11913-11923.

Chang J. Y. (2007). Methylmercury causes glial IL-6 release. *Neuroscience Letters*. 416 217-220

Chen Y. W., Huang C. F., Tsai K. S. Yang R. S., Yen C. C., Yang C. Y., Lin-Shiau S.Y., Liu S. H. (2006). Methylmercury Induces Pancreatic β -Cell Apoptosis and Dysfunction. *Chemistry Research Toxicology*. 19 1080-1085

Duarte C. A. (2003). *Semiologia Imunológica Nutricional*. Editora Axcel Books do Brasil.

Ellman G. L., (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70.

Farina M., Frizzo E. S. M., Soares F. A. A., Schwalm F. D., Dietrich M. O., Zeni G., Rocha J. B. T., Souza D. O. (2003). Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicology Letters*. 144 351-357.

Farina M., Cereser V., Portela L.V., Mendez A., Porciúncula L.O., Fornaguera J., Gonçalves C.A., Wofchuk S.T, Rocha J.B.T., Souza D. O. (2005). Methylmercury increases S100B content in rat cerebrospinal fluid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19 249-253.

Franco J. L., Braga H. C., Stringari J., Missau F. C., Posser T., Mendes B. G., Leal R. B., Santos A. R. S., Dafre A. L., Pizzolatti M. G., Farina M. (2007). Comparative study of activities in reactiveoxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Chemistry Research Toxicology*. 20 1919-1926.

Freitas A. S., Funck V. R., Rotta M. S., Bohrer D., Mörschbacher V., Puntel R. L., Nogueira C. W., Farina M., Aschner M., Rocha J. B. T. (2009). Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Research Bulletin*. 79 77-84

Gochfeld M. (2003)., Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 9 56-174.

Hempel S. L., Buettner G. R., O Malley Y. Q., Wessels D. A. and Flaherty D. M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biological Medicine*. 27 146-159.

Hirayama K., Yasutake A. and Adachi T. (1991). Mechanism for renal handling of methylmercury. In *Advances in Mercury Toxicology* (Suzuki T. Imura N. and Clarkson T.W., Eds) Plenum Press New York, pp. 121-134.

Hirayama K. (1975). Transport of mechanism of methylmercury – intestinal absorption biliary excretion and distribution of methylmercury. *The Kumamoto medical journal*. 28 151-163.

Hirayama K. (1980). Effect of amino acid on brain uptake of Methylmercury. *Toxicology Applied Pharmacology*. 55 318-323.

Hirayama K. (1985). Effect of combined administration of thiol compounds and methylmercury chloride on mercury distribution in rats. *Biochemistry Pharmacology*. 34 2020-2032.

Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., Endou H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *Journal of Biological Chemistry*. 273:236 29–32.

Kerper L. E., Ballatori N. and Clarkson T. W. (1992). Methyl mercury cross the blood-brain by an amino acid carrier. [The American Journal of Physiology](#). 262 R761-R765.

Kobal A. B., Prezelj M., Horvat M., Krsnik M., Gibicar D., Osredkar J. (2007). Glutathione levels after long-term occupational elemental mercury exposure. *Environmental Research*. 107 115-123.

Komulainen H., Bondy S. C. (1987). Increased free intrasynaptosomal Ca^{2+} by neurotoxic organometals: distinctive mechanisms. *Toxicology Applied Pharmacology*. 88, 77-86.

Limke T. L., Atchison W. D. (2002). Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicology Applied Pharmacology*. 178 52-61.

Madejczyk M. S., Aremu D. A., Simmons-Willis T. A., Clarkson T. W., Ballatori N. (2007). Accelerated Urinary Excretion of Methylmercury following Administration of Its Antidote N-Acetylcysteine Requires Mrp2/Abcc2, the Apical Multidrug Resistance-Associated Protein. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 322 378-384.

Marty M. S., Atchison W. D. (1997). Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicology Applied Pharmacology*. 147 319-330.

Meotti F. C., Borges V. C., Zeni G., Rocha J. B. T., Nogueira C. W. (2003). Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters*. 143 9 -16.

Mori N., Yasutake A., Hirayama K. (2007). Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Archives of Toxicology*. 81 769-776

Pereira M. A., Huang C. I., Izquierdo I. (1992). Effects of chronic treatment with 2,5-hexanedione on several behavioral measures in rats. *Psychobiology*. 20 133-138.

Peterson J. G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. 83 346-356.

Reis R. A. M., Herculano A. M., Silva M. C. C., Santos R.M., Nascimento J. L. M. (2007). In vitro toxicity induced by methylmercury on sympathetic neurons is reverted by L-cysteine or glutathione. *Neuroscience Research*. 58 278-284

Robertson J. D., Orrenius S. (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. [Critical reviews in toxicology](#). 30 609-627.

Rocha J. B., Freitas A. J., Marques M. B., Pereira M. E., Emanuelli, Souza D. O. (1993). Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. *Brazilian Journal Medicine Biological Research*. 26 1077-1083.

Rooney J. P. K. (2007). The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*. 234 145–156

Rossato J. I., Ketzler L. A., Centuriao F. B., Silva S. J. N., Ludtke D. S., Zeni G., Braga A. L., Rubin M. A., Rocha J. B. T. (2002). Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research*. 27 297-303.

Sarafian T. A., Verity M. A. (1991). Oxidative mechanisms underlying methylmercury neurotoxicity. *International Journal Developmental Neuroscience*. 9 147-153.

Sarafian T. A. (1999). Methylmercury-induced generation of free radical: biological implications. *Metal Ions Biological System*. 36 415-444.

Simmons-Willis T. A., Koh A. S., Clarkson T. W., Ballatori N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochemistry Journal*. 367 239-246.

Simpon R. B. (1961). Association Constant of Methylmercury with Sulphydryl and other bases. [Journal of the American Chemical Society](#). 83 4711-4717.

Stringari J., Nunes A. K., Franco J. L., Bohrer D., Garcia S. C., Dafre A. L., Milatovic D., Souza D. O., Rocha J. B., Aschner M., Farina M. (2008). Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicological Applied Pharmacology*. 227 147-154.

Yasutake A., Adachi T., Hirayama K., Inouye M. (1991). Integrity of blood-brain system against methylmercury acute toxicity. *Japan Journal of Toxicology Environmental Health*. 37 355-362.

Yin Z., Jiang H., Syversen T. Rocha J. B. T., Farina M., Aschner M. (2008). The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *Journal of Neurochemistry*. 107 1083-1090

Figures

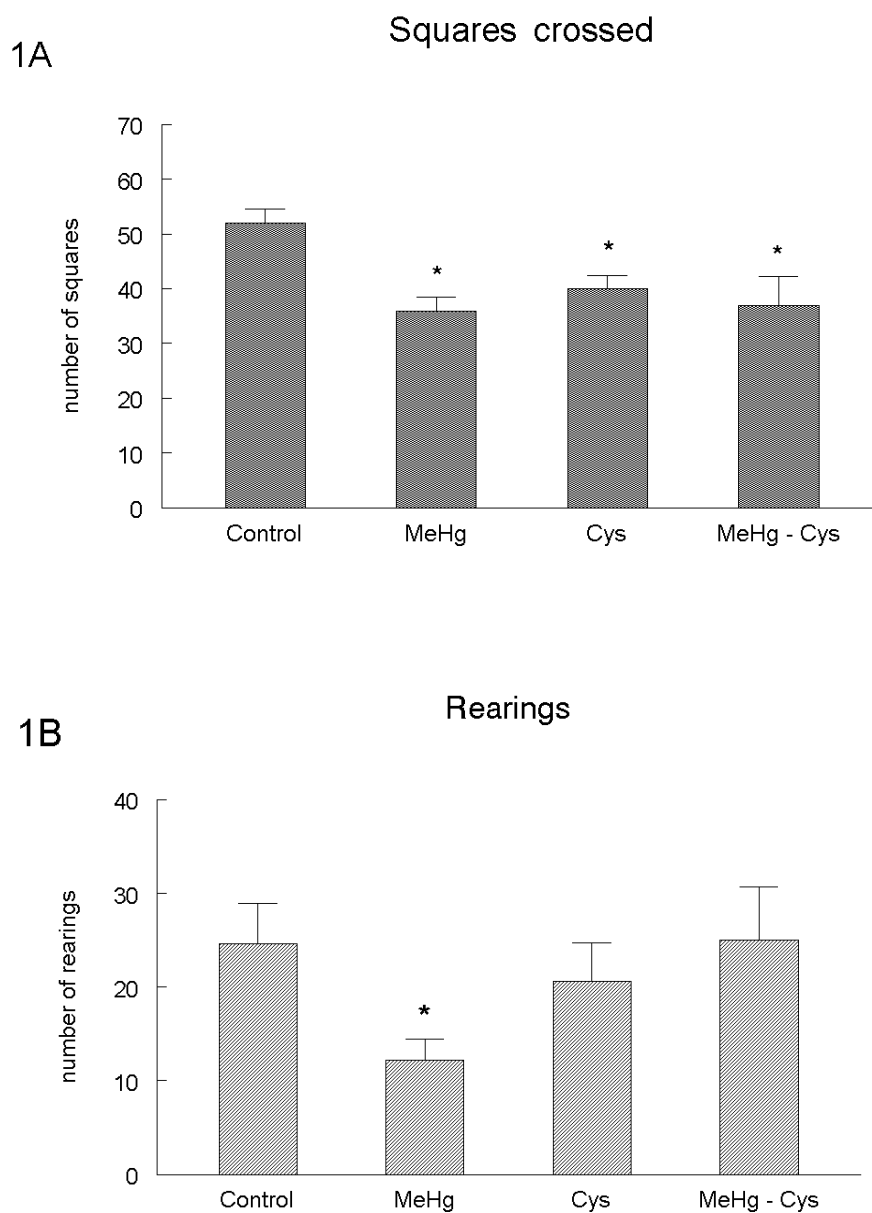


Fig. 1 - Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on locomotor activity; squares crossed (A) and exploratory activity; rearings (B). Mice were intraperitoneally injected with MeHg (2 mg/Kg/day); Cys (2 mg/Kg/day); or complex MeHg-Cys (2 mg/Kg/day), during 60 consecutive days. (* Indicates $p < 0.05$ from control; $n = 6$ mean \pm S.E).

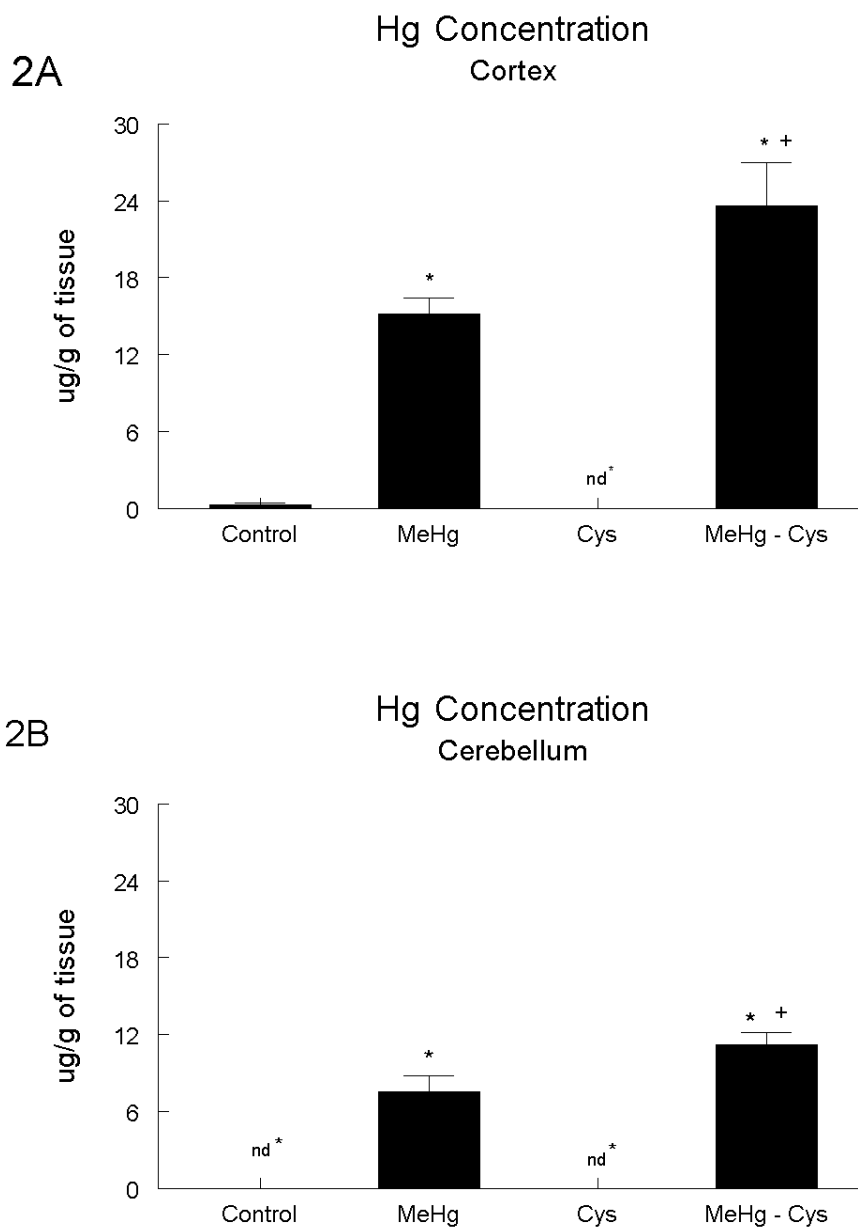


Fig. 2 - Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on tissue Hg-uptake; cortex (A) and cerebellum (B). Mice were intraperitoneally injected with MeHg (2 mg/Kg/day); Cys (2 mg/Kg/day); or complex MeHg-Cys (2 mg/Kg/day), during 60 consecutive days. (* Indicates $p < 0.05$ from control; + Indicates $p < 0.05$ from MeHg; nd Indicates no detected; $n = 6$ mean \pm S.E).

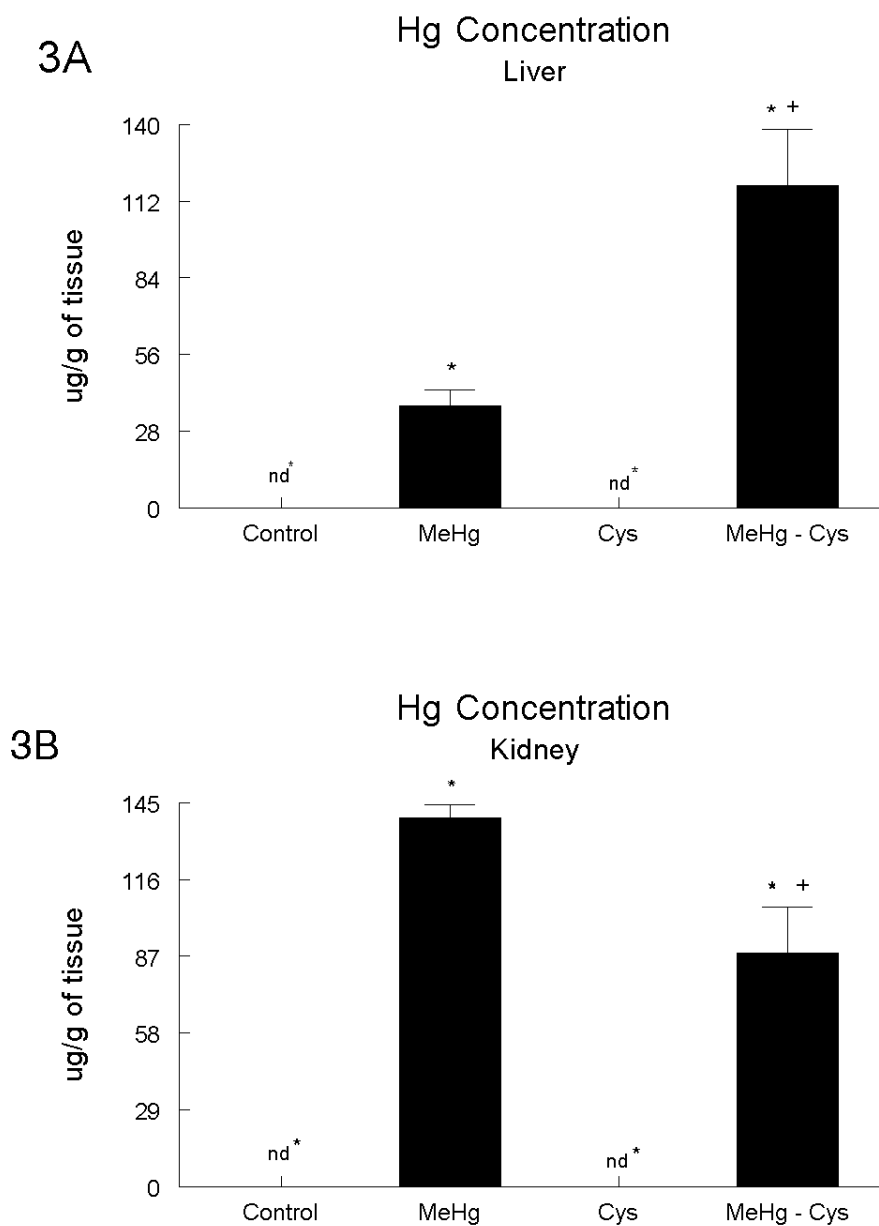


Fig. 3 - Effects of treatments with Cys, MeHg or complex MeHg-Cys on tissue Hg-uptake; liver (A) and kidney (B). Mice were intraperitoneally injected with MeHg (2 mg/Kg/day); Cys (2 mg/Kg/day); or complex MeHg-Cys (2 mg/Kg/day), during 60 consecutive days. (* Indicates $p < 0.05$ from control; + Indicates $p < 0.05$ from MeHg; nd* Indicates no detected; $n = 6$ mean \pm S.E).

5. DISCUSSÃO

O MeHg é um composto neurotóxico, que reage rapidamente formando complexos com os tióis livres do organismo. Dessa forma várias biomoléculas que contém grupos sulfidrílicos podem ser consideradas um potencial alvo nucleofílico do MeHg. Possivelmente esses complexos MeHg-tiol sejam a principal forma pela qual o mercúrio é transportado para dentro de tecidos e órgãos.

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que camundongos tratados com concentração equimolar de MeHg-Cys, apresentaram um aumento adicional no acúmulo de mercúrio em áreas cerebrais (córtex e cerebelo) e no fígado, quando comparado com o grupo tratado apenas com MeHg. Esses resultados sugerem que o MeHg é transportado para o cérebro e fígado principalmente quando conjugado a Cys, provavelmente através do sistema L de transporte de aminoácidos neutros (LATs) (Adachi, 2006; Simmons-Willis e cols., 2002). O complexo MeHg-Cys é estruturalmente similar a metionina, substrato do sistema L, dessa maneira esse transportador pode estar envolvido com o transporte de mercúrio para dentro das células (Kerpe e cols., 1992). Além disso, estudos têm demonstrado que ovócitos que expressam LAT1-4F2hc ou LAT2-4F2hc acumulam mais mercúrio quando este é co-administrado com Cys, do que quando administrado apenas mercúrio (Simmons-Willis e cols., 2002). Similarmente, um recente estudo com células CHO-k1, também mostrou que o transportador de aminoácidos LAT1, transporta eficientemente MeHg através das membranas celulares. A super expressão desse transportador nessas células, está associada ao aumento da captação de MeHg quando tratado com Cys (Yin e cols., 2008). Em contraste, o “knock-down” do transportador LAT1 diminuiu a captação do conjugado MeHg-Cys e atenuou os efeitos do MeHg sobre a diminuição da viabilidade dessas células (Yin e cols., 2008). Mostrando a relação direta da expressão do transportador LAT1, com o transporte do complexo MeHg-Cys através das membranas celulares.

O fígado é o órgão central do metabolismo de proteínas e recebe aminoácidos provenientes tanto da absorção intestinal quanto oriundos de outros órgãos e sistemas (Duarte, 2003), possivelmente por essa razão o transportador LAT1 é altamente expressado nesse órgão (Kanai e cols., 1998). Esse fato, pode explicar em parte, o porquê do acúmulo

de mercúrio, nos camundongos que receberam o complexo MeHg-Cys, ser maior no fígado do que nos outros órgãos avaliados.

Surpreendentemente, nossos resultados também mostram que a concentração de mercúrio encontrada nos rins dos camundongos tratados com o complexo MeHg-Cys, foi menor que nos camundongos tratados apenas com MeHg (Figura 3B). Esse fato pode ser devido à excreção renal do mercúrio após o processo de filtração glomerular (Hirayama e cols., 1991), uma vez que a maior parte do MeHg é eliminada na urina conjugada com a Cys (Yasutake e cols., 1991). Experimentos similares com o complexo MeHg-N-Acetilcisteína demonstraram um aumento da excreção urinária de MeHg dependente da dose em ratos Wistar (Madejczyk e cols., 2007). Entretanto, como ocorre com vários aminoácidos (Duarte, 2003), o complexo MeHg-Cys por ser mimético à metionina, pode ser redistribuído dos rins para outros órgãos, principalmente o fígado.

Outro importante dado do nosso estudo foi a mudança comportamental causada pelo MeHg e pelo complexo MeHg-Cys. Juntos, nossos resultados mostram que o MeHg ou o complexo MeHg-Cys, diminuíram a atividade locomotora e exploratória (Figuras 1A e 1B, respectivamente), em parte, esses resultados podem ser reflexo de um dano neurológico causado pela exposição ao MeHg ou ao complexo MeHg-Cys. Esses resultados reforçam os dados da literatura que atribuem ao MeHg um prejuízo motor e uma diminuição da atividade exploratória (Farina e cols., 2005; Carvalho e cols., 2007). Entretanto, o efeito do MeHg e do complexo MeHg-Cys na atividade exploratória foi um caso distinto. De fato, apenas o grupo tratado com MeHg apresentou diminuição significativa nesta tarefa, indicando que as conseqüências neuro-comportamentais causadas pelo MeHg podem variar dependendo se o MeHg estiver ligado a Cys ou não. A alta afinidade do MeHg pela forma aniônica dos grupos sulfidrílicos das biomoléculas, pode ser responsável por essa alteração comportamental observada no grupo que recebeu apenas MeHg. Dessa forma, pouco ou nada se sabe sobre a toxicologia comportamental do complexo MeHg-Cys. Contudo, nossos resultados apontam para uma toxicologia neuro-comportamental singular, entre a administração da forma livre de MeHg e a administração da forma conjugada com cys, ao menos no que diz respeito à atividade comportamental exploratória.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o tratamento com o complexo MeHg-Cys permitiu uma melhor absorção e captação de mercúrio pelos tecidos, que o

tratamento apenas com MeHg, nas áreas cerebrais e no fígado de camundongos. Além disso, nossos resultados reforçam a idéia que o MeHg causa prejuízo na performance motora e atividade exploratória dos animais e sugerem que a forma de exposição ao MeHg (conjugado com Cys ou livre), afeta de forma diferente alguns parâmetros comportamentais.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir que:

1 – O complexo MeHg-Cys causa um acúmulo adicional de mercúrio em áreas cerebrais (córtex e cerebelo) e fígado de camundongos, no entanto o tratamento com complexo MeHg-Cys acumula menos mercúrio no tecido renal, do que o tratamento com MeHg em camundongos.

2 – O tratamento com MeHg ou com o complexo MeHg-Cys leva a alterações neuro-comportamentais (locomotoras) em camundongos.

3– O tratamento com MeHg leva a alterações neuro-comportamentais (exploratórias) em camundongos.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, faz-se ainda necessário investigar:

1. Para ensaios *in vivo*:

Analisar os efeitos do tratamento com o complexo MeHg-Cys em parâmetros oxidativos bem como:

- (a) Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio;
- (b) Verificar os níveis de peroxidação lipídica;
- (c) Verificar os níveis de tiol totais e não protéicos.

2. Para ensaios *in vitro*:

(a) Analisar os efeitos do complexo MeHg-Cys nos parâmetros oxidativos anteriormente citados.

(b) Analisar o transporte desse complexo em células, fatias de órgãos e organelas celulares.

8. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E MESTRADO

1. PUNTEL, Robson Luiz, ROOS, Daniel Henrique, PAIXÃO, Márcio Weber, BRAGA, Antônio Luiz, NOGUEIRA, Cristina Wayne, ROCHA, João Batista Teixeira.

Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: Effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chemico-Biological Interactions.* , v.165, p.87 - 98, 2007.

2. PUNTEL, Robson Luiz, ROOS, Daniel Henrique, GROTTTO, Denise, GARCIA, Solange C., NOGUEIRA, Cristina Wayne, ROCHA, João Batista Teixeira.

Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: A comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat. *Life Sciences.* , v.81, p.51 - 62, 2007.

3. BRAGA, Antonio L, Alberto E. Eduardo, SOARES, C. Letiere, ROCHA, João B T, Sudati H. Jessie, ROOS, Daniel Henrique.

Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. *Organic and Biomolecular Chemistry.* , v.7, p.43 - 45, 2008.

4. Teixeira A., Reckziegel P., Mülle L., Pereira P., ROOS, Daniel Henrique, ROCHA, João B. T., BURGER, Marilise E.

Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* , 2009.

5. ROOS, Daniel Henrique, PUNTEL, Robson Luiz, SANTOS, Mateus M dos, SOUZA, Diogo O, Farina M, NOGUEIRA, Cristina Wayne, ASCHENER, Mishael, BURGER, Marilise e, ROCHA, João Batista Teixeira.

Guanosine And Syntetic Organoselenium Componds Modulate Methylmercury-Induced Oxidative Stress In Rat Brain Cortical Slices: Involvement Of Glutamatergic System. *Toxicology in vitro.* , v. 23 p.302-307, 2009.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADACHI T. (2006). Characteristic effect of L-methionine on tissue distribution of methylmercury in mice. *Journal of Health Science*. 52(2) 174-179
- ALLENA J. W., SHANKERA G., ASCHNER M. (2001). Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons *Brain Research*. 894 131–140.
- ANDERSON M. E., MEISTER A. (1983). Transport and direct utilization of gamma-glutamylcysteine for glutathione synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80 707–711.
- ASCHNER M., CLARKSON T. W. (1988). Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. *Brain Research*. 462, 31–39.
- ASCHNER M., EBERLE N. B., GODERIE S., KIMELBERG H. K. (1990). Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. *Brain Research*. 521 221–228.
- ASCHNER M., YAO C. P., ALLEN J. W., TAN K. H., (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes, *Neurochemistry International*. 37 199–206.
- ATCHISON W. D. (2005). Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 26 n11.
- BACH R. D. AND WEIBEL A. T. (1976). Nuclear Magnetic Resonance Studies on Anion - Exchanges Reactions of Alkylmercury Mercaptides. [*Journal of the American Chemical Society*](#). 98 6241- 6249.
- BAKIR F., DAMLUJI D. F, AMIN-ZAKI L., MURTADHA M., KHAKIDI A., AL-RAWI N. Y., TKRITI S., DAHAHIR H. I, CLARKSON T. W., SMITH J. C., DOHERTY R. A. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 181 230–41.
- BANNAI S. (1984). Transport of cystine and cysteine in mammalian cells, *transBiochim. Biophysical Acta*. 779 289–306.
- BARROS V., DAFRE A. L., SANTOS A. R. S., FARINA M. (2006). Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury *Environmental Research*. 102 22–28.
- BOENING D. W. (2000). Ecological Effects, Transport, and Fate of Mercury: a general review. *Chemosphere*. 40 1335-1351.
- BRAUNWALD E., FAUCI A. S., KASPER D. L., HAUSER S. L., LONGO D. L., JAMESON J. L. (2001). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, pp. 467–469, 2592–2593, 2602.

- BRIDGES, C. C., ZALUPS, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology Applied Pharmacology*. 204 274–308.
- CARVALHO M. C., FRANCO J. L., GHIZONI H., KOBUS K., NAZARI E. M., ROCHA J. B. T., NOGUEIRA C. W., DAFRE A. L., MULLER Y. M. R., FARINA M. (2007). Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology*. 239 195–203
- CHANG, L. W., (1980). Mercury. In: P.S. Spencer and H.H. Schaumburg (Eds.), *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, Williams and Wilkins, Baltimore 508-525.
- CHANG J. Y. (2007). Methylmercury causes glial IL-6 release. *Neuroscience Letters*. 416 217–220.
- CHEN Y. W., HUANG C. F., TSAI K. S., YANG R. S., YEN C. C., YANG C. Y., LIN-SHIAU S. Y., LIU S. H. (2006). Methylmercury Induces Pancreatic α -Cell Apoptosis and Dysfunction. *Chemistry Research Toxicology*. 19 1080-1085.
- CHOI B. H. (1978). Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *Journal Neuropathology Expression Neurology*. 37 719–733.
- CHOI D. W (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology*. 23 1261-76.
- CHOW C. K. (1979). Nutritional influence on cellular antioxidant defence system. *American Journal Clinical Nutrition*. 32 1066-81.
- CHUU J. J., LIU S. H., YN S., SHIAU L. (2007). Differential neurotoxic effects of methylmercury and mercuric sulfide in rats. *Toxicology Letters*. 169 109–120.
- CLARKSON, T. W. (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review Pharmacology*. 12 375–406.
- CLARKSON T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*. 110 (Suppl. 1), 11–23.
- CLARKSON T. W., MAGOS L., MYERS G. J. (2003). The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New England Journal Medicine*. 349 1731-1737.
- CLARKSON T. W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 34, 369-403.
- CONNOR E. O., DEVESA A., GARCIA C., PUERTES I. R., PELLIN A., VINA J. R. (1995). Biosynthesis and maintenance of GSH in primary astrocyte VINA, cultures: role of L-cystine and ascorbate. *Brain Research*. 680 157–163.

- DUARTE C. A. (2003). *Semiologia Imunológica Nutricional*. Editora Axcel Books do Brasil.
- FARINA M., CERESER V., PORTELA L.V., MENDEZ A., PORCIÚNCULA L.O., FORNAGUERA J., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S.T, ROCHA J.B.T., SOUZA D. O. (2005). Methylmercury increases S100B content in rat cerebrospinal fluid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19 249–253.
- FARINA M., FRIZZO E. S. M., SOARES F. A. A., SCHWALM F. D., DIETRICH M. O., ZENI G., ROCHA J. B. T., SOUZA D. O. (2003). Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicology Letters*. 144 351-357.
- FREITAS A. S., FUNCK V. R., ROTTA M. S., BOHRER D., MÖRSCHBÄCHER V., PUNTEL R. L., NOGUEIRA C. W., FARINA M., ASCHNER M, ROCHA J. B. T. (2009). Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Research Bulletin*. 79 77–84
- FRIBERG L., MOTTET N. K. (1989). Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biological Trace Element Research*. 21 201–6.
- GALINDO MF, JORDAN J, GONZALEZ-GARCIA C, CENA V. (2003). Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Brain Journal Pharmacology*. 139 797–804
- GOCHFELD M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 9 56 - 174.
- GRANDJEAN P. (1997). Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratology*. 19 417–428.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; p. 1–936.
- HARGREAVES R. J., EVANS J. G., JANOTA I, MAGOS L., CAVANAGH J. B. (1988). Persistent mercury in nerve cells 16 years after metallic mercury poisoning. *Neuropathology Applies Neurobiology* 14 443–452.
- HIRAYAMA K. (1975). Transport of mechanism of methylmercury – intestinal absorption biliary excretion and distribution of methylmercury. *The Kumamoto medical journal* 28 151-163.
- HIRAYAMA K. (1980). Effect of amino acid on brain uptake of Methylmercury. *Toxicology Applied Pharmacology*. 55 318-323.

HIRAYAMA K. (1985). Effect of combined administration of thiol compounds and methylmercury chloride on mercury distribution in rats. *Biochemistry Pharmacology*. 34 2020-2032.

HIRAYAMA K., YASUTAKE A. AND ADACHI T. (1991). Mechanism for renal handling of methylmercury. In *Advances in Mercury Toxicology* (Suzuki T. Imura N. and Clarkson T.W., Eds) Plenum Press New York. pp. 121-134.

INSUG O., DATAR S., KOCH C. J., SHAPIRO I. M., SHENKER B. J. (1997). Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: Evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology*. 124, 211-224.

IPCS (International Programme On Chemical Safety). (1990). Methylmercury. *Environmental Health Criteria*. World Health Organization, Geneva. V. 101, pp144.

JOSHUA R. EDWARDS, M. SUE MARTY, WILLIAM D. ATCHISON. (2005). Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 208 222– 232.

KANAI Y., SEGAWA H., MIYAMOTO K., UCHINO H., TAKEDA E. AND ENDOU H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *Journal Biological Chemistry*. 273 23629–23632.

KERPER L. E., BALLATORI N. AND CLARKSON T. W. (1992). Methyl mercury cross the blood-brain by an amino acid carrier. [The American Journal of Physiology](#). 262 R761-R765.

LACERDA L. D. (1997). Contaminação Por Mercúrio No Brasil: Fontes Industriais Vs Garimpo De Ouro. *Química Nova*. 20(2).

LEVISOHN L. (2000). Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain*. 123 1041–1050.

LIMKE T. L., OTERO-MONTANEZ J K. L., AND ATCHISON W. D. (2003). Evidence for Interactions between Intracellular Calcium Stores during Methylmercury-Induced Intracellular Calcium Dysregulation in Rat Cerebellar Granule Neurons *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 304 949–958.

LORSCHIEDER F. L., VIMY M. J., SUMMERS A. O. (1995). Mercury exposure from “silver” tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. *FASEB Journal*. 9 504–508.

MADEJCZYK M. S., AREMU D. A., SIMMONS-WILLIS T. A., CLARKSON T. W., BALLATORI N. (2007). Accelerated Urinary Excretion of Methylmercury following Administration of Its Antidote N-Acetylcysteine Requires Mrp2/Abcc2, the Apical Multidrug Resistance-Associated Protein. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 322:378-384.

MALM O. (1998). Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research* 77 73–8.

MARTY M. S., ATCHISON W. D. (1998). Elevations of intracellular Ca⁺⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 150 98–105.

MATSUO H., TSUKADA S., NAKATA T. (2000). Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Neuroreport*. 11 3507–3511.

MOKRZAN E. M., KERPER L. E., BALLATORI N., CLARKSON T. W. (1995). Methylmercury-thiol uptake into cultured brain capillary endothelial cells on amino acid system L. *J. Pharmacol. Experimental Theratology*. 272 1277–1284.

MULLER Y. M. R., FARINA M. (2007). Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology*. 239 195–203.

MUTTER J., NAUMANN J., SADAGHIANI C., WALACH H., DRASCH G., (2004). Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity. *International Journal Highland Environmental Health*. 207 391–397.

NISHIOKU T., TAKAI N., MIYAMOTO K., MURAO K., HARA C., YAMAMOTO K., NAKANISHI H. (2000). Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia. *Brain Research*. 871, 160–164.

NUMAN I. T, HASSAN M. Q, STOHS S. J. (1990). Protective effects of antioxidants against endrin-induced lipid peroxidation, glutathione depletion, and lethality in rats. *Archives Environmental Contain Toxicological*. 19 302-6.

OPITZ H., SCHWEINSBERG F., GROSSMANN T., WENDT-GALLITELLI M. F., MEYERMANN R. (1996). Demonstration of mercury in the human brain and other organs 17 years after metallic mercury exposure. *Clinical Neuropathology*. 15 139–144.

OYAKE Y, TANAKA M, KUBO H, CICHIBU H. (1966). Neuropathological studies on organic mercury poisonings with special reference to the staining and distribution of mercury granules. *Advance Neurological Science*. 10 744–50.

OZUAH P. O. (2000). Mercury poisoning. *Current Problem Pediatric*. 30 91–99.

- PARKER S. K., SCHWARTZ B., TODD J., PICKERING L. K. (2004). Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. *Pediatrics* 114 793–804.
- PINES G., DANBOLT N. C., BJORAS M., ZHANG Y., BENDAHAN A., EIDE L. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360 464-467.
- PINHEIRO M. C. N, HARADA M., YASODA E., NAKANISHI J., OIKAWA T., VIEIRA J. L. F., (2003). Toxicological and epidemiological data on human exposure to mercury in the Tapajós River basin: 1994–1998. *Environmental Science*. 10 99-105.
- RADI R., CASSINA A., HODARA R. (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological Chemistry*. 383 401–9.
- REICHL F. X., WALTHER U. I., DURNER J., KEHE K., HICKEL R., KUNZELMANN K. H., SPAHL W., HUME W. R., BENSCHOP H., FORTH W. (2001) Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dental Material*. 17, 95-101.
- RIVA D., GIORGI C. (2000). The cerebellum contributes to higher functions during development: evidence from a series of children surgically treated for posterior fossa tumours. *Brain*. 123 1051–1061
- ROBERTSON, J. D., ORRENIUS, S. (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical reviews in toxicology*. 30 609 -627.
- ROONEY J. P. K. (2007). The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury *Toxicology*. 234 145–156.
- SAGARA J., MIURA K., BANNAI S. (1993). Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension, *Journal Neurochemistry*. 61 1667–1671.
- SAKAMOTO, (1996). Protective effects of Ca²⁺ channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacology Toxicology*. 78 193–199
- SARAVANAN N., SENTHIL D., VARALAKSHMI P. (1992). Effect Of L-Cysteine On Lipid Peroxidation In Experimental Urolithiatic Rats. *Pharmacological Research*. 32 1993-1995.
- SARNAT, H. B., ALCALA H. (1980). Human cerebellar hypoplasia – asyndrome of diverse causes. *Archives Neurology*. 37 300–305.
- SHENKER B. J., DATAR, S., MANSFIELD K., SHAPIRO I. M. (1997). Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: A flow cytometric analysis. *Toxicological Applied Pharmacology*. 143, 397-406.

SEEGAL R. F., DREIEM A., (2007). Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent, *NeuroToxicology*. 28 720–726.

SHANKER G., SYVERSEN T., ASCHNER J. L., ASCHNER M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Molecular Brain Research*. 137 11 – 22

SIMMONS-WILLIS T. A., KOH A. S., CLARKSON T. W., BALLATORI N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochemistry Journal*. 367 239-46.

SIMPON R. B. (1961). Association Constant of Methylmercury with Sulphydryl and other bases. [Journal of the American Chemical Society](#). 83 4711- 4717.

TAKEUCHI T., ETO K., TOKUNAGA H., (1989). Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. *Neurotoxicology*. 10 651–657.

WASSERMAN J. C., HACON S. S., WASSERMAN M. A. (2001). O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo e Vida*. 2 1-2.

WATANABE C. E SATOH H. (1996). Evolution of our understanding of methylmercury as a health threat. *Environmental Health Perspective*. 9 853-869.

WOOD J. M. KENNEDY F. S., ROSEN C. E. (1968). Synthesis on methylmercury compounds by extracts of methanogenic bacterium. *Nature*. 220 173–4.

WOOD J. M. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science*. 183 1049-1053.

YANAGIDA O., KANAI Y., CHAIROUNGDU A. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochemistry Biophysical Acta*. 1514 291–302.

YASUTAKE A., ADACHI T., HIRAYAMA K., INOUYE M. (1991). Integrity of blood-brain system against methylmercury acute toxicity. *Japan Journal of Toxicology Environmental Health*. 37 355-362.

YEOH T. S., LEE A. S., LEE H. S. (1986). Absorption of mercuric sulphide following oral administration in mice. *Toxicology*. 41 107–111.

YIN Z., JIANG H., SYVERSEN T., ROCHA J. B. T., FARINA M., ASCHNER M. (2008). The methylmercury-l-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transport. *Journal of neurochemistry*. 107 1083-1090.

ZHENG Y. B., WANG Z., CHEN B. Y., WANG X. C., (2003). Multiple effects of chemical reagent on enzyme: o-phthalaldehyde-induced inactivation, dissociation and partial unfolding of lactate dehydrogenase from pig heart. *Interactions Journal of Biological Macromolecules*. 32 191–197.