

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA
ACETICOLINESTERASE E SOBRE O
COMPORTAMENTO EM RATOS EXPOSTOS AO
CÁDMIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Amanda Maino Fiorenza

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**EFEITOS DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA
ACETICOLINESTERASE E SOBRE O COMPORTAMENTO EM
RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

por

Amanda Maino Fiorenza

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

Orientadora: Prof. (Dra) Vera Maria Melchiors Morsch
Co-orientadora: Prof. (Dra) Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil
2011

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

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

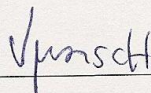
**EFEITOS DA ROTINA SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE
E SOBRE O COMPORTAMENTO EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

elaborada por

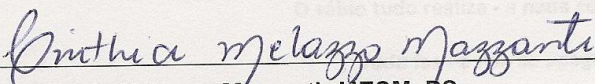
Amanda Maino Fiorenza

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

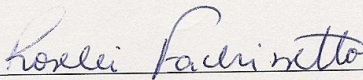
COMISSÃO EXAMINADORA:



**Dra. Vera Maria Melchior Morsch
(Presidente/Orientador)**



Dra. Cíntia Melazzo Mazzanti - UFSM- RS



Dra. Roselei Fachineto - UFSM- RS

Santa Maria, 09 de setembro 2011

Só temos consciência do belo
Quando conhecemos o feio.
Só temos consciência do bom
Quando conhecemos o mau.
Porquanto o Ser e o Existir
Se engendram mutuamente.
O fácil e o difícil se completam.
O grande e o pequeno são complementares.
O alto e o baixo formam um todo.
O som e o silêncio formam a harmonia.
O passado e o futuro geram o tempo.
Eis por que o sábio age
Pelo não-agir.
E ensina sem falar.
Aceita tudo que lhe acontece.
Produz tudo e não fica com nada.
O sábio tudo realiza - e nada considera seu.
Tudo faz - e não se apega à sua obra.
Não se prende aos frutos da sua atividade.
Termina a sua obra
E está sempre no princípio.
E por isso sua obra prospera.

Lao Tsé

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Rosemari e José Paulo, por renunciarem
muitas vezes suas vontades em prol do meu sucesso!
Amo vocês!*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo pelo dom da vida e por fazer de cada novo dia uma oportunidade de crescimento, autoconhecimento e perdão!

Agradeço aos meus avós, por não terem medido esforços para que meus pais progredissem e fossem exemplos de pessoas dignas! Hoje, sou o que sou, porque vocês me presentearam tanto com meus pais, maravilhosos, como com as inúmeras lições de vida que aprendi com vocês!

Agradeço aos meus pais por tudo! Posso dizer que seria injusto citar qualquer coisa em detrimento de outras! Para não cair na injustiça do esquecimento, basta dizer que agradeço por tudo! Pois cada passo que vocês me ajudaram a dar, sendo de mãos dadas quando pequena, sendo pelo incentivo de dizer “Eu sei que tu consegue!” foram a base para que eu nunca desistisse dos meus sonhos e serão a base, sempre, de todas as minhas conquistas. Muitas vezes quis mais por vocês do que por mim mesma... mas nunca duvidei de que eu era capaz!

Agradeço também ao meu companheirinho imbatível... Carlos Eduardo! Tu não tens idéia de como teu alto astral, teu amor e carinho me contagiam! Amor, obrigada por me agüentar de mau-humor e cansada depois de uma maratona de afazeres, por ir aos fins de semana me ajudar a tratar os ratos, por me ditar listas infindas de resultados, pelas palavras de força quando tudo parecia dar errado... obrigada por fazer meus dias muuuito mais felizes! N.E.O.Q.E.A.V.!

Agradeço também à minha amiga Paola por toda uma “vida” juntas, desde o colégio quando entrávamos num desespero conjunto em provas e trabalhos, pelas horas de choro no ombro, pelos enredos incríveis que inventávamos e até mesmo pelas festas mais loucas! Amiga! Muito desse trabalho também é teu, pois, sempre fizemos tudo juntas e sempre uma lembrou a outra da importância do estudo para que fôssemos algo! Hoje, sei que me entendes pela ausência, afinal, foram meses sem nos vermos na correria do dia-a-dia e a satisfação, embora isso tudo, de nos encontrarmos como se tivéssemos nos visto ontem! Te amo como uma irmã de alma!

Deixo aqui um agradecimento especial à minha orientadora prof^a Vera. Gostaria de te agradecer muito pelo carinho, ajuda e presença tanto na minha iniciação científica, como decorrer deste trabalho e da minha docência! Foste uma excelente orientadora e amiga, compreendendo meu modo de trabalho, respeitando a minha individualidade e se fazendo presente mesmo em momentos difíceis.

Agradeço também à prof^a Maria Rosa pelo carinho e atenção desde a minha iniciação científica.

Agradeço também a todos os meus colegas do laboratório 2208 /Enzitox pela ajuda, amizade e carinho durante todo o tempo que estive no laboratório. Vocês, e não vou citar ninguém em especial por medo de esquecer alguém, foram companheiros de trabalho, papo-furado e confidências ... vocês fizeram meus dias muuuuuito mais DIVER! Lavar uma louça, fazer uma acetil, ler um verde, fazer uma junção, almoçar no RU, ir no 16 , no croassonho ou no Dani café é muito mais engraçado com vocês!

Agradeço, em especial, ao meu mais novo amigo : Jonas ! Fomos nos conhecendo devagarzinho, construindo uma amizade sincera e que pretendo levar pra vida toda! Se não fosse teu entusiasmo, talvez eu continuasse com o conforto do conhecido, mas tu me fez enxergar que é possível se lançar para o incerto (“Se joga menina!”) sem medo e que isso pode dar certo! Vamos lá, agora terás que me agüentar por 4 anos!

Agradeço também aos alunos e professores de outros laboratórios que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Fabiano e a professora Maribel pelo carinho, esforço e atenção dispendidas.

Agradeço aos alunos, muito carinhosos, que me receberam em docência como “profe” e me ratificaram o porquê estou aqui!

Agradeço às professoras Cíntia Melazzo Mazzanti e Roselei Fachinetto por terem aceitado o convite para compor a minha banca.

Agradeço às cobaias que renderam suas vidas em prol deste trabalho! Espero que todas estas vidas que se fazem úteis para os estudos de hoje, salvem vidas amanhã!

Agradeço ao PPG pelo apoio e prestabilidade.

Agradeço ao CNPq pelo fomento imprescindível para que eu pudesse realizar este trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E SOBRE O COMPORTAMENTO EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO

Autor: Amanda Maino Fiorenza

Orientadora: Vera Maria Melchior Morsch

Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de setembro de 2011.

O presente estudo investigou o efeito da administração de Cádmio (Cd), de Rutina (Rut) ou de ambos, na peroxidação lipídica em diferentes estruturas encefálicas, na memória e ansiedade e na atividade da acetilcolinesterase (AChE) (ex vivo, in vitro e cinética) em ratos. Os animais receberam Cd (2 mg / kg) e Rut (40 e 80 mg / kg) por gavagem diariamente por 21 administrações em dias alternados. Os ratos do estudo ex vivo, foram divididos em seis grupos (n = 10): salina/salina, salina/Rut40, salina/Rut80, Cd/salina, Cd/Rut40 e Cd/Rut 80. Os ensaios da AChE in vitro foram realizados nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 μM de Rut em homogeneizado de encéfalo de ratos controles. As mesmas concentrações foram utilizadas para a análise cinética de *Electroforus electricus* (E.e. AChE). O metal aumentou a peroxidação lipídica em todas as estruturas analisadas exceto no estriado. A Rut reverteu esse efeito somente no hipotálamo e hipocampo. Houve uma piora da memória no grupo que recebeu somente Cd, porém a Rut reverteu essa diminuição de memória tanto nas doses de 40 quanto na de 80 mg/kg. O Cd teve efeito ansiogênico e a Rut reverteu esse comportamento em ambas as doses. A sensibilidade ao choque e a atividade locomotora não foram alteradas nos ratos que foram expostos ao Cd e/ou tratados com Rut. A atividade ex vivo da enzima AChE aumentou no córtex e no hipotálamo dos ratos que receberam somente cádmio. A Rut reverteu esse aumento em ambas as doses. A atividade in vitro da enzima AChE foi inibida em todas as concentrações em sinaptossoma de córtex, no cerebelo, no estriado, no hipocampo e hipotálamo. A análise cinética da interação entre Rut e E.e.AChE caracterizou uma inibição competitiva. Os achados do presente estudo demonstram que o tratamento com Rut diminuiu os danos oxidativos à membrana, impediu o aumento da atividade da AChE, reverteu o déficit de memória e a ansiedade causados pelo Cd. Além disso, caracterizou o composto como um inibidor da AChE, demonstrando que este flavonóide pode modular a neurotransmissão colinérgica e, conseqüentemente, melhorar a cognição.

Palavras-chave: Rutina, Cádmio, Acetilcolinesterase, Memória, Ansiedade, Estresse Oxidativo, Flavonóides

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF RUTIN ON THE ACTIVITY OF THE ACETYLCHOLINESTERASE AND ON THE BEHAVIOR OF RATS EXPOSED TO CADMIUM

Author: Amanda Maino Fiorenza
Advisor: Vera Maria Melchior Morsch
Co-advisor : Maria Rosa Chitolina Schetinger
Place and date: Santa Maria, 09 of September of 2011.

This study investigated the effect of administration of cadmium (Cd), Rutin (Rut), or both, on lipid peroxidation in different brain structures, memory, anxiety and activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (ex vivo, in vitro and kinetic). The rats received Cd (2 mg / kg) and Rut (40 and 80 mg / kg) by gavage for 21 administrations on alternate days. To the ex vivo study, the animals were divided into six groups (n = 10): saline/saline, saline/Rut40, saline/Rut80, Cd/saline, Cd/Rut40 and Cd/Rut80. The trials of AChE in vitro were performed at concentrations of 1, 5, 10, 25 and 50 mM of Rut in rat brain homogenate controls. The same concentrations were used for kinetic analysis of *Electroforus electricus* (E.e.AChE). Cd increased lipid peroxidation in all structures analyzed except in the striatum. Rut reversed this effect only in the hypothalamus and hippocampus. Cd caused a decrease in test step-down latency and administration of Rut (40 and 80 mg/kg) reversed this effect of Cd. Cd increased the number and the percent of entries in enclosed arms of plus-maze, suggesting an anxiogenic effect of Cd. Rut (40 and 80 mg/kg) reversed the anxiogenic effect of Cd. Rats that were exposed to Cd and/or treated with Rut showed no altered sensitivity to shock, nor the locomotor activity. The ex vivo activity of the enzyme AChE increased in the cortex and hypothalamus of rats that received only Cd. Rut reversed this increase in both doses. In vitro activity of the enzyme AChE was inhibited at all concentrations of synaptosome cortex, cerebellum, striatum, hippocampus and hypothalamus. The kinetic analysis of the interaction between the Rut and E.e.AChE showed a competitive inhibition. The findings show that treatment with Rut decreased oxidative damage to the membrane, prevented the increase in AChE activity, reversed the memory deficit and anxiety caused by Cd. Moreover, characterized Rut as an inhibitor of AChE, showing that this flavonoid may modulate cholinergic neurotransmission and, consequently, improve cognition.

Keywords: Rutin, Cadmium, Acetylcholinesterase, Memory, Anxiety, Oxidative Stress, Flavonoids

Lista de abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BHE/BBB	Barreira hematoencefálica (do inglês Blood-brain barrier)
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
ChAT	Colina-acetiltransferase
CHT	Transportador de colina
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês deoxyribonucleic acid)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (do inglês high-density lipoprotein)
mAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MT , MTs	Metalotioneína (s)
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
Rut	Rutina
SC	Sistema colinérgico
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido Dismutase
VAcHT	Acetilcolina vesicular

Lista de figuras

Figura 1 - Núcleo genérico de um flavonóide.....	23
Figura 2 - Absorção, metabolismo e distribuição dos flavonóides.....	25
Figura 3 - Fórmula estrutural da Rutina.....	26
Figura 4 - Inflorescência do Faveiro, <i>Dimorphandra mollis</i> , árvore nativa do serrado brasileiro e principal fonte de Rutina.....	27
Figura 5 - Reação de clivagem da Rutina.....	28
Figura 6 - Resumo esquemático da distribuição dos neurônios colinérgicos e suas projeções no cérebro de ratos.....	30
Figura 7 - Esquema da transmissão colinérgica do impulso nervoso.....	31
Figura 8 - Isoformas da acetilcolinesterase.....	32
Figura 9 - Aparato para esquiva inibitória.....	35
Figura 10 - Aparato para open field.....	36

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sub-Classes dos flavonóides, características e fontes.....	24
--	----

Sumário

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	11
APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Cádmio	18
3.2 Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante	20
3.3 Flavonóides	22
3.3.1 Rutina	26
3.3.2 Flavonóides e o Sistema Nervoso Central	29
3.4 Sistema colinérgico e acetilcolinesterase	29
3.5 Noções sobre Memória	33
4 MANUSCRITO	37
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	71
6 CONCLUSÕES	77
7 REFERÊNCIAS	78

Apresentação

Esta dissertação está organizada na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscrito. Os itens discussão e conclusão, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao mesmo. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão.

1. Introdução

O cádmio (Cd) é um metal pesado ubíquo na natureza, porém, de certa forma raro, encontrado em concentrações normais médias de $0,20 \text{ mg/Kg}^{-1}$ na crosta terrestre (VIG *et al.*, 2003). O Cd é resistente à corrosão e não biodegradável, dificilmente encontrado em estado livre estando corriqueiramente formando complexos com elementos como: Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Ferro (Fe). É um elemento tóxico, sendo um importante contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (CHEN & KAO, 1995). As concentrações normais de Cd na litosfera estão cada vez mais desequilibradas, chegando de 24 até 100 mg/Kg^{-1} (ALLOWAY & STEINNES, 1999; SUN, 2006), devido às ações antropogênicas, tais como a liberação desse metal em efluentes industriais e agrícolas. As principais fontes de intoxicação humana por Cd são ocupacionais, tabagismo e alimentar (SATARUG & MOORE, 2004; BERNARD, 2008).

Este metal pode acumular-se, principalmente nos rins e fígado, devido a sua baixa eliminação diária e meia-vida biológica longa (± 30 anos) (PERRY *et al.*, 1962; YAMANO, 1998). A contaminação pelo Cd pode desencadear processos inflamatórios, imunossupressão e o desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio (EROs) (HASSOUN & STOHS, 1996).

As células produzem, em condições normais, espécies reativas de oxigênio (EROs) em pequenas quantidades que são perfeitamente neutralizadas pelo organismo (FANG *et al.*, 2002). Este possui um mecanismo de defesa denominado sistema antioxidante que pode ser dividido em enzimático, o qual inclui enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GSH-Px) e em não-enzimático, que inclui a glutatona reduzida (GSH), a vitamina C e a vitamina E (MATÉS *et al.*, 1999).

O quadro de estresse oxidativo se dá pelo desequilíbrio entre as EROs e os antioxidantes. Dentre os danos que o organismo pode sofrer estão: a peroxidação lipídica, a oxidação protéica, a diminuição do conteúdo de ácido ascórbico e as

alterações na atividade de enzimas antioxidantes (SEVEN *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2006).

Para amenizar os efeitos oxidativos, além das defesas naturais, podemos utilizar antioxidantes provenientes da dieta, como os flavonóides (FANG *et al.*, 2002). Os flavonóides são derivados fenólicos que compreendem um grande grupo de compostos químicos caracterizados pela presença de anéis aromáticos (AFANAS'EV *et al.*, 2001; BLASCO *et al.*, 2004; RODRIGO & BOSCO, 2006). Os flavonóides são substâncias lipo ou hidrossolúveis, glicosilados ou não, em seu estado livre (ACKER *et al.*, 1996). Esses compostos estão presentes em várias espécies vegetais de uso alimentício, como frutas, verduras e sementes. Esta classe de compostos é amplamente conhecida por sua ação antioxidante, anticarcinogênica, vasodilatadora, antiinflamatória, imunoestimulante, antialérgica, vasoprotetora, neuroprotetora entre outros. (ANSARI *et al.*, 2009).

A Rutina (Rut), também conhecida como vitamina P, é um flavonóide glicosilado pertencente à classe dos flavonóis. Suas principais fontes alimentares incluem a cebola, a uva, o trigo sarraceno, a maçã, o vinho tinto, o chá e o tomate. Essa classe de compostos possui importância farmacológica e terapêutica por inibir o processo de formação de radicais livres, além de evitar danos ao sistema nervoso através da modulação da atividade de enzimas como a acetilcolinesterase, por exemplo (YOU DIM *et al.*, 2003; 2004; SOBRATTEE *et al.*, 2005; SCHMATZ *et al.*, 2009 a; 2009 b; PARK, 2010).

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor do sistema colinérgico, realizando um importante papel nas sinapses nervosas (PERRY *et al.*, 1999; MESULAM *et al.*, 2002). A enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) é responsável pela hidrólise deste neurotransmissor em acetato e colina, modulando assim a duração do impulso nervoso. Os neurônios colinérgicos, bem como a AChE se encontram amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), onde desempenham papéis importantes na organização cortical do movimento, no aprendizado e na memória (EVERITT & ROBBINS, 1997; SZEGLETES *et al.*, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001).

Os processos de aprendizado e memória são constituídos de uma complexidade imensa, que envolve tanto a percepção do meio, a interpretação, as modificações nervosas que ocorrem durante essa memória, as novas ligações nervosas que serão constituídas, e ainda, muitos processos, por hora, desconhecidos (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CONWAY, 2005). Isso faz da memória um processo complexo, gradual e dinâmico o qual pode ser danificado por qualquer composto que altere a homeostase nervosa como o Cd, por exemplo.

Diante do exposto, esse trabalho pretende avaliar o efeito do Cd, potencialmente tóxico ao SNC, sobre os processos mnemônicos (TSANGARIS, 1998; LAFUENTE *et al.*, 2004; CAREY *et al.*, 2006), bem como, avaliar a capacidade da Rut (um bioflavonóide) sobre as possíveis alterações oxidativas e comportamentais causadas pela administração do Cd.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da rutina sobre a memória e atividade da acetilcolinesterase em ratos machos adultos expostos oralmente ao cádmio.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a possível ocorrência de dano oxidativo em encéfalos de animais expostos ao cádmio e/ou rutina;
- Analisar a atividade da acetilcolinesterase *ex vivo* em diferentes estruturas encefálicas (córtex, estriado, hipocampo, cerebelo e hipotálamo) bem como em preparações de sinaptossomas de ratos;

- Analisar a atividade *in vitro* da acetilcolinesterase em diferentes estruturas encefálicas (córtex, estriado, hipocampo, cerebelo e hipotálamo) bem como em sinaptossomas de ratos;
- Analisar o efeito do cádmio e/ou rutina sobre a retenção de memória em ratos;
- Analisar os efeitos da administração do cádmio e/ou rutina sobre parâmetros de ansiedade em ratos;
- Analisar os efeitos da administração do cádmio e/ou rutina sobre a atividade locomotora em ratos;
- Analisar o efeito *in vitro* da rutina sobre a cinética da acetilcolinesterase de *Electrophorus electrus*;

3. Revisão bibliográfica

3.1. Cádmio (Cd)

O cádmio (Cd) é um metal branco acinzentado, pertencente ao grupo IIB da Tabela Periódica. Possui número atômico 48, massa atômica relativa 112, (ANDERSEN, 1984; BERNARD, 2008). É classificado como metal pesado, por estar no grupo de elementos com densidade maior que 5 g cm^{-3} (BIZARRO, 2007). É um elemento divalente com prevalência relativamente baixa na crosta terrestre, tendo o seu teor médio em cerca de $0,17 - 0,20 \text{ mg/Kg}^{-1}$, sendo corriqueiramente complexado com elementos como: Zinco, Cobre, Chumbo e Ferro.

O Cd é um elemento não essencial, amplamente explorado pela indústria devido, principalmente, às suas propriedades anti-corrosivas e condutivas, levando o seu uso à quase todos os setores de produção. Essas atividades tem elevado a sua presença na crosta terrestre, chegando de 24 a até 100 mg/Kg^{-1} (JARUP, 1998 ; ALLOWAY & STEINNES, 1999; SUN, 2006), fato que o faz um dos principais contaminantes ambiental e um dos mais tóxicos dentre os metais pesados (CHEN & KAO, 1995).

A distribuição normal deste metal pode ser alterada devido à fenômenos naturais como a erosão de rochas, erupções vulcânicas e incêndios florestais, bem como por atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis, efluentes industriais, mineração, dentre outras (VIG *et al.*, 2003; ATSDR,2008).

O Cd, bem como os metais pesados em geral, possui diversos mecanismos de ação, exercendo seus efeitos tóxicos ao combinar-se com um ou mais grupos reativos essenciais para funções fisiológicas normais. O principal efeito tóxico deste grupo de elementos é a sua ação sobre a estrutura das proteínas, muitas delas com atividades enzimáticas. Ao alterarem as atividades enzimáticas, os metais pesados afetam o metabolismo, membranas celulares e organelas. A influência destas substâncias se dá por mecanismos complexos, tais como: interação com metais essenciais por

similaridade eletrônica, formação de complexos metal-proteína, inibição enzimática de proteínas com grupos sulfidrilas (-SH) e comprometimento na função de organelas celulares como mitocôndrias, lisossomas e microtúbulos (FERRER, 2003; SENGER, 2009).

As principais fontes de intoxicação humana por Cd são ocupacionais, tabagismo e alimentares (SATARUG & MOORE, 2004; BERNARD, 2008), sendo que, a sua toxicidade varia conforme a via de contaminação, dose, forma química do metal, duração da exposição, idade do exposto, dentre outros fatores (CASALINO *et al.*, 1997). Este elemento é absorvido no organismo em pequenas quantidades, podendo se acumular nos tecidos, principalmente fígado e rins, devido à baixa eliminação diária e sua longa meia-vida biológica (\pm 30 anos) (PERRY *et al.*, 1962; YAMANO, 1998). Esse acúmulo pode afetar vários órgãos como o fígado, rins, pulmões, ovários, ossos, testículos e cérebro (SANTOS *et al.*, 2004; 2005a; 2005b; 2006; LUCHESE *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008).

Na célula, cerca de 70% do Cd é retido no citosol, 15% no núcleo e em quantidade irrelevante em outras organelas (DIN & FRAZIER, 1985) ligando-se, também, às metalotioneínas (MTs) bem como a grupos sulfidrílicos ou histidínicos (IZATT *et al.*, 1971; KLAASSEN, 2009). Além disso, o Cd interage com os componentes dos ácidos nucléicos e com os fosfolipídios de membrana (VALLE & ULMER, 1972).

A intoxicação aguda por Cd produz primariamente injúria hepática e testicular, enquanto a exposição crônica produz dano renal, osteotoxicidade, neurotoxicidade, infertilidade, dentre outros (RIKANS & YAMANO, 2000). Dessa forma, sob condição de exposição mais prolongada ao Cd, o complexo Cd-MT hepático é lentamente liberado na circulação (TOHYAMA & SHAIKH, 1981; JARUP, 1998). Posteriormente à filtração glomerular, este complexo é degradado e os íons Cd liberados se ligam as MTs renais pré-existentes ou àquelas recentemente sintetizadas (CHERIAN, 1978). Quando a quantidade de Cd presente no córtex renal excede a capacidade de ligação às MTs, este Cd não ligado é capaz de causar indiretamente nefrotoxicidade (NOMIYAMA & NOMIYAMA, 1986), provavelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio

(EROs) uma vez que não participa diretamente de reações de oxidação-redução (HASSOUN & STOHS, 1996; CASALINO *et. al.*, 1997).

A toxicidade do cádmio está intimamente relacionada com a geração de EROs uma vez que diversos trabalhos demonstraram alterações como aumento dos níveis de peroxidação lipídica, carbonilação protéica, bem como inibição ou redução da atividade de enzimas antioxidantes como CAT, SOD, GSH-Px, glutatona redutase e enzimas de reparo do DNA (CASALINO *et. al.*, 1997; JOSEPH, 2009). Com o aumento constante das EROs e a diminuição da efetividade do sistema antioxidante, se instala um quadro denominado estresse oxidativo, onde, vários processos fisiológicos são perturbados levando à uma série de danos como mutações, deleções, apoptose, neurotoxicidade, neurodegeneração, dano às membranas, perda de memória e etc (LÓPEZ *et. al.*, 2006).

3.2. Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante

As EROs são normalmente formadas nas células e nos tecidos em baixas concentrações, por meio da redução do oxigênio molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Este pode sofrer reduções parciais, dando origem a moléculas com um ou mais elétrons não pareados na camada de valência: os radicais livres. Essa configuração faz destes, espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente muito reativas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Muitos tipos de EROs são formados dentro dos organismos, as formas mais comuns de EROs incluem: ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot), oxigênio singlete (1O_2), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Havendo o desequilíbrio entre a produção das EROs e a ação do sistema antioxidante, temos o estresse oxidativo, onde essas EROs exercem efeitos citotóxicos sobre os fosfolípidios de membrana, resultando na peroxidação lipídica, danificando o metabolismo da glutatona, oxidando proteínas, depletando o conteúdo de ácido ascórbico e alterando a atividade das enzimas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A membrana celular é o principal alvo das EROs, sendo a peroxidação de seus fosfolípidios, um bom indicador de dano oxidativo nas células, através da quantificação do malondialdeído (MDA) (ALEXANDROVA & BOCHEV, 2005). O cérebro é um dos órgãos mais afetados pela peroxidação lipídica devido à constituição de suas membranas rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais são preferencialmente oxidados (PATRICÒ & DELANTY, 2000). A seletividade de uma membrana que sofreu danos oxidativos é comprometida, havendo a liberação de enzimas hidrolíticas e produtos citotóxicos que podem conduzir à apoptose celular (HORTON, 2003). Sabe-se que o radical hidroxil e o ferro desempenham um papel extremamente determinante na iniciação deste processo através da reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Dentre os alvos das EROs, estão também, as proteínas. Estas podem sofrer modificações estruturais, bem como a perda de sua atividade catalítica, quando enzimas (DEAN *et al.*, 1997). A carbonilação protéica pode ser uma medida razoável para quantificação do dano por oxidação (BERLETT & STADMAN, 1997; DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

Nosso organismo possui um aparato antioxidante que tem por finalidade combater e reduzir os danos oxidativos. Esse recurso pode ser classificado, quanto ao seu modo de ação em: enzimático e não enzimático (SODHI *et al.*, 2008). Os antioxidantes enzimáticos incluem três enzimas principais: SOD, que é encontrada no citosol (Cu/Zn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD), GSH-Px e CAT que estão presentes no citosol e nos peroxissomos, respectivamente (MATÉS *et al.*, 1999). A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em uma molécula menos reativa, o H_2O_2 (PARIHAR *et al.*, 2008). O H_2O_2 tem meia-vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que produz o OH^{\cdot} (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A CAT é uma clássica enzima da família das oxidoredutases que converte H_2O_2 em H_2O enquanto a GSH-Px catalisa a redução do H_2O_2 e dos hidróxidos orgânicos com a simultânea oxidação da molécula de glutatona (MATÉS *et al.*, 1999). O sistema de defesa não-enzimático é formado por moléculas

hidrossolúveis e lipossolúveis de baixo peso molecular. Os antioxidantes hidrossolúveis são compostos que têm alta afinidade pela água, como a GSH, o ácido úrico e o ácido ascórbico (vitamina C). Os antioxidantes lipossolúveis são compostos que têm alta afinidade por lipídios, destacam-se os carotenóides, o α -tocoferol (vitamina E) e a bilirrubina (MURPHY & SIES, 1991; NOCTOR & FOYER, 1998).

É importante ressaltar que os antioxidantes não-enzimáticos, em sua maioria, não são sintetizados pelo organismo animal, sendo, então, necessário a ingestão de alimentos que sejam fontes destas substâncias, como os vegetais, por exemplo. Esses antioxidantes, em sua maioria, são compostos de origem vegetal, que possuem um ou mais anéis aromáticos ligados a hidroxilas, sendo, portanto, capazes de, por vezes, atuar como quelantes de metais e neutralizar a ação dos radicais livres. Um importante grupo de polifenóis com atividade antioxidante é o grupo dos flavonóides. Este grupo pode estar presente nas mais diversas fontes, sendo dividido em várias subclasses, normalmente, combinadas entre si (FERNANDEZ *et al.*, 2002; ROSS e KASUM, 2002; TANDON *et al.*, 2003).

3.3. Flavonóides

Os flavonóides são considerados substâncias antioxidantes lipo e hidrossolúveis, sendo encontrados em forma livre de açúcares, mais apolares e em formas glicosiladas, mais polares (ACKER *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2004). Compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, os quais além de possuírem uma capacidade de atuação antioxidante, possuem, ainda, diversas propriedades farmacológicas, tais como: propriedade anticarcinogênica, vasodilatadora, anti-inflamatória, imunoestimulante, antialérgica, vasoprotetora, neuroprotetora entre outros (ARAÚJO *et al.*, 2005; ANSARI *et al.*, 2009).

Os flavonóides apresentam diversas estruturas, porém, todos incluídos nessa classe, apresentam uma organização genérica composta por 15 átomos de carbono reunidos em um núcleo fundamental tricíclico (Figura 1). Muitos deles se apresentam na forma glicosilada, sendo mais comumente encontrados os carboidratos D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose ligados principalmente na posição 3. A

estrutura de cada flavonóide a partir de seu núcleo fundamental é o que nos permite classificá-los em antocianidina, flavanóis, flavanona, flavonas, flavonóis e isoflavonas (Tabela 1) (RICE-EVANS *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2004).

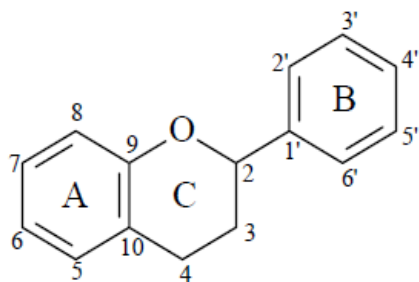


Figura 1. Núcleo genérico de um flavonóide. Os anéis A e B são aromáticos e o anel C é um heterociclo (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Os flavonóides dão a coloração característica de muitas de suas fontes, sendo pigmentos utilizados pelas plantas muitas vezes como atrativos para insetos polinizadores, bem como pigmentos protetores contra radiação UV (HARBORNE, 1988; BROUILLARD *et al.*, 1989; SHAHIDI, 1997).

Tabela 1. Sub-Classes dos flavonóides, características e fontes. Adaptada de (PEDRIALI, 2005).

Sub-Classes	Cor	Flavonóides representativos	Fontes
Antocianidina	Azul, vermelho, violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor	Catequinas, epicatequinas	Maçãs, chá, cerveja
	Amarelo	Procianidina	Sucos de frutas, vinho
Flavanona	Incolor, amarelo	Hesperidina, Naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina, Miricetina e rutina	Cebolas, maçãs, tomates, vinho tinto, trigo sarraceno, chá
Isoflavona	Incolor	Genisteína, daizeína	Legumes (derivados de soja)

O metabolismo dos flavonóides é amplamente conhecido em ratos, porém não se tem muitas informações do seu mecanismo em humanos. Hoje, se tem um interesse grande em esclarecer esse mecanismo, bem como o comportamento destes compostos no organismo visto que, apresentam variadas propriedades farmacológicas de grande interesse. Hoje, se dá destaque à toxicologia dos flavonóides, uma vez que estes podem se acumular em alguns órgãos como o fígado ou modular o sistema imune (BHATIA & JAIN, 2004).

Apesar de acumularem-se em tecidos, os flavonóides possuem baixa toxicidade devido à pequena solubilidade da aglicona e o rápido catabolismo do núcleo pirrólico no fígado (TAPIERO *et al.*, 2002). Os flavonóides por serem moléculas especialmente grandes, passam por um processo de quebra, auxiliado por bactérias intestinais, afim de que possam ser absorvidos com maior facilidade (HOLLMAN & KATAN, 1998; DAY *et al.*, 2000; MIDDLETON *et al.*, 2000; HAVSTEEN, 2002; BHATIA & JAIN, 2004).

Após passarem pelo trato digestório, migram pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofrem mais algumas transformações antes de, por fim, se encontrarem livres no

sangue (Figura 2). Uma vez livres, podem alterar o estado redox de órgãos, melhorar a atividade antioxidante enzimática, modificar a expressão de algumas proteínas, alterar o crescimento celular, promover reparo ao material genético danificado, desencadear apoptose de células aberrantes entre outros (ALIÁ *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2004).

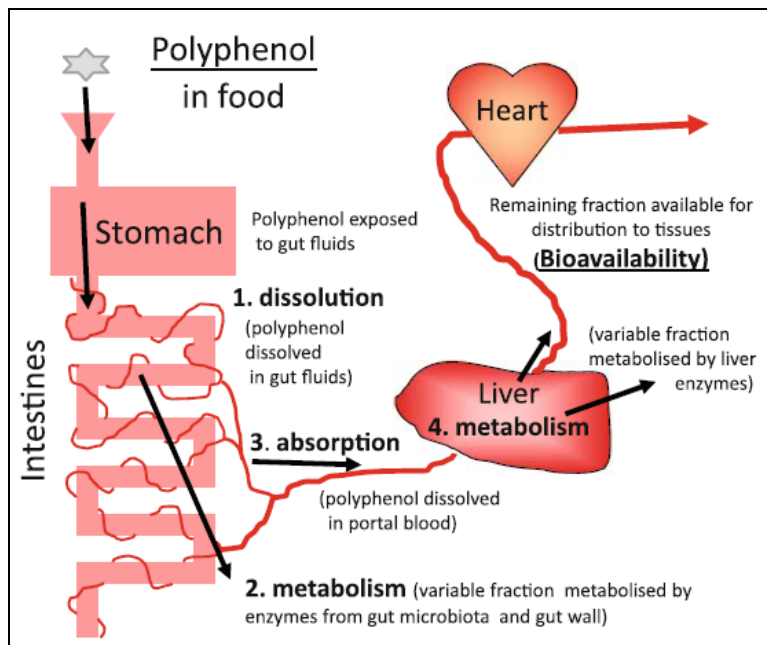


Figura 2. Absorção, metabolismo e distribuição dos flavonóides. Fonte: (SCHEEPENS *et al.*, 2010).

Hoje se fala muito em uma medicina preventiva, onde os compostos bioativos, como os flavonóides, sejam consumidos diariamente, através da dieta, minimizando, assim, os riscos de desenvolvimento de doenças recorrentes, crônicas, degenerativas, bem como prevenindo o envelhecimento. Para que isso ocorra, é necessário, que cada vez mais, se estude esse mecanismo de ação dos flavonóides no organismo, sua inserção em rotas metabólicas, seus efeitos colaterais, sua toxicidade, uma vez que são parte integrante de nossa dieta e que muitas vezes fazemos uso de suplementação com os mesmos sem termos conhecimento de quanto consumimos e de quanto se deve consumir para se obter os seus efeitos benéficos (YAO *et al.*, 2004).

3.3.1. Rutina

A Rut, que é um flavonóide pertencente à sub-classe dos flavonóis, tem sido amplamente pesquisada, em conjunto com a quercetina, devido às suas interessantes propriedades farmacológicas (TRANCHIMAND *et al.*, 2010). É também conhecida como vitamina P, possuindo fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ (Figura 3). Seu extrato, normalmente, se apresenta como um pó com coloração amarelo-esverdeada, insípido e inodoro.

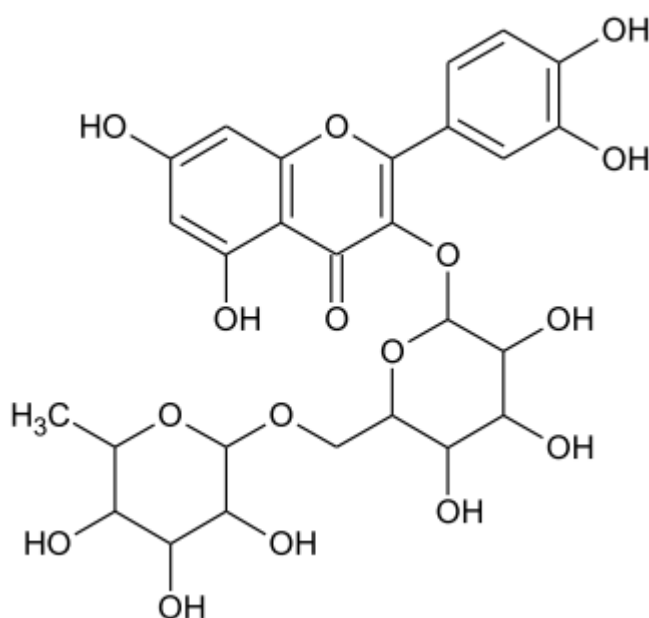


Figura 3. Estrutura da Rutina. Adaptado de (EUQUERES *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos envolvendo a Rut datam de aproximadamente 1842 e referem-se à uma espécie originária da Europa, a *Ruta graveolens* L., mais popularmente conhecida como arruda (COSTA, 1978). Porém, esse flavonóide não está restrito a essa espécie, e sim, amplamente distribuído em diversos gêneros do Reino Vegetal, em pelo menos 34 famílias e mais de 77 espécies (GRIFFITH *et al.* 1955). É encontrado em frutas especialmente maçã e uva, bem como na cebola, tomate, fava,

trigo sarraceno, e chá preto (RICE-EVANS *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2011).

Embora, a Rut seja encontrada em várias espécies vegetais, normalmente ela está em pequenas quantidades e em conjunto a outros flavonóides. As principais fontes deste flavonóide são o trigo sarraceno, espécie predominantemente asiático-européia e a *Dimorphandra mollis*, mais popularmente conhecida como faveiro, espécie brasileira e principal fonte deste composto em quantidade produzida (Figura 4) (SANTOS *et al.*, 2011).



Figura 4. Inflorescência do Faveiro, *Dimorphandra mollis*, árvore nativa do serrado brasileiro e principal fonte de rutina . Fonte: Wikipédia - Verbete: *Dimorphandra mollis* em http://en.wikipedia.org/wiki/Dimorphandra_mollis . Acesso :16 de jun.2011.

A molécula de Rut tem origem na fusão de uma molécula de quercetina com duas moléculas de carboidratos (D-glicose e L-ramnose), tornando-a maior e pouco mais solúvel em água, devido à polaridade do açúcar. No trato digestório, enzimas pertencentes à flora bacteriana intestinal, conseguem clivar a Rut em quercetina e rutinose (D-glicose e L-ramnose) (Figura 5), de modo que essa molécula consiga

penetrar pela parede intestinal e chegar ao sangue, onde pode constituir novamente a Rut, ou permanecer como quercetina (TRANCHIMAND *et al.* , 2010).

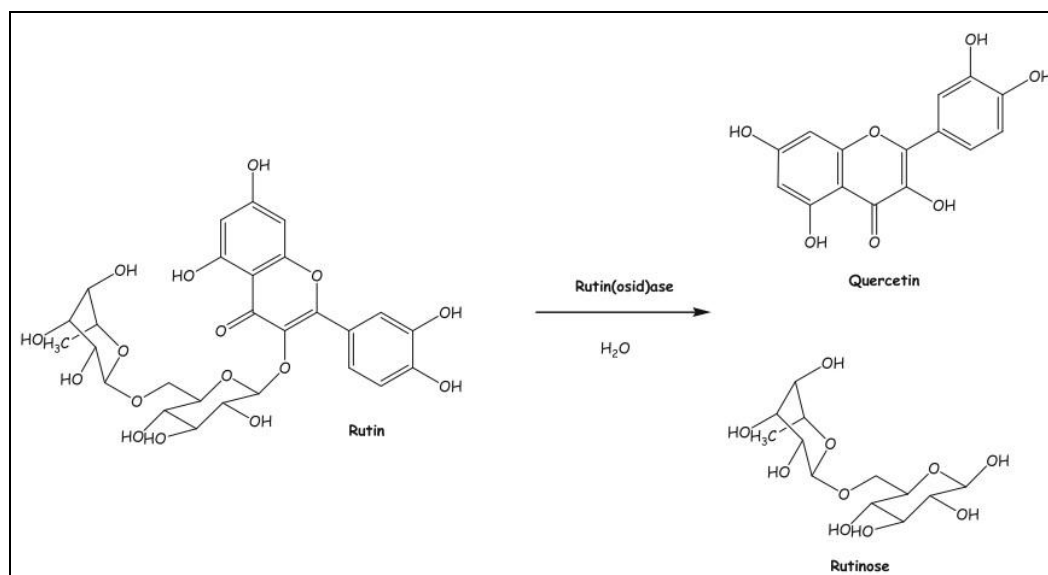


Figura 5. Reação de clivagem da Rutina. Adaptado de (TRANCHIMAND *et al.* , 2010).

Tendo, uma vez, atingido a corrente sanguínea, esse flavonóide, como todos os demais, será metabolizado no fígado e distribuído através da circulação sanguínea para todos os tecidos, onde, por sua vez, realizará uma gama de efeitos, em sua grande maioria, benéficos (SCHEEPENS *et al.*, 2010).

Além de exercer atividade antioxidante, reparando danos oxidativos e neutralizando EROs, a Rut reduz a pressão arterial, aumenta o colesterol-HDL apresenta atividade antiagregante, normalizadora da resistência e da permeabilidade capilar, antiprotozoários, antiviral, inibidora do crescimento bacteriano, imunomoduladora, anticarcinogênica, bem como reparadora de danos ao SNC e memória (JANBAZ *et al.*, 2002; PU *et al.*, 2007).

3.3.2. Flavonóides e o Sistema Nervoso Central

Alguns estudos têm apontado a capacidade dos flavonóides em permear a barreira hemato-encefálica (BHE) através da quantificação dos mesmos no SNC. Sabe-se que a BHE apresenta certa seletividade quanto à passagem de moléculas polares e também de moléculas grandes como polímeros. Já foi registrada a presença de catequinas, antocianidinas, naringeninas, hesperetina, quercetina, Rut, dentre outros flavonóides e derivados, no encéfalo de roedores os quais receberam oralmente estas substâncias (YOU DIM *et al.*, 2003; 2004).

Alguns estudos apontam os flavonóides como moléculas com efeitos benéficos às funções e reparo de danos no SNC, atuando como neuroprotetores, principalmente através da redução das EROs, bem como, evitando a neurotoxicidade de demais substâncias e agindo pela modulação das ectonucleotidases e da acetilcolinesterase, por exemplo (YOU DIM *et al.*, 2003; 2004; SOOB RATTEE *et al.*, 2005; SCHMATZ *et al.*, 2009 a; SCHMATZ *et al.*, 2009 b; PARK, 2010).

3.4. Sistema colinérgico e acetilcolinesterase

O SNC é modulado por vários tipos de neurotransmissores que integram o corpo com o seu meio, sendo, uma via informacional para o indivíduo conseguir interpretar os estímulos externos e reagir de acordo com os mesmos, em uma escala condizente com estes estímulos. Os principais neurotransmissores que desempenham essa função no SNC são, por exemplo, a dopamina, o glutamato, a serotonina, a epinefrina, a norepinefrina, a acetilcolina e outros (PATEL *et al.*, 2011) .

A ACh é o neurotransmissor do sistema colinérgico (SC) e este, por último realiza um dos mais importantes papéis modulatórios no SNC (PERRY *et al.*, 1999; MESULAM *et al.*, 2002). Os neurônios que constituem o SC estão amplamente espalhados pelo encéfalo, destacando hipocampo, amígdala e córtex cerebral (Figura 6). Essas regiões desempenham um papel fundamental em atividades relacionadas com a organização cortical do movimento, aprendizado e memória (EVERITT & ROBBINS, 1997; SOREQ & SEIDMAN, 2001).

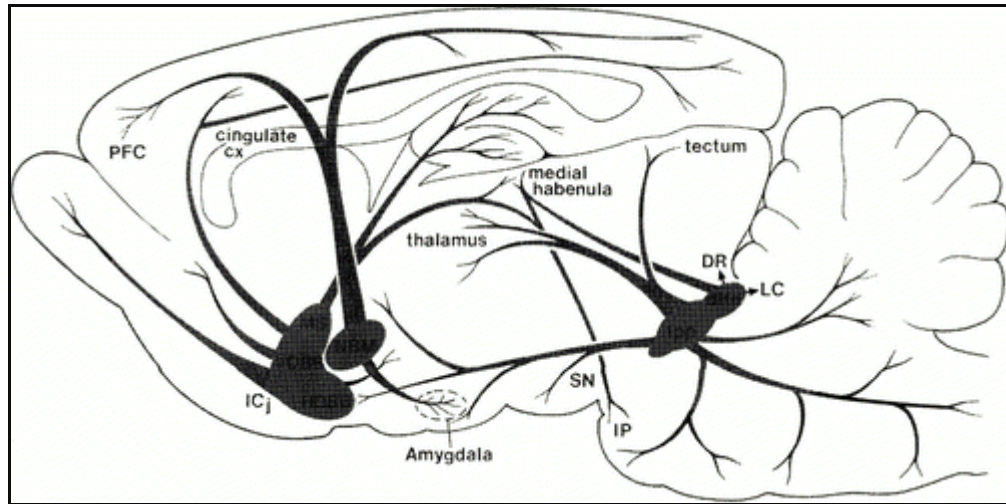


Figura 6. Esquema da distribuição dos neurônios colinérgicos e suas projeções no cérebro de ratos. Fonte: (EVERITT & ROBBINS, 1997).

Para que o SC desempenhe suas complexas funções, muitos “personagens” atuam coordenando a síntese, o armazenamento, o transporte, a recaptção e a degradação do neurotransmissor ACh. Dentre essas estruturas estão: a colinaacetiltransferase (ChAT) a qual sintetiza a ACh a partir de acetato e colina ; o transportador de colina (CHT) que recapta e entrega a colina para a ChAT; o transportador de acetilcolina vesicular (VACHT) que armazena a ACh dentro de vesículas através de uma bomba protônica; os receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) e os nicotínicos (nAChR) que são sensibilizados pela ACh e propagam a despolarização no neurônio pós-sináptico e a acetilcolinesterase (AChE) que degrada a ACh em excesso na fenda sináptica, evitando, assim, uma “super-estimulação” do neurônio pós-sináptico, modulando a neurotransmissão (Figura 7) (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005). Dentre todos estes componentes, daremos ênfase à AChE, a qual é o alvo deste estudo.

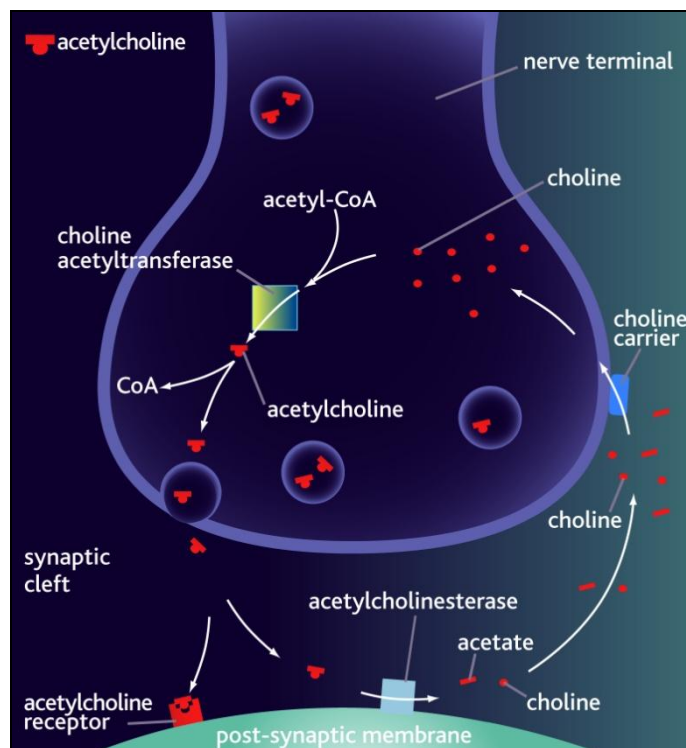


Figura 7. Esquema de uma sinapse colinérgica. Fonte: Lundbeck Institute Image Bank - http://www.cnsforum.com/content/pictures/imagebank/hirespng/rcpt_sys_ACH_acetransf_AD.png . Acesso: 17 de jun. 2011.

A AChE é uma enzima que hidrolisa o neurotransmissor ACh em acetato e colina na fenda sináptica e na junção neuromuscular, finalizando, assim, a ação da ACh (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE apresenta uma atividade muito versátil, podendo desempenhar os mais variados papéis no organismo, uma vez que o sistema colinérgico abrange todo o organismo. Essa hidrolase pode desempenhar importantes papéis na adesão celular, no crescimento de neuritos, na osteogênese, na hematopoiese, na inflamação, em funções imunes dentre outras. Assim, devido à sua onipresença no organismo, um dano na sua atividade poderia gerar efeitos irreparáveis em variadas funções (MESULAN *et al.*, 2002).

A AChE está presente em diversas formas no organismo, se dividindo em duas básicas, a globular e a assimétrica. Dentre a forma globular, temos monômeros,

dímeros e tetrâmeros (G1, G2 e G4 respectivamente), sendo cada uma delas predominante em alguns tecidos. A forma assimétrica (A12) é constituída basicamente de tetrâmeros catalíticos aliados às fibras de colágeno (Figura 8) (DAS *et al.*, 2001; ALDUNATE *et al.*, 2004). A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu sítio ativo é formado por resíduos de serina, histidina e glutamato, os quais compõem a sua tríade catalítica (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

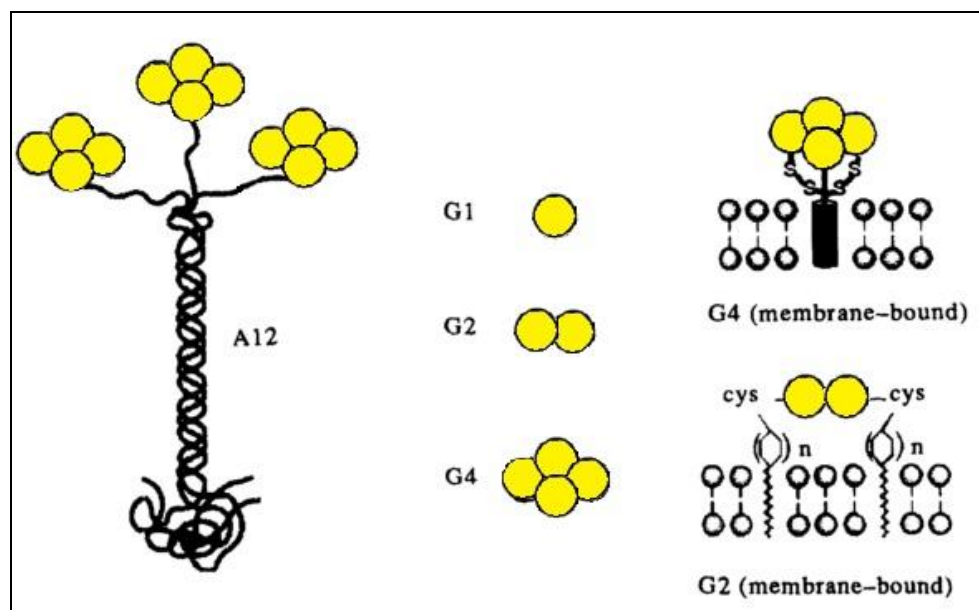


Figura 8. Isoformas da acetilcolinesterase. Adaptada de (SMALL, 1996).

A AChE é uma enzima amplamente pesquisada devido a sua grande importância fisiológica e envolvimento em patologias neurodegenerativas. Alguns inibidores da sua atividade tem sido estudados com a finalidade de diminuir os efeitos hipocolinérgicos causados pela AChE, os quais podem danificar o aprendizado e a memória como no caso da doença de Alzheimer (DAS *et al.*, 2001) .

3.5. Noções sobre Memória

Apesar de termos distante do nosso dia-a-dia a percepção de que todos os fenômenos que ocorrem no nosso cérebro são basicamente químicos, se pensarmos melhor, conseguiremos visualizar que as memórias, imagens, sensações e sentimentos são meramente partes de um conjunto meticulosamente organizado que se baseia em neurotransmissores como a ACh, por exemplo (CONWAY, 2005).

A memória se caracteriza basicamente como a capacidade que temos de armazenar situações percebidas, e evocá-las posteriormente. São como uma espécie de identidade racional que nos possibilita diferenciar cada indivíduo pelo acervo de suas vivências (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CONWAY, 2005).

A memória pode ser classificada em dois grupos, as explícitas ou declarativas e as implícitas ou não-declarativas. A primeira se refere à memória evocada conscientemente e que pode ser verbalizada, que expressa a relação do indivíduo com o meio ou a própria percepção de si. Já a segunda é uma memória inconsciente, que expressa uma forma de condicionamento, uma evocação procedimental automatizada, ou seja, dificilmente definida em palavras (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CONWAY, 2005).

A formação da memória se dá em três etapas: a aquisição, que é o período de exposição ao novo, ou seja, a experiência em si; a consolidação, que é o período em que o traço de memória adquirido na fase anterior ainda não está armazenado, podendo sofrer alterações; e o armazenamento, que é por fim a fixação da memória (IZQUIERDO, 1989).

A evocação é o passo seguinte a essas etapas, pois é onde o indivíduo necessitará lembrar-se do que, teoricamente, foi “memorizado”. Em humanos, a tendência comportamental é de, simplesmente, reconhecer; já para os animais é a reincidência de padrões comportamentais. Já a consolidação é o processo final, onde após evocada uma memória o cérebro rearranja algumas novas impressões e seleciona

novamente as antigas para por fim armazenar a “arte final” (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CONWAY, 2005).

Como foi explicitado, a memória é um processo complexo, gradual e dinâmico e isso a torna difícil de quantificar apesar dos modelos mais avançados que temos hoje. Outro fator que dificulta o seu estudo, é que animais apresentam somente comportamentos positivos ou negativos e não quantificáveis em uma escala de detalhes da memória (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CONWAY, 2005).

São utilizadas para a medição de memória, tarefas de comportamento, onde se observam aspectos motores do animal. Essas são realizadas em ambiente controlado, com mínima interferência e após uma ambientação dos animais ao local. Na primeira tarefa, expomos à nova situação para que ocorra a aquisição da memória, após um intervalo de tempo, se faz a sessão de teste, medindo, novamente, os parâmetros motores do animal (CASTRO, 2005). Vejamos a seguir, um pouco de duas técnicas utilizadas neste trabalho: a tarefa de esquiva inibitória e o teste do campo aberto.

A esquiva Inibitória é um teste amplamente utilizado para avaliação da formação de memória. O teste se realiza em uma caixa contendo uma plataforma estreita localizada logo acima de uma grade metálica por onde passa uma corrente de alguns miliampères (Figura 9). Durante o treino, o animal é colocado na plataforma e quando ele desce para explorar o local, recebe um leve choque nas patas. Durante o teste, o mesmo procedimento é feito horas depois, sendo que, se analisa quanto tempo o animal leva para se encorajar a descer, isso se chama latência, que é a medida do quão retida a memória foi (SILVA, 2006).



Figura 9. Aparato para esquiva inibitória. Fonte (SCHMATZ, 2009).

O teste de campo aberto avalia a atividade exploratória do animal, onde ele obtém as informações a respeito do ambiente. Movimentos como cheirar, levantar, andar, defecar, levar objetos à boca, são analisados e servem para quantificar o padrão exploratório do animal, que em situação normal, tende a procurar conhecer o meio em que se situa; sendo o próprio aparato do campo aberto um ambiente desconhecido que se oferta à exploração (Figura 10).

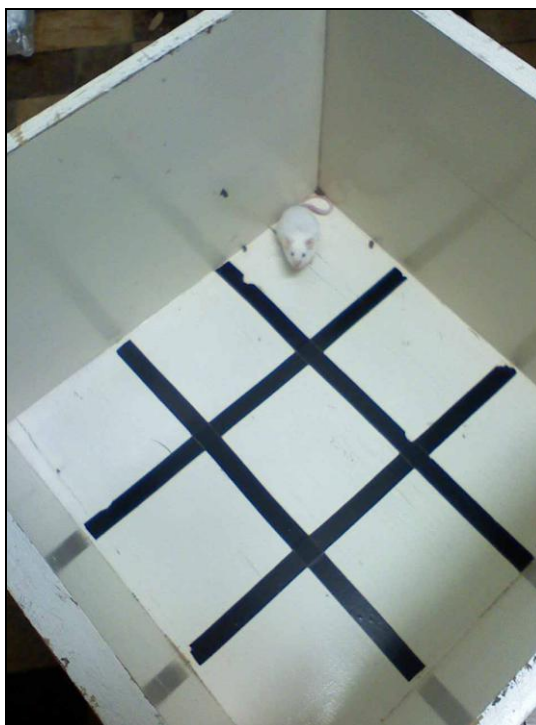


Figura 10. Aparato para campo aberto. Fonte: Arquivo pessoal

Logo, a locomoção é um índice importante que demonstra essa capacidade através do cruzamento de quadrantes, bem como os demais comportamentos que podem remeter à excitabilidade ou estresse (SILVA, 2006).

O labirinto em cruz elevada é um teste muito utilizado para avaliação dos parâmetros de ansiedade em ratos submetidos a diversos tratamentos. O teste se realiza em uma plataforma elevada do chão, contendo dois braços em cruz, sendo um deles fechado com paredes e o outro somente com a plataforma para o animal caminhar. O animal é posicionado no eixo onde os braços se cruzam e a partir disso, é contabilizado o número de entradas em cada braço, bem como o tempo de permanência nos mesmos. À medida que o animal se apresenta ansioso, ele possui a tendência de permanecer no braço fechado, o contrário é observado para animais sem tendência à ansiedade ou sob efeitos de drogas ansiolíticas.

4. Manuscrito

RUTINE REVERSE THE INCREASE OF ACHE ACTIVITY AND THE MEMORY DEFICIT INDUCED BY CADMIUM

Amanda Maino Fiorenza, Fátima Hussein Abdalla, Pauline da Costa, Jonas Daci da Silva Serres, Eduardo José Machado Dutra, Fabiano Barbosa Carvalho, Maribel Antonello Rubin, Jamile Fabbrin Gonçalves, Andréia Machado Cardoso, Valderi Luiz Dressler, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

This study investigated the effect of administration of cadmium (Cd), Rutin (Rut), or both, on lipid peroxidation in different brain structures, memory, anxiety and activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (ex vivo, in vitro and kinetic). The rats received Cd (2 mg / kg) and Rut (40 and 80 mg / kg) by gavage for 21 administrations on alternate days. In the ex vivo study, the animals were divided into six groups (n = 10): saline/saline, saline/Rut40, saline/Rut80, Cd/saline, Cd/Rut40 and Cd/Rut80. The assays of AChE in vitro were performed at concentrations of 1, 5, 10, 25 and 50 mM of Rut in rat brain homogenate controls. The same concentrations were used for kinetic analysis of Electroforus electricus (E.e.AChE). Cd increased lipid peroxidation in all structures analyzed except in the striatum. Rut reversed this effect only in the hypothalamus and hippocampus. Cd caused a decrease in test step-down latency and administration of Rut (40 and 80 mg/kg) reversed this effect of Cd. Cd increased the number and the percent of entries in enclosed arms of plus-maze, suggesting an anxiogenic effect of Cd. Rut (40 and 80 mg/kg) reversed the anxiogenic effect of Cd. Rats that were exposed to Cd and/or treated with Rut showed no altered sensitivity to shock, nor the locomotor activity. The ex vivo activity of the enzyme AChE increased in the cortex and hypothalamus of rats that received only Cd. Rut reversed this increase in both doses. The in vitro activity of the enzyme AChE was inhibited at all concentrations of synaptosome cortex, cerebellum, striatum, hippocampus and hypothalamus. The kinetic analysis of the interaction between the Rut and E.e.AChE showed a competitive inhibition. The findings show that the treatment with Rut decreased oxidative damage to membrane, prevented the increase in AChE activity, reversed the memory deficit and anxiety caused by Cd. Moreover, characterized Rut as an inhibitor of AChE, showing that this flavonoid may modulate cholinergic neurotransmission and, consequently, improve cognition.

Keywords: Rutin, Cadmium, Acetylcholinesterase, Memory, Anxiety, Oxidative Stress, Flavonoids

Introduction

Cadmium (Cd) is a heavy metal with relatively low prevalence in earth's crust, but its intensive use by industry increased its bioavailability dramatically, making it one of the main environmental contaminants [35]. Humans are susceptible to the toxicity of Cd mainly through ingestion of contaminated food and water, inhalation of cigarette smoke or occupational exposure [23,47]. Due to its high toxicity, low rate of body excretion and long biological half-life, the exposure to this metal can damage kidneys, liver, lung, pancreas, testis, placenta, bone and even the central nervous system (CNS) [23, 35, 75].

Cd can indirectly produce reactive oxygen species (ROS) that gradually damage the blood-brain barrier (BBB), facilitating the accumulation of this metal in the brain causing cerebral edema and cellular dysfunction [47]. Some studies have shown the influence of cadmium on synaptic neurotransmission, antioxidant levels and enzymatic alterations in animal brain [49, 57, 69]. The CNS is rich in cholinergic neurons and their projections, which are key in the performance of vital functions such as cortical organization of movement, cerebral blood flow, learning, memory formation and others [48].

Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter that plays many roles in the CNS. After released, it acts in the post-synaptic receptors and then it is rapidly removed from the synaptic cleft by acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) [11].

Many studies have shown changes in activity of some enzymes caused by heavy metals. Some of these related Cd with acetylcholinesterase inhibition or activation, indicating that this metal has the ability to change the neurotransmission and consequently the behavior of both humans and experimental animals [57].

Epidemiological studies have associated the consumption of a healthy diet with a variety of beneficial health effects, in particular, the protective effect of CNS. Flavonoids are a group with great importance in this process, since these compounds have shown

protection to neural tissue against a variety of neurodegenerative conditions caused by oxidative stress [38, 56, 84].

However, the mechanisms by which flavonoids can act are still not completely understood. Andres-Lacueva et al. [3] demonstrated that rats supplemented with anthocyanins show these compounds in the CNS, suggesting these substances are able to cross the blood-brain barrier (BBB) and exert positive effects on memory in the Morris water maze. In addition, Kim et al [37] demonstrated an inhibition of mice AChE in assays with green tea polyphenols, suggesting an alternative for the treatment of Alzheimer's disease. Liu et al [41] found AChE inhibition and memory improvement in rats intoxicated with aluminium and treated with soy isoflavones. Richetti et al [62] showed that rutin and quercetin have an important role in memory impairments caused by scopolamine on zebrafish. As seen, flavonoids have shown a promising performance on memory deficit, neurotoxicity, oxidative stress, among others.

Rutin is a compound of this family, more specifically a flavonol, which has been reported to have a variety of biological effects including antioxidant activity, reducing blood pressure, lowering LDL cholesterol, inhibiting platelet aggregation, normalizing the resistance and capillary permeability, antiprotozoal, antiviral inhibitor bacterial growth, immunomodulatory, anticarcinogenic and repairer of memory and nervous neuronal damage [33, 60].

According to the previously exposed, considering that Cd is associated with behavior impairments and rutin is a flavonoid which has a role in CNS the aim of this study was to investigate if this compound has an effect on anxiety, learning, memory and AChE activity in brain structures of Cd-exposed rats, in order to investigate the potentially therapeutic of this compound in cerebral disorders caused by Cd intoxication.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris-(hydroxymethyl)-aminomethane GR, purified acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Sigma, type V – S), Coomassie brilliant blue G and Rutin hydrate were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (80 days; 315.7 ± 14 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used, both *ex vivo* as an *in vitro*. The animals were maintained at a constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from UFSM (protocol under number- 59 /2010).

2.3. *Ex vivo* and *in vitro* experimental procedure

Cd can be accumulated in the body through ingestion of contaminated food and water [85]. The CdCl_2 is the most common form of exposure to Cd due to its high solubility in water, thus the chemical form of the metal used in this study was $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ at concentration of 2 mg/kg [7, 18] while the doses of Rut used were 40 and 80 mg/kg. The treatment was performed by gavage every other day until 21 administrations. Animals were randomly divided into six groups (n=10 per group): saline/saline, saline/Rut 40, saline/Rut 80, Cd/saline, Cd/Rut 40 and Cd/Rut 80. Cd groups received the metal and after 30 minutes received saline or rutin in treatment groups. The solutions were freshly prepared in saline and were administered (1mL/kg) between 9 and 11 a.m. The *in vitro* assays were performed with rats that received the same maintenance conditions but no treatment. The concentrations of Rut used for the *in vitro* assay were 0, 1, 5, 10, 25 and 50 μM .

2.4. Behavioral procedures

2.4.1. Inhibitory avoidance

One day after the end of the treatment, animals were subjected to training in a step-down inhibitory avoidance apparatus according to Guerra et al. [27]. Briefly, the rats were subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus, which consisted of a 25cm×25cm×35cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7cm×25cm platform, 2.5cm high. The rat was placed gently on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 3-s of 0.4-mA shock was applied to the grid. The retention test took place in the same apparatus 24h later. Test step-down latency was taken as a measure of retention, and a cut-off time of 300 s was established.

2.4.2. Open field

Immediately after the inhibitory avoidance test session, the animals were transferred to an open-field measuring 56×40×30 cm, with the floor divided into 12 squares measuring 12×12 cm each. The open field session lasted for 5 min and during this time, an observer, who was not aware of the treatments, recorded the number of crossing responses and rearing responses manually. This test was carried out to identify motor disabilities, which might influence inhibitory avoidance performance at testing.

2.4.3. Foot shock sensitivity test

Reactivity to shock was evaluated in the same apparatus used for inhibitory avoidance, except that the platform was removed. The modified “up and down” method by Rubin et al. [65] was used to determine the flinch, jump and vocalization thresholds in experimentally naïve animals. Animals were placed on the grid and allowed a 3min habituation period before the start of a series of shocks (1 s) delivered at 10s intervals. Shock intensities ranged from 0.1 to 0.6mA in 0.1mA increments. The adjustments in shock intensity were made in accordance with each animal’s response. The intensity was raised by one unit when no response occurred and lowered by one unit when there

was a response. A flinch response was defined as withdrawal of one paw from the grid floor, and a jump response was defined as withdrawal of three or four paws. Two measurements of each threshold (flinch, jump and vocalization) were taken and the mean of each score was calculated for each animal.

2.4.4. Elevated plus maze

Anxiolytic activity was measured using the elevated plus-maze paradigm [21]. The elevated plus-maze apparatus consisted of a wooden structure elevated 50 cm from the floor and comprising two opposite arms, 50´10 cm, crossed at right angles by two arms of the same dimensions enclosed by 40 cm high walls, with an open roof. In order to avoid falls, the open arms were surrounded by a 0.5 cm high edge. The maze was placed inside a sound-attenuated room with a moderate light level (200 lx). Subjects were initially placed on the center platform of the maze facing an enclosed arm. The behaviors recorded were: the number of total entries into either arm and percentage of time spent on the open arms. The apparatus was thoroughly cleaned between the 5-min observation sessions.

2.5. Brain tissue preparation

After behavioral tests, the animals were anesthetized and submitted to euthanasia. The cranium was opened and the structures were gently removed and separated into cerebral cortex (CO), striatum (ST), hippocampus (HC), cerebellum (CE) and hypothalamus (HT). To verify the cadmium concentration in brain structures, six or seven animals per group were randomly chosen. For the other animals, synaptosomes from the cerebral cortex were obtained and all the other brain structures were homogenized in a glass potter in a solution of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1:10 (w/v) on ice. The homogenate was centrifuged at 1800 rpm for 10min and the resulting supernatant was stored at -30°C until utilization. Protein was determined previously and adjusted for each structure: CO (0.6–0.8 mg/mL), ST (0.4 mg/mL), HC (0.8 mg/mL), CE (0.5–0.6 mg/mL), and HT (0.6 mg/mL) according to the Bradford method [8] using

bovine serum albumin as standard solution. It was made the euthanasia and sample preparation procedure in the same way to *in vitro* treatment.

2.6. Synaptosome preparation

The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado—Escueta [51] using a discontinuous Percoll gradient. The cerebral cortex was gently homogenized in 10 volumes of an ice-cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH of 7.5, in a motor driven Teflon–glass homogenizer and then centrifuged at 1000g for 10 min. An aliquot of 0.5 ml of the crude mitochondrial pellet was mixed with 4.0 ml of an 8.5% Percoll solution and layered onto an isoosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). The synaptosomes that banded at the 10% and 16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The synaptosomal fraction was washed twice with isoosmotic solution by centrifugation at 15.000 g for 20 min to remove any contaminating Percoll. The pellet from the second centrifugation was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0–4°C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

2.7. *Ex vivo* and *in vitro* AChE enzymatic assay

The AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. [19] as previously described by Rocha et al. [63]. The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, DTNB, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

On *in vitro* assay, the enzyme was pre-incubated with 50 μl of Rut in different concentrations (0, 1, 5, 10, 25 and 50 μM) for 2 min. The rutin was diluted in DMSO. The

final concentration of DMSO, when tested alone in the incubation medium, did not affect the enzyme activity (data not shown).

All the other procedures for enzymatic assays were the same as those described by the *ex vivo* assays.

2.8. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement

Brain TBARS levels were determined according to Ohkawa [54] by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Briefly, the reaction mixture, containing 200L of brain supernatants or standard (0.03mM MDA), 200L of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 500L of 0.8% TBA and 500L of acetic acid solution (2.5M HCl, pH 3.4), was heated at 95 °C for 120 min. The absorbance was measured at 532 nm. TBARS tissue levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.9. Kinetic Parameters

The interaction between Rut and AChE and the values of the Michaelis – Menten constant (K_m) were determined using the Lineweaver-Burk [40] double reciprocal plot, by plotting $1/V$ against $1/S$ analyzed over a range of substrate acetylthiocholine concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1mM) in the absence and in the presence Rutin. Concentrations of 0, 1, 5, 10, 25 and 50 μ M were used to flavonoid. The evaluation of the kinetic parameters was performed using purified acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Sigma, type V – S) but the assay was done using the same procedure and reagents of *in vitro* assay. All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in U/h/ml. The values of inhibition constant (K_i) were obtained using replot of data from Lineweaver-Burk

plot of $K_{m,app}$ versus $[I]$ and the type of inhibition was characterized by Cornish–Bowden plots [13] of S/V versus $[I]$. Determination of IC50 Values: The sample concentration showing 50% inhibition (IC50) was calculated by plotting the inhibition percentages against the corresponding sample solution concentrations.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of training and test step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). Foot shock sensitivity was analyzed by unpaired t test. All other parameters evaluated were analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests, where $p < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments.

3. Results

3.1. Lipid peroxidation

The results of lipid peroxidation (Fig. 1) indicate that Cd significantly increased the damage to membrane lipids in all brain structures ($P < 0.05$), except in the striatum and cerebellum, where in spite of showing an increase, this was not significant. The groups who received rutin (40 and 80 mg/kg) along with the Cd showed a significant decrease in lipid peroxidation in the hypothalamus, cerebellum and hippocampus when compared with the group that received only Cd ($P < 0.05$). No significant differences were observed on lipid peroxidation in the cortex and striatum in the groups who received rutin along with Cd were observed compared to the group that receiving only Cd. Administration of rutin per se did not modify significantly TBARS levels in all cerebral structures when compared to the control group.

3.2. Behavioral tests

Figure 2A presents the effects of Rut on test step-down latencies. This flavonoid *per se* does not alter significantly this parameter ($P > 0.05$).

Fig. 2B shows the effects of Rut (40 and 80 mg/kg) and Cd in step-down latencies. We can observe that Cd *per se* causes a statistically significant deficit in memory retention, which is reverted to control levels with combined administration of Rut at both doses ($P < 0.05$).

Because motivational disparities in the training session may account for differences in test step-down latencies, experiments were performed to assess whether Cd or Rut affected shock threshold, or locomotor ability of the animals. Table 1 shows that Cd and Rut had no effect on the locomotor ability of the animals, as assessed by the similar spontaneous locomotion scores (crossing / rearing) presented by all groups. Moreover, Cd, Rut or the combination of both did not alter foot shock sensitivity, as demonstrated by the similar flinch and jump thresholds exhibited by the animals (table 1). These results suggest that neither intoxication by Cd nor the treatment with Rut showed interference on the exploratory behavior or in the sensitivity to shock of the animal.

The results of the elevated plus maze (Table 2) showed that the group of animals that received Cd increased the number of closed arm entries and the percentage of closed arm entries. On the other hand, Cd decreased the percentage of entries in open arms. The results also showed that Rut (40 and 80 mg/kg) protected from the effect of cadmium on these parameters and did not alter the general locomotor activity (measured by the number of entries in open arms over the number of closed arm entries). These results suggest that cadmium has anxiogenic effect and that the Rut prevents this effect.

3.3. *Ex vivo*, *in vitro* and kinetic AChE enzymatic assays

The results of AChE activity *ex vivo* in different brain structures and synaptosomes are presented in Fig. 3. Two-way ANOVA revealed that there were no significant

alterations in AChE activity in cerebellum, striatum, hippocampus and synaptosomes of cerebral cortex in Cd group when compared to the control group. In cerebral cortex and hypothalamus a significant increase in AChE activity ($P<0.05$) in Cd group was observed in comparison to saline group. However, in both groups that received Cd and Rut in different doses, AChE activity, return up to the levels proximity to control group ($P<0.05$). Administration of rutin per se did not modify significantly AChE activity in all cerebral structures when compared to the control group.

The results from activity of the enzyme AChE *in vitro* in the presence of different concentrations (1, 5, 10, 25 and 50 μM) of rutin in synaptosomes and brain structures are shown in Fig. 4. One-way ANOVA revealed that there was a significant inhibition ($P<0.05$) in AChE activity in hypothalamus, cerebellum, hippocampus and striatum in all concentrations of rutin tested. No significant alterations in the AChE activity in cerebral cortex were observed in the doses of rutin tested. The final concentration of DMSO solvent, when tested alone in the incubation medium, did not affect AChE activities (data not shown).

Observing the inhibition caused by rutin in AChE enzyme activity of brain structures, the kinetic test was performed with the *E.e.* AChE in the presence of these flavonoid concentrations used in *in vitro* tests for more information about the kinetic behavior and the type of enzyme inhibition. As can be observed in the Fig. 5, there was a significant inhibition ($P<0.05$) in AChE activity at all concentrations tested, with characteristic behavior of competitive inhibition type with a value of K_i equal to 2.8 mM.

4. Discussion

Cd is a metal that is deposited in increasing amounts in the atmosphere and soils, mainly due to the intense industrial activity, mining and use of fertilizers containing the metal as a contaminant. The main routes of contamination by cadmium, in addition to occupational exposure, are given by smoking and the consumption of vegetables grown in contaminated soils [34]. This metal can accumulate in the body and exert their toxic

effects on various organs such as kidneys, liver, lungs, testicles and other, mainly through the generation of ROS which damage the tissues and deplete the antioxidant defense [24, 42, 52, 55, 72, 73, 79].

Only small amounts of Cd can reach the CNS due to the selectivity of the blood brain barrier (BBB). However, prolonged exposure to this metal can generate an oxidative imbalance that can compromise the protection provided by this barrier [24, 55, 70, 72].

The results in this study demonstrated that small amounts of Cd were deposit in cortex, cerebellum, hypothalamus, hippocampus and striatum (data not shown), confirming the literature finding [23]. Since Cd is a hydrophilic metal and that the BBB has selective permeability to these solutes, if we analyze the results of lipid peroxidation (Fig. 1) of these brain structures, we can suggest that a process of damage to the BBB and membrane structures has started through the action of EROs [6] facilitating access of the metal to the cerebral parenchyma and neurons [4, 12, 53, 77] which may have caused neurological damage as shown in studies with animals and humans [4, 31, 39, 45, 49, 64]. As there was no statistical difference among all treatment groups in the deposition of Cd in the brain (data not shown), we can infer that the rutin does not act by removing the metal, but exerting an antioxidant activity [66] that may have a beneficial role on the neurological damage in the animals.

Among in the CNS effects that cadmium may exert are observed hypernociception, olfactory dysfunction, mitochondrial dysfunction, neurotoxicity, neurochemical imbalance, imbalance of ions such as Ca^{2+} , hemorrhage, edema, apoptosis, attention and memory deficits [2, 30, 46, 47, 49, 55, 59, 78, 83] which might indicate an involvement of this metal in the development and pathophysiology of neurodegenerative and neurocomportamental diseases [55]. In addition, Ishitobi et al. (2007) showed that Cd may alter the gene expression of neurogranine RC3 (gene regulated by thyroid hormones that could play an important role in memory, learning and anxiety), and changes in sex hormone receptors in the brain of rats treated with perinatal metilmazol [32]. Moreover, Lukawski et al. [45] in an experiment with cerebral oligemic hypoxia

showed enhancement of memory deficits by the action of cadmium in the passive avoidance task [45]. According to Cahill et al.[10] the inhibitory avoidance task is a classical model of behavior, which uses an aversive stimulus to evaluate learning and memory in rats and mice. In this study, we observed a significant decrease in step-down latency in rats intoxicated with Cd in the inhibitory avoidance, suggesting that this metal causes a learning impairment in these animals (Fig 2) [23]. However, rats that received Cd and Rutin, presented the test step-down latency similar to controls, suggesting that treatment with this flavonoid was able to prevent the impairment of memory induced by Cd.

Schmatz et al. [68] refer to the importance of making together with the inhibitory avoidance test, the sensitivity to foot shock in rats that received some type of drug because it can exert a motor or analgesic effect in animals. To discard this possibility, we evaluated the locomotor behavior immediately after the session of inhibitory avoidance in order to identify any physical disabilities that could influence performance in this task. Our results showed, by the open field, that the locomotor activity in all groups was not affected by treatment and remained similar to controls on the number of crosses and rearings. These data exclude the possibility that the locomotor activity or shock sensitivity may have contributed to the change in step-down latency, in treated rats (Table 1).

Another important aspect to be emphasized is the anxiolytic property of rutin against Cd anxiogenic properties (Table 2) [50]. It is known that flavonoids possess anxiolytic properties. Detailed study reports that flavonoids are able to produce anxiolytic effects as well as displacement of γ -aminobutyric acid receptor, serotonin, glutamate and acetylcholine [25]. Salgueiro et al. [67], tested synthetic and natural flavonoids such as quercetin and found in both properties anxiolytic in benzodiazepine receptor binding. Once the rutin becomes quercetin in the digestive tract through a deglicosilation [61, 76, 80], we suggest that this anxiolytic process can be given by the same mechanism reported for quercetin, since both compounds show great structural similarity among themselves and if compared with benzodiazepines, which have anxiolytic properties well established [25].

AChE enzyme is very important for the control of cholinergic neurotransmission by acting on the modulation of many vital functions and is closely associated with neurobehavioral processes [48, 57]. It is widely described in literature the effects of metal poisoning on the activity of this enzyme. Both *in vitro* and *ex vivo* Cd can alter its activity, inhibiting or activating the hydrolysis of ACh [44, 57]. These controversial results may appear due to multiple factors involving exposure to different forms of metal, time of exposure, age of exposed, route of contamination and type of tissue analyzed. Fasitsas et al. [20] found that variation in the activity of AChE, only changing the time of exposure of animals to Cd, in acute treatment, with decreased activity, followed by a chronic treatment, with increased activity. In this study, we analyzed AChE activity in different brain structures, as well as in synaptosomal fractions, observing a significant increase in the activity of this enzyme in the cortex and hypothalamus of rats treated with cadmium (Fig 3).

Interestingly, an increase in AChE activity can lead to a fast ACh degradation and a subsequent down stimulation of AChE receptors causing undesirable effects on cognitive function. Based on our results we can suggest that the increase in AChE activity caused by Cd intoxication leads to a reduction of cholinergic neurotransmission efficiency due to a decrease in ACh levels in the synaptic cleft, thus contributing to progressive cognitive impairment and other neurological dysfunctions seen in the cases of intoxication by Cd. Furthermore, we may infer that the activator effect elicited by Cd on AChE activity could be one of the mechanisms involved in the memory impairment observed in the inhibitory avoidance test in this study as well as in other behavioral tests.

A hypothesis that we can relate these structures (cortex and hypothalamus) and the raise in AChE activity is the aversive hypothesis. If we think about inhibitory avoidance as a stimulus of aversion, this triggers the limbic system, which has thalamocortical extensions [22, 74] that may be involved in memory formation of aversive shock. Since ACh is a neurotransmitter essential for the memory formation and the AChE activity is increased in the cortex and hypothalamus of rats that received only Cd we can relate this information with the decrease of latency in these animals [28].

It is well known that Cd can alter the membrane functions in various tissues, including brain [6]. AChE has a significant biological role in contributing to their membrane integrity and permeability changes that occur during synaptic transmission. This enzyme is present in the G4 isoform (membrane-bound) and G1 isoform (soluble) in different brain regions [15]. In mammalian brain the G4 isoform is predominant, depending on the anatomical region and the rest is composed of G1 and G2 isoforms [17]. Knowing that there are different isoforms of this enzyme in various tissue types, we can infer that these structures (cortex and hypothalamus) have a common isoform, which may be more susceptible to Cd. We also suggest that this isoform appears soluble, and not anchored to the membrane, since the activity of AChE is not altered in cortical synaptosome (Fig 3). In addition, changes in the lipid membrane, as has been reported in the literature for metal intoxication, corroborating with the increased of lipid peroxidation in brain observed in this study (Fig 1). Thus we can suggest, that the oxidative deterioration of the membrane of brain structures could be a decisive factor in the modification of the conformational state of the AChE molecule and would explain changes in activity this enzyme found in this study [1, 15].

On the other hand, it is well know that the inhibition of AChE activity is currently the most accepted and recognized as a therapy for cognitive development [16] and that this inhibition may be useful for the treatment of neurological disorders. It is interesting to note that rutin is performed as an inhibitor of this enzyme activity *ex vivo*, significantly reducing its activity in rats treated with Cd + Rut at different doses.

The flavonoids have the capacity to reduce the activity of AChE [9, 29], as well as antioxidants in general [23, 68]. In the present study, we observed significant inhibition of this enzyme in all tested brain structures *in vitro*, except in the cerebral cortex, which showed no statistical difference (Fig 4). Again we hypothesized that isoforms of the enzyme can explain these differences in each brain structure.

Kinetic tests with the enzyme AChE were performed in order to observe the inhibitory profile between the enzyme and rutin. For this, we used EeAChE, a purified form of the enzyme. The results obtained (Fig 5) indicated that rutin showed competitive

inhibition of AChE with a value of K_i equal to 2.8 mM. We suggest a mechanism where this compound can exert an interaction with cholinergic neurotransmission by preventing the progressive hydrolysis of ACh in the synaptic cleft, making this neurotransmitter more available for cholinergic synapses, contributing to the improvement in patients' cognitive functions such as learning and memory [5, 16, 26, 36, 48, 58].

In conclusion, the results of the present study demonstrated an impairment of memory in rats treated with Cd, which was coupled with a marked increase in AChE activity in some brain structures. Moreover, treatment with rutin was able to prevent an increase in AChE activity and the cognitive impairment in Cd-treated rats, demonstrating that this compound can modulate cholinergic neurotransmission and, consequently, improve cognition. These results may contribute to a better understanding of the neuroprotective role of rutin, emphasizing the influence of this antioxidant polyphenol and many others present in the diet, contributing to human health and possibly preventing neurologic disorders associated with cognitive impairment.

Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. ALDUNATE, R.; CASAR, J. C.; BRANDAN, E.; INESTROSA, N. C. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain research. Brain research reviews**, v. 47, n. 1-3, p. 96-104, 2004.
2. ALMAZAN, G.; LIU, H.N.; KHORCHID, A.; SUNDARARAJAN, S.; MARTINEZ-BERMUDEZ, A.K.; CHEMTOB, S. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 9, p. 858–869, 2000.
3. ANDRES-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; JOSEPH, J.A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 111-120, 2005.
4. ANTONIO, M.T.; CORREDOR, L.; LERET, M.L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 3, p. 331–40, 2003.
5. BENZI, G.; MORETTI, A. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer ' s disease ? **European Journal of Pharmacology**, 1998.
6. BLUDOVSÁ, M.; KOTYZOVÁ, D.; KOUTENSKÝ, J.; EYBL, V. The influence of alpha-lipoic acid on the toxicity of cadmium. **General Physiology and Biophysics**, v. 18, p. 28-32, 1999.
7. BORGES, L. P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.
8. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
9. BRÜHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as

- acetylcholinesterase inhibitors. **Chemistry and Biodiversity**, v. 1, n.6, p. 819-829, 2004.
10. CAHILL, L.; BRIONI, J. D.; IZQUIERDO, I. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications. **Psychopharmacology**, v. 90, p. 454-456, 1986.
 11. CHATONNET, A.; COUSIN, X.; STRA, U. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases ? Lessons from mutant animal models. **BioEssays**, , n. 9, p. 189-200, 2005.
 12. CLARK, D.E.; NATION, J.R.; BOURGEOIS, A.J.; HARE, M.F.; BAKER, D.M.; HINDERBERGER, E.J. The regional distribution of cadmium in the brains of orally exposed adult rats. **Neurotoxicology**, v. 6, n. 3, p. 109-114, 1985.
 13. CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and noncompetitive inhibitors. **Biochemistry Journal**, v. 137, p. 143–144, 1974.
 14. COUSIN, X.; STRAHLE, U.; CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions on acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. **BioEssays**, v. , 27, p. 189-200, 2005.
 15. DAS, A; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Perfusion**, v. 68, n. 6041, p. 1545-1555, 2001.
 16. DAS, AMITAVA; SHANKER, G.; NATH, CHANDISHWAR; PAL, R. A comparative study in rodents of standardized extracts of Bacopa monniera and Ginkgo biloba Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. **Enzyme**, v. 73, p. 893 - 900, 2002.
 17. DESCARRIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 53, n. 5, p. 603-625, 1997.
 18. EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; KEDWANY, F. S.; BAGHDADI, H. H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-

- carotene. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 42, n. 10, p. 1563-71, 2004.
19. ELLMANN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.
20. FASITSAS, C.D.; THEOCHARIS, S.E.; ZOULAS, D.; CHRISSIMOU, S.; DELICONSTANTINOS, G. Time-dependent cadmium-neurotoxicity in rat brain synaptosomal plasma membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 100, n.1/2, p. 271-275, 1991.
21. FRUSSA-FILHO, R.; BARBOSA-JÚNIOR, H.; SILVA, R. H.; DA CUNHA, C.; MELLO, C. F. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 168-73, 1999.
22. GAREL, S.; RUBENSTEIN, J. L. R. Intermediate targets in formation of topographic projections : inputs from the thalamocortical system. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 9, 2004.
23. GONÇALVES, J. F.; FIORENZA, A. M.; SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C.M.; BOCHI, G.V.; ANTES, F.G.; STEFANELLO, N.; RUBIN, M.A.; DRESSLER, V.L.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chemico-biological interactions**, v. 186, n. 1, p. 53-60, 2010.
24. GORMAN, A.M.; MCGOWAN, A.; O'NEILL, C.; COTTER, T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 139, p. 45-52, 1996.
25. GOUTMAN, J.D.; WAXEMBERG, M.D.; DOÑATE-OLIVER, F.; POMATA, P.E.; CALVO, D.J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, n. 2/3, p. 79-87, 2003.

26. GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Distribution**, v. 686, n. July, p. 672-686, 1999.
27. GUERRA, G. P.; MELLO, CARLOS FERNANDO; SAUZEM, P. D.; BERLESE, D.B.; FURIAN, A.F.; TABARELLI, Z.; RUBIN, M.A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 2, p. 150-8, 2006.
28. GULLEDGE, A. T.; STUART, G. J. Cholinergic Inhibition of Neocortical Pyramidal Neurons. **Neuroscience**, v. 25, n. 44, p. 10308 -10320, 2005.
29. GUO, A. J. Y.; XIE, H. Q.; CHOI, R. C.; ZHENG, K.Y.; BI, C.W.; XU, S.L.; DONG, T.T.; TSIM, K.W. Chemico-Biological Interactions Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 246-248, 2010.
30. GUTIÉRREZ-REYES, E. Y. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. , v. 131, p. 145 - 154, 1998.
31. HART, R.P.; ROSE, C.S.; HAMER, R.M. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 11, n. 6, p. 933-943, 1989.
32. ISHITOBI, H.; MORI, K.; YOSHIDA, K.; WATANABE, C. Effects of perinatal exposure to low-dose cadmium on thyroid hormone-related and sex hormone receptor gene expressions in brain of offspring. **Health (San Francisco)**, v. 28, p. 790-797, 2007.
33. JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄ -induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n.7/8, p. 557-563, 2002.
34. JÄRUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 201-8, 2009.

35. JARUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C.G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 24, p. 1-52, 1998.
36. KAUR, T. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. , v. 67, p. 25-30, 2008.
37. KIM, H. K.; KIM, MIJA; KIM, S.; KIM, MUJO; CHUNG, J. H. Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1977-9, 2004.
38. LAU, F. C.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. **Neurobiology of aging**, v. 26, p. 128-32, 2005.
39. LEHOTZKY, K.; UNGVARY, G.; POLINAK, D.; KISS, A. Behavioral deficits due to prenatal exposure to cadmium chloride in CFY rat pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 12, n. 2, p. 169-172, 1990.
40. LINEWEAVER, B.; BURK, D. The enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
41. LIU, Y.-QIANG; XIN, T.-RONG; LIANG, J.-JING; WANG, W.-MING; ZHANG, Y.-YUAN. Memory performance, brain excitatory amino acid and acetylcholinesterase activity of chronically aluminum exposed mice in response to soy isoflavones treatment. **Phytotherapy research : PTR**, v. 24, n. 10, p. 1451-6, 2010.
42. LÓPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M. J.; CAÑADAS, S.; GONZÁLEZ, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 6, p. 940-51, 2006.
43. LÓPEZ, E.; FIGUEROA, S.; OSET-GASQUE, M. J.; GONZÁLEZ, M. P. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. **British journal of pharmacology**, v. 138, n. 5, p. 901-11, 2003.

44. LUCHESE, C.; BRANDÃO, R.; OLIVEIRA, R. DE; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, F. W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology letters**, v. 173, n. 3, p. 181-90, 2007.
45. LUKAWSKI, K.; NIERADKO, B.; SIEKLUCKA-DZIUBA, M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. **Animals**, v. 27, p. 575 - 584, 2005.
46. MÉNDEZ-ARMENTA, M. Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. **Animals**, v. 161, p. 189- 199, 2001.
47. MÉNDEZ-ARMENTA, M.; RÍOS, C. Cadmium neurotoxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 350-358, 2007.
48. MESULAM, M.-M.; GUILLOZET, A; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.
49. MINAMI, A.; TAKEDA, A.; NISHIBABA, D.; TAKEFUTA, S.; OKU, N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. **Brain research**, v. 894, n. 2, p. 336-9, 2001.
50. MINETTI, A.; REALE, C.A. Sensorimotor developmental delays and lower anxiety in rats prenatally exposed to cadmium. **Journal of applied Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2006.
51. NAGY, A.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll). **Journal of Neurochemistry**, v. 43, p. 1114–1123, 1984.
52. NAWROT, T. S.; STAESSEN, J. A. The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at: <http://circ.ahajournals.org/content/114/13/1347>. **Circulation**, p. 1347-1349, 2006.

53. NISHIMURA, T.; IMAI, H.; MINABE, Y.; SAWA, A.; KATO, N. Beneficial effects of FK506 for experimental temporal lobe epilepsy. **Neuroscience Research**, v. 56, p. 386-390, 2006.
54. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v 95, p. 351–358, 1979.
55. OLANOW, C.W.; ARENDASH, G.W. Metals and free radicals in neurodegeneration. *Current opinion in neurology*, v. 7, n.6, p.548-558, 1994.
56. PAPANDEOU, M. A.; DIMAKOPOULOU, A.; LINARDAKI, Z. I.; CORDOPATIS, P.; KLIMIS-ZACAS, D.; MARGARITY, M.; LAMARI, F.N. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. **Behavioural brain research**, v. 198, n. 2, p. 352-8, 2009.
57. PARI, L.; MURUGAVEL, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rats. **Toxicology**, v. 234, n. 1-2, p. 44-50, 2007.
58. PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Cholinesterase inhibitors and memory. **Chemico-biological interactions**, v. 187, n. 1-3, p. 403-8, 2010.
59. PROVIAS, J.P.; ACKERLEY, C.A.; SMITH, C.; BECKER, L.E. Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. **Acta Neuropathologica**, v. 88, p. 583–586, 1994.
60. PU, F.; MISHIMA, K.; IRIE, K.; MOTOHASHI, K.; TANAKA, Y.; ORITO, K.; EGAWA, T.; KITAMURA, Y.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 104, n. 4, p. 329 - 334, 2007.

61. RECHNER, A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 2, p. 212-225, 2004.
62. RICETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; et al. Neurotoxicology Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 1, p. 116-122, 2011.
63. ROCHA, J.B.T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M.E. Effects of early undernutrition on 15 kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v. 53, p. 431–437, 1993.
64. ROSE, C.S.; HEYWOOD, P.G.; COSTANZO, R.M. Olfactory impairment after chronic occupational cadmium exposure. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 34, n. 6, p. 600-605, 1992.
65. RUBIN, M. A; BERLESE, DAIANE B; STIEGEMEIER, J. A; VOLKWEIS, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; DOS SANTOS, T.L.; FENILI, A.C.; MELLO, C.F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2328-34, 2004.
66. SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19, p.481–486, 1995.
67. SALGUEIRO, J. B.; ARDENGHI, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M.B.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 58, n. 4, p. 887-91, 1997.
68. SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; DA ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1/3, p. 42-48, 2009.

69. SENER, M. R.; ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; ARIZI, M.D.B.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 6, p. 954-8, 2006.
70. SHUKLA, A.; SHUKLA, G.S.; SRIMAL, R.C. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. **Human & experimental toxicology**, v. 15, n.5, p. 400- 405, 1996.
71. SUN, Q.Q.; HUGUENARD, J. R.; PRINCE, D. A. Barrel Cortex Microcircuits : Thalamocortical Feedforward Inhibition in Spiny Stellate Cells Is Mediated by a Small Number of Fast-Spiking Interneurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1219 -1230, 2006.
72. TAKEDA, A.; TAKEFUTA, SACHIYO; IJIRO, H.; OKADA, S.; OKU, NAOTO. Cd transport in rat brain. **Brain Research**, v. 49, n. 6, p. 453- 457, 1999.
73. TAKIGUCHI, M.; YOSHIHARA, S. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. **Environmental Sciences**, v. 13, n. 2, p. 107-116, 2006.
74. TAYLOR S.F.; LIBERZON, I.; KOEPPE, R.A. The effect of graded aversive stimuli on limbic and visual activation. **Neuropsychologia**, v. 38, n. 10, p. 1415-1425, 2000.
75. THÉVENOD, F. Cadmium and cellular signaling cascades : To be or not to be ? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 221-239, 2009.
76. TRANCHIMAND, S.; BROUANT, P.; IACAZIO, G. The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. **Biodegradation**, p. 833-859, 2010.
77. USAI, C.; BARBERIS, A.; MOCCAGATTA, L.; MARCHETTI, C. Pathways of Cadmium Influx in Mammalian Neurons. , p. 2154-2161, 1999.
78. VIAENE, M. K.; MASSCHELEIN, R.; LEENDERS, J.; DE GROOF, M.; SWERTS, L.J.; ROELS, H.A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to

- cadmium : a cross sectional epidemiological study. **Occupational and Environmental Medicine**, p. 19-27, 2000.
79. WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Molecular Biology**, v. 192, p. 95-117, 2003.
80. WALLE, T.; OTAKE, Y.; WALLE, U.K.; WILSON, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **Journal of nutrition**, v. 130, n. 11, p. 2658-2661, 2000.
81. WÄTJEN, W.; BEYERSMANN, D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells : Influence of oxidative. **Apoptosis**, p. 65-78, 2004.
82. YAN-QIANG, L.; TIAN-RONG, X.; JING-JING, L.; WEI-MING, W.; YUAN-YUAN, Z. Memory performance, brain excitatory amino acid and acetylcholinesterase activity of chronically aluminum exposed mice in response to soy isoflavones treatment. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1451-1456, 2010.
83. YOSHIDA, S. Re-evaluation of acute neurotoxic effects of Cd 21 on mesencephalic trigeminal neurons of the adult rat. **Time**, v. 892, p. 102-110, 2001.
84. YODIM, K.A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1683-1693, 2004.
85. ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, n. 3, p. 163-188, 2003.

Figure Legends

Fig. 1. Oxidative stress measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) cerebellum (A), cortex (B), striatum (C), hippocampus (D) and hypothalamus (E) of cadmium (Cd)-exposed rats (to 21 administration each other day and treated with Rutin (Rut 40 and 80 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm S.E.M. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($P < 0.05$).

Fig 2. Effect of oral administration of saline or rutin (40 and 80 mg/kg) (A) and saline or rutin (40 and 80 mg/kg) in cadmium (2 mg/kg)-exposed rats (B) to 21 administration each other day, on the inhibitory avoidance task performance of adult rats measured as the test step-down latencies. Data are the median \pm interquartile range for 10-12 animals in each group. $*(P<0.05)$ compared with saline group and $\#(P<0.05)$ compared with cadmium group by Dunn's Multiple Comparison Test.

Fig. 3. Acetylcholinesterase (AChE) activity *in vitro* in supernatant of cerebellum (A), cortex (B), striatum (C), hippocampus (D), hypothalamus (E) and synaptosomal fraction (F) of cadmium (Cd)-exposed rats and treated with Rutin (Rut). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm S.E.M. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($P < 0.05$).

Fig. 4. Acetylcholinesterase (AChE) activity in supernatant of cerebellum (A), cortex (B), striatum (C), hippocampus (D), hypothalamus (E) and synaptosomal fraction (F) of control rats incubated with 0, 1, 5, 10, 25 and 50 μ M of Rutin (Rut). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm S.E.M. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($p < 0.05$).

Fig. 5. Lineweaver-Burk plots for rutin on AChE activity from *Electrophorus electricus*. $1/V_{max}$ versus $1/[\text{acetylthiocholine}]$ in the presence of various concentrations of rutin: (\blacktriangle) 0 μ M, (\bullet) 1 μ M, (\blacklozenge) 5 μ M, (\blacksquare) 10, (\blacktriangledown) 25 μ M and (\blackplus) 50 μ M.

Fig. 1

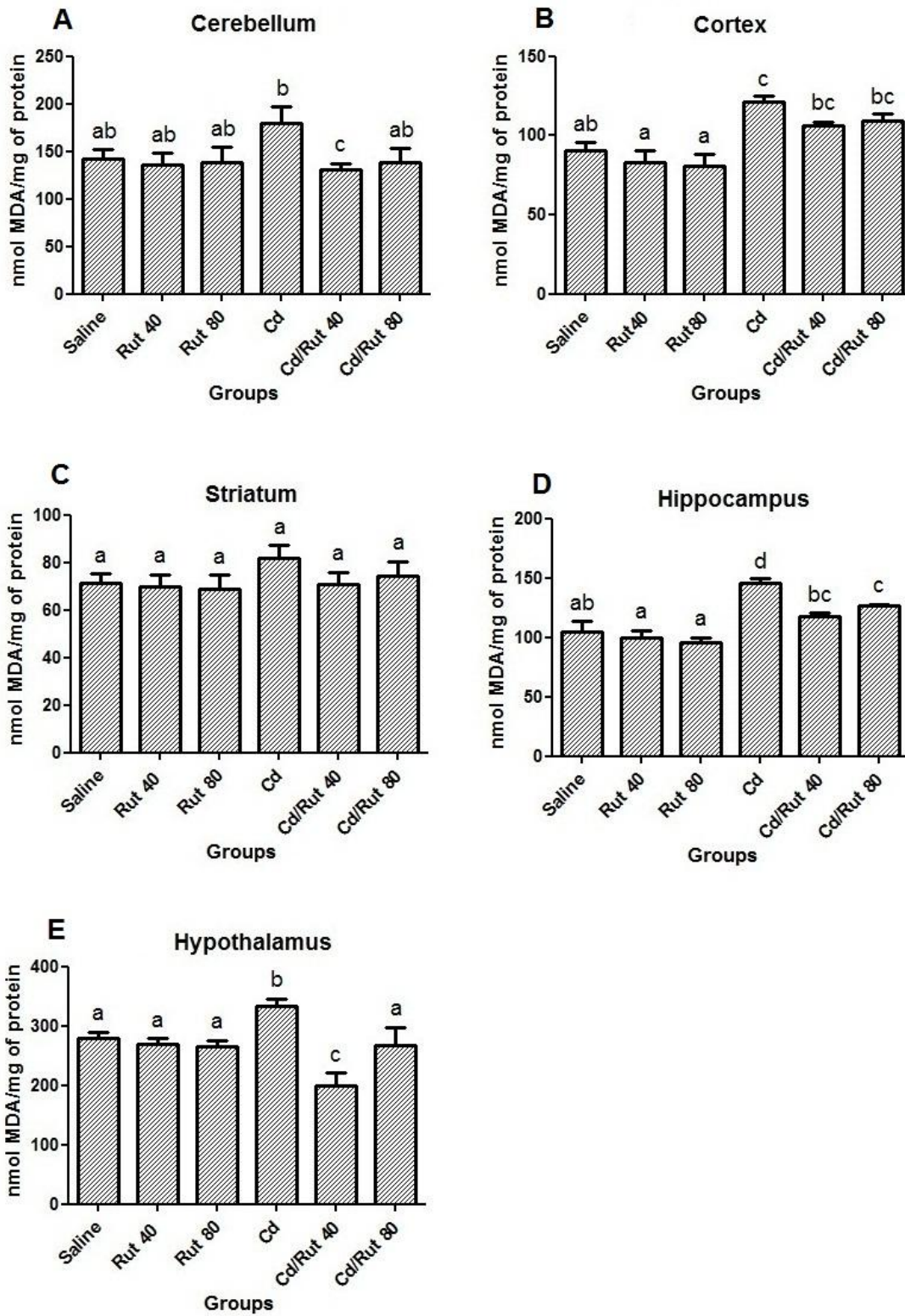


Fig. 2

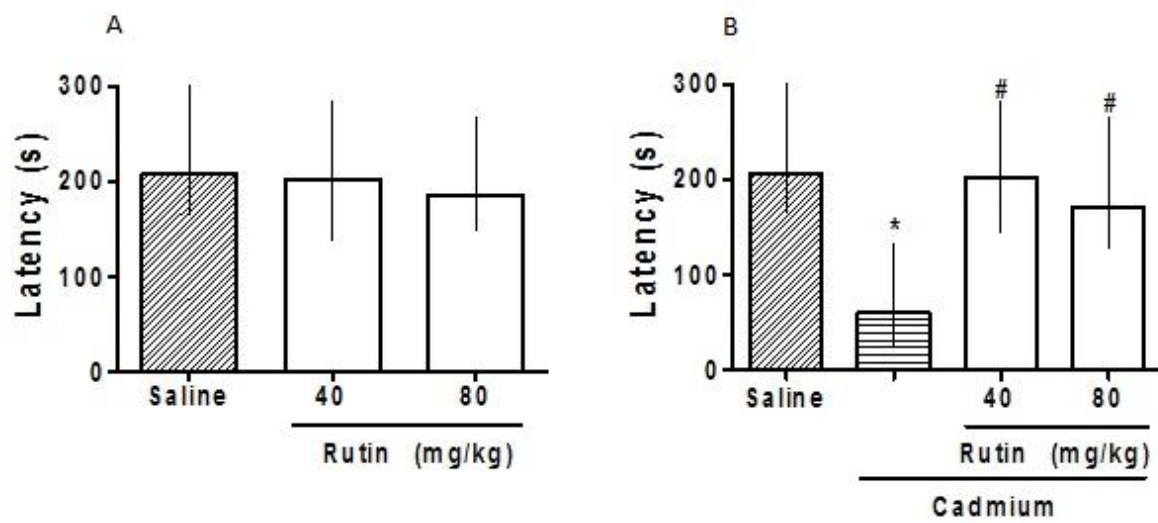


Fig.3

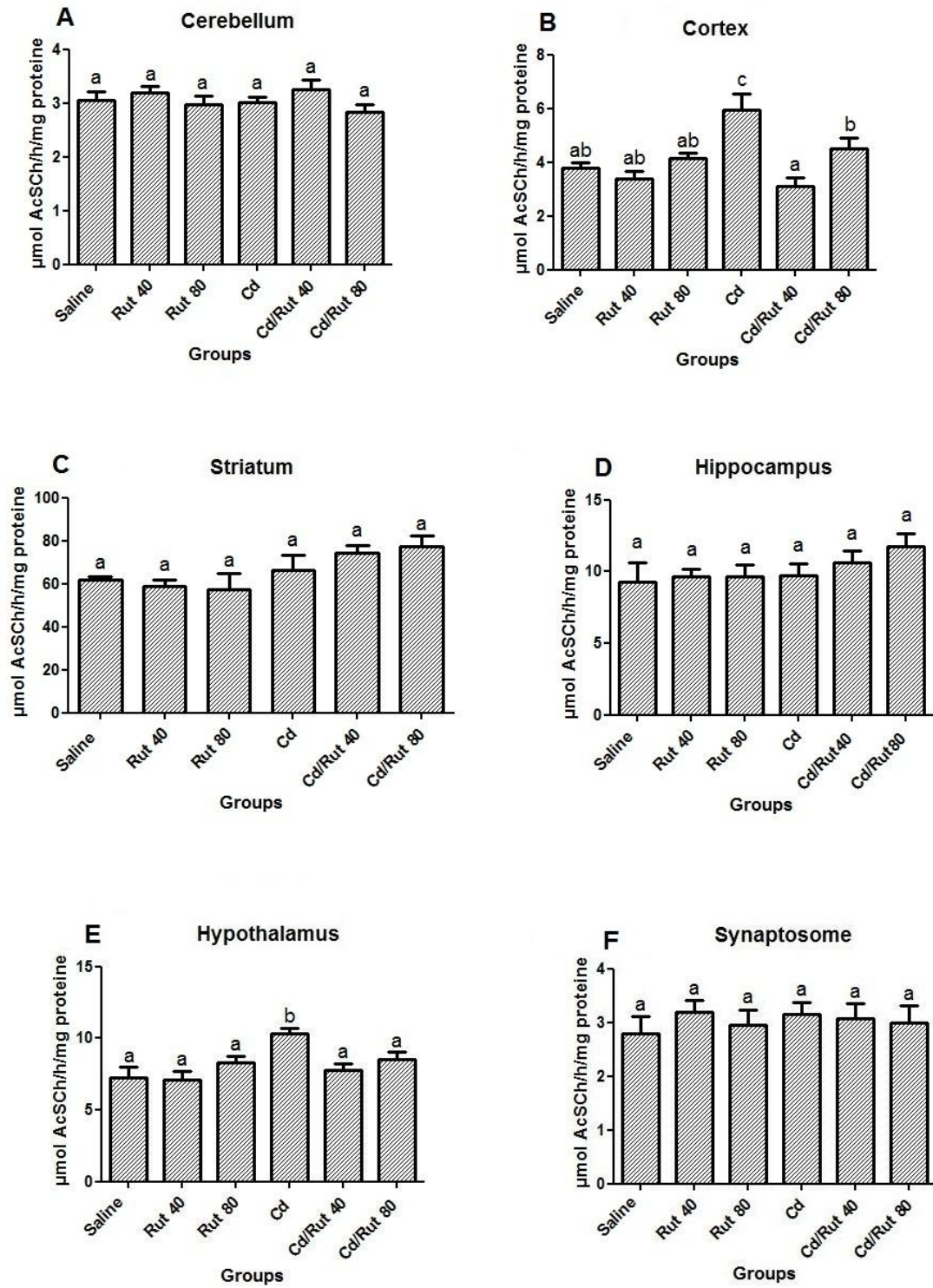


Fig. 4

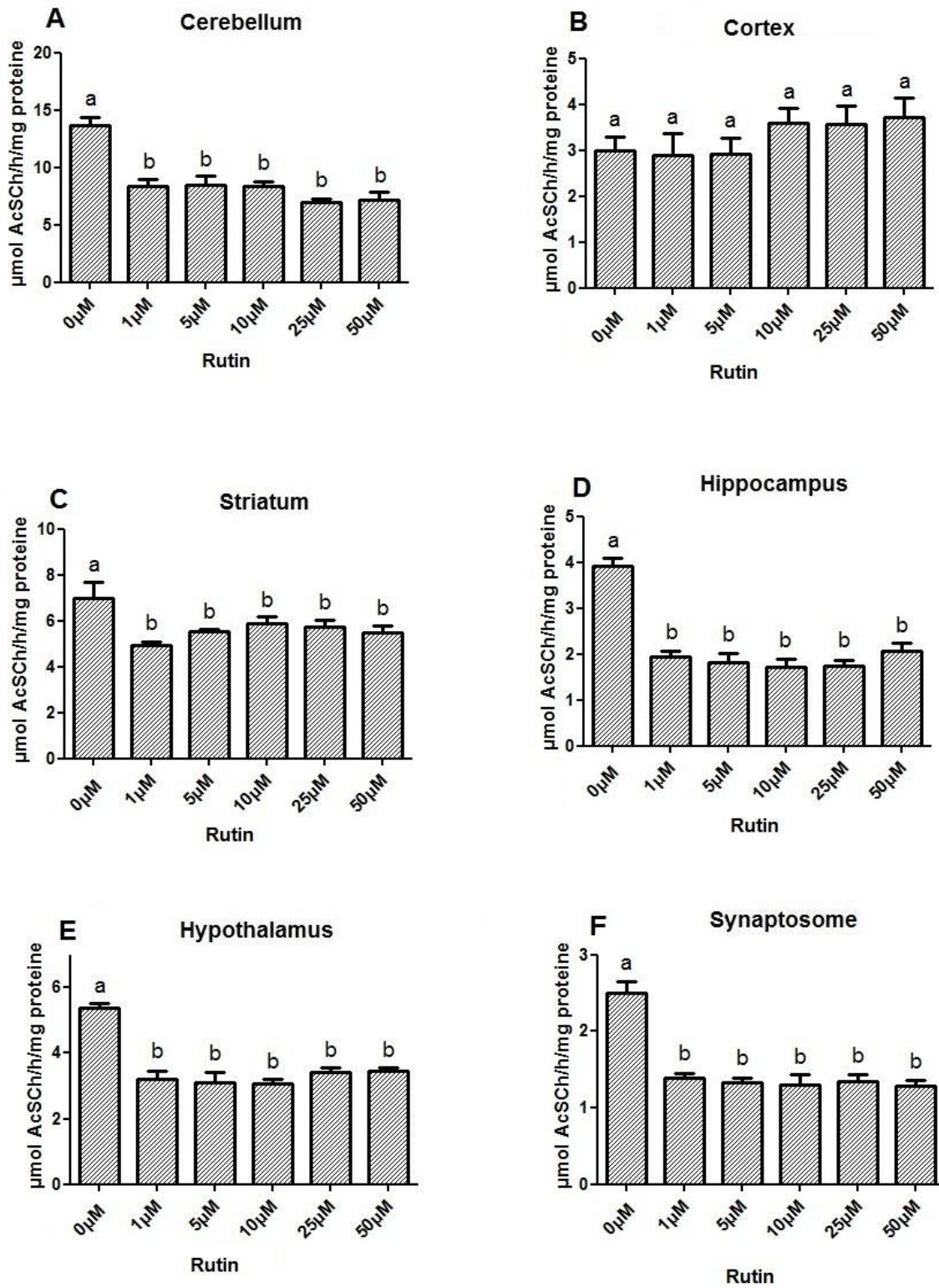


Fig. 5

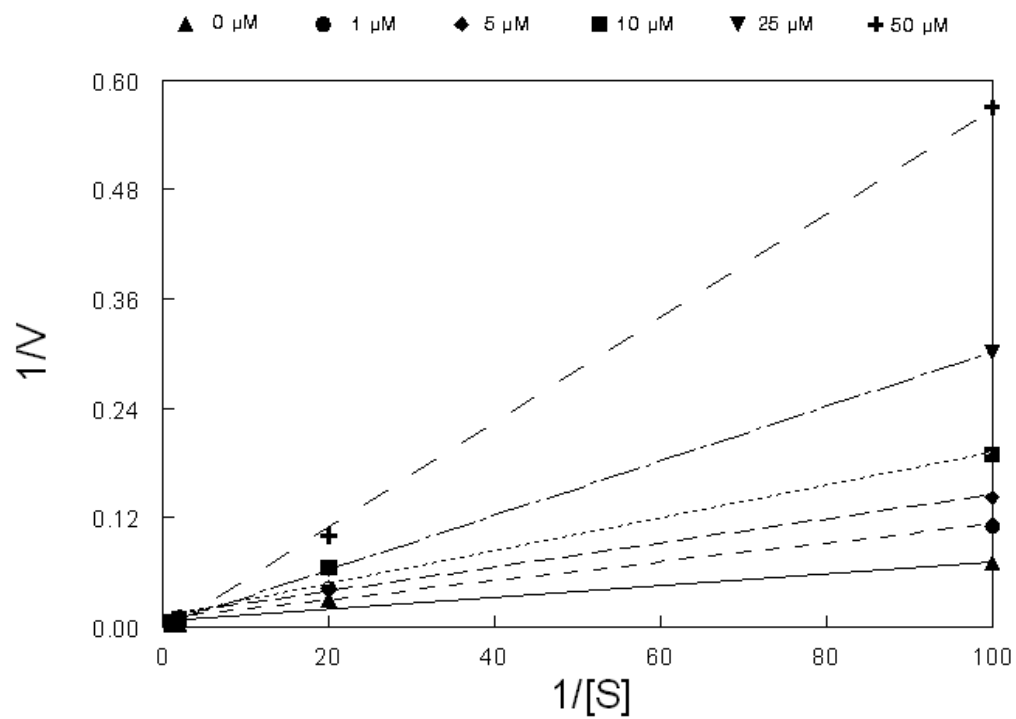


Table 1. Effect of oral administration of saline or rutin (40 and 80 mg/kg) and saline or rutin (40 and 80 mg/kg) in cadmium (Cd, 2 mg/kg)-exposed rats to 21 administration each other day, on the latency to training on the inhibitory avoidance apparatus, on the behavior of rats (number of crossing and rearing responses) in the open-field immediately after the inhibitory avoidance testing session and on the flinch and jump expressed as mA.

Group (mg/kg)	Lat.					N
	Training (s)	Crossing	Rearing	Flinch	Jump	
Saline	10.2 ± 2.2	16.7 ± 2.2	11.0 ± 1.7	1.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	11
Rutin (40)	12.6 ± 2.1	17.4 ± 2.2	11.5 ± 1.3	1.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	12
Rutin (80)	13.1 ± 2.3	14.7 ± 1.6	10.6 ± 2.0	1.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2	12
Cd	9.6 ± 2.0	19.3 ± 2.0	10.8 ± 1.4	1.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2	12
Cd/Rutin (40)	10.0 ± 2.4	16.5 ± 2.3	10.8 ± 1.4	1.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2	10
Cd/Rutin (80)	8.3 ± 2.3	15.0 ± 1.6	11.3 ± 1.6	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	11

Data are means ± SEM. N, number of animals in each group.

Table 2. Effect of oral administration of saline or rutin (40 and 80 mg/kg) and saline or rutin (40 and 80 mg/kg) in cadmium (Cd, 2 mg/kg)-exposed rats to 21 administration each other day, on the number of entries and time spent in open/closed arms on the elevated plus maze apparatus.

Group (mg/kg)	Time spent in arms		No. of entries in arms		% number entries	
	Enclosed	Open	Enclosed	Open	Enclosed	Open
Saline	232.9 ± 11.6	14.0 ± 4.0	3.2 ± 0.7	1.2 ± 0.3	72.1 ± 5.9	24.2 ± 6.2
Rutin (40)	248.7 ± 14.3	28.6 ± 11.6	3.6 ± 0.3	1.4 ± 0.3	77.0 ± 4.6	23.0 ± 4.5
Rutin (80)	251.2 ± 12.7	17.6 ± 7.7	4.8 ± 0.4	1.1 ± 0.3	85.0 ± 3.9	14.9 ± 3.9
Cd	268.2 ± 8.3	5.4 ± 4.1	5.7 ± 0.4*	0.2 ± 0.1	94.8 ± 3.8*	4.4 ± 2.4*
Cd/Rutin (40)	272.7 ± 6.4	11.3 ± 4.2	5.4 ± 0.8	0.9 ± 0.3	89.3 ± 3.8	11.9 ± 4.5
Cd/Rutin (80)	257.9 ± 8.0	16.7 ± 4.5	4.6 ± 0.3	1.4 ± 0.4	78.6 ± 5.2	21.4 ± 5.2
Statistical Analysis	F(5,63)=1.7; p>0.05	F(5,63)=1.3; p>0.05	F(5,63)=3.5; p<0.05	F(5,63)=1.9; p>0.05	F(5,63)=3.5; p<0.05	F(5,63)=2.8; p<0.05

Data are expressed as mean ± SEM. *P<0.05 compared with saline group. Cd is Cadmium.

5. Discussão dos resultados

O Cd é um metal que se deposita em quantidades cada vez maiores na atmosfera e em solos devido, principalmente, à intensa atividade industrial, mineração e utilização de fertilizantes que contêm esse metal como contaminante. As principais vias de contaminação pelo cádmio, além da exposição ocupacional, se dão pelo tabagismo e pelo consumo de vegetais cultivados em solos contaminados. Este metal possui uma meia-vida biológica de aproximadamente 30 anos, podendo se depositar em vários órgãos como fígado, testículos, pulmões e principalmente nos rins, causando lesão e morte tecidual nesses órgãos através da geração indireta de EROs .

Apenas pequenas quantidades de Cd conseguem atingir o SNC devido à seletividade da BHE, porém, uma exposição prolongada a esse metal pode gerar um desequilíbrio oxidativo que pode vir a comprometer a proteção conferida por esta barreira .

O presente estudo corrobora com essa hipótese, encontrando apenas pequenas quantidades do metal em diferentes estruturas cerebrais (dados não mostrados). Visto que o Cd é um metal hidrofílico e que a BHE possui permeabilidade seletiva a esses solutos, se analisarmos os resultados da peroxidação lipídica destas estruturas encefálicas (cerebelo, córtex, estriado, hipocampo e hipotálamo) , podemos sugerir que se iniciou um processo de dano à BHE e estruturas de membrana facilitando, assim, o acesso desse metal ao parênquima cerebral e neurônios, o que pode ter iniciado danos neurológicos como mostrado em estudos com animais e humanos .

Como não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na deposição do Cd no encéfalo (dados não mostrados), pode-se inferir que a rutina não atua através da remoção do metal e sim exercendo uma atividade antioxidante, uma vez que foi reduzida a peroxidação lipídica, que pode ter um papel benéfico sobre os danos neurológicos dos animais.

Dentre os efeitos centrais que o cádmio pode exercer destacam-se a hipernocicepção, disfunção olfativa, disfunção mitocondrial, neurotoxicidade,

desequilíbrio neuroquímico, desequilíbrio de íons como Ca^{2+} , hemorragia, edema, apoptose, déficits de atenção e de memória; o que pode indicar um envolvimento desse metal no desenvolvimento e patofisiologia de doenças neurodegenerativas e neurocomportamentais.

Além disso, Ishitobi e colaboradores (2007) mostraram que o Cd pode alterar a expressão gênica da neurogranina RC3 (regulada pelos hormônios da tireóide podendo desempenhar um papel importante na memória, aprendizado e ansiedade), e alteração em receptores de hormônios sexuais no cérebro de ratos perinatais tratados com metilmazol.

Lukawski et al. em um experimento com hipóxia oliguêmica cerebral, mostrou a potencialização dos déficits de memória pela ação do cádmio na tarefa de esquiva passiva. De acordo com Cahill et al. a tarefa de esquiva inibitória é um modelo clássico de comportamento, que se utiliza de um estímulo aversivo para avaliar o aprendizado e a memória em ratos e camundongos. No presente estudo, observamos uma diminuição significativa na latência de descida em ratos intoxicados com Cd no teste de esquiva inibitória, sugerindo que este metal causa um comprometimento na aprendizagem nestes animais. Contudo, ratos que receberam Cd e Rutina, apresentaram a latência de descida da plataforma similares aos controles, sugerindo que o tratamento com rutina evitou o comprometimento de memória induzido pelo Cd.

Schmatz et al. atentam para a importância de se fazer, em conjunto com a esquiva inibitória, o teste de sensibilidade ao choque nas patas em ratos que receberam algum tipo de droga, visto que esta pode exercer um efeito motor ou ainda analgésico nos animais. Para descartar esta hipótese, foi avaliado o comportamento locomotor imediatamente após a sessão de teste em esquiva inibitória, a fim de identificar qualquer deficiência motora que possa influenciar o desempenho desta tarefa. Nossos resultados demonstraram pelo teste de campo aberto, que a atividade locomotora em todos os grupos não foi afetada pelo tratamento, e manteve-se semelhante aos controles no número de cruzamentos e levantamentos. Estes dados excluem a possibilidade de que a atividade locomotora ou sensibilidade ao choque possam ter

contribuído para a alteração das latências de descida, testadas na tarefa de esquiva inibitória em ratos tratados. Outro efeito central que destacamos ainda, é a propriedade ansiolítica da rutina frente ao cádmio, ansiogênico (tabela 2). É sabido que flavonóides possuem propriedades ansiolíticas, estudo mais detalhados retratam que estes compostos possuem também a capacidade de deslocamento de receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA), de serotonina, de glutamato e de acetilcolina . Salgueiro et al., testaram flavonóides sintéticos e naturais como a quercetina, encontrando, em ambos, propriedades ansioseletivas na ligação aos receptores de benzodiazepínicos. Uma vez que a rutina, no trato digestivo, se converte em quercetina, através de uma deglicosilação, sugerimos que esse processo ansiolítico possa se dar pelo mesmo mecanismo relatado para quercetina, já que ambos compostos apresentam grande similaridade estrutural entre si e se comparados com benzodiazepínicos, que têm propriedades ansiolíticas bem estabelecidas .

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima muito importante para o controle da neurotransmissão colinérgica, agindo na modulação de muitas funções vitais e estando intimamente associada a processos neurocomportamentais . Está amplamente descrito na literatura os efeitos de intoxicação por metais na atividade dessa enzima. Tanto in vitro como ex vivo, o Cádmio pode alterar a sua atividade, inibindo ou ativando a hidrólise da acetilcolina .Estes resultados controversos podem aparecer devido aos múltiplos fatores que envolvem a exposição, como diferentes formas do metal, tempo de exposição, idade do exposto, via de contaminação, tipo de tecido analisado e outros.

Fasitsas e colaboradores (1991), encontraram essa variação na atividade da AChE, apenas alterando o tempo de exposição dos animais ao Cd, em tratamento agudo, com a diminuição da atividade; seguido de um tratamento crônico, com o aumento da atividade. No presente estudo, foi analisada a atividade da AChE em diferentes estruturas encefálicas, bem como em frações sinaptossomais, sendo observados, aumento significativo na atividade dessa enzima no córtex e hipotálamo de ratos tratados com Cd (Fig.3).

Um aumento na atividade da AChE pode levar a uma rápida degradação da ACh e a um baixo estímulo subsequente dos receptores colinérgicos, levando a danos na função cognitiva e gerando efeitos indesejáveis. Baseado em nossos resultados podemos sugerir que o aumento na atividade da AChE causada por uma intoxicação pelo Cd leva a uma redução de eficiência da neurotransmissão colinérgica devido a uma diminuição dos níveis de ACh na fenda sináptica, contribuindo assim para declínio cognitivo progressivo e outras disfunções neurológicas nos casos de intoxicação por Cd.

Além disso, podemos inferir que o efeito ativador provocado por este metal sobre a atividade AChE poderia ser um dos mecanismos envolvidos na perda de memória observada no teste de esQUIVA inibitória neste estudo, assim como outros testes de comportamento. Uma hipótese que podemos lançar relacionando estas estruturas (córtex e hipotálamo) e atividade da AChE é a hipótese aversiva. Se pensarmos na esQUIVA inibitória como um estímulo de aversão, esse aciona o sistema límbico, o qual possui extensões tálamo-corticais que podem estar envolvidas com a formação da memória de aversão ao choque. Uma vez que a ACh é um neurotransmissor essencial para a formação dessa memória e a atividade da AChE está aumentada no córtex e hipotálamo de ratos que receberam somente o metal, podemos relacionar estas informações com a diminuição da latência nesses animais .

O cádmio pode alterar as funções da membrana em vários tecidos, incluindo o cérebro. A AChE tem uma função biológica significativa na membrana contribuindo para a sua integridade e alterações na permeabilidade que ocorrem durante a transmissão sináptica. Esta enzima está presente na isoforma G4 (ligada à membrana) e isoforma G1 (solúvel) em diferentes regiões cerebrais . No cérebro de mamíferos a isoforma G4 é predominante, dependendo da região anatômica; o restante é composto pelas isoformas G1 e G2 . Sabendo que existem diferentes isoformas desta enzima, nos mais variados tipos de tecido, podemos inferir que estas estruturas (córtex e hipotálamo) possuam uma isoforma em comum, que possa ser mais suscetível ao cádmio. Sugerimos, também, que essa isoforma se apresenta solúvel, e não ancorada à membrana, uma vez que, a atividade da AChE não está alterada em sinaptossoma de

córtex (Fig. 3F). Além disso, alterações na membrana lipídica, como já bem relatado na literatura para intoxicações com metal, foram observadas (Fig1). Assim, podemos inferir que a deterioração oxidativa da membrana das estruturas do cérebro poderia ser um fator decisivo na modificação do estado conformacional da molécula de AChE e poderia explicar mudanças na atividade desta enzima encontrada neste estudo .

Sabe-se que a inibição da AChE é, atualmente, mais aceita e reconhecida como uma terapia para o desenvolvimento cognitivo e que essa inibição pode ser interessante para o tratamento de desordens neurológicas. É interessante ressaltar que a rutina se apresenta como um inibidor desta atividade enzimática *ex vivo*, reduzindo a sua atividade em ratos tratados com Cd + Rut em diferentes doses.

Os flavonóides, assim como antioxidantes em geral, têm a capacidade de reduzir a atividade da AChE .

No presente estudo, observou-se inibição desta enzima em todas as estruturas do encéfalo testadas *in vitro*, exceto no córtex cerebral, que não mostrou diferença estatística (Figura 4). Novamente levantamos a hipótese das isoformas dessa enzima para possivelmente explicar essas diferenças em cada estrutura encefálica.

Ensaio cinéticos com a enzima AChE foram realizados a fim de se observar o perfil inibitório existente entre a enzima e a rutina. Para isso, usamos E.e.AChE, uma forma purificada da enzima. Os resultados obtidos (Fig. 5) indicaram que a rutina mostrou inibição competitiva frente a AChE, com um valor de K_i igual a 2,8 mM. Sugerimos um mecanismo onde este composto possa exercer uma interação com a neurotransmissão colinérgica, evitando a hidrólise progressiva de ACh na fenda sináptica, tornando este neurotransmissor mais disponível para sinapses colinérgicas, contribuindo para a melhoria nas funções cognitivas , tais como o aprendizado e memória .

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram uma diminuição da memória em ratos tratados com Cd, que foi acompanhado por um aumento acentuado na atividade da AChE de algumas estruturas cerebrais. Além disso, o tratamento com rutina foi capaz de impedir um aumento na atividade da AChE e da disfunção cognitiva

em ratos tratados com Cd, demonstrando que este composto pode modular a neurotransmissão colinérgica e, conseqüentemente, melhorar a cognição.

Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão do papel neuroprotetor da rutina, enfatizando a influência deste polifenol antioxidante e de muitos outros presentes na dieta, contribuindo para a saúde humana e, possivelmente, prevenindo distúrbios neurológicos associados com prejuízo cognitivo.

6. Conclusões

- A administração de Cd pode aumentar os níveis de EROs danificando algumas estruturas, como a BBB, facilitando, assim, a permeabilidade do metal nestes tecidos;
- A Rut em diferentes doses, foi capaz de diminuir os danos oxidativos em algumas estruturas, apesar de não remover este metal. Levando-nos a crer que ela é um neuroprotetor devido as suas propriedades antioxidantes;
- A atividade da AChE é alterada na presença deste metal, mostrando-se aumentada nesse experimento, tendo sua atividade normalizada, em algumas estruturas, pela Rut;
- A atividade da enzima AChE foi inibida *in vitro*, em algumas estruturas, nas diferentes doses de Rut testadas, indicando que este composto pode ter uma atividade terapêutica em doenças hipocolinérgicas e demências tais como Alzheimer;
- O Cd apresentou efeitos amnésico e ansiogênico em ratos, sendo que a Rut foi capaz de reverter esses danos em ambas as doses, reforçando seu potencial terapêutico;
- A *E.e.AChE* também foi inibida *in vitro* nas diferentes doses de Rut testadas, caracterizando uma inibição competitiva, ratificando o potencial terapêutico do composto;

7. Referências

- ACKER, S.A.V.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20 , p.331-342,1996 .
- AFANAS'EV, A.I.B.; OSTRAKHOVITCH, E.A.; MIKHAL'CHIK, E.V.; IBRAGIMOVA, G.A.; KORKINA, L.G. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochemical Pharmacology**,v.61, p.677-684, 2001.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **A toxicological profile for Cadmium**. Atlanta, 2008. 512 p.
- ALDUNATE, R.; CASAR, J. C.; BRANDAN, E.; INESTROSA, N. C. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain research reviews**, v. 47, n. 1/3, p. 96-104, 2004.
- ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke . **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, n. 3, p. 297 - 316, 2005.
- ALÍA, M. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 9, p. 1251-1267, 2003.
- ALLOWAY, B.J.; STEINNES, E. Anthropogenic additions of cadmium to soils In: McLaughlin, M.J.; Sing, B.R. (Org.). **Cadmium in soils plants**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, 98p.
- ALLOWAY, B.J.; STEINNES, E. Anthropogenic additions of cadmium to soils. In: McLaughlin, M.J.; Sing, B.R. (Org.). **Cadmium in soils plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, 98p.

- ANDERSEN, O. Chelation of cadmium. **Environmental health perspectives**, v. 54, p. 249-66, 1984.

- ANSARI, M.A.; ABDUL, H.M.; JOSHI, G.; OPII, W.O.; BUTTERFIELD, D.A. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 20, p.269-275, 2009.

- ANSARI, M.A.; ABDUL, H.M.; JOSHI, G.; OPII, W.O.; BUTTERFIELD, D.A. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 269-275, 2009.

- ARAÚJO, P. W. B. D.; JÚNIOR, J. L. Q.; VASCONCELOS, H. D. DE; ALMEIDA, J. R. G. DA S. Flavonóides e Hipertensão. **Archives of Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 188-189, 2005.

- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging , Disease , and Oxidative Stress. **The journal of Biological Chemistry**, v. 272 , n. 33 , p. 20313-20316,1997.

- BERNARD, A. Cadmium & its adverse effects in human health. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 128, p. 557-564, 2008.

- BERNARD, A. Cadmium & its adverse effects on human health. **The Indian Journal Of Medical Research**, v. 128 , n. 4, p. 557-564, 2008.

- BHATIA, A. L.; JAIN, M. Spinacia oleracea L . protects against gamma radiations : a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. **Phytochemistry**, v. 11, p. 607-615, 2004.

- BIZARRO, V.G. **Teor e biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados**.2007. 65 f. Dissertação de mestrado -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

- BLASCO, A.J.; GONZÁLEZ, M.C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 71-81, 2004.
- BORGES, L. P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico-biological interactions**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.
- BROUILLARD, R.; MAZZA, G.; SAAD, Z.; ALBRECHT-GARY, A.M.; CHEMINAT, A. The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 2604-2610, 1989
- CAREY, J.B.; ALLSHIRE, A.; PELT, F.N.V. Immune Modulation by Cadmium and Lead in the Acute Reporter Antigen–Popliteal Lymph Node Assay. **Toxicological Sciences**, v. 91, 113-122, 2006.
- CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 346, n. 2, p. 171-9, 1997.
- CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, v. 16, 249-252, 1995.
- CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 249-252, 1995.
- CHERIAN, M. G. Metabolism of orally administered cadmium-metallothionein in mice. **Environmental health perspectives**, v. 28, p. 127-30, 1979.
- CONWAY, M. A. Memory and Language Memory and the self. **Journal of Memory and Language**, v. 53, p. 594-628, 2005.

- CONWAY, M. A. Memory and Language Memory and the self. **Journal of Memory and Language**, v. 53, p. 594-628, 2005.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Vol. II. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23 - 38, 2003.
- DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Perfusion**, v. 68, n. 6041, p. 1545-1555, 2001.
- Day, A.J.; Cañada, F.J.; Díaz, J.C.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R; Faulds, C.B.; Plumb, G.W.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G. Dietary flavonoids and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hidrolase. **FEBS Letters**, v. 468, p. 166-170, 2000.
- DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical Journal**, v. 324, p. 1-18, 1997.
- DIN, W. S.; FRAZIER, J. M. Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. **The Biochemical Journal**, v. 230 , n. 2, p. 395-402, 1985.
- EUQUERES, J.S. **Estimativa dos pK_a da rutina empregando modelos semi-empíricos de cálculo mecânico-quântico**. 2009. 78 f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2009.
- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Central cholinergic systems and cognition. **Annual Review of Psychology**, v. 48, p. 649-684, 1997.

- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Central cholinergic systems. **Learning**, 1997.
- FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-9, 2002.
- FERNANDEZ, M. T.; MIRA, M. L.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Iron and copper chelation by flavonoids : an electrospray mass spectrometry study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, p. 105-111, 2002.
- FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FERRER, A. Intoxicación por metales Metal poisoning. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, p. 141-153, 2003.
- GAUBIN, Y.; VAISSADE, F.; CROUTE, F.; BEAU, B.; SOLEILHAVOUP, J.; MURAT, J. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1495, n. 1, p. 4-13, 2000.
- GRIFFITH, J. Q; KREWSON C. F; NAGHSKI, J. **Rutin and Related Flavonoids**. Easton : Mack Publishing Company, 1955.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.
- HARBORNE, J.B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. New York: Chapman and Hall, 1988.
- HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide , DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A . 1 cell cultures. **Toxicology**, v. 112, p. 219-226, 1996.

- HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide , DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. **Toxicology**, v. 112, n. 3, p. 219-226, 1996.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, 2002.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary Flavonoids : intake , health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9/10, p.937-942,1999.
- IZATT, R.; CHRISTENSEN, J.; RYTTING, J. Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides. **Chemical Reviews**, v. 71, p. 439–481, 1971.
- IZQUIERDO, I. Different forms of post training memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, p. 171–202, 1989.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.
- IZQUIERDO, I; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl 4 -induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n.7/8, p. 557-563, 2002.
- JARUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C.G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate .**Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**,v. 24, p. 1-52, 1998.

- JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 272-9, 2009.
- KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sciences**, v. 72, p. 2101 - 2109, 2003.
- KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; DIWAN, B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 215-220, 2009.
- LAFUENTE, A.; GONZÁLEZ-CARRACEDOL, A.; ESQUIFINO, A. I. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 17, n. 4, p. 451-6, 2004.
- LÓPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M. J.; CAÑADAS, S.; GONZÁLEZ, M. P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 6, p. 940-951, 2006.
- LUCHESE, C.; BRANDÃO, R.; OLIVEIRA, R. DE; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, F. W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology letters**, v. 173, n. 3, p. 181-90, 2007.
- Lundbeck Institute Image Bank [internet] - Acesso: 17 de jun. 2011. Disponível em : http://www.cnsforum.com/content/pictures/imagebank/hirespng/rcpt_sys_ACH_ace_transf_AD.png .
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595- 603, 1999.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**. v. 32, p.595-603, 1999.

- MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.
- MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A; SHAW, P., LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.
- MIDDLETON, E. JR., KANDASWAMI, C. & THEOHARIDES T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MURPHY, M. E. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. **Biochemistry**, v. 88, p. 10860-10864, 1991.
- NOCTOR, G., FOYER, C.H. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma- glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, v. 264, p. 98-110, 1998.
- NOMIYAMA, K.; NOMIYAMA, H. Critical concentration of “unbound” cadmium in the rabbit renal cortex. **Experientia**, v. 42, p.149, 1986.
- PARIHAR, A.; PARIHAR, M. S.; MILNER, S.; BHAT, S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Faseb Journal**, v. 34, p. 6-17, 2008.
- PARK, S.Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer’s disease from natural sources. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 10, p. 1589-609, 2010.
- PARK, S.Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer’s disease from natural sources. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 10, p. 1589-609, 2010.

- PATEL, D. R.; FEUCHT, C. Basic Concepts of Neurotransmission. **Pediatric Clinics of North America**, v. 58, n. 1, p. 21-31, 2011.

- PATRICÒ, D.; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 577-585, 2000.

- PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina : determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127 f. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- PERRY, E.; WALKER, M.; GRACE, J.; PERRY, R. Acetylcholine in mind : a neurotransmitter correlate of consciousness ? **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 6 , p. 273-280, 1998.

- PERRY, H.M.; TIPTON, I.H.; SCHROEDER, H.A.; COOK, M.J. Variability in the metal content of human organs. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.60, p. 245-253, 1962.

- PERRY, H.M.; TIPTON, I.H.; SCHROEDER, H.A.; COOK, M.J. Variability in the metal content of human organs. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 60, p. 245-253, 1962.

- PU, F.; MISHIMA, K.; IRIE, K.; MOTOHASHI, K.; TANAKA, Y.; ORITO, K.; EGAWA, T.; KITAMURA, Y.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. **Journal of Pharmacological Sciences** , v. 104, n. 4, p. 329 - 334, 2007.

- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

- RIKANS, L. E.; YAMANO, T. Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity. **Molecular Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 110-117, 2000.

- RODRIGO, R.; BOSCO, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 142, n. 3-4, p. 317-27, 2006.

- ROSS, J. A; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

- SANTOS, B. L.; SILVA, A. R.; PITANGA, B. P. S.; SOUSA, C.S.; GRANGEIRO, M.S.; FRAGOMENI, B.O.; COELHO, P.L.C.; OLIVEIRA, M.N.; MENEZES-FILHO, N.J.; COSTA, M.F.D.; EL-BACHÁ, R.S.; VELOZO, E.S.; SAMPAIO, G.P.; FREIRE, S.M.; TARDY, M.; COSTA, S.L. Antiproliferative , proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404-411, 2011.

- SANTOS, F.W.; GRAÇA, D.L.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; WEIS, S.N.; FAVEIRO, A.M.; NOGUEIRA, C.W. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 546-550, 2006.

- SANTOS, F.W.; ORO, T.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NASCIMENTO, P.C.; NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 255-263, 2004.

- SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NASCIMENTO, P.C.; MARQUES, M.S.; NOGUEIRA, C.W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1723-1730, 2005a.

- SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; WEIS, S.N.; FACHINETTO, J.M.; FÁVERO, A.M.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico-Biological Interactions**, v. 151, p. 159-165, 2005b.
- SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters , cholinergic transmission and cognition. **Neuroscience**, v. 6, p. 48-56, 2005.
- SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1099-1103, 2004.
- SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1099-1103, 2004.
- SCHEEPENS, A.; TAN, K.; PAXTON, J. W. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. **Review Literature And Arts Of The Americas**, p. 75-87, 2010.
- SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; MALDONADO, P.A.; CORREA, M.; ROSA, C.S.; BECKER, L.; BAGATINI, M.; GONÇALVES, J.F.; JAQUES, J.S.J.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. **Brain Research Bulletin**, v. 80, p. 371-376, 2009.
- SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORREA, M.; da ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 42-48, 2009.

- SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; DA ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1/3, p. 42-48, 2009.

- SCHMATZ, R.; SCHETINGER, M.R.C.; SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C.M.; STEFANELLO, N.; MALDONADO, P.A.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; GIROTTO, E.; MORETTO, M.B.; MORSCH, V.M. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life sciences**, v. 84, n. 11-12, p. 345-50, 2009.

- SENGER, M.R. **Influência de metais tóxicos nas enzimas do sistema purinérgico e na acetilcolinesterase em sistema nervoso central do peixe zebra (Danio rerio)**. 2009. 56 f. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

- SEVEN, A.; GUZEL, S.; SEYMEN, O.; CIVELEK, S.; BOLAYIRLI, M.; UNCU, M.; BURCAK, G. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei medical journal**, v. 45, n. 4, p. 703-710, 2004.

- Seven, A.; Güzel, S.; Seymen, O.; Civelek, S.; Bolayirli, M.; Uncu, M.; Burçak, G.; Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, p.703-710, 2004.

- SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In:____. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.1-11.

- SILVA, W. C. DA; BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, IVÁN; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation

through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of learning and memory**, v. 86, n. 1, p. 100-6, 2006.

•SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 28, n. 5/6, p. 453-483,1996.

•SODHI, S.; SHARMA, A.; BRAR, A.P.S.; BRAR, R.S. Effect of α -tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 82-86, 2008.

•SOOB RATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

•SOOB RATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200–213, 2005.

•SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

•SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

•SUN, Q.Q.; HUGUENARD, J. R.; PRINCE, D. A. Barrel Cortex Microcircuits : Thalamocortical Feedforward Inhibition in Spiny Stellate Cells Is Mediated by a Small Number of Fast-Spiking Interneurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1219 -1230, 2006.

•SZEGLLETES, T.; MALLENDER, W. D.; THOMAS, P. J.; ROSENBERRY, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic

catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 122-33, 1999.

•TANDON, S. K.; SINGH, S.; PRASAD, S.; KHANDEKAR, K.; DWIVEDI, V.K.; CHATTERJEE, M.; MATHUR, N. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent , antioxidant or their combination in rat . **Toxicology Letters**, v. 145, p. 211-217, 2003.

•TAPIERO, H.; TEW, K. D.; BA, G. N.; MATHÉ, G. Polyphenols : do they play a role in the prevention of human pathologies ? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 4, p. 200-207, 2002.

•TOHYAMA, C.; SHAIKH, Z.A. Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 1, p. 1-7,1981.

•TRANCHIMAND, S.; BROUANT, P.; IACAZIO, G. The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. **Biodegradation**,v. 21, n. 6, p. 833-859, 2010.

•TSANGARIS, G. T.; TZORTZATOUSTATHOPOULOU, F. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. **Toxicology**, v. 128, n. 2, p. 143-50, 1998.

•VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

•VALLE, B.L.; ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. **Annual Review of Biochemistry**, v. 41, p. 91–128, 1972.

•van ACKER, S. A. B. E.; de GROOT, M. J. ; van den BERG, D. J.; TROMP, M.N.; DEN KELDER, G. D.O.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical research in toxicology**, v. 9, n. 8, p. 1305-12, 1996.

- VASQUES, V. D. C.; BRINCO, F.; WAJNER, M. Intrahippocampal administration of the branched-chain alpha-hydroxy acids accumulating in maple syrup urine disease compromises rat performance in aversive and non-aversive behavioral tasks. **Journal of the neurological sciences**, v. 15, n. 1/2, p. 11-21, 2005.
- VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil : a review. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 121-135, 2003.
- VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil : a review. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 121-135, 2003.
- Wikipédia [internet] – Acesso: 16 de jun.2011. Disponível em : http://en.wikipedia.org/wiki/Dimorphandra_mollis. Verbete: “Dimorphandra mollis”.
- YAMANO, T.; SHIMIZU, M.; NODA, T. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. **Toxicological Sciences**, v. 46.p. 393–402, 1998.
- YAMANO, T.; SHIMIZU, M.; NODA, T. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 393-402, 1998.
- YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-22, 2004.
- YODIM, K. A.; DOBBIE, M. S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A.R.; ABBOTT, N.J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood – brain barrier : in vitro studies. **Journal of neurochemistry**, v. 85, p. 180-192, 2003.

- YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain : interactions at the blood – brain barrier and their physiological effects on the central nervous system, v. 37, n. 11, p. 1683-1693, 2004.
- YOUDIM, K.A.; DOBBIE, M.S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A.R.; ABBOTT, N.J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, p. 180-192,2003.
- YOUDIM, K.A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1683-1693,2003.
- ZHANG, X.-MEI; LIU, G.; SUN, M.-JI. Epitopes of human brain acetylcholinesterase 1. **Microbiology**, v. 868, p. 157-164, 2000.