



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

**EFEITO DA QUERCETINA NA ATIVIDADE DE
ECTOENZIMAS E DA ACETILCOLINESTERASE EM
SINAPTOSSOMAS DO CÓRTEX CEREBRAL DE
RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fátima Husein Abdalla

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**EFEITO DA QUERCETINA NA ATIVIDADE DE
ECTOENZIMAS E DA ACETILCOLINESTERASE EM
SINAPTOSSOMAS DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
EXPOSTOS AO CÁDMIO**

Fátima Husein Abdalla

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti

Co-orientadora: Prof Dr^a Luciane Belmonte Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

A 135e Abdalla, Fátima Husein

Efeito da quercetina na atividade de ectoenzimas e da acetilcolinesterase em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao cádmio / por Fátima Husein Abdalla. – 2012.

81 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti

Coorientador: Luciane Belmonte Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas : Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Acetilcolinesterase 2. Cádmio 3. Quercetina 4. Sistema purinérgico
I. Mazzanti, Cinthia Melazzo de Andrade II. Pereira, Luciane Belmonte
III. Título.

CDU 577.1

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central da UFSM

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Fátima Husein Abdalla. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Conde de Porto Alegre, n. 1236, Centro, Santa Maria, RS. CEP: 97015-110

Fone: 55 84395466; E-mail: faha.biomed@hotmail.com

**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

**EFEITO DA QUERCETINA NA ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DA
ACETILCOLINESTERASE EM SINAPTOSSOMAS DO CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

elaborada por
Fátima Husein Abdalla

com requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti, Dr^a (Presidente/ Orientadora)

Vânia Lucia Loro, Dr^a (1º membro da banca)

Roselei Fachinetto, Dr^a (2º membro da banca)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012

Dedico esta dissertação a minha família, pelo apoio que me foi dado ao longo destes anos e por investirem nos meus sonhos. Ao amor da minha vida e grande amigo Thiago, que esteve sempre ao meu lado me apoiando e me fazendo acreditar em todos os meus sonhos. Muito obrigada por comemorarem comigo cada vitória alcançada e me darem suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelas bênçãos alcançadas ao longo destes anos de estudo, e, por apesar dos obstáculos, iluminar meu caminho e fazer com que desse tudo certo.

À minha família, em especial meus pais, por me darem a vida, por me ensinarem a trilhá-la com dignidade, pela oportunidade dada por vocês, que me acompanharam durante meus momentos de felicidades ou mesmo nos momentos difíceis, dando-me forças para prosseguir, compartilhando minha alegria. Sou eternamente grata por tudo. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Thiago, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por me dar força para lutar pelos meus sonhos, pela compreensão e incentivo durante o mestrado, por estar sempre ao meu lado me apoiando nas horas mais difíceis, pelo seu amor que me dá forças para continuar sempre em frente com meus objetivos. Te amo muito!

À minha orientadora Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti, sou grata pela oportunidade da realização do estágio no laboratório, assim como por me aceitar como orientada no programa. Obrigada, professora, pelo auxílio incondicional na realização deste trabalho, pela disponibilidade de me ensinar, pelo apoio e incentivo em todos os momentos, pelas horas disponibilizadas para me atender, pela paciência nos meus momentos de ansiedade, pelo companheirismo e amizade e principalmente por acreditar na minha capacidade e dar-me seu voto de confiança.

Agradeço à minha co-orientadora, Luciane Belmonte Pereira, por compartilhar comigo todos os desafios deste trabalho, pelo companheirismo, amizade e carinho. Tenho você como um exemplo de dedicação e competência. Muito obrigada Lú pelos ensinamentos de vida e pela amizade.

Agradeço enormemente às professoras Dr^a. Maria Rosa Schetinger e Dr^a. Vera Maria Morsch pela oportunidade de trabalharmos juntos e poder cursar esta pós-graduação.

Aos meus amigos e amigas: Fabiano, Jeandre, Tammi e Marília, sempre presentes a cada instante para rir, chorar e conversar. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos meus inúmeros amigos e colegas do laboratório 2208, pela amizade, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela ajuda nos experimentos. Obrigada por tudo sem a ajuda vocês hoje eu não estaria aqui!

À UFSM e ao curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À todos os amigos e pessoas que de alguma forma me ajudaram, meu sincero agradecimento a todos.

*É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louca,
que em conformidade viver.*

(Martin Luther King)

RESUMO

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

EFEITO DA QUERCETINA NA ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E DA ACETILCOLINESTERASE EM SINAPTOSSOMAS DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO

Autora: Fátima Husein Abdalla
Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti
Co-orientadora: Luciane Belmonte Pereira
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2012.

O cádmio (Cd) é um dos metais pesados de maior toxicidade pela sua capacidade de afetar órgãos vitais como o fígado, os rins, o encéfalo entre outros. Este metal pode desencadear um quadro de estresse oxidativo pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, e também afetar a neurotransmissão colinérgica e purinérgica. A quercetina (Querc), um flavonóide presente em vários alimentos exerce diversas funções terapêuticas no organismo como atividade antioxidante e ação neuroprotetora. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de ectoenzimas e da acetilcolinesterase (AChE) em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos adultos expostos ao cloreto de cádmio na dose de 2,5 mg/kg e tratados com Querc nas doses de 5, 25 e 50mg/kg, ambas por via oral e administradas no volume de 1 mL/kg por 45 dias. Os resultados demonstraram que a hidrólise de ATP, ADP, AMP e a atividade da ADA no sinaptossoma do córtex cerebral do grupo Cd/etanol aumentaram quando comparado com o grupo salina/etanol ($p < 0,05$). O tratamento com todas as doses de Querc preveniu o aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP bem como a atividade da ADA ($p < 0,05$). Ensaio *in vitro* com a Querc 25 e 50 μM demonstraram uma diminuição na atividade destas enzimas exceto na atividade da ADA ($p < 0,05$). A atividade da AChE *ex vivo* não foi significativamente diferente no grupo Cd/etanol quando comparado com o grupo salina/etanol. O tratamento com Querc 25 e 50 mg/kg diminuiu significativamente a atividade da AChE quando comparado com o grupo Cd/etanol ($p < 0,05$). Ensaio *in vitro* demonstraram uma diminuição na atividade da AChE somente com 100 e 200 μM de Querc ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que a Querc preveniu as alterações causadas pelo Cd no sistema purinérgico e colinérgico. Deste modo, os resultados descritos neste estudo sugerem que a Querc é um composto promissor que pode ser investigada clinicamente a fim de ser utilizado em terapias alternativas para o tratamento de doenças neurodegenerativas ou doenças cerebrais associadas à intoxicação por metais pesados.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Cádmio. Quercetina. Sistema purinérgico.

ABSTRACT

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

EFFECT OF THE QUERCETIN ON THE ECTOENZYMES AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN SYNAPTOSOMES THE CEREBRAL CORTEX OF RATS EXPOSED TO CADMIUM

Author: Fátima Husein Abdalla

Advisor: Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti

Co-advisor: Luciane Belmonte Pereira

Place and Date: Santa Maria, February 27, 2012.

Cadmium (Cd) is one of the most toxic heavy metals by their ability to affect the vital organs like liver, kidney, brain and other. This metal can trigger a framework of oxidative stress by increase of reactive oxygen species and also affect cholinergic and purinergic neurotransmission. Quercetin (Querc), a flavonoid found in various foods has several functions in the body as a therapeutic antioxidant and neuroprotective action. The aim of this study was to evaluate the activity of ectoenzymes and acetylcholinesterase (AChE) activity in synaptosomes of the cerebral cortex of adult rats exposed to cadmium chloride at a dose of 2.5 mg/kg and treated with Querc at doses of 5, 25 and 50mg/kg, both solutions were orally administered in a volume of 1 mL/kg for 45 days. Results showed that the hydrolysis of ATP, ADP, AMP and ADA activity in the synaptosome cerebral cortex in the Cd/ethanol group increased compared to the saline/ethanol group ($p < 0.05$). The treatment with all doses of Querc prevented the increase in the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP as well as the ADA activity ($p < 0.05$). In vitro assay with Querc 25 and 50 μM showed a decrease in the activities of these enzymes except of ADA ($p < 0.05$). The AChE activity ex vivo was not significantly different in the Cd/ethanol group when compared to the saline/ethanol group. The treatment with Querc 25 and 50 mg/kg significantly decreased the AChE activity when compared to the Cd/ethanol group ($p < 0.05$). In vitro assay showed a decrease in the AChE activity only with 100 and 200 μM of Querc ($p < 0.05$). These results suggest that Querc prevented the alterations caused by Cd in purinergic and cholinergic system. Thus, the results reported here suggest that Querc is a promising compound that can be clinically investigated in order to be used in alternative therapies for the treatment of neurodegenerative diseases or brain diseases associated with poisoning by heavy metals.

Keywords: Acetylcholinesterase. Cadmium. Quercetin. Purinergic system.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Sub-Classes dos flavonóides, características e fontes.....	35
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 -	Esquema Ilustrando o mecanismo responsável pela acumulação seletiva de Cd nas células tubulares proximais. Alb: albumina, Mt: metalotioneína, GSH: glutatona; aa: aminoácido.....	18
Figura 2 -	Efeito do Cd nos neurônios.....	20
Figura 3 -	Sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (vAChT).....	23
Figura 4 -	Isoformas da acetilcolinesterase.....	25
Figura 5 -	A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS). B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE.....	26
Figura 6 -	Enzima envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	29
Figura 7 -	Membros da família da E-NTPDase.....	30
Figura 8 -	Estrutura da ecto 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI.....	32
Figura 9 -	Núcleo genérico de um flavonóide. Os anéis A e B são aromáticos e o anel C é um heterociclo.....	34
Figura 10 -	Estrutura do flavonóide Quercetina. Destaque para as estruturas envolvidas na sua atividade farmacológica e antioxidante. O grupamento mais importante é o catecol (amarelo). Outros grupamentos importantes: presença de insaturação no anel C (vermelho), presença de função 4-oxo no anel C (verde). O grupo catecol e as outras funções (azul) possuem a habilidade em quelar metais de transição como o cobre e o ferro.....	37

Manuscrito

- Figura 1 - Efeito da quercetina *in vitro* (A) e *ex vivo* (B) sobre a atividade da AChE em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos. A primeira barra (A), representa o controle. As outras barras representam diferentes concentrações de Querc (μM). Cada coluna representa a média \pm SEM (n=4-5). Letras diferentes indicam diferença significativa do controle. Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). A atividade da AChE *ex vivo* (B) em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao Cd e tratados com Querc (mg/Kg). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa média \pm SEM (n = 10-12). Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Resultados são expressos em mmol de AcSCh / h / mg de proteína..... 63
- Figure 2 - Efeitos da quercetina *in vitro* na hidrólise de ATP (A), ADP (B), e AMP (C) em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos. A primeira barra em todos os gráficos representa o controle. As outras barras em todos os gráficos representam diferentes concentrações de Querc (μM). Cada coluna representa média \pm SEM (n = 4-5). Os resultados estão expressos como nmol/ Pi / min/ mg de proteína. Letras diferentes indicam diferença significativa em do controle. Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)..... 64
- Figure 3 - Hidrólise de ATP (A), ADP (B), AMP (C) e atividade da ADA (D) em sinaptossomas do córtex cerebral *ex vivo* de ratos expostos ao Cd e tratados com Querc. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Cada coluna representa a média \pm SEM (n = 10-12). Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)..... 65

LISTA DE ABREVIações

Cd - Cádmió

MT - Metalotioneínas

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

BHE - Barreira Hematoencefálica

ACh - Acetilcolina

ChAT - Colina acetiltransferase

CHT- Transportador de colina

TACHV - Transportador de acetilcolina vesicular

AChRm - Receptores de acetilcolina muscarínicos

AChRn - Receptores de acetilcolina nicotínicos

AChE - Acetilcolinesterase

ATP - Adenosina Trifosfato

ADP - Adenosina Difosfato

ADO - Adenosina

ADA - Adenosina desaminase

INO - Inosina

Querc - Quercetina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. MANUSCRITO.....	40
4. CONCLUSÕES.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: Biometals.

1. INTRODUÇÃO

Metais pesados são substâncias presentes no nosso dia-dia, principalmente devido ao processo de industrialização. Esses compostos possuem a característica de serem altamente reativos e bioacumuláveis (TAVARES, 1992). Entre os metais pesados encontrados no meio ambiente e utilizados industrialmente, o cádmio (Cd) é o que apresenta maior interesse clínico, uma vez que a intoxicação por este metal é de difícil tratamento (JONES & CHERIAN, 1990). Além disso, estudos relatam que o Cd é amplamente utilizado na fabricação de baterias recarregáveis, de pilhas, de esmaltes, de tinturas, de alguns tipos de soldas, em televisores e ainda em fertilizantes e cigarro (JARUP *et al.*, 1998).

O Cd é um metal branco acinzentado, pertencente ao grupo IIB da tabela periódica. Possui número atômico 48, massa atômica relativa 112,41. É um elemento que não se encontra no meio ambiente na sua forma pura, mas como um composto mineral com outros elementos, como o oxigênio (óxido de Cd), cloro (cloreto de Cd), ou sulfeto de Cd, além de Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Ferro (Fe) (ATSDR, 1998).

O Cd é um elemento não essencial existente na crosta terrestre em baixas concentrações, entre 0,15 - 0,20 mg/kg⁻¹ (BERNARD & LAUWERYS, 1984; CHEN & KAO, 1995). A distribuição normal deste metal pode ser alterada devido a 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 e mineração (BENAVIDES *et al.*, 2005). Durante o século XX, a produção, o consumo e a emissão de Cd no ambiente atmosférico, aquático e terrestre têm aumentado drasticamente, pois produtos contendo Cd são freqüentemente despejados junto com o lixo doméstico e, assim, contaminam o meio ambiente, especialmente se os resíduos são queimados. Desta forma, o Cd, quando lançado no meio ambiente, pode ser absorvido pelos tecidos animais e vegetais, contaminando os ecossistemas terrestres e aquáticos, entrando, desta forma, na cadeia alimentar (JARUP, 1998).

Sabe-se que as principais fontes de intoxicação humana por Cd são ocupacionais, alimentares e pelo tabagismo (SATARUG & MOORE, 2004;

BERNARD, 2008). Entretanto, a dieta é a mais importante fonte de exposição, em geral, na população não fumante (WHO, 1992). A toxicidade causada por este metal varia conforme a via de contaminação, dose, forma química, duração da exposição e idade do exposto ao Cd (CASALINO *et al.*, 1997). Além disso, a absorção gastrointestinal de Cd pode ser influenciada por fatores nutricionais, como uma baixa ingestão de Cálcio, Ferro, Zinco e Cobre que podem aumentar a absorção intestinal do Cd (NORDBERG *et al.*, 1985; FOX, 1988).

O Cd é absorvido no organismo em pequenas quantidades. Entretanto, devido a sua baixa eliminação diária e meia-vida biológica de ± 30 anos, este metal torna-se prejudicial para o meio ambiente e para os seres humanos (MORSELT, 1991; WHO, 1992; SANTOS *et al.*, 2006; BORGES *et al.*, 2008), uma vez que ele pode se acumular em vários órgãos, como o fígado, rins, pulmões, ovários, ossos, testículos e encéfalo (SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005a; SANTOS *et al.*, 2005b; SANTOS *et al.*, 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) e a grupos sulfidrílicos ou histidínicos (IZATT *et al.*, 1971). Além disso, o Cd pode interagir 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 que a exposição crônica produz dano renal, osteotoxicidade, neurotoxicidade, infertilidade, dentre outros (RIKANS & YAMANO, 2000).

Uma vez que o Cd é absorvido pelos pulmões ou pelo trato gastrointestinal este metal é transportado pelo sangue ligado à albumina até o fígado, parte do Cd no fígado é excretado na bile ligada a glutathione (NORDBERG *et al.*, 1977). Entretanto, sob condição de exposição mais prolongada, a excreção na bile diminui e o metal induz a produção de proteínas de baixo peso molecular, as MTs as quais se ligam formando o complexo Cd-MT que é lentamente liberado na circulação sistêmica (TOHYAMA & SHAIKH, 1981; JARUP, 1998), no plasma este complexo é filtrado pelos glomérulos renais e liberado na urina. Seguidamente o complexo Cd-MT é reabsorvido pelos túbulos renais por endocitose absorptiva mediada pelo transportador ZIP8 na superfície apical das células tubulares renais (BERNARD *et al.*, 1987) As lisozimas e as células tubulares degradam rapidamente este complexo e liberam os íons Cd livre no citoplasma. O metal liberado se liga a MTs renais pré-

existentes ou àquelas recentemente sintetizadas pelas células tubulares (CHERIAN, 1978). Entretanto, quando a quantidade de Cd presente no córtex renal excede a capacidade de ligação às MTs, os íons Cd liberados podem causar danos nos tecidos (NOMIYAMA & NOMIYAMA, 1986), provavelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) uma vez que o Cd não participa diretamente de reações de oxidação-redução (HASSOUN & STOHS, 1996; CASALINO *et al.*, 1997) (Figura 1).

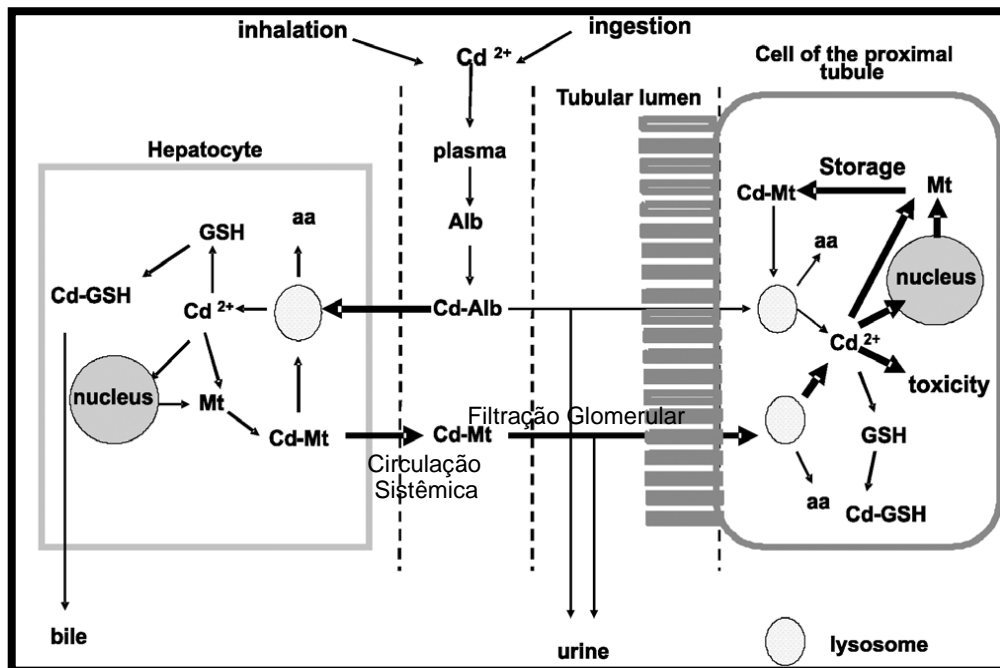


Figura 1: Esquema Ilustrando o mecanismo responsável pela acumulação seletiva de Cd nas células tubulares proximais. Alb: albumina, Mt: metalotioneína, GSH: glutationa; aa: aminoácido. Adaptado de BERNARD, (2008).

Deste modo, acredita-se que a toxicidade do Cd está intimamente relacionada com a geração de EROs, uma vez que estudos demonstraram um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, de carbonilação protéica, uma inibição ou redução da atividade de enzimas antioxidantes como catalase, a superóxido dismutase, a glutatona redutase, a glutatona peroxidase e enzimas de reparo do DNA induzido pelo Cd (CASALINO *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005a; SANTOS *et al.*, 2005b; SANTOS *et al.*, 2006; LUCHESE *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008). 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 alterados levando à uma série de danos, como

mutações, deleções, apoptose, neurotoxicidade, neurodegeneração, dano às membranas, entre outras (LÓPEZ *et al.*, 2006; MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007). Além disso, estudos relataram que tanto a exposição ambiental quanto a ocupacional ao Cd tem sido associada com diversas manifestações clínicas incluindo a toxicidade no sistema nervoso central (SNC) (JARUP *et al.* 1998, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2010).

O SNC é protegido de muitos efeitos tóxicos por uma barreira anatômica denominada barreira - hematoencefálica (BHE) (MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007). Devido à permeabilidade seletiva da BHE, baixas quantidades de Cd podem chegar ao cérebro. Entretanto, concentrações mais elevadas podem ser alcançadas se um veículo for empregado, como por exemplo, o etanol. Devido à capacidade deste veículo se difundir através das membranas biológicas, ele permite uma maior penetração do metal através BHE (MÉNDEZ-ARMENTA *et al.*, 2001; MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007). Além disso, estudos têm relatado que a entrada de íons de Cd nos neurônios pode ser mediada através dos canais de cálcio (KUMAR *et al.*, 1996) (Figura 2).

Portanto uma vez dentro das células, o Cd induz a uma diminuição na atividade da glutathiona peroxidase, da catalase e da superóxido dismutase, produzindo um aumento de radicais livres. Esta produção de radicais livres é capaz de causar uma saturação nos lipídeos de diversas áreas das regiões do cérebro resultando na lipoperoxidação, que causa alteração na fluidez da membrana e nas concentrações intracelulares de cálcio. Acredita-se que este aumento intracelular Ca^{2+} cause o rompimento das membranas (celular e mitocondrial) e, portanto seja a principal causa de morte celular (ORRENIUS & NICOTERA, 1994; CASALINO *et al.*, 1997).

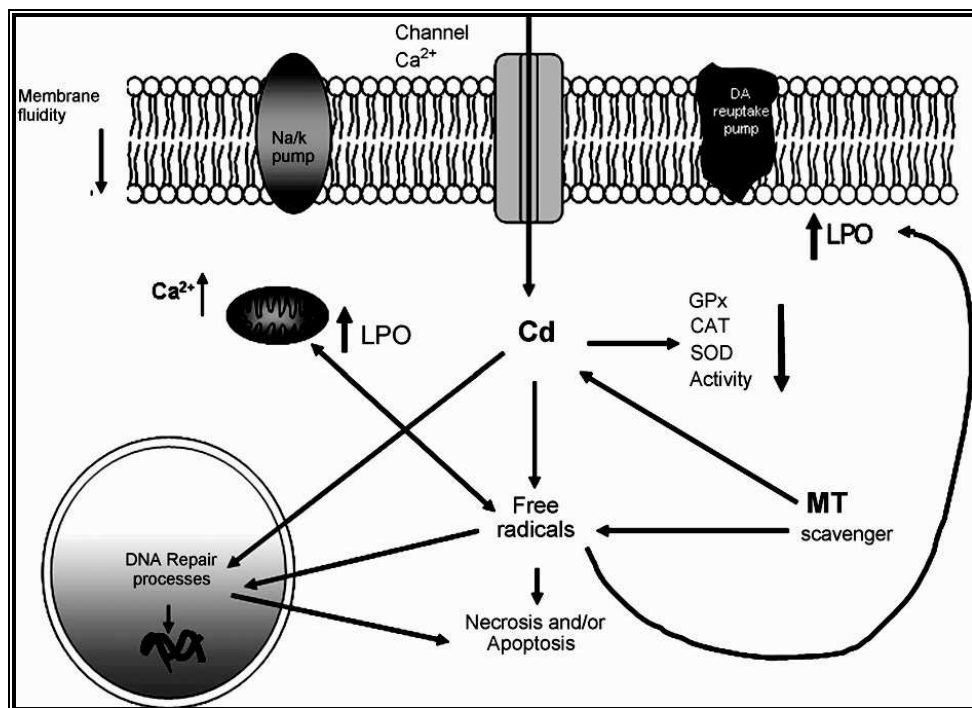


Figura 2: Efeito do Cd nos neurônios (MENDEZ-ARMENTA, 2007).

De acordo com Minami *et al.*, (2001), o Cd pode agir como uma neurotoxina ocasionando uma diminuição na liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) no espaço extracelular e aumentando a liberação de neurotransmissores inibitórios (glicina e GABA), sugerindo que este metal afeta o balanço de excitação-inibição na neurotransmissão sináptica.

Estudos *in vitro* e *ex vivo* relataram os efeitos do Cd na atividade da AChE em diferentes modelos experimentais, no entanto estes resultados são controversos e podem ser explicados de acordo com a dose, a via e a duração de administração de Cd (CARAGEORGIU *et al.*, 2004; LUCHESE *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2010). Em adição, um estudo demonstrou que a administração crônica de cloreto de cádmio (CdCl_2) levou a uma diminuição na atividade da AChE no hipocampo, no cerebelo e no hipotálamo de ratos (GONÇALVES *et al.*, 2010). Deste modo como resultado da inibição da AChE, o neurotransmissor ACh é menos hidrolisado nas sinapses acumulando-se na fenda sináptica e conseqüentemente, tal efeito pode levar a uma maior ativação dos receptores colinérgicos induzindo possíveis efeitos tóxicos no SNC (WALKER, 2001).

Além disso, sabe-se que metais pesados, incluindo o Cd, afetam as mitocôndrias assim como a síntese e a utilização de ATP, resultando em deficiência de energia dependente do transporte ativo de íons e absorção de neurotransmissores (RAJANNA *et al.*, 1990). Assim o Cd pode afetar a sinapse que é essencial para a neurotransmissão, e fornece a comunicação entre neurônios no SNC (VAWTER *et al.*, 2002).

Os sinaptossomas são estruturas artificiais, caracterizados como sacos membranosos, que contêm componentes sinápticos obtidos a partir de frações homogêneas de vesículas sinápticas (BAI & WITZMANN, 2007). A grande quantidade de mitocôndrias em sinaptossomas permite que haja a produção de ATP, uma molécula que ajuda nas atividades de comunicação celular e transdução de sinais. Portanto qualquer fator que afete negativamente a capacidade das mitocôndrias de gerar ATP é provável que tenha conseqüências negativas para o desenvolvimento e função cerebral (MILLAR *et al.*, 2005).

O córtex cerebral é uma estrutura complexa e corresponde à camada mais externa do encéfalo sendo rica em neurônios e o local do processamento neuronal mais sofisticado e distinto. Esta estrutura desempenha um papel central em muitas funções complexas associadas a linguagem, a percepção, a emoção, a cognição e a memória (BRODMANN, 1908; BYSTRON *et al.*, 2008).

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 (PATEL *et al.*, 2001). Os principais neurotransmissores que desempenham essas funções no SNC são a dopamina, o glutamato, a serotonina, a epinefrina, a norepinefrina e a acetilcolina (ACh) entre outros (EVERITT & ROBBINS, 1997; LOPES *et al.*, 1999).

O comprometimento da transmissão catecolaminérgica e serotoninérgica tem sido relatado em animais tratados com Cd (GUPTA *et al.*, 1993; ANTONIO *et al.*, 2003). Deste modo torna-se importante realizar estudos sobre a atividade de enzimas encefálicas como a AChE que é essencial para a detecção de efeitos neurotóxicos de certos metais pesados. Vários estudos já observaram que a produção de radicais livres poderia, estar associado com a diminuição na atividade desta enzima (TSAKIRIS *et al.*, 2000; LUCHESE *et al.*, 2007; PARI, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2010).

A AChE é uma enzima amplamente pesquisada devido a sua grande importância fisiológica e envolvimento em patologias neurodegenerativas. Alguns inibidores da sua atividade têm sido estudados com a finalidade de diminuir os efeitos hipocolinérgicos causados por tal atividade como no caso da doença de Alzheimer (DAS *et al.*, 2001). Entretanto uma diminuição além do esperado na atividade da AChE pode levar a um acúmulo do neurotransmissor ACh e conseqüentemente uma hiperatividade colinérgica, convulsão e estado de mal epiléptico (OLNEY *et al.*, 1986).

A ACh foi o primeira molécula a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudada nas sinapses do SNC. Esta molécula é considerada um mediador químico de sinapses no SNC e periférico, e também na junção neuromuscular (ZEE & LUITEN, 1999; BRUNEAU & AKAABOUNE, 2006). A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU & AKAABOUNE, 2006).

O sistema colinérgico realiza um dos mais importantes papéis modulatórios no SNC por desempenhar um papel fundamental na regulação de muitas funções vitais relacionadas ao comportamento, bem como o aprendizado e a memória, além de atuar na organização cortical do movimento e controlar o fluxo sanguíneo cerebral (PERRY *et al.*, 1999; MESULAM *et al.*, 2002). Os principais componentes que constituem este sistema são: a acetilcolina (ACh), a colina-acetiltransferase (ChAT), o transportador de colina (TCH), o transportador de acetilcolina vesicular (TACHV), os receptores de acetilcolina muscarínicos (AChRm) e os nicotínicos (AChRn) e a acetilcolinesterase (AChE) (KAWASHIMA & FUJII, 2000; SARTER & PARIKH, 2005).

A ChAT é a enzima responsável pela síntese da ACh na junção neuroefetora e ganglionar a partir de acetil-coenzima A, um produto do metabolismo celular, e da colina um importante produto do metabolismo dos lipídios da dieta (Figura 3) (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO *et al.*, 2002). Uma vez sintetizada a ACh é transportada pelo TACHV que armazena a ACh dentro de vesículas e liberam seu conteúdo por exocitose, após um influxo de cálcio no terminal nervoso. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage com os AChRm ou com os AChRn que são sensibilizados causando a despolarização e a propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005). A ACh que permanece na fenda é hidrolisada em acetato e colina pela enzima AChE,

presente na fenda sináptica evitando, assim, uma “super-estimulação” do neurônio pós-sináptico, modulando a neurotransmissão colinérgica (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005). A colina resultante da hidrólise é parte recaptada pelo TCH para o terminal pré-sináptico onde poderá ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh (MESULAM, *et al.*, 2002). Dentre todos estes componentes do sistema colinérgico supracitados, daremos ênfase a AChE, a qual é um dos alvos deste estudo.

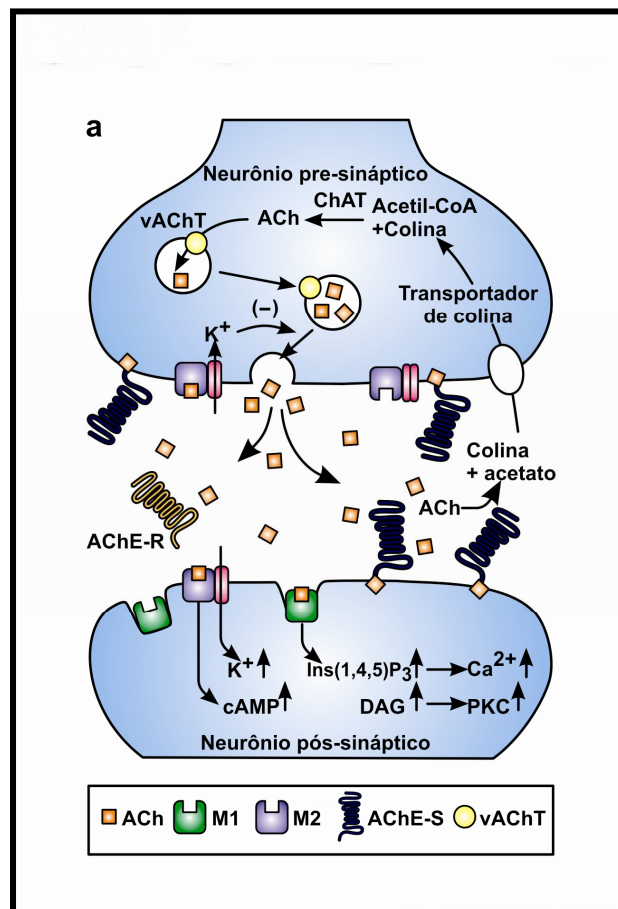


Figura 3: Esquema de uma sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (TACHV). Adaptado de Soreq & Seidman, (2001).

A AChE é uma glicoproteína globular predominantemente encontrada no encéfalo, na junção neuromuscular e nos eritrócitos (COKUGRAS, 2003). Pode ser classificada como uma enzima serina hidrolase regulatória a qual é extremamente

importante e que hidrolisa o neurotransmissor ACh em acetato e colina atuando no controle da hidrólise e da inativação da ACh. Deste modo a AChE modula a concentração de ACh tanto na sinapse colinérgica quanto na junção neuromuscular, finalizando assim a transmissão do impulso (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Esta enzima apresenta uma atividade muito versátil, podendo desempenhar os mais variados papéis no organismo, uma vez que o sistema colinérgico abrange todo o organismo. Já foi verificado que esta hidrolase pode desempenhar importantes papéis na adesão celular (JONHSON & MOORE, 1999), no crescimento dos neuritos (DAY & GREENFIEL, 2002), na regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, na osteogênese e na hematopoiese (SOREQ & SEIDMAN, 2001) além de provavelmente representar uma função na regulação das funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000). Assim, devido à sua onipresença no organismo, um dano na sua atividade poderia gerar efeitos irreparáveis em variadas funções metabólicas (MESULAN ET AL., 2002).

A AChE está presente em diversas formas moleculares no organismo, a globular e a assimétrica dependendo da sua conformação espacial (Figura 4). A forma globular apresenta-se como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas que aparecem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros originando, respectivamente, as seguintes formas globulares (G): G1, G2 e G4, sendo cada uma delas predominante em alguns tecidos. Outra classe de AChE é a forma assimétrica que apresenta-se como uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde a ligação através de pontes dissulfeto de uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois, ou três tetrâmeros catalíticos resultando nas formas estruturais assimétricas A4, A8 ou A12, respectivamente (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

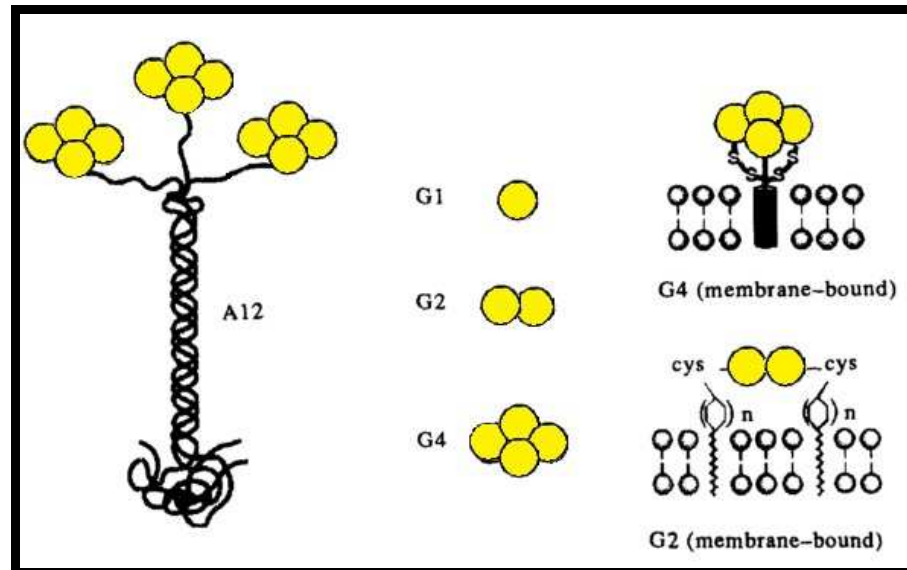


Figura 4: Isoformas da acetilcolinesterase. Adaptada de (SMALL, 1996).

Sabe-se que as formas globulares podem ser solúveis ou ancoradas à membrana por seqüências de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto que as formas assimétricas estão incluídas na matriz extracelular por uma cauda colagênica (ColQ) (ALDUNATE *et al.*, 2004). Entretanto todas essas formas apresentam uma alta taxa de hidrólise enzimática, de aproximadamente 5.000 moléculas de ACh/s (JÓSÊ *et al.*, 2009). As formas globulares encontram predominantemente no SNC, enquanto que as formas assimétricas são encontradas principalmente no SNP e no músculo (RAKONCZAY *et al.*, 2005). Além disso, a maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é principalmente do tipo G4, ligada à membrana (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu sítio ativo é encontrado no interior de um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*) a uma profundidade de 20 Å, alinhado com resíduos hidrofóbicos, os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (Figura 5) (JOHNSON & MOORE, 1999). Este sítio ativo consiste de dois subsítios de ligação. Um subsítio carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário [$N^+(CH_3)_3$] da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo uma tríade catalítica formada por serina 203, histidina 447 e glutamato 334, o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (TAYLOR & BROWN, 1999).

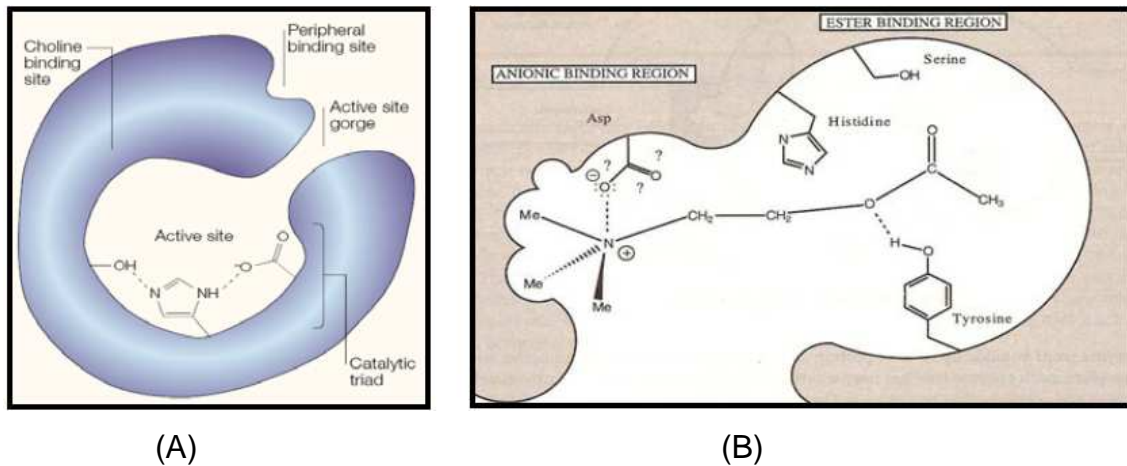


Figura 5: A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS) Adaptado de Soreq & Seidman (2001). B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE. Adaptado de Patric (2001).

Na borda ou superfície do gorge, cerca de 14 \AA do sítio ativo, situa-se um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site - PAS), o qual foi proposto com base na ligação de composto bi-quaternários (BOURNE *et al.*, 2005). Tem sido proposto que este sítio periférico possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES *et al.*, 2002; SILMAN & SUSSMAN, 2005). A ACh é hidrolisada a partir de sua ligação ao resíduo de serina no sítio ativo da enzima, formando o intermediário acetil-AChE, liberando colina. Em seqüência, há a hidrólise deste intermediário liberando acetato, e permitindo o “turnover” da enzima (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

Outro sistema que atualmente constitui um importante alvo de estudos devido ao seu papel em modular o SNC é o sistema purinérgico, que está envolvido em vários processos fisiológicos, como a neurotransmissão, a neuromodulação, o desenvolvimento do encéfalo, e o reparo neuronal (NORTH, 2002). A sinalização purinérgica é caracterizada como uma via de sinalização importante para diferentes tecidos, sendo capaz de desencadear múltiplos efeitos celulares (BURNSTOCK, 2006; ROBSON *et al.*, 2006; Schetinger *et al.*, 2007).

Estas ações são mediadas principalmente pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina extracelulares, pelos receptores através dos quais estes nucleotídeos exercem seus efeitos e pelas ectoenzimas (YEGUTKIN, 2008). Neste contexto

daremos ênfase às ectoenzimas as quais são alvo do nosso estudo e são responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas.

Os nucleotídeos extracelulares de adenina a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina difosfato (ADP), e o nucleosídeo adenosina (ADO) são considerados importantes moléculas sinalizadoras, mediando seus efeitos através de receptores purinérgicos localizados na superfície celular (Illes & RIBEIRO, 2004). Em condições fisiológicas, os nucleotídeos estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações, normalmente em quantidades nanomolares, podendo chegar até a quantidades micromolares em determinadas situações (DI VIRGILIO, 2001). As concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina são influenciadas por vários fatores, tais como: secreção e/ou lise celulares, efeito da diluição no espaço extracelular e pela ação catalítica das ecto-nucleotidases (RATHBONE *et al.*, 1999; MALMSJO *et al.*, 2000).

O papel da molécula ATP como uma molécula energética tem sido bem estabelecido por muitos anos. Entretanto, os nucleotídeos também são conhecidos por existir no meio extracelular e, tem sido demonstrado que o ATP e seus metabólitos extracelulares têm uma grande variedade de papéis fisiológicos em diversas células e tecidos (BURNSTOCK, 2006). O ATP é considerado um importante neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas podendo ser também co-liberado juntamente com outros neurotransmissores tais como o glutamato, a noradrenalina e ACh através das vesículas pré-sinápticas dependentes de cálcio. Na sinapse neuromuscular o ATP é degradado até adenosina pela ação das ecto-nucleotidases (LING *et al.*, 2005; BURNSTOCK, 2006). Deste modo, o ATP modula a liberação de ACh através de seu metabólito adenosina e também pela presença de receptores P2X e P2Y na sinapse neuromuscular (DE LORENZO *et al.*, 2006). Dias-Hernández *et al.*, (2002) demonstraram que os receptores de nucleotídeos ionotrópicos estão presentes nos terminais colinérgicos possuindo a capacidade de induzir a liberação de ACh sinaptossomal sugerindo que os receptores nucleotídicos podem co-existir e interagir com receptores nicotínicos no mesmo terminal.

A adenosina tem um papel relevante na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós sinapticamente (CUNHA, 2001; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003). A regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios por esta molécula tem se tornado

importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade destes neurotransmissores, exercendo assim uma ação protetora no SNC (ZIMMERMANN *et al.*, 1998; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

Outras ações dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina no sistema nervoso têm sido relatadas além das propriedades neurotransmissoras e neuromoduladoras clássicas. Estas moléculas são reconhecidas por estarem envolvidas também na formação e regulação da sinaptogênese, plasticidade neuronal, proliferação de células gliais, e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (RATHBONE *et al.*, 1999; FIELDS & STEVENS, 2000; CICARELLI *et al.*, 2001; STEVENS *et al.*, 2002; WINK *et al.*, 2003; AGRETI *et al.*, 2005).

Os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e a conseqüente sinalização purinérgica por eles induzida através dos receptores são regulados através de uma variedade de enzimas localizadas na superfície celular ou solúveis no meio intersticial, denominadas ecto-nucleotidases (ZIMMERMANN *et al.*, 2007). Este conjunto de enzimas inclui a família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), a família das E-NPPs (ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), as fosfatases alcalinas, a ecto-5'-nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA) (ROBSON *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008). Dentre estas daremos destaque as E-NTPDases (apirase, CD39, ATP difosfohidrolase), a 5'-nucleotidase e a ADA, enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP, AMP e adenosina a seus receptores específicos.

Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise de ATP e do ADP formando AMP (ZIMMERMANN *et al.*, 2007). A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando a adenosina, a qual posteriormente sofre desaminação pela ação da ADA formando a inosina seu metabólito inativo (INO) (Figura 6) (YEGUTKIN, 2008).

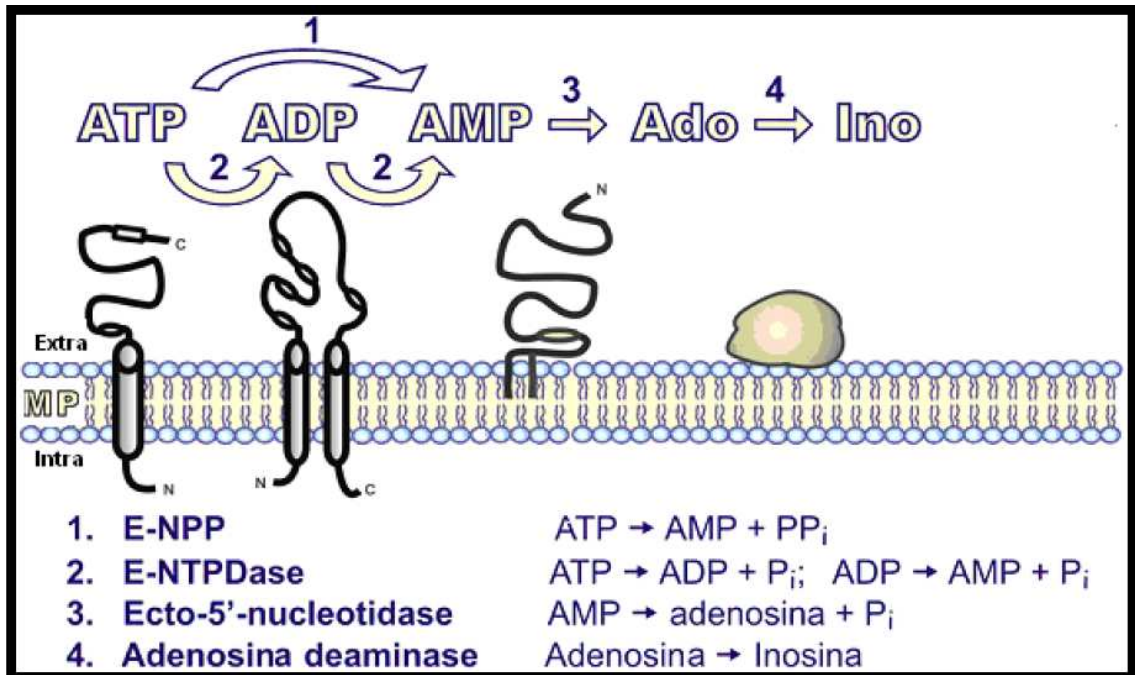


Figura 6: Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008).

E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) é o termo genérico para designar uma família de enzimas presentes na membrana plasmática de diversos tecidos, que catalisam a hidrólise de nucleotídeos di e trifosfatos até suas formas monofosfato (ZIMMERMANN, 2007). Atualmente oito membros da família das E-NTPDases já foram identificadas (Figura 7), as quais são denominadas E-NTPDases 1-8 e diferem entre si quanto à especificidade ao substrato (NDP ou NTP) e a cátions divalentes (ROBSON *et al.*, 2006).

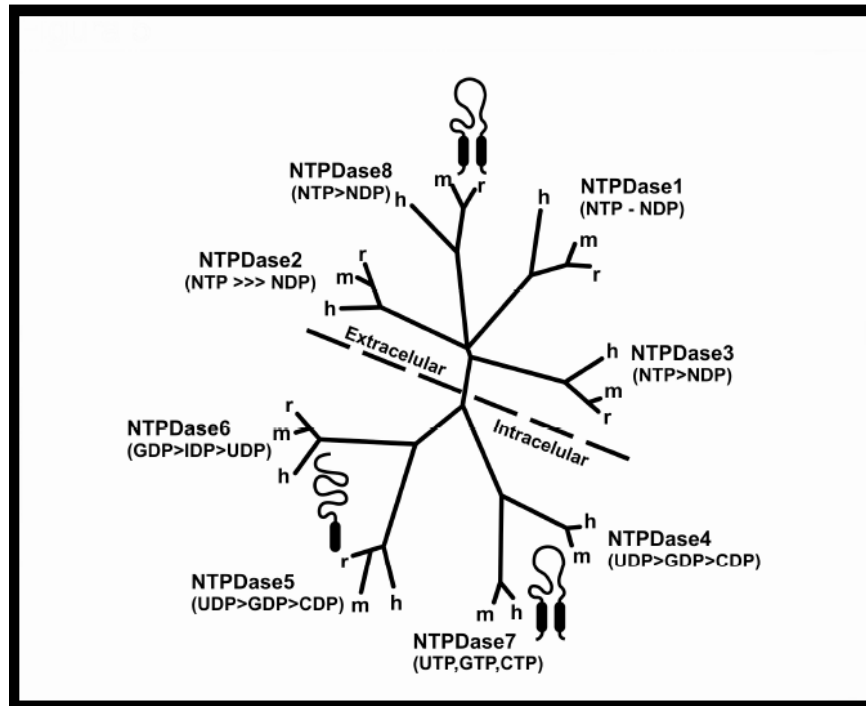


Figura 7: Membros da família da E-NTPDase (Robson *et al.*, 2006).

A NTPDase 1 degrada o ATP e ADP em iguais proporções (1:1), diferindo da NTPDase 2 que hidrolisa preferencialmente o ATP (BALZ *et al.*, 2003). As NTPDases 3 e 8, por sua vez apresentam uma preferência maior pelo substrato ATP em relação ao ADP (ROBSON *et al.*, 2006). Além disso, ao contrário da NTPDase 1 e 2, as NTPDases 3 e 8 são preferencialmente ativadas pelo Ca^{2+} em relação ao Mg^{2+} (BIGONNESSE *et al.*, 2004; LAVOIE *et al.*, 2004; VORHOFF *et al.*, 2004). Estas diferenças entre os subtipos nas propriedades catalíticas podem ser devidas a diferenças na seqüência de aminoácidos, como também nas estruturas secundária, terciária e quaternária das enzimas (GRINTHAL & GUIDOTTI, 2004).

Além das diferenças quanto à preferência a substratos e a cátions divalentes, estas enzimas apresentam diferenças quanto à distribuição tecidual e localização celular. Um grupo de E-NTPDases (NTPDase 1, 2, 3, 8) estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular. Outro grupo é composto pelas enzimas NTPDase 4, 5, 6 e 7 e caracterizam-se por apresentar localização intracelular (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON *et al.*, 2006).

Têm sido relatado que a E-NTPDase é expressa em sinaptossomas isolados, bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos (BATTASTINI *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 2007). Estudos imunoistoquímicos têm

demonstrado que esta enzima é amplamente distribuída no encéfalo de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e células endoteliais (WANG & GUIDOTTI, 1998).

A NTPDase 1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, Ecto/CD39), foi a primeira enzima da família E-NTPDase a ser descrita e já foi identificada em uma ampla variedade de organismos tais como: protozoários, plantas, invertebrados, peixes, aves, ratos e humanos (ANICH *et al.*, 1990; VASCONCELOS *et al.*, 1993; FRASSETO *et al.*, 1995; MATOS *et al.*, 2001; SCHETINGER *et al.*, 2001; RICO *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2005). Está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 7). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ZIMMERMANN, 2001).

Já a ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína ancorada à membrana plasmática via uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 8). Por outro lado, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER *et al.*, 2005). Esta enzima é amplamente encontrada em uma variedade de tecidos como rins, fígado, encéfalo, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN *et al.*, 2006).

A reação catalisada pela ecto 5'-nucleotidase é a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP a seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). No entanto, foi demonstrado que a 5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN *et al.*, 1998; ZIMMERMANN, 2001). Em adição, a função da 5'-nucleotidase correlaciona-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina um importante neuroprotetor. Entretanto, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, a neuromodulação e neuroproteção do sistema nervoso (ZIMMERMANN *et al.*, 1998; KAWASHIMA *et al.*, 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001). A ecto-5'-nucleotidase no SNC está transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (SCHOEN & KREUTZBERG, 1994; BRAUN *et al.*, 1995).

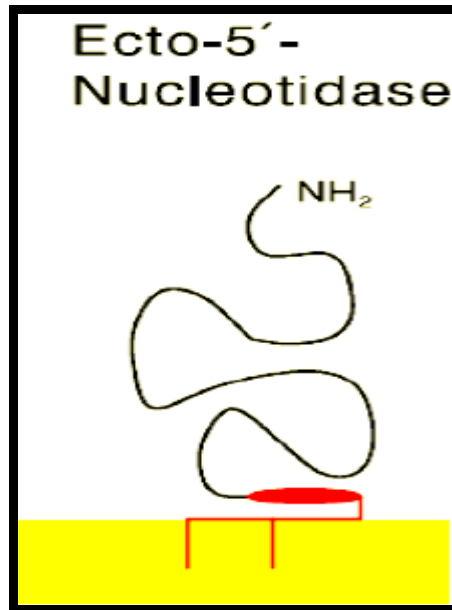


Figura 8: Estrutura da ecto 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

Vários estudos tem demonstrado a importância das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase no processo de neurotransmissão em diferentes patologias (LUNKES *et al.*, 2004; SPANEVELLO *et al.*, 2005). KAIZER *et al.*, (2007) encontrou um aumento na atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase em frações sinaptossomais do córtex cerebral e hipocampo em ratos tratados com alumínio, sugerindo que este aumento seja um mecanismo adaptativo a fim de reduzir os níveis de ATP e aumentar os níveis de adenosina no meio.

A enzima adenosina desaminase (ADA) também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (YEGUTKIN, 2008). Portanto é responsável por realizar a desaminação da adenosina (ADO) com conseqüente produção de inosina (INO), seu metabolito inativo, regulando assim, as concentrações extracelulares deste nucleosídeo (FREDHOLM *et al.*, 2005). A ADO pode ser sintetizada tanto no meio intra quanto extracelular cujas ações são exercidas através de um grupo de receptores metabotrópicos classificados como: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, sendo que a maioria do conhecimento sobre a distribuição e funcionalidade dos purinoreceptores P1 corresponde a estudos referentes aos receptores A₁ e A_{2A} (FREDHOLM *et al.*, 2001;

BURNSTOCK, 2006). A ADO tem um papel importante na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós sinapticamente (CUNHA, 2001; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; RIBEIRO, *et al.*, 2003). A regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios por esta molécula tem se tornado importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade destes neurotransmissores, exercendo assim uma ação protetora no SNC (ZIMMERMANN *et al.*, 1998; DUNWIDDIE & MASINO, 2001). Entretanto apesar de seus efeitos modulatórios, a adenosina não é considerada um neurotransmissor, pois não há indícios de que é armazenada em vesículas sinápticas (DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

Por outro lado, o interesse pela prevenção e cura de doenças através da alimentação vem aumentando a cada dia, e cada vez com mais embasamento científico. Neste contexto, um crescente número de estudos epidemiológicos tem associado o consumo de compostos flavonóides a uma variedade de efeitos benéficos para a saúde, portanto além da atuação antioxidante, já foi descrito que estes compostos possuem, ainda, diversas propriedades farmacológicas, tais como: propriedade anticarcinogênica, vasodilatadora, anti-inflamatória, imunoestimulante, antialérgica, vasoprotetora, neuroprotetora, entre outras (COOK & SAMMAN 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; MIDDLETON *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; KANG *et al.*, 2005).

Estudos vêm sendo realizados na tentativa de reverter ou minimizar os efeitos causados pelo Cd principalmente os danos relacionados a neurotoxicidade uma vez que este metal tem a capacidade de acumular-se no SNC. Deste modo, o uso de compostos naturais provenientes da dieta como os flavonóides vem sendo amplamente estudados (FANG *et al.*, 2002; MARTIN, 2004; MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2010).

Os flavonóides são uma classe de compostos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares (NIJVELDT, 2001). Apesar de apresentarem diferenças estruturais, todos incluídos nesta classe, apresentam uma organização genérica composta por 15 átomos de carbono reunidos em um núcleo fundamental tricíclico, ou seja, consistem de um esqueleto de difenil propano (C6C3C6) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 9) (AHLENSTIEL, 2003). A estimativa é e que existe em torno de 8.000 variedades de flavonóides, sendo que a estrutura de cada um a partir de seu núcleo fundamental é

o que permite classificá-los em: antocianidina, flavanóis, flavanona, flavonas, flavonóis e isoflavonas (Tabela 1) (RICE-EVANS *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2004).

Estes compostos não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e, portanto devem ser adquiridos através da alimentação, deste modo, compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural (MIDDLETON *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; KANG *et al.*, 2005).

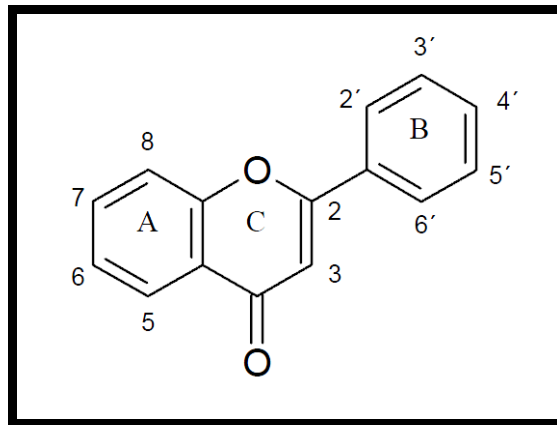


Figura 9: Núcleo genérico de um flavonóide. Os anéis A e B são aromáticos e o anel C é um heterociclo (COOK & SAMMMAN, 1996).

Os flavonóides são considerados substâncias lipo e hidrossolúveis, sendo encontrados em forma livre de açúcares, mais apolares, e em formas glicosiladas, mais polares (BRAVO,1998). A maioria deles se apresenta na forma glicosilada, sendo mais comumente encontrados os carboidratos D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose ligados principalmente na posição 3 (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Sabe-se que a forma intacta glicosilada é dificilmente absorvida no intestino delgado devido ao favorecimento da sua hidrofiliçidade (CRESPY, 1999).

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)

Os flavonóides são encontrados em frutas, legumes, vegetais, açúcares, grãos, vinho tinto, chás de ervas, café e chocolate (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000; AHERNE & O'BRIEN, 2002). De acordo com Pierpoint (1986) o teor de flavonóides em alimentos consumidos diariamente é: 44 mg em cereais, 79 mg em batatas, 45 mg em grãos e nozes e 162 mg em vegetais e ervas. A maior parte dos flavonóides consumidos, aproximadamente 420 mg/dia, provém do cacau, da cola, do café, do chá preto, da cerveja e do vinho, com um adicional de 290 mg/dia provenientes de frutas e sucos.

O metabolismo dos flavonóides é amplamente conhecido em animais, 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 (MIDDLETON *et al.*, 2000; MUROTA, 2003).

Os flavonóides são moléculas especialmente grandes e passam por um processo de quebra, auxiliados por enterobactérias, liberando a aglicona, uma molécula que pode ser absorvida com maior facilidade pelas células epiteliais do intestino grosso devido a sua lipofilicidade (HOLLMAN & KATAN, 1999; MIDDLETON *et al.*, 2000; HAVSTEEN, 2002; MUROTA, 2003; BHATIA & JAIN, 2004). Após passarem pelo trato digestivo, estas moléculas migram pela corrente sanguínea até o fígado onde são submetidos a metilação, glucoronidação e/ ou sulfatação e, por fim, encontram-se livres no sangue. 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 (YAO *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm apontado a capacidade dos flavonóides em atravessar a BHE através da quantificação dos mesmos no SNC (MÉNDEZ-ARMENTA *et al.*, 2001; MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007). Sabe-se que a BHE possui certa seletividade quanto à passagem de moléculas polares e também de moléculas grandes como polímeros. Entretanto já foi registrada a presença de catequinas, antocianidinas, naringeninas, hesperetina, quercetina, rutina, dentre outros flavonóides e derivados, no encéfalo de roedores que receberam oralmente estes compostos (YOU DIM *et al.*, 2003).

O efeito neuroprotetor dos flavonóides foi evidenciado em vários estudos que demonstraram que estes compostos protegem as células neuronais da morte celular em modelos animais de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a isquemia cerebral unilateral ou global e ainda, em modelos de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (ARUOMA *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2005; MANDEL *et al.*, 2005).

Outros estudos tem demonstrado os efeitos benéficos dos flavonóides no SNC, atuando como neuroprotetores, principalmente através da redução das EROs, bem como, evitando a neurotoxicidade de demais substâncias e agindo pela modulação de atividades de enzimas como as ectonucleotidasas e a AChE (SCHMATZ *et al.*, 2009a; SCHMATZ *et al.*, 2009b; GONÇALVES *et al.*, 2010).

Dentre todos os flavonóides destaca-se um em especial: a quercetina (Querc) a qual é considerada um dos compostos flavonóides (3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona) mais abundantes sendo encontrados em frutas, legumes e vegetais (Figura 10). Também é um dos componentes mais conhecidos na *Ginkgo biloba* e na erva de São João (*Hypericum perforatum*). (PRIOR, 2003; WILLIANS *et al.*, 2004). Acredita-se que a cebola (284-486 mg/kg), a maçã (21-72 mg/kg) e o brócolis (30mg/Kg) são as fontes majoritárias de Querc (HERTOG *et al.*, 1993; Murota, 2003).

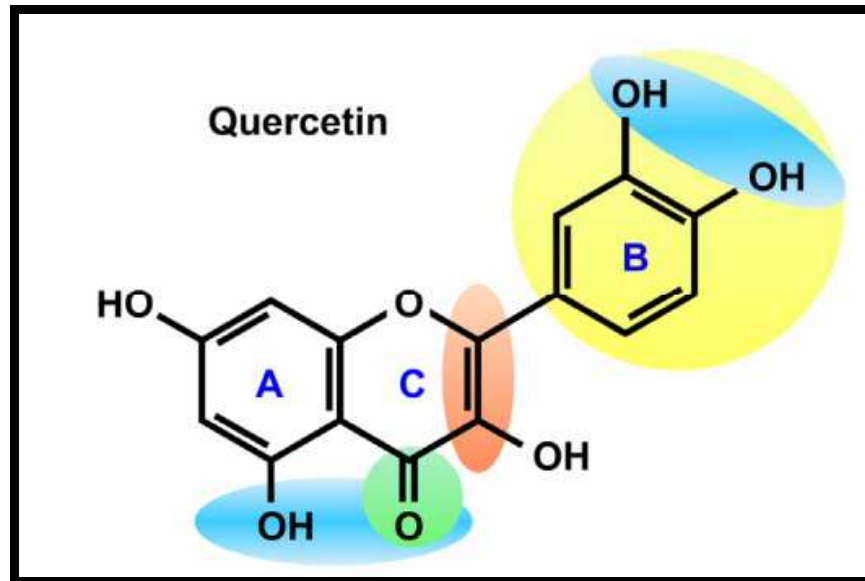


Figura 10. Estrutura do flavonóide Quercetina. Destaque para as estruturas envolvidas na sua atividade farmacológica e antioxidante. O grupamento mais importante é o catecol (amarelo) outros grupamentos importantes: presença de insaturação no anel C (vermelho), presença de função 4-oxo no anel C (verde). O grupo catecol e as outras funções (azul) possuem a habilidade em quelar metais de transição como o cobre e o ferro. (Adaptado de Spencer *et al.*, 2003).

A Querc possui baixa toxicidade e a estimativa calculada de ingestão por indivíduo é de aproximadamente 25mg/dia (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1992; COOK & SAMMAN, 1996; CHOI *et al.*, 2003). É um composto facilmente absorvido por pequenas células intestinais onde sofre hidrólise para posteriormente entrar na corrente sanguínea e seus metabólitos não utilizáveis ser excretados pela urina. Uma vez atingido a corrente sanguínea, este 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 (MURATA & TERAOKA, 2003; MANACH *et al.*, 2005).

Pesquisas têm descrito várias aplicações terapêuticas da Querc incluindo atividade antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica, vasoprotetora e neuroprotetora (COOK & SAMMAN 1996; CHOI *et al.*, 2003). Em muitas situações, estas ações provavelmente envolvem sua propriedade antioxidante (PRIOR, 2003), a qual pode ser explicada por sua participação em inibir enzimas como a ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase que estão envolvidas na citotoxicidade oxidativa (KAHRAMAN, 2003).

A ação da Querc no SNC tem sido relatada em diferentes estudos demonstrando que a mesma exerce uma ação neuroprotetora. PU *et al.*, 2007 observaram uma ação protetora da Querc em testes de memória espacial e a redução da morte neuronal em ratos. Existem também registros da ação protetora da Querc na discinesia orofacial induzida por tratamento crônico com neurolépticos (haloperidol) (NAIDU *et al.*, 2003), no modelo de isquemia (SARKAR & DAS 2006), em insultos por privação de glicose e oxigênio (HA *et al.*, 2003) e na injúria de células corticais causada por EROs (HA *et al.*, 2003).

Neste contexto, tendo em vista os inúmeros efeitos benéficos da Querc torna-se relevante avaliar se o tratamento com este composto pode prevenir os efeitos tóxicos induzidos pelo Cd através da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina e adenosina assim como a atividade da acetilcolinesterase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos adultos expostos oralmente ao Cd e tratados com diferentes doses de Querc. Este estudo também visa avaliar o potencial uso terapêutico da Querc com o intuito de beneficiar pacientes submetidos a exposição pelo Cd.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade das enzimas que degradam nucleotídeos de adenina e ésteres de colina em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao cádmio e tratados com diferentes doses de quercetina.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar *ex vivo* a atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao Cd e tratados com diferentes doses de Querc;
- Analisar *ex vivo* a atividade da AChE em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos expostos ao Cd e tratados com diferentes doses de Querc;
- Investigar o efeito *in vitro* da Querc sobre a atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em sinaptossomas do córtex cerebral de ratos;
- Avaliar o efeito *in vitro* da Querc sobre a atividade da AChE em sinaptossoma do córtex de ratos.

3. MANUSCRITO

3.1 Manuscrito 1:

Efeito neuroprotetor da quercetina no sistema purinérgico e colinérgico de ratos expostos ao cádmio

Neuroprotective effect of quercetin in the purinergic and cholinergic system of rats exposed to cadmium

Fátima Husein Abdalla¹, Luciane Belmonte Pereira^{1*}, Roberta Schmatz¹, Andréia Machado Cardoso¹, Naiara Stefanello¹, Amanda Maino Fiorenza¹, Jessié Gutierrez¹, Jonas Daci da Silva Serres¹, Daniela Zanin¹, Victor Camera Pimentel¹, Jamile Fabbrin Gonçalves², Juliano Vieira March¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera Maria Morsch¹, Cinthia Melazzo Mazzanti^{3*}.

Submetido à revista Biometals

**Neuroprotective effect of quercetin in the purinergic and cholinergic system
after cadmium intoxication**

Fátima Husein Abdalla¹, Luciane Belmonte Pereira^{1*}, Roberta Schmatz¹, Andréia Machado Cardoso¹, Naiara Stefanello¹, Amanda Maino Fiorenza¹, Jessié Gutierrez¹, Jonas Daci da Silva Serres¹, Daniela Zanin¹, Victor Camera Pimentel¹, Jamile Fabbrin Gonçalves², Juliano Vieira March¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera Maria Morsch¹, Cinthia Melazzo Mazzanti^{3*}.

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Setor de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding Author:

E-mail address: cmelazzomazzanti@gmail.com

Fax: +55-55-3220-8814

E-mail address: lubiors@yahoo.com.br

Fax: +55-55-3220-8978

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effects of Quercetin (Querc), an important neuroprotective compound, on the purinergic and cholinergic system in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats orally exposed to Cadmium (Cd) for 45 days. The animals were divided into eight groups: saline/ethanol 25%, saline/Querc 5 mg/kg, saline/Querc 25 mg/kg, saline/Querc 50 mg/kg, Cd/ethanol 25%, Cd/Querc 5 mg/kg, Cd/Querc 25 mg/kg, and Cd/Querc 50 mg/kg. Results showed that the hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and adenosine deaminase (ADA) activity in Cd/ethanol group increased compared to the saline/ethanol group. The treatment with all doses of Querc prevented the increase in the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP as well as the ADA activity. *In vitro* assay with Querc showed a decrease in the activities of these enzymes in 25 and 50 μM except of ADA. The Acetylcholinesterase (AChE) activity *ex vivo* was not significantly different in the Cd/ethanol group compared to the saline/ethanol group. The treatment with Cd/Querc 25 and 50 mg/kg significantly decreased the AChE activity compared to the Cd/ethanol group, while in the *in vitro* assay the activity of these enzymes was decreased only in the concentrations of 100 and 200 μM . Querc is likely to interfere in the activities of these enzymes and this flavonoid is a promising compound that can be clinically investigated in order to be used in alternative therapies for the treatment of neurodegenerative diseases or in brain disorders associated with the intoxication for heavy metal poisoning.

Keywords: Purinergic system, Acetylcholinesterase, Cadmium, Quercetin

1 Introduction

Cadmium (Cd) is one of the most environmentally abundant and distributed toxic metal that affects many organs of the body. This wide distribution has led to an increased interest in its toxicity and biological effects (Thevenod 2003). Cd is present as an industrial pollutant as food contaminant and as one of the major constituents of cigarette smoke (Godt et al. 2006). Environmental and occupational exposure to Cd has been associated with clinical manifestations such as renal dysfunction, bone diseases (Jarup et al. 2000), cardiovascular diseases (Carroll 1966), cancers (Jarup et al. 1998), and toxicity in the central nervous system (CNS) (Gonçalves et al. 2010).

The CNS is protected from many potential toxicants through an anatomically defined barrier called the blood–brain barrier (BBB). Cd can penetrate the BBB and accumulate in the brain (Méndez-Armenta and Ríos 2007). Recent studies have investigated the influence of Cd on the synaptic neurotransmission in animal brain (Luchese et al. 2007; Minami et al. 2001).

The cholinergic system plays an important role in many functions of both the CNS and peripheral nervous system. Acetylcholine (ACh) is the main neurotransmitter of cholinergic system playing vital functions such as learning, memory, movement control, and modulation of cerebral blood flow (Kiehn 2006; Mesulam et al. 2002). ACh levels are regulated by cholinesterases capable of hydrolyzing this neurotransmitter in many tissues. Acetylcholinesterase (AChE) is one of these enzymes, which is membrane-bound and can be found mainly in the brain, muscles, erythrocytes, lymphocytes, and cholinergic neurons (Kawashima and Fujii 2003; Schetinger et al. 2000), hydrolyzing esters with acetyl groups. AChE has been reported as an enzyme that responds to different levels of injury to the organism, altering its activity regarding oxidative stress and intoxication for Cd, for instance (Kawashima and Fujii 2003; Méndez-Armenta and Ríos 2007; Schetinger et al. 2000).

Another important resource of regulation in CNS is the purinergic system that is involved in various physiological processes such as neurotransmission, neuromodulation, development, and neuronal repair (North 2002). These actions are mediated primarily by adenine nucleotides and nucleosides such as adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate

(AMP), and adenosine (Hunsucker et al. 2005; Yegutikin et al. 2002). ATP is a molecule released from nerve terminals of different brain areas including synaptosomes. This molecule can be rapidly hydrolyzed to adenosine at brain synapses which in turn activates pre or postsynaptic receptors, by modulating neuronal transmission (Cunha and Ribeiro 2000). However, it is clear that adenosine plays different roles such as an intercellular messenger. This is the case of the brain, which expresses high concentrations of adenosine receptors involved in many processes, including regulation of sleep, excitement, neuroprotection, and epilepsy (Dunwiddie and Masino 2001).

To regulate the hydrolysis of extracellular ATP into adenosine, important enzymes, called ectonucleotidases, such as NTPDase and 5'-nucleotidase (Zimmermann 2001), are necessary. The ectonucleotidase cascade is initiated by NTPDase that hydrolyzes ATP and ADP as well as another nucleoside di- and triphosphate generating extracellular AMP. The enzyme ecto-5'-nucleotidase catalyzes the hydrolysis of AMP leading to the production of adenosine, which is irreversibly converted by the enzyme adenosine deaminase, forming inosine (Resta et al. 1998; Robson 1996; Zimmermann 1992). Studies in our laboratory showed that this cascade is altered in several pathological conditions such as multiple sclerosis models (Mazzanti et al. 2007), as well as in patients with multiple sclerosis (Spanevello et al. 2010), diabetes mellitus (Schmatz et al. 2009), and aluminum intoxication (Kaizer et al. 2010).

The molecular mechanisms of Cd toxicity are not yet well defined. However, the oxidative effect of Cd is indirect and based mainly on the depletion of sulphhydryl (SH)-group-containing compounds (Rikans and Yamano 2000). Thus, one of the possible damages of Cd toxicity is the indirect production of reactive oxygen species (ROS) (Galan et al. 2001). Considering the relationship between Cd exposure and oxidative stress caused by this metal, the administration of antioxidant compounds can have an important role in the therapeutic of Cd intoxication.

Thus, the study of flavonoids that are polyphenolic compounds distributed in fruits, vegetables, wine, and medicinal plants is very relevant. These compounds have been recognized for having interesting clinical properties (Croft 1998). The average daily intake of this flavonoid in the occidental diet is about 23 mg/day, and Querc is one of the most abundant, representing about 60%-75% of the polyphenol ingestion (Goldberg et al. 1995; Sampson et al. 2002). Querc is widely distributed in

a variety of vegetables and fruits which are regularly consumed in our diet, helping to combat a host of disorders, asthma, cancer, and heart disease (Molina et al. 2003). In addition, Querc has many therapeutic applications highlighting the antioxidant, antithrombotic and neuroprotective activities (Chen et al. 1996; Choi et al. 2003; Lu et al. 2006).

Considering that Querc is a flavonoid ubiquitous in the vegetable kingdom and presents several therapeutic properties including mainly antioxidant and neuroprotective role, and that Cd can accumulate in the brain and cause damage to the CNS, the objective of this work was to evaluate the effect of the Querc in different doses in the activity of important enzymes of CNS from adult rats orally exposed to Cd.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Acetylthiocholine iodide, Percoll, HEPES, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, Nucleotides, Trizma, Querc, and Cd chloride (CdCl_2) 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 (70-90 days; 220-300 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 031/2011).

2.3 Experimental procedure ex vivo

Cd is derived primarily from the ingestion of food and water contaminated with Cd. CdCl_2 is the principal form of Cd associated with oral exposure since it is highly soluble in water (Zalups and Ahmad 2003). Thus, in the present study the rats

received by oral administration: Cd as CdCl₂ dissolved in saline (Cd 2.5 mg/kg) (Santos et al. 2004) and Querc dissolved in ethanol 25 % (vehicle) at doses of 5, 25, and 50 mg/kg (Choi et al. 2003; Lu et al. 2006; Nagy and Delgado-Escueta 1984) five days a week for 45 days. Animals were randomly divided into eight groups of 10 - 12 animals each: saline/ethanol, saline/Querc 5 mg/kg, saline/Querc 25 mg/kg, saline/Querc 50 mg/kg, Cd/ethanol 25%, Cd/Querc 5 mg/kg, Cd/Querc 25 mg/kg, and Cd/Querc 50 mg/kg.

Querc was administered 30 min after Cd. The solutions were freshly prepared; Cd was diluted in saline and the Querc in ethanol 25% and both were administered (1 mL/kg) between 9 and 11 a.m. After the treatment period, animals were first submitted to the euthanasia being previously anesthetized with halothane; the cerebral cortex then was collected for the subsequent enzymatic assay.

It is important to note that controls for all *ex vivo* tests were performed to correct for vehicle (ethanol) interference. No differences between vehicle and control activities were observed (data not shown).

2.4 Preparation of samples and enzyme assays

2.4.1 Sample preparation for assay

Firstly, the brain was dissected in cerebral cortex, which was homogenized in Medium I buffer pH 7.5. Synaptosomes were prepared as described by Nagy & Delgado Escueta (1984) using a discontinuous Percoll gradient. The synaptosomal preparation is considered feasible when there is a break below 10%. The pellet was resuspended in an isosmotic 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.

2.4.2 Assay of the enzyme AChE in synaptosomes from cerebral cortex

AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex was determined spectrophotometrically by the modified method of Ellman et al. (1961), as previously described Rocha et al. (1993). The AChE activity was measured by the increase of the absorbance of 412 nm.

In vitro, the variable Querc concentrations were added to a final volume of 2 mL, immediately before incubation at 25⁰C. The absorbance was read on a

spectrophotometer at 412 nm and the specific activity was expressed in $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

2.4.3 Ectonucleotidase activity in synaptosomes from cerebral cortex

The activity of NTPDase was determined according to Schetinger et al. (2000), where as the 5'-nucleotidase activity was determined by the method of Heymann et al. (1984). The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5mM KCl, 1.5mM CaCl_2 , 0.1mM EDTA, 10mM glucose, 225mM sucrose and 45mM Tris - HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 μl as described in a previous study from our laboratory (Schetinger et al. 2000). The 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10mM MgSO_4 and 100mM Tris - HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 μl . Synaptosomes were pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP (1.0 mM) or AMP (2.0 mM) and incubation time was 20 min. In all cases the reaction was stopped with 200 μl of trichloroacetic acid and the release of inorganic phosphate was measured by the method of Chan *et al.* (1986).

In vitro, the variable Querc concentrations were added to a final volume of 200 μL . The samples were chilled on ice for 10 min before assaying for the release of inorganic phosphate (P_i) as described by Chan et al. (1986), using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls with the addition of the enzyme preparation after the addition of TCA were used to correct for non-enzymatic hydrolysis of the substrate. All samples were carried out in triplicate and enzyme activity was reported as nmol P_i released/min/mg protein.

2.2.4 Adenosine Deaminase (ADA) activity in synaptosomes from cerebral cortex

The ADA activity was assessed according to the colorimetric method of Giusti and Gakis (1974), which is to quantify spectrophotometrically the amount of complexes of ammonia released per minute, from the degradation of adenosine.

In vitro, the variable Querc concentrations were added to a final volume of 525 μL to the reaction (37°C) at the same time of the addition of the enzyme (*synaptosomes*). The activity of ADA was expressed in ADA/UL.

2.2.5 *In vitro* experiments

To evaluate the effect of Querc in nucleotide hydrolysis *in synaptosomes* from cerebral cortex, *in vitro* experiments were performed using different concentrations of Querc (in 1, 5, 10, 25, 50 μM) diluted in methanol in the presence of ATP, ADP, and AMP as substrate with the incubation medium as described above. The same concentrations of Querc were used by ADA activity. In order to evaluate the effect of Querc in the AChE activity in *synaptosomes* from cerebral cortex, the *in vitro* experiments were performed using 10, 25, 50, 75, 100, and 200 μM of Querc diluted in methanol. The final concentrations of methanol, when tested alone in the incubation medium, did not affect the enzyme activity. All the other procedures for enzymatic assays were the same as those described above.

2.3 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.4 Statistical Analysis

The statistical analysis used was one-way ANOVA or Two-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. All data were expressed as mean \pm SEM.

3 Results

3.1 AChE activity

The results obtained for AChE activity in cerebral cortex synaptosomes *in vitro* are shown in Figure 1a. As can be observed, the AChE activity was significantly decreased ($P < 0.05$) in the concentrations of 100 and 200 μM (40% and 73%, respectively) when compared with the control group. The results obtained for the AChE activity in cerebral cortex synaptosomes *ex vivo* were basically similar to those found for *in vitro*. *Ex vivo* Cd/ethanol group showed no significant difference for the AChE activity in cerebral cortex synaptosomes when compared with the saline/ethanol group (Fig. 1b). However, the treatment with Querc in the doses of 25

and 50mg/kg significantly decreased (25% and 50%, respectively) ($P < 0.05$) when compared with the Cd/ethanol group.

3.2 NTPDase and 5'-nucleotidase activity

Our results showed that Querc can alter NTPDase and 5'-nucleotidase activities *in vitro* and *ex vivo* ($P < 0.05$). In the ATP hydrolysis *in vitro*, a significant decrease ($P < 0.05$) with concentrations of 25 and 50 μM of Querc (31% and 38%, respectively) was observed when compared to control (Fig. 2a). *Ex vivo* observed a significant increase ($P < 0.05$) in ATP hydrolysis in Cd/ethanol group when compared to the saline/ethanol group (93%) (Fig. 3a). In the groups treated with Cd and 5, 25 and 50 mg/Kg of Querc, this flavonoid prevented the increase in ATP hydrolysis (49%, 45% and 40%, respectively) when compared to the Cd/ethanol group ($P < 0.05$).

In relation to ADP, a significant decrease ($P < 0.05$) in the hydrolysis of this nucleotide *in vitro* with concentrations of 25 and 50 μM of the Querc (34% and 35% respectively) was observed when compared to control (Fig. 2b). *Ex vivo* ADP hydrolysis in the Cd/ethanol group showed a significant increase ($P < 0.05$) when compared with the saline/ethanol group (95%) (Fig. 3b). On the other hand, the treatment with Querc in the doses 5, 25 and 50 mg/Kg prevented an increase in the ADP hydrolysis (61%, 53%, and 36%, respectively) compared with the Cd/ethanol group ($P < 0.05$).

The results obtained for the 5'-nucleotidase activity *in vitro* were similar to those found for the NTPDase activity. A significant decrease ($P < 0.05$) was observed in AMP hydrolysis *in vitro* in the concentrations of 25 and 50 μM of Querc (50% and 60%, respectively) when compared to control (Fig. 2c). However, *ex vivo* showed a significant increase ($P < 0.05$) in AMP hydrolysis in the Cd/ethanol group when compared to the saline/ethanol group (83%). In rats treated with Cd and Querc in the doses of 5, 25 and 50 mg/Kg, this flavonoid prevented the increase ($P < 0.05$) in AMP hydrolysis (50%, 46% and 45%, respectively) compared with the Cd/ethanol group (Fig. 3c).

3.3 Adenosine deaminase activity

Results obtained for the ADA activity were not significantly different *in vitro* (data not showed). *Ex vivo* showed a significant increase ($P < 0.05$) in the ADA

activity in the Cd/ethanol group (220%) when compared to the saline/ethanol group. The treatment with Cd and Querc in the doses of 5, 25 and 50 mg/kg prevented an increase in the ADA activity (37%, 48% and 59%, respectively) and presented results similar to those found in the Querc/ethanol group ($P < 0.05$) (Fig. 3d).

4. Discussion and Conclusion

It is well known that the CNS is particularly vulnerable to heavy metal exposure. Although the neurotoxicity of Cd has been less characterized, experimental studies have shown that this metal can penetrate the BBB and accumulate in the brain (Méndez-Armenta and Ríos 2007). Furthermore, electrophysiological studies in the CNS in isolated neurons indicate that Cd can enter the cells through Ca^{2+} channels and interfere in the cerebral activity (Shirakawa et al. 2000). In experimental animals, neurological effects of Cd such as cerebral edema and alterations in motor behavior have been reported (Ali et al. 1990; Gonçalves et al. 2010). However, there are no studies in literature correlating the effect of the exposure to Cd on the activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and the AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats. Adenine nucleotides and AChE are expressed in the synaptosomes and are essential to keep the function of the CNS correct (Bai and Witzmann 2007). In view of this, the aim of this study was to investigate orally rats intoxicated with Cd and treated with different doses of Querc to assess the possible effects of these compounds in CNS.

The role of the cholinergic system in the CNS is well documented. AChE is an important enzyme for cholinergic neurotransmission and there are strong indications of its essential role in the regulation of many vital functions and its association with neurobehavioral processes (Mesulam et al. 2002; Pari and Murugavel 2007). Both *in vitro* and *ex vivo* effects of Cd on the AChE activity have been described in literature for different animal models (Luchese et al. 2007; Pari and Murugavel 2007; Senger et al. 2006). However, results are still controversial and the activation and the inhibition of AChE activity have been reported.

As can be seen in this study, *in vitro* tests performed in cortex synaptosomes of rats with the Querc in the concentrations of 100 and 200 μ M decreased the AChE activity (Fig. 1a). Therefore, Querc *per se* can cause a decrease of the AChE activity

suggesting that there may be more ACh free. This increase of ACh may have a neuroprotective action contributing to the formation and modulation of the impulse in CNS (Descarries et al. 1997).

In relation to *ex vivo* treatment, rats treated with Cd and Querc 5 mg/Kg showed a tendency to decrease the AChE activity in cortex synaptosomes. In addition, when Querc 25 and 50 mg/kg was co-administered with Cd, there was a decrease in the AChE activity when compared to the Cd/control group (Fig. 1B). Thus, according to the results obtained in our research, Cd showed no alterations in the AChE activity in cortex synaptosomes of rats. Similar effect for Cd was showed by Gonçalves et al. (2010) when rats exposed to Cd (2 mg/kg) and NAC (150 mg/kg) showed no alterations in the AChE activity in cortex synaptosomes and striatum. In addition, Dvira et al. (2010) showed that there are no reports on the visualization of metal ions in the gorge of any of the crystal structures of AChE because the metal ions can accumulate in the gorge of the AChE causing a crowd in the active site of the enzyme.

Therefore, results obtained in our study show that Querc co-administered with Cd can cause AChE inhibition therefore believed that consequently the neurotransmitter ACh is less hydrolyzed in synapses having more ACh free. According to Walker (2001), an increased amount of ACh in synapses can consequently cause overactivation of cholinergic receptors and possible toxic effects such as convulsion and status epilepticus. Thus, an important result observed in this study was that Querc *in vitro* and *ex vivo* acted effectively in the reduction of the AChE activity only in the highest concentration tested. From these results we believe that Querc *per se* can be considered a promising natural compound to therapies against hypocholinergic disease and can be applied after pre-clinical studies for the treatment of neurodegenerative diseases, acting as inhibitor of AChE in order to have more ACh in the synaptic cleft.

Several studies from our laboratory have demonstrated that beyond the cholinesterase, the adenine nucleotides also have an important role in neurotransmission. Alterations in their activities have been observed in various diseases suggesting that it could be an important physiological and pathological parameters (Kaizer et al. 2010; Mazzanti et al. 2007; Schmatz et al. 2009; Schetinger et al. 2007; Spanevello et al. 2010). Therefore, the other set of experiments was

performed in order to evaluate the effects of Querc on adenine nucleotide hydrolysis in rats intoxicated with Cd.

The results of the present study demonstrated that the cascade of ecto-enzymes was altered both in the rats intoxicated with Cd and after treatment with Querc. Our results demonstrated that Querc per se *in vitro* (25 and 50 μ M) promoted a decrease in NTPDase and 5'-nucleotidase activities in cerebral cortex synaptosomes (Fig. 2a, b, c). However, no differences were observed in the ADA activity *in vitro* (data not shown). These results suggest that Querc *in vitro* promotes a decrease in the ATP hydrolysis in pathological and healthy conditions. Moreover, it is able to maintain a high level of adenosine in the extracellular environment and this can promote a favorable effect on the CNS mainly in neurodegenerative disease since the adenosine under pathological conditions plays a protective role by modulating the release of the neurotransmitters and tropic factors (Beraudi et al. 2003; Burnstock 2006; Desrosiers et al. 2007; Hasko and Cronstein 2004; Rathbone et al. 1999; Sitkovsky and Ohta 2005).

In vitro effects of Cd on NTPDase and 5'-nucleotidase activity have been described in literature for different animal models. These results are controversial and both activation and inhibition of ectonucleotidases have been reported. Barcellos et al. (1994) found an inhibition *in vitro* of the NTPDase activity by Cd acetate (concentration between 0.05-1mM) on rat cerebral cortex synaptosomes. In addition, different results have been shown in zebrafish by Senger et al. (2006), where the same concentration of the Cd used by Barcellos (1994) caused a decrease in ADP hydrolysis and increased hydrolysis of ATP. Thus, a plausible explanation to the contrasting Cd effect on ATP and ADP hydrolysis is that it causes an inhibition of NTPDase 1 and activation of NTPDase 2 in the brain of zebrafish.

However, the effects of Querc on purinergic neurotransmission in animal models intoxicated with Cd remains unknown. Thus, the results of the present study aim to elucidate the interactions little-known between the Cd and Querc. In relation to the *ex vivo* treatment NTPDase, 5`- nucleotidase and ADA activities were increased in synaptosomes of rats intoxicated with Cd (Fig. 3a, b, c, d).

ATP is a molecule involved in a diverse group of functions in the CNS (Rathbone et al. 1999). There is considerable evidence that ATP acts as a fast neurotransmitter (Sperlágh 1995) co-transmitter in autonomic and sensory nerves and as a presynaptic modulator (Burnstock 2006; Cunha and Ribeiro 2000). In

addition to ATP, its breakdown product, adenosine, acts as a CNS modulator in mammals, regulates cell metabolism, and triggers a variety of physiological effects participating in apoptosis, necrosis, and cell proliferation. Under pathological conditions, adenosine plays a protective role by modulating the release of the neurotransmitters and tropic factors (Beraudi et al. 2003; Burnstock 2006; Desrosiers et al. 2007; Hasko and Cronstein 2004; Rathbone et al. 1999; Sitkovsky and Ohta 2005). The concentration of extracellular adenosine is regulated by the activity of ADA which catalyses the conversion of the adenosine into its inactive metabolite inosine.

In this context and considering our results, we can suggest that the increase in NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities in synaptosomes from Cd-intoxicated rats could lead to the conversion of adenosine into inosine, decreasing the levels of this nucleotide. However, when the treatment with Querc (5, 25 and 50 mg/kg) was associated with the Cd intoxication, a decrease in NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities was observed (Fig. 3a, b, c, d). These results suggest the treatment with Querc may cause a modulation of NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities. This modulation may be very important because the decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis can maintain the levels of extracellular ATP molecule, an important excitatory neurotransmitter in nerve synapses purinergic. In addition, the prevention in the increase of ADA activity in Cd-intoxicated rats may contribute to an increase in the levels of adenosine, an important neuroprotective molecule that may protect the CNS from neurological complications caused by the intoxicated Cd.

In conclusion, the results obtained in the present study demonstrate alterations in NTPDase, 5'-nucleotidase, ADA activities; however, no alterations were observed in the AChE activities in cerebral cortex synaptosomes from Cd-intoxicated rats, indicating that only purinergic system was altered in rats intoxicated for heavy metals. In addition, the treatment with Querc modulates the purinergic cascade suggesting that Querc co-administered with Cd can maintain normal levels of ATP and adenosine on CNS, which may have an important neuroprotective role under pathophysiological conditions caused by the Cd. Querc *in vitro* caused alterations in NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE activities in cerebral cortex synaptosomes demonstrating that this compound may modulate cholinergic and purinergic neurotransmission. Thus, we can suggest that Querc can have an important role in the prevention of cerebral complication caused by Cd intoxication.

Acknowledgments: This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil, and the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociências (IBNet)”.

References

Ali MM, Mathur N, Chandra SV (1990) Effects of chronic cadmium exposure on locomotion of rats. *Indian J Exp Biol* 28:653-156.

Bai F, Witzmann FA (2007) Synaptosome proteomics. *Subcell Biochem* 43:77-98.

Barcellos CK, Schetinger MRC, Battastini AMO, Silva LB, Dias RD, Sarkis JJF (2004) Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5; apyrase) from adult rat cerebral cortex. *Braz J Med Biol Res* 27:1111-1115.

Beraudi A, Traversa U, Villani L, Sekino Y, Nagy JI, Poli A (2003) Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. *Neurochem Int* 42:455-463.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.

Carroll RE (1966) The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *Jama* 198:267-269.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-NTPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–378.

Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* 79:157-63.

Choi EJ, Chee KM, Lee BH (2003) Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol* 482:281-5.

Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann NY Acad Sci* 42:854-435.

Cunha RA, Ribeiro JÁ (2000) ATP as presynaptic modulator. *Life Sci* 68:119-137

Descarries L, Gisiger V, Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603-625.

Desrosiers MD, Katherine MC, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, Mehal WZ, Santamaria P, Shi Y (2007) Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *Journal of Immunology* 179:1884-1892.

Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry, TL, Sussman JL (2010) Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem Biol Interact* 187:10-22.

Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-90.

Galan A, Garcia-Bermejo L, Troyano A, Vilaboa NE, Fernandez C, de Blas E, Aller P (2001) The role of intracellular oxidation in death induction in human promonocytic cells treated with stress inducers. *Eur J Cell Biol* 80:312-20.

Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12:417-425.

Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 22:1-6.

Goldberg DM, Hanh SE, Parkes JG (1995) Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* 237:155-187.

Gonçalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG, Dressler VL, Morsch VM, Schetinger MRC (2010) N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 186:53-60.

Hasko G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25:33-39.

Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GM (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43:263-273.

Hunsucker AS, Mitchell BS, Spychala J (2005) The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* 107:1-30.

Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M (1998) Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24:1-51.

Jarup L, Hellström L, Alfvén T, Carlsson MD (2000) Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med* 57:668-672.

Kaizer RR, Gutierrez JM, Schmatz R, Spanevello RM, Morsch VM, Schetinger MR, Rocha JB (2010) In vitro and in vivo interactions of aluminum on NTPDase and AChE activities in lymphocytes of rats. *Cell Immunol* 265:133-8.

Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74:675-696.

North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-67.

Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Ann Rev Neurosci* 29:279-306.

Lu J, Zheng Y, Luo L, Wu D, Sun D, Feng Y (2006) Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav Brain Res* 171:251-260.

Luchese C, Brandão R, Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW (2007) Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett* 173:181-190.

Mazzanti CM, Spanevello RM, Morsch A, Zanin R, Battisti V, Ahmed M, Gonçalves JF, Mazzanti A, Graca DL, Morsch VM, Schetinger MR (2007) Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci* 81:241-8.

Méndez-Armenta M, Ríos C (2007) Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Appl Pharmacol* 23:350-358.

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110:627-639.

Minami A, Takeda A, Nishibaba D, Takefuta S, Oku N (2001) Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res* 894:336-339.

Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J (2003) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull*, 26:1398-1402.

Nagy A, Delgado-Escueta AV (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43:1114-1123.

Pari L, Murugavel P (2007) Diallyl tetrasulfide improves cadmium-induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rat. *Toxicology* 234:44-50.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MAR, Reed JK, Ciccarelli R, Lorio P, Caciagli F (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59:663-690.

Resta R, Yamashita Y, Thompson LF (1998) Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161:95-109.

Rikans LE, Yamano T (2000) Mechanisms of cadmium mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 14:110-7.

Robson SC, Candinas D, Siegel JB, Kopp C, Millan M, Hancock WW, Bach FH (1996) Potential mechanism of abnormal thromboregulation in xenograft rejection: loss of ecto-ATPases upon endothelial cell activation. *Transplant Proc* 28:536.

Rocha JBT, Emanuelli T, Pereira ME (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp* 53:431-437.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB (2002) Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 102:1414-20.

Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JBT, Nascimento PC, Nogueira CW (2004) Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicology Letters* 152:255-263.

Schetinger MRC, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *BioFactors* 31:77-98.

Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB, Morsch VM, Rocha JBT, Vieira V, Moro F, Neis RT, Bittencourt S, Bonacorso HG, Zanatta N (2000) New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem Res* 25:949-955.

Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PC, Gutierrez J, Corrêa MC, Girotto E, Moretto M, Morsch VM (2009) Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 84:345-350.

Senger MR, Rosemberg DB, Rico EP, Arizi MB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2006) In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol In Vitro* 20:954-958.

Shirakawa T, Honma S, Katsuno Y, Oguchi H, Honma KI (2000) Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur J Neurosci* 12:2833-8.

Sitkovsky MV, Ohta A (2005) The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 26:299-304

Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thomé G, Bagatini M, Correa M, Rosa C, Stefanello N, Bellé LP, Moretto MB, Oliveira L, Morsch VM, Schetinger MR (2010) The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 411:210-4.

Sperlágh B, Kittel A, Lajtha A, Vizi ES (1995) ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme cytochemical evidence. *Neuroscience* 66:915-920.

Thevenod F (2003) Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* 93:87-93.

Walker CH (2001) Organic Pollutants, in: Walker CH (Ed.), *An Ecotoxicological Perspective*, Taylor and Francis 282.

Yegutikin GG, Henttinen T, Samburski SS, Sychala J, Jalkanen S (2002) The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 367:121-128.

Zalups RK, Ahmad S (2003) Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 186:163-188.

Zimmermann H (1992) 5'-nucleotidase-molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285:345-365.

Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note of nomenclature, *Drug Dev Res* 52:44-56.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1:

Effects of quercetin *in vitro* (A) and *ex vivo* (B) on the AChE activity in cerebral cortex synaptosomes of rats. The first bar (A), represents the control. The other bars represent different concentrations of Querc (μM). Each column represents mean \pm SEM (n=4-5). Different letters indicate significant difference from control. Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's test ($P < 0.05$). AChE activity *ex vivo* (B) in cerebral cortex synaptosomes of Cd-exposed rats and treated with Querc (mg/Kg). Different letters indicate significant difference among the groups. Each column represents mean \pm SEM (n=10-12). Data were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan's test ($P < 0.05$). Results are expressed as $\mu\text{mol de AcSCh/h/mg}$ protein.

Figure 2:

Effects of quercetin *in vitro* on ATP (A), ADP (B), and AMP (C) hydrolysis in cerebral cortex synaptosomes of rats. The first bars, in all graphics, represent the control. The other bars in all graphics represent different concentrations of Querc (μM). Each column represents mean \pm SEM (n=4-5). Results are expressed as nmol/ Pi / min/ mg protein. Different letters indicate significant difference from control. Data were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan's test ($P < 0.05$).

Figure 3:

ATP (A), ADP (B), AMP (C) hydrolysis, and ADA activity (D) *ex vivo* in cerebral cortex synaptosomes of Cd-exposed rats and treated with Querc. Different letters indicate

significant difference among the groups. Each column represents means \pm SEM (n=10-12). Data were evaluated by Two-way ANOVA followed by Duncan's test ($P < 0.05$).

Figure 1:

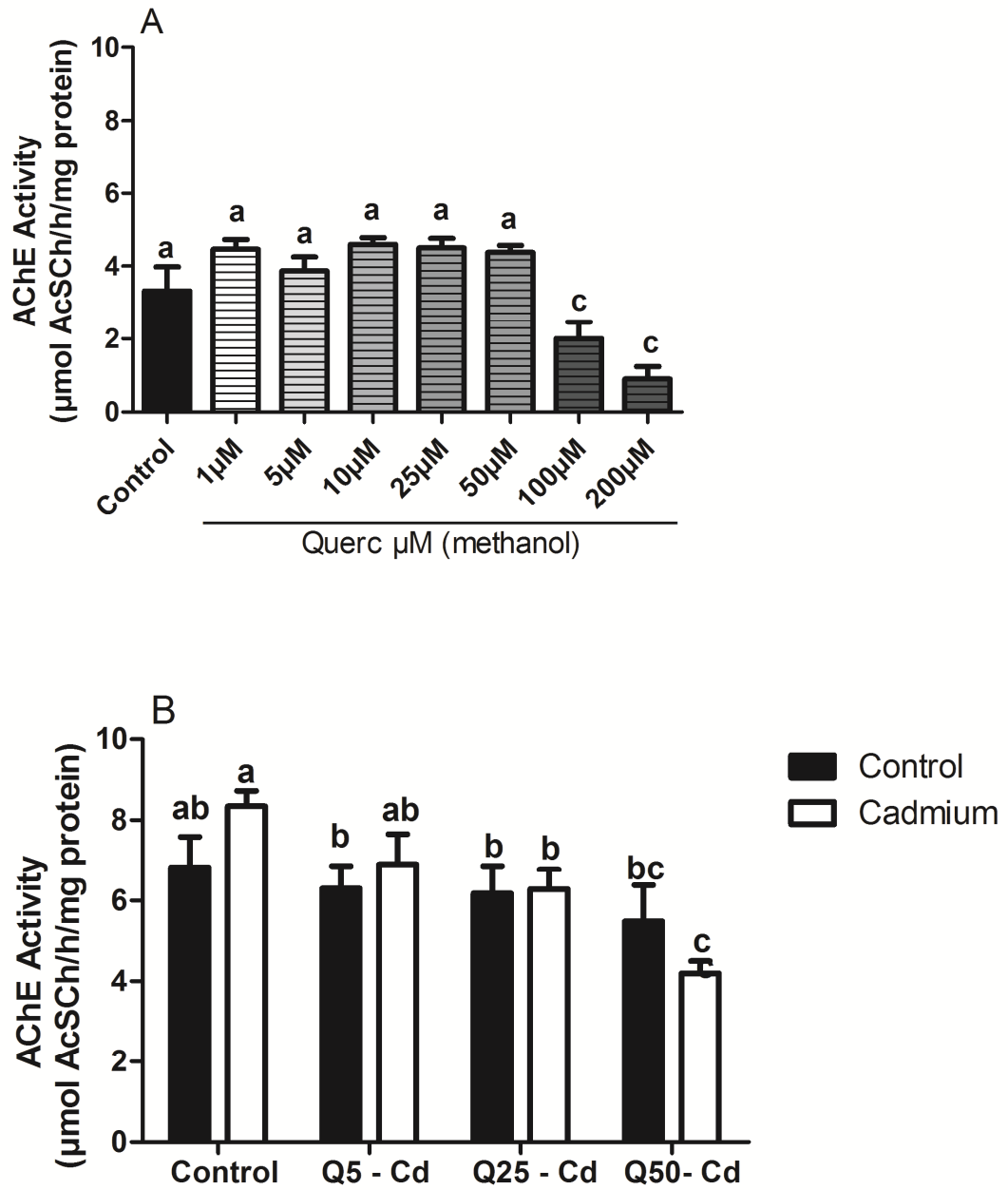


Figure 2:

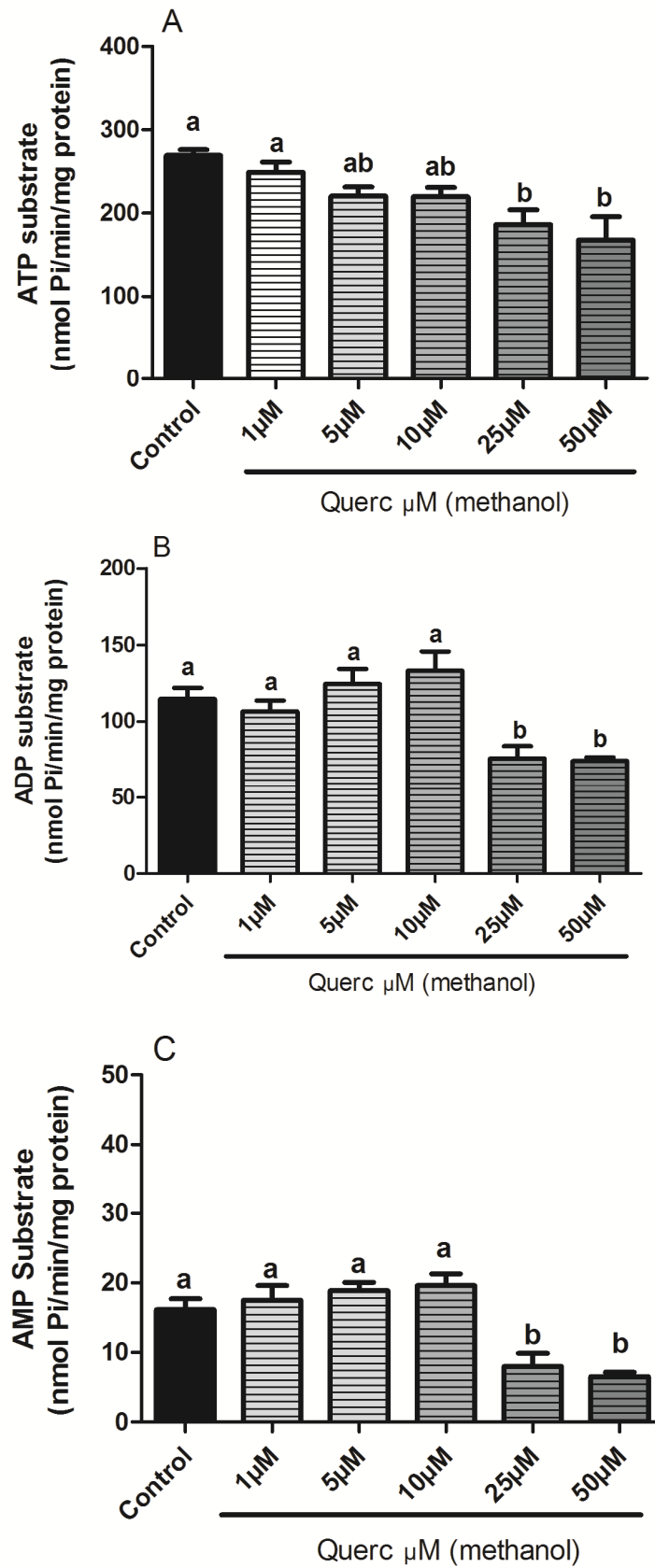
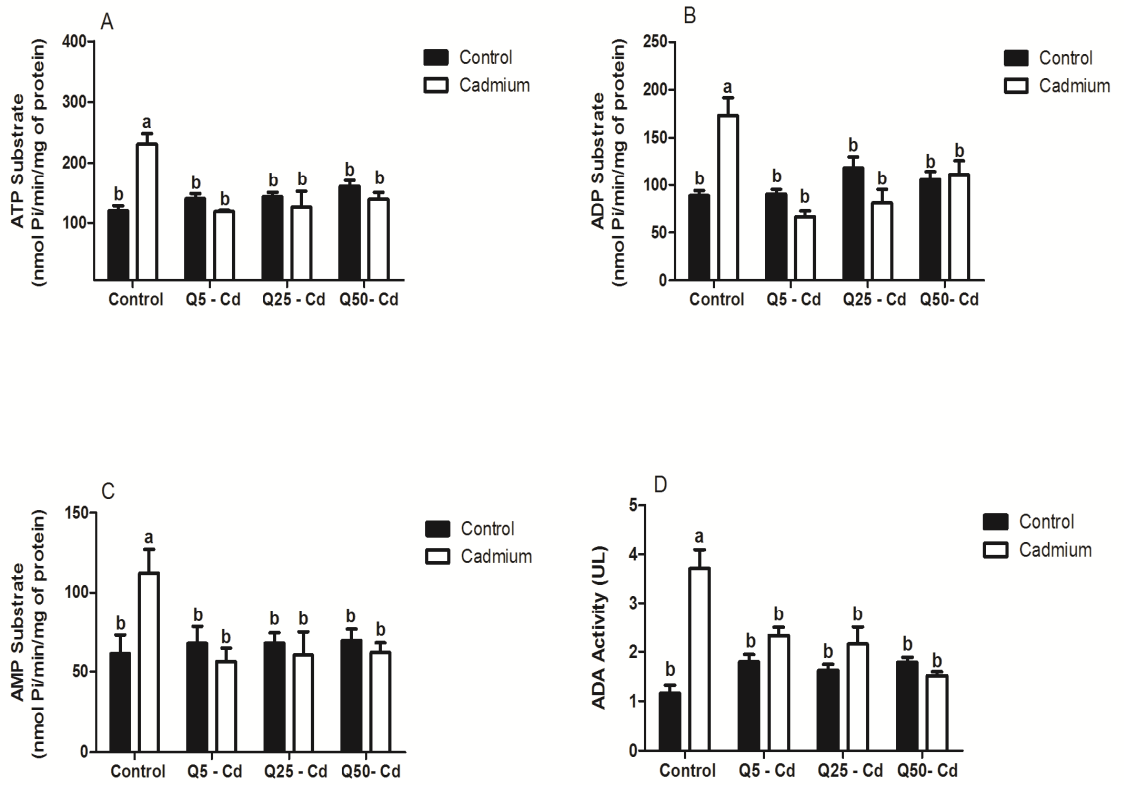


Figure 3:



4.CONCLUSÕES

- 1) O Cd aumentou a atividade da NTPDase, da 5'-nucleotidase e da ADA e o tratamento com as diferentes doses de Querc preveniu este aumento. Pode-se sugerir que este composto quando co-administrado com o Cd pode modular a atividade das enzimas do sistema purinérgico e manter os níveis de ATP extracelular e de adenosina no SNC em condições fisiopatológicas causadas pelo Cd.
- 2) Não foi observada alteração na atividade da AChE nos ratos que receberam Cd. Sugere-se que o metal possa ter acumulado no sítio ativo da enzima uma vez que o Cd é um metal de massa atômica relativa 112,41. O tratamento com Querc nas doses de 25 e 50 mg/kg diminuiu significativamente a atividade da AChE demonstrando que este composto tem a capacidade de alterar a atividade desta enzima. Sugere-se que a Querc possa ser utilizada com a finalidade de diminuir os efeitos hipocolinérgicos causados pelo aumento na atividade da AChE.
- 3) A Querc *in vitro* nas doses de 25 e 50 μM diminuiu a atividade da E-NTPDase e da 5'-nucleotidase. Estes resultados sugerem que em condições saudáveis a Querc *per se* pode promover um aumento de ATP extracelular, assim como da ADO, importantes moléculas para o SNC.
- 4) A Querc 100 e 200 μM *in vitro* causou uma diminuição na atividade da AChE, demonstrando que a Querc *per se* pode ser um composto promissor a ser utilizado em terapias alternativas para o tratamento de doenças hipocolinérgicas como é o caso da doença de Alzheimer.

5. REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **U.S. Public Health Service. Toxicological Profile for Cadmium.** Atlanta, GA, 1998.

AGRESTI, C. et al. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. **Brain Research Reviews**, v.48, p.157-165, 2005.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v.18, p.75-81, 2002.

AHLENSTIEL, T. et al. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. **Kidney Int.**, v.63, p.554-563, 2003.

ALDUNATE, R.; CASAR, J.C.; BRANDAN, E. Inestrosa, N.C. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, 47: 405-410, 2004.

ANICH, M. et al. A transverso-cori apyrase activity and changes in mtabolites Turing germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v.29, p.1411-1415, 1990.

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. **Toxicol. Lett**, v.143, p.331-340, 2003.

BAI, F.; Witzmann, F.A. Synaptosome proteomics. **Subcell Biochem**, v.43, p.77-98, 2007.

BALZ, D. et al. In vitro effects of L-arginine and guanidino compounds on NTPDase 1 and 5'-nucleotidase activities from rat brain synaptosomes. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.21, p.75-82, 2003.

BATTASTINI, A.M.O. et al. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemical Research**, v.16, p.1303-1310, 1991.

BERNARD, A. Cadmium and its adverse effects on human health. **Indian J. Med. Res.** v.128, p.557-564, 2008.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v.40, p.143-152, 1984.

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

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, p.5511-5519, 2004.

BORGES L.P. et al. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.171, p.15-25, 2008.

BOURNE, Y. et al. Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. **Chemico-Biological Interactions**, v.15, p.159-165, 2005.

BRAUN, A.P.; SCHULMAN, H. The Multifunctional Calcium/Calmoulin-Dependent rotein Kinase: From to Function. **Annual Reviews in Physiology**, v.57, p.417-445, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutr. Rev.** v.56, p.317-333, 1998.

BRODMANN, K. Beitrage zur histologischen lokalisation der grosshirnrinde. VI. Mitteilung: die cortexgliederung des menschen. **J. Psychol. Neurol**, v.10, p.231-246, 1908.

BRUNEAU, E.G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. *Mol Neurobiol.* v.34, p.137-51 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p.172-181, 2006.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex. **Boulder Committee revisited**, v.9, p. 1-122, 2008.

CARAGEORGIU, H. et al. Cadmium effects on brain acetylcholinesterase activity and antioxidant status of adult rats: modulation by zinc, calcium and L-cysteine co-administration co-administration. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.97, p.320-324, 2005.

CARAGEORGIU, H. et al. In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine, **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v.94, p.112-118, 2004.

CARAGEORGIU, H. et al. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.94, p.112-118, 2004.

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, p.171-179, 1997.

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.; GOYER, R.A.; VALBERG, L.S. Gastrointestinal absorption and organ distribution of oral cadmium chloride and cadmium-metallotionein in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.4, p.861-868, 1978.

CHO S.Y. et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 243, p.15-160, 2003.

CHOI E.J.; CHEE K.M.; LEE B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.482, p.281-285, 2003.

CICARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative progress in the brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.19, p.395-414, 2001.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.28, p.54-61, 2003.

COLGAN, S. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**. v.2, p.351-360, 2006.

COOK, N.C.; SAMMAN, S.; Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources-review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.

CRESPY, V. et al. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **Am. J. Physiol**, v.277, p.120-126, 1999.

CUNHA, R.; RIBEIRO, J.A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sciences**, v.68, p.119-137, 2000.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v.38, p.107-125, 2001.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v.68, p.1545-1555, 2001.

DAY, T.; GREENFIELD, S.A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurons in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v.111, p.649-656, 2002.

DE LORENZO S. et al. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. **Neuroscience**, v.142, p.71-81, 2006.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p.587-600, 2001.

Díaz-Hernández, M. et al. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. **Neuropharmacology**, v.42, p.20-33, 2002.

DIN, W.S.; FRAZIER, J.M. Protective effect of metallothionein on cadmium toxicity in isolated rat hepatocytes. **Biochemical Journal**, v.230, p.395-402, 1985.

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.31-55, 2001.

EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. Central cholinergic systems and cognition. **Annu. Rev. Psychol**, v.48, p.649-84, 1997.

FANG, Y.Z.; YANG, S., WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872- 879, 2002.

FIELDS, D.; STEVENS, B. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. **Trends in Neurosciences**, v.23, p.625-633, 2000.

FOX, S. Nutritional factors that may influence bioavailability of cadmium. **J Environ Quality**, v.17, p.175-80, 1988.

FRASSETTO, S.; DIAS, R.D.D.; SARKIS, J.F.F. Inhibition and kinetics alterations by excess of free ATP, ADP, of the ATP diphosphohydrolase activity (e.c. 3.6.1.5) from rat blood platelets. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.35, p.499-506, 1995.

FREDHOLM, B.B. et al. Adenosine and brain functions. **International Review of Neurobiology**, v.63, p.191-270, 2005.

FREDHOLM, B.B. et al. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.527-552, 2001.

GONÇALVES J.F. et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chemico-Biological Interactions**, v.186, p.53-60, 2010.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Dynamic motions of CD39 transmembrane domains regulate and are regulated by the enzymatic active site. **Biochemistry**, v.43, p.13849-13858, 2006.

GUPTA, A.; GUPTA, A.; SHUKLA, S.G. Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v.51, p.12-17, 1993.

HA, H.J. et al. Quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxin-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. **Biol Pharm Bull**, v.26, p.544-546, 2003.

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.

HAVSTEEN, B.N. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, v.96, p.67-202, 2002.

HERTOG, M.G. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, v.20, p.21-29, 1993.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res*, v.31, p.75-80S, 1999.

HUNSUCKER, S.; MITCHELL, B.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology and Therapeutics*, v.107, p.1-30, 2005.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, v.483, p.5-7, 2004.

IZATT, R.M.; CHRISTENSEN, J.J.; RYTTING, J.H. Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides. *Chem Rev*, v.71, p.439-81, 1971.

JARUP L. et al. Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate, *Scand J Work Environ Health*, v.24, p.1-52, 1998.

JARUP, L. et al. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med*, v.57,668-672, 2000.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. *Biochemical and Biophysical Research Communicatins*, v.258, p.758-762, 1999.

JONES, M.M.; CHERIAN, M.G. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology*, v.6, p.1-25, 1990.

JÓSE A.S. et al. Sensitivity of young rats to nicotine exposure: Physiological and biochemical parameters. *Ecotoxicol Environ Saf*, v.72, p. 242-7, 2009.

KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetina on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J. Nephrol.*, v.16, p. 219-224, 2003.

KAIZER, R.R. et al. The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.25, p.381-386, 2007.

KANG, S.S., et al. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. **Bioorg Med Chem Lett**, v.15, p.3588-3591, 2005.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacological and Therapeutics**, v.86, p.29-48, 2000.

KUMAR, R.; AGARWAL, A.K.; SETH, P.K. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. **Toxicol. Lett**, v.89, p.65-69, 1996.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal Neurochemical**, v.79, p. 463-484, 2001.

LAVOIE, E.G. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p.1917-1926, 2004.

LEAL, D.B.R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1721, p.9-11, 2005.

LING, K.K.Y. et al. ATP potentiates the formation of AChR aggregate in the co-culture of NG108-15 cells with C2C122 myotubes. **FEBS Letters**, v.579, p.2469-2474, 2005.

LOPES, A.C.P. et al. ASPECTOS MOLECULARES DA TRANSMISSÃO SINÁPTICA. **Medicina**, v.32, p.167-188, 1999.

LÓPEZ, E. et al. induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture, *Free Radic. Biol. Med*, v.40, p.940-951, 2006.

LUCHESE, C. et al. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology Letters**, v.173, p.181-190, 2007.

LUNDBECK INSTITUTE-IMAGE BANK

http://www.cnsforum.com/content/pictures/imagebank/hirespng/rcpt_sys_ACH_acetransf_AD.png . Acesso: 12 de Jan. 2012.

LUNKES, G.I.L. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.65, p.1-6, 2004.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**, v.390, p.173-180, 2000.

MANACH, C. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Lett**, v.426, p.331-336, 1998.

MANDEL, S.A., et al. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. **Neurosignals**, v.14, p. 46-60, 2005.

MARTIN, A.I.M. ET AL. Efecto de la quercetina sobre La nefrotoxicidad producida por cádmio. **Revista de toxicología**, v.21, p.23-30, 2004.

MASSOULIÉ, J. ET AL. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.31-41, 1993.

MATOS, J.J.A. et al. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, E.C. 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.770-775, 2001.

MAZZANTI, C.M. et al. Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Life Sciences**, v.81, p.241-249, 2007.

MÉNDEZ-ARMENTA M. et al. Histopathological alterations in brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethazone, **Toxicology**, v.161, p.189-199, 2001.

MÉNDEZ-ARMENTA M.; RÍOS C. Cadmium neurotoxicity, **Environ. Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.23, p.350-358, 2007.

MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, p.627-639, 2002.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v.52, p.673-751, 2000.

MILLAR, J.K. et al. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. **Mol. Cell. Neurosci.**, v.30, p.477-484, 2005.

MINAMI, A. et al. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. **Brain Research**, v.894, p.336-339, 2001.

MORSELT, A.F. A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. **Toxicology**, v.70, p.1-132, 1991

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.417, p.12-17, 2003.

NAIDU, P.S.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Neuropharmacology**. v.44, p.1100-1106, 2003.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and Carcinogenesis studies of Quercetin (CAS NO. 117-39-5) in F344/N Rats (Feed Studies). U.S. Department of Health and Human Services, **Nat Toxicol Program**, p.171, 1992.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.74, p.418-425, 2001.

NOMIYAMA, K.; NOMIYAMA, H. Critical concentration of "unbound" cadmium in the rabbit renal cortex. **Experientia**, v.42, p.149, 1986.

NORDBERG, G.F.; KJELLSTROM T.; NORDBERG M. Genetics and metabolism. In: Friberg L.; Elinder C.G.; Kjellstrom T.; Nordberg G.F.; editors. Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal, v. I (Exposure, dose, and metabolism). Boca Raton (FL): CRC Press, p.103-78, 1985.

NORTH, R.A.; Molecular physiology of P2X receptors, **Physiol Rev**, v.82, p.1013-67, 2002.

- NUNES-TAVARES, N. et al. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, p.1071-1079, 2002.
- OLNEY, J.W.; COLLINS, R.C.; SLOVITER, R.S.; Exotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol**, v.44, p.857-877, 1986.
- ORRENIUS, S., NICOTERA, P. The calcium ion and cell death. **J. Neural. Trans.** v.43, p.1-11, 1994.
- PATEL, A.B. et al. Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex in vivo following acute GABA-transaminase inhibition. **Brain Res**, v. 919, p. 207-20, 2001.
- PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends Neurosci.**, v.22, p.273-280, 1999.
- PIERPOINT, W.S. Flavonoids in the human diet. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.213, p.125-140, 1986.
- PRADO, M.A.M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v.41, p.291-299, 2002.
- PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am J Clin Nutr**, v.78, p.570S-578S, 2003.
- PU, F. et al. 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. **J Pharmacol Sci**, v.104, p.329-334, 2007.
- RAJANNA, B. Effects of chronic treatment with cadmium on ATPases, uptake of catecholamines, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.20, p.36-41, 1990.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.157, p.233-238, 2005.

RATHBONE, M. et al. Trophic effects of purines in neuron and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v.59, p.663-690, 1999.

RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M.; MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathological implications. **Progress in Neurobiology**, v.68, p.377-392, 2003.

RICE-EVANS, C.A. et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v.22, p.375-383, 1995.

RICO, E.P. et al. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sciences**, v.73, p.2071-2082, 2003.

RIKANS, L.E.; YAMANO, T. Mechanisms of cadmium mediated-acute hepatotoxicity. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.14. p.110-117, 2000.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function, relationships and pathophysiology significance. **Purinergic Signalling**, v.2, p.409-430, 2006.

SANTOS F.W. et al. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. **Reproductive Toxicology**, v.22, p.546-550, 2006.

SANTOS, F.W. et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico-Biological Interactions**, v.151, p.159-165, 2005b.

SANTOS, F.W. et al. 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.

SARKAR, S.; DAS, N. Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat brain. **Mech Ageing Dev.** v.127, p.391-397, 2006

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews**, v.6, p.48-56, 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, v.130, p.2073S-2085S, 2000.

SCHETINGER, M.R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v.31, p.77-98, 2008.

SCHETINGER, M.R.C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128, p.731-741, 2001.

SCHMATZ, R. et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v.610, p.42-48, 2009a.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci**, v.84, p.345-350b, 2009

SCHOEN, S.W.; KREUTZBERG, G.W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat entorhinal gyrus. **Experimental Neurology**, v.127, p.106-118, 1994.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: "classical" and "non-classical" functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v.5, p.293-302, 2005.

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, p.453-483, 1996.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholine: new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, p. 294-302, 2001.

SPANNEVELLO, R.M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . **Neurochemical Research**, v.31, p.455-462, 2006.

SPENCER, J.P.E. et al. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. **Biochem. J.** 372, 173-81, 2003.

STEVENS, B. et al. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potential. **Neuron**, v.36, p.855-868, 2002.

SZEGLETES, T. et al. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry**, v.38, p.122-133, 1999.

TAVARES, M.T; CARVALHO, M.F. Avaliação de exposição de população humana a metais pesados no ambiente: Exemplos do recôncavo Baiano. **Química Nova**, v.15, 1992.

TAYLOR, P.; BROWN, J.H., 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranof, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A, p. 214-242.

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

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K.H.; Stavridis, J.C. Protective effect of l-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. **Clin. Biochem**, v.33, p.103-106. 2000.

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

VASCONCELOS, E.G. et al. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.58, p.205-214, 1993.

VAWTER, M.P. et al. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. **Mol. Psychiatry**, v.7, p.571-578, 2002.

VORHOFF, T. et al. Cloning and characterization of ecto-nucleotidase NTPDase 3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to members of the E-NTPDase family and action. **Purinergic Signalling**, v.1, p.259-270, 2004.

WALKER, C.H. Organic Pollutants, in: WALKER, C.H. (Ed.), *An Ecotoxicological Perspective*, Taylor and Francis, **New York, USA**, 2001.

WANG, A. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by LC-ESI-MS. **Chromatografia**, v.67, p.281-285, 2007.

WANG, T.; GUIOTTI, G.; Widespread expression of ecto-ATPase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research**, v.790, p.318-322, 1998.

WHO. Environmental Health Criteria, Cadmium. 1st ed. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, v.134. 1992.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Free Radical Biol Med. v.36, p.838-849, 2004.

WINK, M. et al. Extracellular adenosine nucleotides metabolism in astrocytes cultures from different brain regions. **Neurochemistry International**, v.43, p.621-628, 2003.

YAO H.W. et al. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats. **Acta Pharmacol Sin**, v.25, p.915-920, 2004.

YEGUTKIN G. Nucleotide and nucleoside conserving ectoenzymes: important modulators of purinergic cascade. **Biochim Biophys Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.

YOUSSEF, M.B.H.; RIEDERER, P. 2003. Iron in the brain, normal and pathological conditions. In: SMITH, B.; ADELMAN, G. (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, Amsterdam (in press). ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T.; JEN, L.S. (2003) Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. **Mutat Res**, v.544, p.203-215.

ZEE, V.D.; E.A.; Luiten, P.G.M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, v.58, p.409-472, 1999.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization, and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.49, p.589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, 52: 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v.73, p.537-566, 2007.

ZIMMERMANN, H. et al. New insights into molecular structure and structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v.32, p.421-425, 1998.