



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

**ATIVIDADE DA NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE E NÍVEIS DE
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS EXPOSTOS AO
CÁDMIO E TRATADOS COM CURCUMINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pauline da Costa

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ATIVIDADE DA NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE E NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO
LIPÍDICA EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO E
TRATADOS COM CURCUMINA**

Pauline da Costa

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^a Dr^a Vera Maria Melchiors Morsch
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Jamile Fabbrin Gonçalves**

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Costa, Pauline da
Atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase,
acetilcolinesterase e níveis de peroxidação lipídica em
ratos expostos ao cádmio e tratados com curcumina. /
Pauline da Costa.-2014.
90 p.; 30cm

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2014

1. Cádmio 2. Curcumina 3. Ecto-nucleotidasas 4.
Acetilcolinesterase 5. Peroxidação lipídica I. Morsch,
Vera Maria Melchiors II. Título.

© 2014

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

E-mail: line.dct@gmail.com

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

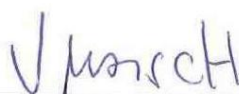
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DA NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE,
ACETILCOLINESTERASE E NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO E TRATADOS COM CURCUMINA**

elaborada por
Pauline da Costa

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

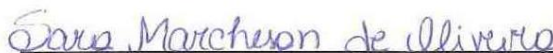
COMISSÃO EXAMINADORA



Vera Maria Melchior Morsch, Dr^a (Presidente/ Orientadora)



Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr^a (1^o membro da banca)



Sara Marchesan de Oliveira, Dr^a (2^o membro da banca)

Santa Maria, 15 de outubro de 2014.

Dedico esta dissertação a meus familiares, amigos e colegas, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram. Em especial meus pais, Paulo e Mara, que sempre investiram nos meus sonhos e meu namorado Sandor, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter me dado coragem e determinação, guiar minhas decisões, iluminando meu caminho, para que os obstáculos fossem superados e eu conquistasse esse objetivo.

Aos meus pais Paulo e Mara, que sempre me incentivaram e compartilharam comigo momentos de alegria e tristeza, que muitas vezes abriram mão dos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pelo amor e dedicação. Amo vocês.

A minha irmã Andreza, obrigada por sua atenção, amor, carinho e ajuda em todos momentos de minha vida.

Ao meu namorado Sandor, por seu amor, carinho e dedicação todos esses anos ao meu lado, mesmo nas horas difíceis, sendo muito compreensivo e paciente, incentivando e ajudando na conquista dos meus sonhos. Te amo!

A minha orientadora Vera Morsch, por me aceitar como orientada, pelos ensinamentos, dedicação, atenção e confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora Jamile Fabbrin Gonçalves, por todo carinho e dedicação, que desde o meu primeiro dia no laboratório até agora me deu atenção e ensinamentos. Obrigada por sempre contribuir e orientar meus trabalhos e toda minha vida acadêmica. Consegui conquistar este objetivo porque você esteve ao meu lado, me apoiando e ajudado. Sou muito grata.

A professora Maria Rosa Schetinger, pela oportunidade de realização do estágio no laboratório e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores membros desta banca de dissertação, Daniela Bitencourt Rosa Leal e Sara Marchesan de Oliveira, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

Aos meus inúmeros amigos e colegas do laboratório Enzitox, pela amizade, apoio, ensinamentos e ajuda nos experimentos. Obrigada pelo companheirismo e momentos inesquecíveis.

Aos meus colaboradores Jucimara Baldissarelli, Thaís Mann, Fátima Abdalla, Amanda Fiorenza, Fabiano Carvalho, Jessié Gutierrez, Cinthia Mellazzo pelo apoio e dedicação.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação, pela possibilidade de realização deste curso e disponibilização de todos os equipamentos. E seus professores e funcionários pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

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

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

RESUMO

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

ATIVIDADE DA NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE, ACETILCOLINESTERASE E NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO E TRATADOS COM CURCUMINA

Autora: Pauline da Costa
Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Maria Melchior Morsch
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Jamile Fabbrin Gonçalves
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de outubro de 2014.

O cádmio (Cd) é um dos metais mais tóxicos tanto em nível de intoxicação humana quanto de contaminação ambiental. Pelo fato desse metal possuir uma longa meia-vida biológica (10-30 anos), a exposição prolongada a ele tem sido associada a efeitos danosos em muitos órgãos como rins, fígado, pulmões, ossos, e inclusive o cérebro, provavelmente devido à geração de estresse oxidativo. Neste contexto, sabe-se que o polifenol curcumina, composto natural obtido a partir de *Curcuma longa*, exerce diversas funções terapêuticas, destacando-se o grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor. Sendo assim, este trabalho visou avaliar os parâmetros comportamentais e de memória, a atividade das ectoenzimas e acetilcolinesterase, bem com a peroxidação lipídica em ratos intoxicados por Cd e o possível efeito protetor da curcumina. Para tanto, foram utilizados 120 ratos Wistar machos, que receberam cádmio na forma CdCl₂.H₂O (Cd; 1 mg/kg) e/ou curcumina (Curc; 30, 60 ou 90 mg/kg) cinco vezes por semana durante 3 meses. Os animais foram divididos ao acaso em 8 grupos (n=15): (1) Salina/óleo, (2) Salina/Curc 30, (3) Salina/Curc 60, (4) Salina/Curc 90, (5) Cd/óleo, (6) Cd/Curc 30, (7) Cd/Curc 60 e (8) Cd/Curc 90. Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e na atividade da enzima AChE em diferentes estruturas encefálicas. A intoxicação por Cd também aumentou a atividade das enzimas AChE e NTPDase (substratos ATP e ADP) e diminuiu a atividade da enzima 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral. Esses efeitos do Cd no sistema nervoso central podem estar associados ao déficit de memória, evidenciado através da diminuição do tempo de latência no teste de esquivas inibitórias. Além disso, o Cd também aumentou a atividade da enzima AChE periférica (sangue total e linfócitos) o que pode estar relacionado com um estado pró-inflamatório nesses animais. No entanto, a Curc foi eficaz em reduzir os efeitos danosos do Cd, diminuindo a peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais, prevenindo o aumento da atividade da AChE e da NTPDase, melhorando, assim, a neurotransmissão e os processos cognitivos, sugerindo que este composto natural possa ser considerado após estudos adicionais um importante aliado em terapias contra a intoxicação por esse metal.

Palavras-chave: Cádmio. Curcumina. Ecto-nucleotidases. Acetilcolinesterase. Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

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

ACTIVITY OF NTPDase, 5'-NUCLEOTIDASE, ACETYLCHOLINESTERASE AND PEROXIDATION LIPID LEVELS IN RATS EXPOSED TO CADMIUM AND TREATED WITH CURCUMIN

Author: Pauline da Costa
Advisor: Vera Maria Melchiors Morsch
Co-advisor: Jamile Fabbrin Gonçalves
Place and Date: Santa Maria, October 13, 2014.

Cadmium (Cd) is one of the most toxic metals in relation to environmental contamination and human poisoning. This metal has a long biological half-life (10-30 years) and prolonged exposure to Cd has been associated with toxic effects on many organs as kidneys, liver, lungs, bone, including the brain, probably due to generation of stress oxidative. In this context, it is known that the polyphenol curcumin, natural compound derived from *Curcuma longa*, exerce several therapeutic functions, highlighting the great antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective potential. Thus, this work aims to evaluate the behavioral and memory parameters, the activity of acetylcholinesterase and ectonucleotidases, as well as lipid peroxidation in rats intoxicated by Cd and to determine the possible protective effect of curcumin. For this, we used 120 male Wistar rats, that received CdCl₂.H₂O as cadmium (Cd; 1 mg/kg) and/or curcumin (Curc, 30, 60 or 90 mg/kg) five times a week during 3 months. The animals were randomly divided into 8 groups (n = 15): (1) Saline/oil (2) Saline/Curc 30 (3) Saline/Curc 60, (4) Saline/Curc 90 (5) Cd/oil (6) Cd/Curc 30 (7) Cd/Curc 60 and (8) Cd/Curc 90. The results showed an increase in the levels of lipid peroxidation and in the AChE activity in different cerebral structures. The Cd was also increase the AChE and NTPDase (ATP and ADP as substrate) and decrease the 5'-nucleotidase activity from cerebral cortex synaptosomes. These Cd effects on central nervous system may be associated with memory deficits, evidenced by decreasing in step-down latency in the inhibitory avoidance test. Moreover, Cd also increased peripheral AChE activity of AChE (whole blood and lymphocytes) which can be associated with a pro-inflammatory state in these animals. However, Curc was effective in reducing the harmful effects of Cd decreasing lipid peroxidation and preventing increased AChE and NTPDase activities, thereby improving neurotransmission and cognitives processes, suggesting that this natural compound may be considered, after further study, an important ally in therapies against poisoning by this metal.

Keywords: Cadmium. Curcumin. Ecto-nucleotidases. Acetylcholinesterase. Lipid peroxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Esquema representativo do metabolismo do Cd através do organismo e o papel das metalotioneínas na acumulação do Cd no fígado e nos rins18
- Figura 2** – Danos oxidativo causados por espécies reativas em macromoléculas biológicas19
- Figura 3** – Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina21
- Figura 4** – Vias de sinalização purinérgica. Sinalização mediada por nucleotídeos através de receptores P2X e P2Y. O nucleosídeo gerado, adenosina, age em quatro receptores próprios acoplados à proteína G23
- Figura 5** – Estrutura das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidases24
- Figura 6** – Estrutura das enzimas da família NTPDase (1- 8)25
- Figura 7** – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana26
- Figura 8** – Esquema de uma sinapse colinérgica28
- Figura 9** – Isoformas da enzima AChE. Estrutura assimétrica (A12) e molecular (G1, G2 e G4) da AChE30
- Figura 10** –A) Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio aniônico periférico (PAS). B) Interação do substrato (ACh) com o sítio esteárico da AChE31
- Figura 11** –Formas que a curcumina pode ser encontrada33
- Figura 12** –Estrutura química da curcumina34

MANUSCRITO

- Figura 1** – Curcumin (30, 60 or 90 mg/kg) prevented memory impairment in the inhibitory avoidance test in rats exposed to cadmium (1 mg/kg). After one treatment-free day, the animals were subjected to training (A) in a step-down latency test and 24 hours later was realized the retention test (B) in the same apparatus. Different lowercase letters indicate significant difference among the groups at testing by the Dunn's nonparametric multiple comparison task. Data are median \pm interquartile range of training and test. (n = 10-15; P < 0.05)70
- Figura 2** – Acetylcholinesterase (AChE), NTPDase and 5'-nucleotidase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan's test (n = 4–7; P < 0.05)71
- Figura 3** – Acetylcholinesterase (AChE) activity in supernatant of striatum (A), cerebral cortex (B), hippocampus (C), hypothalamus (D) and cerebellum (E) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan's test (n = 5–10; P < 0.05)72
- Figura 4** – Acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood (A) and lymphocytes (B) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan's test (n = 4–10; P < 0.05)73
- Figura 5** – Oxidative stress measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in striatum (A), cerebral cortex (B), hippocampus (C), hypothalamus (D) and cerebellum (E) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan's test (n = 5–10; P < 0.05).....74

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Rats exposed to cadmium (Cd; 1 mg/kg) and/or treated with curcumin (Curc; 30, 60 or 90 mg/kg) did not demonstrate altered motor abilities68

Table 2. Rats exposed to cadmium (Cd; 1 mg/kg) and/or treated with curcumin (Curc; 30, 60 or 90 mg/kg) did not demonstrate altered shock sensitivity ..69

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ACh	– Acetilcolina
AChE	– Acetilcolinesterase
ADP	– Adenosina Difosfato
AMP	– Adenosina Monofosfato
ATP	– Adenosina Trifosfato
BChE	– Butirilcolinesterase
BHE	– Barreira Hematoencefálica
Cd	– Cádmiio
ChAT	– Colina acetiltransferase
CHT	– Transportador de colina
Curc	– Curcumina
DMPS	– Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico
DMSA	– Ácido <i>meso</i> 2,3- dimercaptosuccínico
ERRO	– Espécies Reativas de Oxigênio
IL-1	– Interleucina-1
IL-6	– Interleucina-6
IL-8	– Interleucina-8
INF-γ	– Interferon - gama
MT	– Metalotioneínas
NF-κB	– Fator Nuclear - kappa beta
NTPDases	– Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
SNC	– Sistema Nervoso Central
TACHV	– Transportador de acetilcolina vesicular
TBARS	– Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	– Fator de Necrose Tumoral- alfa

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM	90
--	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3. MANUSCRITO	37
4. CONCLUSÕES	75
5. REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	89

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 representam 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 equivalem 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 será submetido: BMC Complementary and Alternative Medicine

1. INTRODUÇÃO

Muitos metais são essenciais para a preservação da vida, porém alguns são considerados tóxicos e estes são, provavelmente, as toxinas mais antigas conhecidas pelo homem, e quando entram em contato com a população tornam-se um problema de saúde pública (GOYER, 1996; TAVARES & CARVALHO, 1992). Um exemplo destes, é o cádmio (Cd), o qual teve seu primeiro registro realizado em 1817 por Friedrich Strohmeyer, e que apesar de ter sido reconhecido tardiamente se comparado a outros metais, é considerado altamente tóxico tanto em nível de intoxicação humana quanto de contaminação ambiental (NORDBERG, 2004).

O Cd é um metal pesado de cor prata claro, com peso molecular 112,41 e número atômico 48, classificado como um metal de transição, pertencente ao grupo 12 da tabela periódica, possuindo pontos de fusão e ebulição 321°C e 767,2°C, respectivamente, densidade de 8,65 g/cm³ e encontra-se geralmente associado ao zinco, chumbo ou cobre (OSPAR Commission, 2002). Este metal é encontrado no meio ambiente, devido ao processo natural de erosão e abrasão de rochas e solos, além de eventos como incêndios florestais e erupções vulcânicas. Encontrando-se principalmente na forma do mineral greenockita, composto por sulfeto de cádmio (77,6% de Cd), e também é encontrado em outros minerais como o otavite (carbonato de cádmio) (RAO et al., 2010).

Este elemento não essencial é encontrado na natureza, geralmente, em concentrações baixas, as quais variam entre 0,1 e 1,0 ppm (HUFF et al., 2007). Porém, tem seus níveis aumentados no meio ambiente, devido ao seu amplo emprego na indústria, sendo um subproduto da mineração e fundição de chumbo e zinco sendo que em virtude de suas propriedades não corrosivas, seu principal uso é na galvanização. O Cd é também encontrado na fabricação de baterias, plásticos, corantes, pesticidas, fertilizantes e cigarros (ATSDR, 2012; JÄRUP et al., 1998; 2009; MÉNDEZ-ARMENTA et al., 2007). Assim este metal possui grande interesse clínico, porque é quimicamente muito reativo, tem uma grande solubilidade em água, um elevado tempo de meia-vida biológica (10-30 anos) e a sua toxicidade é difícil de tratamento (JÄRUP & AKESSON, 2009).

Estudos demonstram que o Cd possui três principais formas de exposição aos humanos: cutânea, pulmonar e gastrointestinal. A absorção dérmica de Cd é lenta,

porém níveis de Cd podem atingir 8 a 12% (GODT et al., 2006; JÄRUP et al., 1998). Já a via de absorção pulmonar de Cd é cerca de 40 a 60% do total de Cd inalado. Assim, durante a exposição ocupacional, onde o Cd é liberado no ar pelas indústrias que empregam processos térmicos, por exemplo, na produção de ferro e queima de combustíveis fósseis, o Cd inalado torna-se particularmente perigoso.

Além destas, temos a exposição gastrointestinal, que apesar de ter uma absorção baixa, cerca de 5 a 8%, essa via se destaca, pois o Cd entra em contato com quase todos os alimentos devido à contaminação das águas e dos solos, uma vez que os produtos contendo Cd são lançados juntamente com o lixo doméstico ao meio ambiente, aplicados em fertilizantes, utilizados na adubação, o que promove uma bioacumulação deste metal na cadeia alimentar atingindo a população em geral (não ocupacional e não fumante) (GODT et al., 2006; JARUP et al., 1998; SATARUG & MOORE, 2004; WESTER et al., 1992). Fato este ocorrido na década de 50, antes e durante a Segunda Guerra Mundial em Fuchu, Japão, onde as pessoas que se alimentavam de arroz irrigado pelas águas do rio Jinzu contaminadas por Cd, apresentavam deformidades ósseas graves e insuficiência renal crônica. Essa doença foi conhecida pelo nome de Itai-Itai (ai-ai), devido à dor sentida pela fratura do osso (JÄRUP & AKESSON, 2009; NORDEG, 2004).

Sabe-se que a via de contaminação, dose, forma química, duração da exposição, a idade, o estilo de vida, bem como a nutrição das pessoas podem afetar os níveis de Cd absorvidos, uma dieta pobre em cálcio, ferro ou proteínas aumentada a absorção deste metal, por exemplo, as mulheres apresentam níveis sanguíneos de Cd absorvidos maiores do que os homens devido aos baixos níveis de ferro perdidos durante a menstruação (BERGLUND, 1994; REEVES & CHANEY, 2008; ZALUPS & AHMAD, 2003). A exposição ao Cd através dos alimentos ocorre principalmente pelos mariscos, tais como mexilhões, vieiras e ostras podendo atingir valores entre 100 e 1000 µg/kg, enquanto as sementes podem atingir valores na faixa de 10 a 150 µg/kg de Cd. A carne, o peixe e os frutos podem conter entre 1 e 50 µg/kg, onde as maiores concentrações estão no fígado e rins destes animais. A ingestão semanal tolerável deste metal é de 7 µg/kg de peso corporal, valor estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1992; GOYER, 1996).

Após sua absorção, o Cd é transportado no sangue ligado a proteínas de elevado peso molecular, em particular a albumina plasmática. No fígado, o Cd é

excretado na bile ligado à glutatona. Uma exposição baixa e constante ao Cd tem uma excreção urinária pequena e constante. Porém, quando ocorre uma exposição mais prolongada, além de ter maiores concentrações de Cd excretados na urina, através da qual dosamos e determinamos a sua intoxicação, este metal também induz a síntese de metalotioneínas (MT) e é armazenado como o complexo Cd-MT, que pode ser transportado através do sangue e redistribuído para vários tecidos e órgãos (JARUP et al., 1998; KLAASSEN et al., 2001; TOHYAMA & SHAIKH, 1981).

O complexo Cd-MT também pode ser filtrado no glomérulo e reabsorvidos nos túbulos renais, acumulando-se nos lisossomos do córtex renal. Este complexo é, então, degradado e os íons de Cd liberados se ligam as MT renais. Quando a quantidade de Cd presente no córtex renal excede a capacidade de ligação às MT, este Cd não ligado à MT, pode induzir toxicidade renal (Figura 1) (GOYER et al., 1995a; JARUP et al., 1998; ZALUPS & AHMAD, 2003).

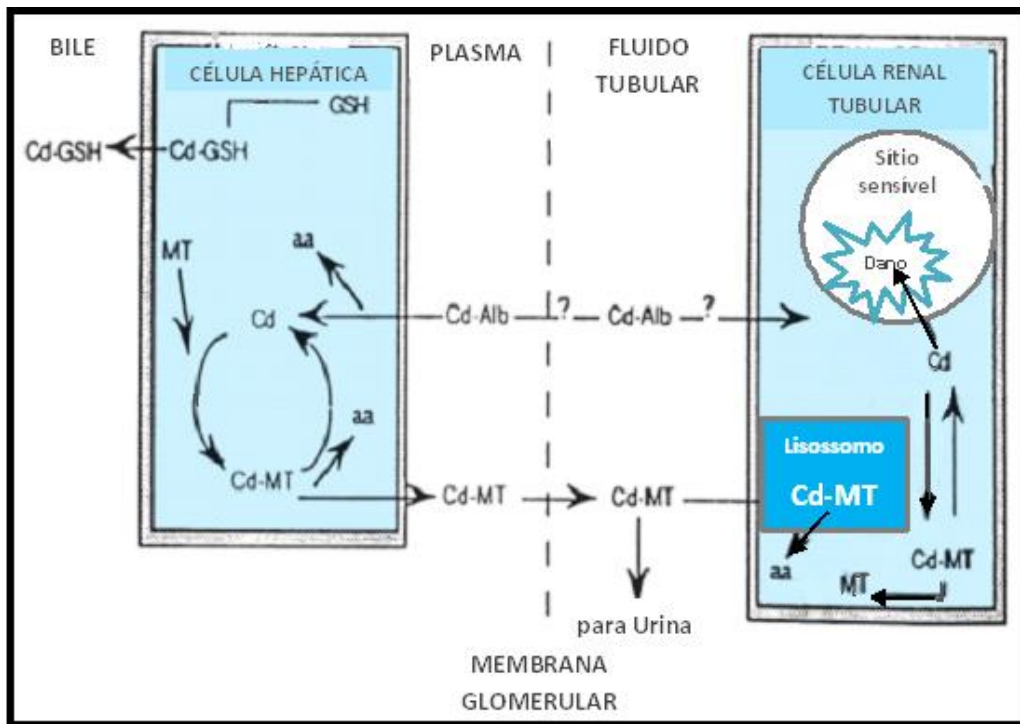


Figura 1 – Esquema representativo do metabolismo do Cd através do organismo e o papel das metalotioneínas na acumulação do Cd no fígado e nos rins.

Alb = albumina; **aa** = aminoácidos; **Cd** = cádmio; **GSH** = glutatona; **MT** = metalotioneínas.
 Fonte: Adaptado de Järup et al., (1998).

Sendo assim, além de induzir, primariamente, toxicidade aguda hepática e toxicidade crônica renal, o Cd pode afetar vários órgãos e tecidos como, sangue, pulmões, ovários, ossos, testículos e, inclusive, o cérebro (BORGES et al., 2008; CHEN et al., 2009; LUCHESE et al., 2007; RIKANS & YAMANO, 2000; SANTOS et al., 2005 a, b), porém os mecanismos de toxicidade do Cd ainda não estão bem estabelecidos. Acredita-se que esses efeitos são, provavelmente, devido ao estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas ao oxigênio (ERO), pois o Cd pode agir sobre as enzimas de defesa antioxidante como a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona redutase e a glutatona peroxidase. Logo, os níveis aumentados desse metal e de ERO podem ocasionar a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e também lipídios, conduzindo a alterações tanto na estrutura quanto nas funções celulares, um exemplo é perda na fluidez e alterações na função da membrana (Figura 2) (GONÇALVES et al., 2007, 2009; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

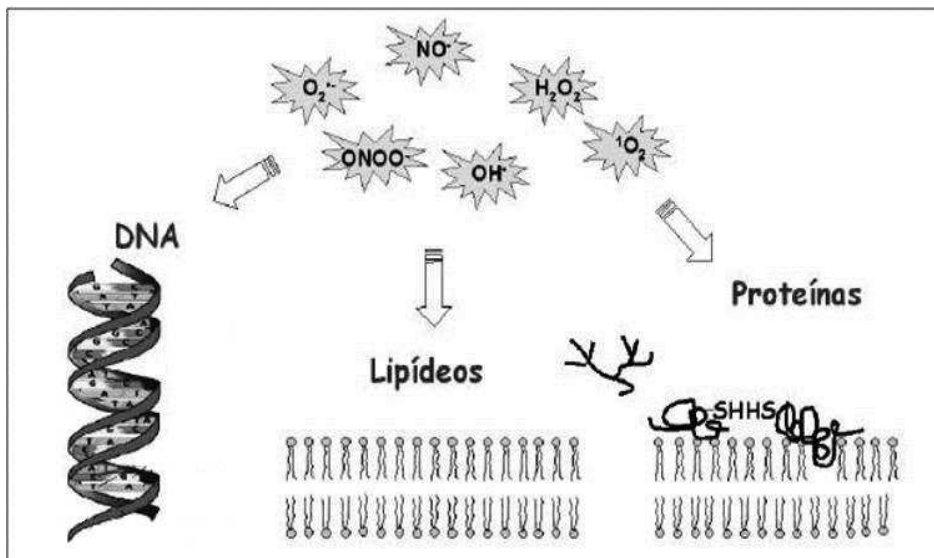


Figura 2 – Danos oxidativo causados por espécies reativas em macromoléculas biológicas.

Fonte: Torres, (2003).

O cérebro possui uma ampla susceptibilidade à lipoperoxidação, devido ao elevado fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados e alta utilização de oxigênio (CALABRESE et al., 2000), mas apesar do sistema nervoso central (SNC) ser

protegido de muitas substâncias tóxicas pela barreira hematoencefálica (BHE), pequenas quantidades de Cd podem chegar a ele. Essa neurotoxicidade causada pelo Cd tem sido bem demonstrada em modelos animais (ABDALLA et al., 2013, GONÇALVES et al., 2013; VIAENE et al., 2000), onde relata-se mudanças comportamentais e danos sobre diversas regiões do SNC, com perda de memória e aumento da ansiedade e agressividade (GONÇALVES et al., 2012; MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007; MINAMI et al., 2001). Estudos demonstram que o Cd pode causar neurotoxicidade por promover tanto uma diminuição na liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato), quanto um aumento na liberação de neurotransmissores inibitórios (glicina e GABA). Os metais pesados também causam uma deficiência na absorção de neurotransmissores e de energia, pois afetam as mitocôndrias bem com a síntese e a utilização de ATP (MINAMI et al., 2001; RAJANNA et al., 1990). Sabe-se que sinaptossomas são sacos membranosos artificiais, obtidos a partir de frações homogêneas de vesículas sinápticas, que contêm componentes sinápticos, como grande quantidade de mitocôndrias que promovem produção de ATP. Assim, fatores que afetem negativamente a capacidade das mitocôndrias de gerar ATP, provavelmente, provocarão consequências negativas para o desenvolvimento e função cerebral (BAI & WITZMANN, 2007; MILLAR et al., 2005).

Além da ação neurotóxica, muitos estudos têm documentado os efeitos imunossupressores do Cd (KOLLER et al., 1998; PILLET et al., 2006). Acredita-se que este metal induza alterações nas respostas imunes humoral e celular, afetando os linfócitos B e T, e macrófagos, bem como as citocinas que são mediadores de reações inflamatórias e imunes. As citocinas regulam fortemente a proliferação, maturação, diferenciação, funções, e a apoptose em células do sistema imunológico, assim quando secretadas excessivamente causam a disfunções das células imunológicas (MONIUSZKO-JAKONIUK et al., 2009). Muitos trabalhos evidenciaram que a administração de Cd em ratos promoveu elevação nas citocinas séricas como as interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ , promovendo assim um efeito imunotóxico (EL-BOSHY et al., 2014; KATARANOVSKI et al., 1998, 2009; MARIT et al., 2010; SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2000).

Dentre os sistemas enzimáticos que estão envolvidos em respostas imunes e neuromoduladoras destacam-se os sistemas purinérgico e colinérgico. O sistema

purinérgico é composto principalmente pelos nucleotídeos extracelulares de adenina, adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e o nucleosídeo adenosina (Figura 3), consideradas moléculas sinalizadoras, que são capazes de modular uma variedade de processos biológicos (ILLES & RIBEIRO, 2004; ZIMMERMANN, 2001). Estas moléculas são constitutivamente secretadas em concentrações muito baixas (micromolares), nos fluidos extracelulares a partir das células, havendo uma extensa discussão em torno das vias celulares envolvidas na sua liberação, uma vez que o exato mecanismo não é bem estabelecido. Sabe-se, contudo, que as concentrações desses nucleotídeos no meio exterior ao da célula são influenciadas por vários fatores, como a secreção e/ou lise celulares, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, exocitose das vesículas secretoras, efeito da diluição no espaço extracelular e pela ação catalítica das ecto-nucleotidases (MALMSJO et al., 2000; RATHBONE et al., 1999).

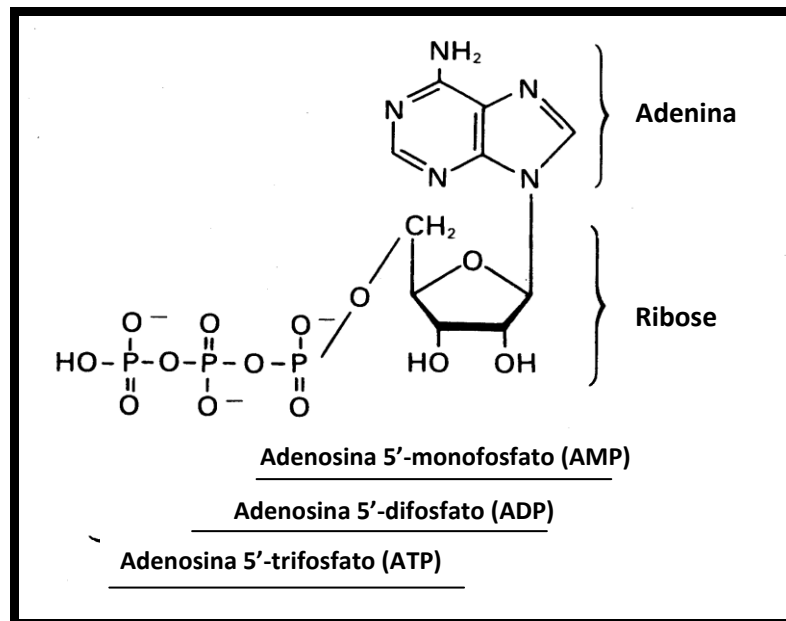


Figura 3 – Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.

Fonte: Adaptado de (<http://www.benbest.com/cryonics/ischemia.html>).

O ATP possui uma variedade de papéis fisiológicos em diversos tipos celulares, além de ser uma molécula altamente energética é considerado um importante neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas e neuromodulador, sendo liberado juntamente com outros neurotransmissores como o

glutamato, a noradrenalina e acetilcolina (ACh) através das vesículas pré-sinápticas dependentes de cálcio (BURNSTOCK, 2006; ILLES & RIBEIRO, 2004). Além disso, o ATP e o ADP atuam como substâncias ativadoras e reguladoras dos processos tromboembólicos desencadeados pelas plaquetas. Concentrações micromolares de ADP são suficientes para induzir a agregação plaquetária. O ATP por agir como uma molécula pró-inflamatória, dependendo do receptor purinérgico utilizado, assim estimulando a proliferação de linfócitos e sendo essencial para a liberação de citocinas, também é um inibidor competitivo das ações mediadas pelo ADP, embora evidências indiquem a existência de mecanismos não competitivos e demonstrem que o ATP em altas ou baixas concentrações modula diferentemente a agregação plaquetária, ou seja, em baixas concentrações ele induz a agregação, enquanto que em altas concentrações ele provoca a inibição desse fenômeno (BLACKBURN et al., 2005). Por outro lado, a adenosina possui propriedades vasodilatadoras, por modular o tônus vascular e inibir a agregação plaquetária; anti-inflamatórias e imunossupressoras, por inibir a proliferação de células T e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GESSI et al., 2007), e ainda é capaz de regular a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós-sinápticamente, o que pode prevenir uma excitotoxicidade, causando uma neuroproteção (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004; CUNHA, 2001; SCHETINGER et al., 2007; YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN et al., 2001).

Os nucleotídeos e seus metabólitos, uma vez presentes no meio extracelular, desempenham sua ação pela ligação aos receptores de adenosina (receptores P1) e receptores P2 expressos na superfície das células, imunes e neurais (Figura 4). Os receptores P2X (ionotrópicos), que são específicos para o ATP, são caracterizados por serem acoplados a canais iônicos e apresentarem seus domínios carboxi e amino terminal voltados para o meio intracelular, sendo que sete subtipos deste receptor já foram descritos (P2X1-7). Os receptores P2Y (metabotrópicos) são receptores acoplados a proteína G e 14 subtipos deste receptor foram identificados (P2Y1-14). Os receptores P2Y1, P2Y11, P2Y12 e P2Y13 respondem principalmente aos nucleotídeos de adenina, ATP e ADP (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004; FÜRSTENAU et al., 2006). A adenosina, por sua vez, medeia seus efeitos através de receptores de adenosina acoplados a proteína-G. Existem quatro tipos de receptores: A2A, A2B, A1 e A2, os quais são proteínas transmembrana acopladas a

proteína G, os dois primeiros ativam a adenilato ciclase, enquanto os últimos a inibem (BLACKBURN et al. 2005; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

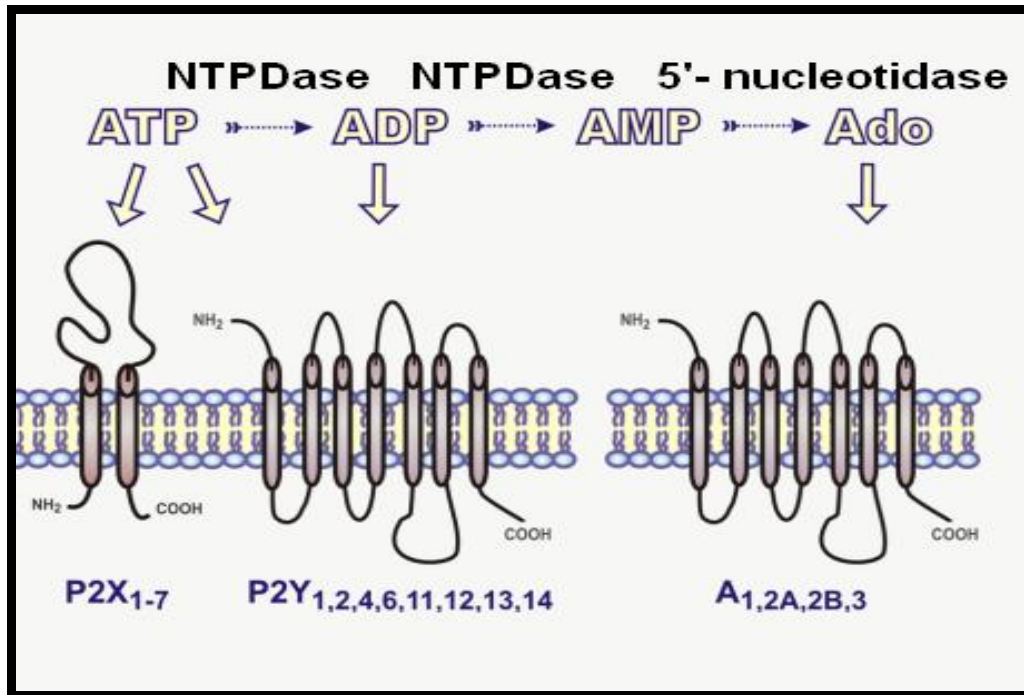


Figura 4 – Vias de sinalização purinérgica. Sinalização mediada por nucleotídeos através de receptores P2X e P2Y. O nucleosídeo gerado, adenosina, age em quatro receptores próprios acoplados à proteína G.

Fonte: Yegutkin (2008).

Após exercerem seus efeitos, os nucleotídeos e nucleosídeos são rapidamente inativados por meio de uma ampla classe de proteínas catalíticas, as ectonucleotidasas, que promovem a sua degradação, para assim manter seus níveis extracelulares em concentrações fisiológicas (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004; SCHETINGER et al., 2007; YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, 2001).

As ectonucleotidasas são um complexo multienzimático, onde diferentes famílias de ectoenzimas trabalham de forma orquestrada. Nesse processo se destacam as enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato-difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase e as fosfatases alcalinas (Figura 5). Atuando em conjunto, estas ectoenzimas formam uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase, que hidrolisam o ATP e o ADP formando AMP. Já enzima 5'-nucleotidase catalise a hidrólise do AMP

em adenosina. Além disso, adenosina é hidrolisada irreversivelmente pela enzima adenosina desaminase (ADA) em inosina (ZIMMERMANN et al., 2007).

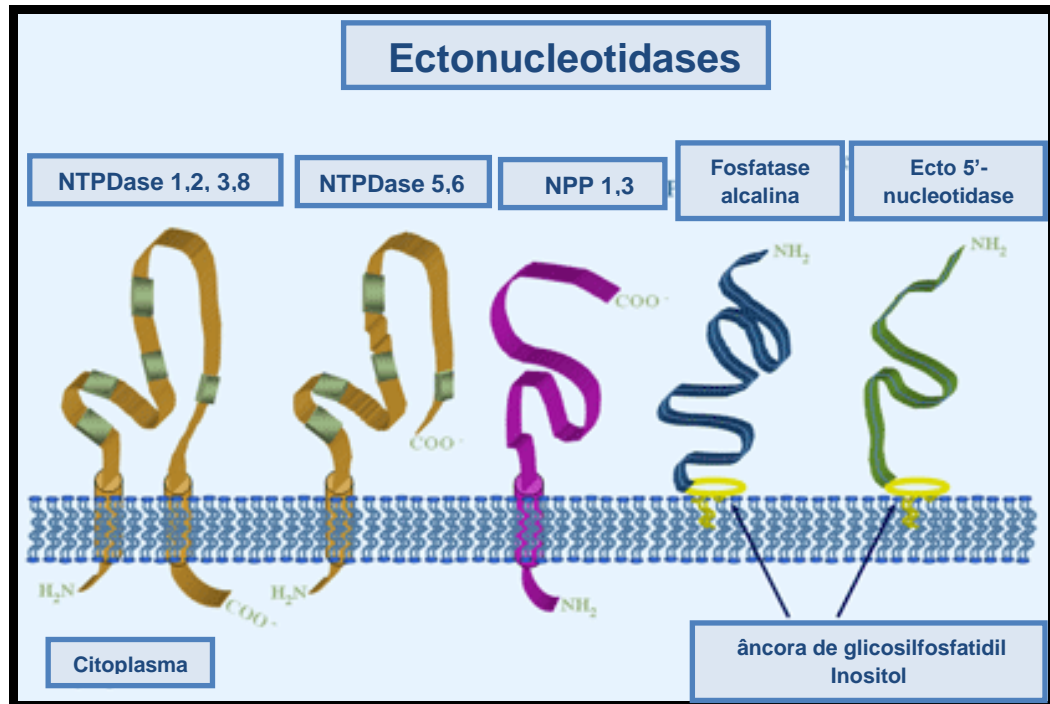


Figura 5 – Estrutura das diferentes famílias de enzimas que compõem o grupo das ectonucleotidasas.

Fonte: Adaptado (<http://www.ccri.ca/sevigny.html>).

As enzimas E-NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, as quais são expressas sobre a superfície de células como, neurônios, plaquetas e linfócitos, estão sendo muito estudadas, uma vez que suas atividades estão modificadas em processos patológicos e toxicológicos como câncer de mama e pulmão, diabetes, além de intoxicação por Cd (ABDALLA et al., 2013; ARAUJO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2012, 2013; LUNKES et al., 2003; ZANINI et al., 2013).

As E-NTPDases são uma família de enzimas amplamente distribuídas na natureza, que estão ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular. Essa classe de enzimas é dependente dos cátions divalentes para exercer sua atividade catalítica ótima e apresentam grande similaridade na sua sequência de aminoácidos, particularmente nas 5 regiões denominadas regiões conservadas da apirase (ACRs), o que

caracteriza esse conjunto de enzimas e que são muito relevantes para sua atividade catalítica (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001). Já foram identificados oito membros nomeados de NTPDase (1-8) que diferem quanto a especificidade por substratos, distribuição tecidual e localização celular (Figura 6) (BIGONNESSE et al., 2004; SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001).

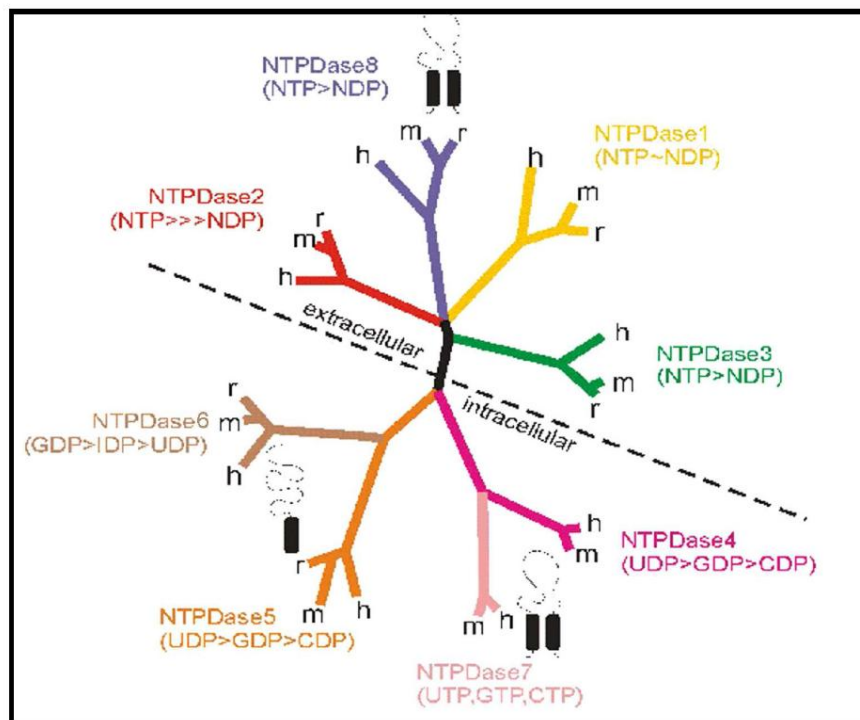


Figura 6 – Estrutura das enzimas da família NTPDase (1- 8).

Fonte: Adaptado de Robson et al., (2006).

As NTPDase 1, 2, 3 e 8 estão localizadas na membrana celular e estão ligadas à ela por dois domínios transmembrana N e C-terminal citoplasmático, com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo as principais metabolizadoras de nucleotídeos no meio extracelular. Além disso, a NTPDase 1, hidrolisa tanto ATP quanto ADP na mesma proporção, NTPDase 3 e 8 possuem maior afinidade pelo ATP, sendo classificadas como ecto-ATPases. As NTPDase 4, 5, 6 e 7 exibem localização intracelular (ROBSON et al., 2006).

A NTPDase-1 (E.C 3.6.1.5, apirase, CD39) foi a primeira enzima da família NTPDase a ser descrita, originalmente classificada como ATP fosfohidrolase foi revelada apenas na metade dos anos 90. Esta enzima hidrolisa os nucleotídeo tri e

difosfatados na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , sendo amplamente distribuída no encéfalo de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e células endoteliais (ZIGANSHIN et al., 1994; ZIMMERMANN, 2001).

Além das E-NTPD ases, as enzimas ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) também são encontradas em muitos tecidos e órgãos como rins, fígado, pulmão, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune, inclusive no SNC, onde desempenham importantes funções, como a neuromodulação e neuroproteção (COLGAN et al., 2006; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; ZIMMERMANN et al., 1998;). Já foram isoladas e caracterizadas sete sub-tipos desta ectoenzima em humanos, sendo responsáveis por catalisar a hidrólise de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP a seus respectivos nucleosídeos, porém é mais eficientemente ao hidrolisar AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN et al., 1998; 2001).

A ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína ligada à membrana via um glicosilfosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, podendo ter localização subcelular, sendo cinco delas localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma anexada à membrana plasmática externa (Figura 7) (ZIMMERMANN, 2001).

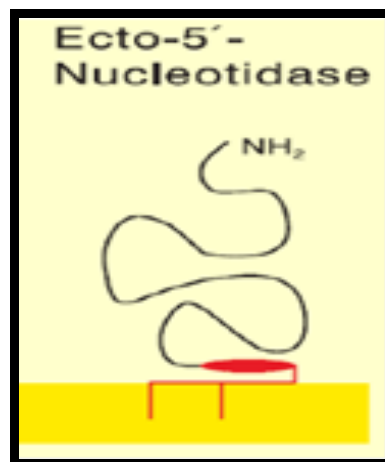


Figura 7 – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.

Fonte: Adaptado de Zimmermann (2001).

Logo, as ectonucleotidasas estão envolvidas em inúmeras funções fisiológicas, uma vez regulam a concentração extracelular dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina, os quais modulam uma variedade de efeitos teciduais, mencionados anteriormente. Estudos mostram o envolvimento destas enzimas em várias doenças e processos de intoxicação o que sugere que elas poderiam ser importantes parâmetros fisiológicos e patológicos na exposição ao Cd (ABDALLA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2010, 2012a, b; GUTIERRES et al., 2012; JAQUES et al., 2011, 2012; MAZZANTI et al., 2009; SCHMATZ et al., 2009).

Além do sistema purinérgico, efeitos nocivos da exposição do Cd sobre o sistema colinérgico têm sido relatados. Alguns estudos sobre toxicidade do Cd associaram perturbações comportamentais com a neurotransmissão colinérgica, sendo que o sistema colinérgico é uma das mais importantes vias modulatórias dos SNC e periférico (GONÇALVES et al., 2010, 2012; PARI & MURUGAVEL, 2007).

O sistema colinérgico é composto pelo neurotransmissor ACh o qual foi o primeiro a ser identificado nas sinapses cerebrais (Figura 8). A ACh é sintetizada na junção neuroefetora e ganglionar pela enzima colina aciltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6), a partir do acetil-CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta (PRADO et al., 2002; RANG et al., 2004; SOREQ & SEIDMAN, 2001). A etapa final da sua síntese ocorre no citoplasma onde a ACh é transportada para o interior de vesículas pré-sinápticas pelo transportador vesicular da ACh (TACHV), onde permanece até que ocorra um potencial de ação no terminal nervoso e desencadeie sua liberação por exocitose num mecanismo Ca^{2+} -dependente, difundindo-a assim na fenda sináptica (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh ativa receptores específicos de ACh posicionados nas células pós-sinápticas, através dos quais seus efeitos, principalmente excitatórios, são efetivados. Esses receptores são designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: muscarínicos e nicotínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes. Os receptores muscarínicos agem via ativação de proteínas G e possuem ACh e a muscarina como agonista. São divididos em cinco subtipos (M1-M5), sendo que os receptores M1 e M2 estão presentes em neurônios do sistema nervoso central e periférico e em outros tecidos ganglionares (SARTER & PARIKH, 2005; SOREQ & SEIDMAN, 2001). Já os receptores nicotínicos atuam como canais iônicos regulados por ligante,

possuem a ACh e a nicotina como agonistas. Estes receptores são compostos por cinco subunidades conhecidas por $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ e δ e localizam-se, predominantemente, nas sinapses ganglionares (UNGLESS & CRAGG, 2006).

Após exercer sua ação, a ACh é hidrolisada em acetato e colina na fenda sináptica pelas enzimas colinesterases. A colina é recaptada pelo transportador de colina para o terminal pré-sináptico onde poderá ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh (MESULAM, et al., 2002).

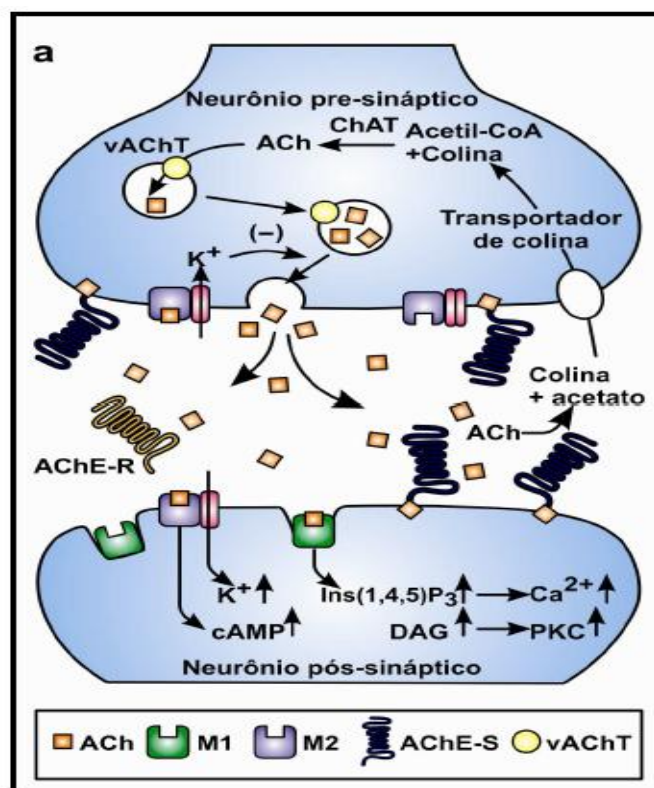


Figura 8 – Esquema de uma sinapse colinérgica.

ACh = acetilcolina; M1 = receptor muscarínico tipo 1; M2 = receptor muscarínico tipo 2; VACHT = transportador de ACh vesicular.

Fonte: Adaptado de Soreq & Seidman (2001).

As colinesterases são enzimas importantes na neurotransmissão colinérgica, pois possuem funções como hidrólise e detoxificação de xenobióticos. A acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira (AChE; E.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) são os dois tipos de colinesterases, as quais são classificadas de acordo com as suas propriedades

catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (COKUGRAS, 2003). A AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, como a ACh e, a BuChE hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A AChE é encontrada no cérebro, junção neuromuscular, eritrócitos e linfócitos, sendo 10 vezes mais abundante que a BuChE. Por outro lado, a BuChE é encontrada no plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE (MESULAM et al., 2002).

Dentre todos estes componentes do sistema colinérgico, daremos ênfase a AChE, uma vez é uma enzima amplamente pesquisada devido a sua grande importância fisiológica em patologias neurodegenerativas, além de estar envolvida na intoxicação por organofosforados (MEHTA et al., 2012; SIKORA et al., 2011).

Além disso, estudos em modelos animais e humanos encontraram uma associação da intoxicação por Cd com distúrbios comportamentais e neurotransmissão colinérgica, uma vez que ocorreu um aumento ou uma diminuição na atividade da AChE após a exposição ao Cd (GONÇALVES et al., 2010, 2012b; PARI E MURUGAVEL, 2007).

A AChE é uma enzima que atua no controle hidrólise e da inativação da ACh, modulando a concentração de ACh tanto na sinapse colinérgica quanto na junção neuromuscular, tendo assim um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica (COKUGRAS, 2003; SOREQ & SEIDMAN, 2001). Esta glicoproteína existe em duas formas moleculares: globular (G1, G2 e G4) e assimétrica (A4, A8 e A12), as quais dependem conformação espacial. A forma globular apresenta-se como monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) de subunidades catalíticas em uma montagem homomérica. Estas podem ser solúveis ou ancoradas a membrana por sequências de aminoácidos hidrofóbicos. A forma G4 é mais predominante no tecido nervoso, mas também pode ser encontrada no plasma, a forma G2 é mais encontrada nos eritrócitos (ALDUNATE et al., 2004; DAS et al., 2001; RAKONCZAY et al., 2005). Já a forma assimétrica apresenta-se em uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde um (A4), dois (A8) e três (A12) tetrâmeros catalíticos estão ligados através de pontes dissulfeto a uma subunidade estrutural colagênica chamada Q (ColQ), resultando nas formas estruturais assimétricas. Estão associadas à lâmina basal, sendo mais abundantes na junção neuromuscular (Figura 9) (ALDUNATE et al., 2004).

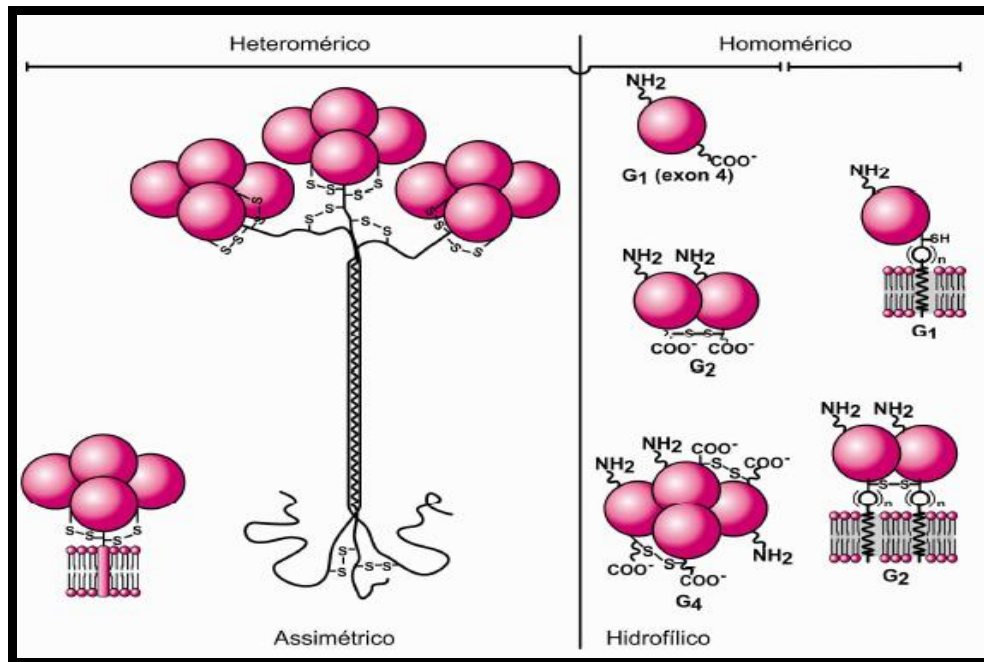


Figura 9 – Isoformas da enzima AChE. Estrutura assimétrica (A12) e molecular (G1, G2 e G4) da AChE.

Fonte: http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm.

O sítio ativo da AChE é encontrado no interior de um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*) de profundidade de 20 Å, alinhado com resíduos hidrofóbicos, os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (JOHNSON & MOORE, 1999). Este sítio ativo contém dois subsítios de ligação, um sítio esterásico, no qual está localizado uma tríade catalítica formada por serina (Ser-203), histidina (His-447) e glutamato (Glu-334) e o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh. Já o outro é carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga (DVIR et al., 2010; TAYLOR & BROWN, 1999).

Um segundo sítio aniônico na borda ou superfície do *gorge*, cerca de 14 Å do sítio ativo, ficou conhecido como sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site* - PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis-quaternários. Acredita-se que este sítio possa estar envolvido na reação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (Figura 10) (NUNES-TAVARES et al., 2002; SILMAN & SUSSMAN, 2008).

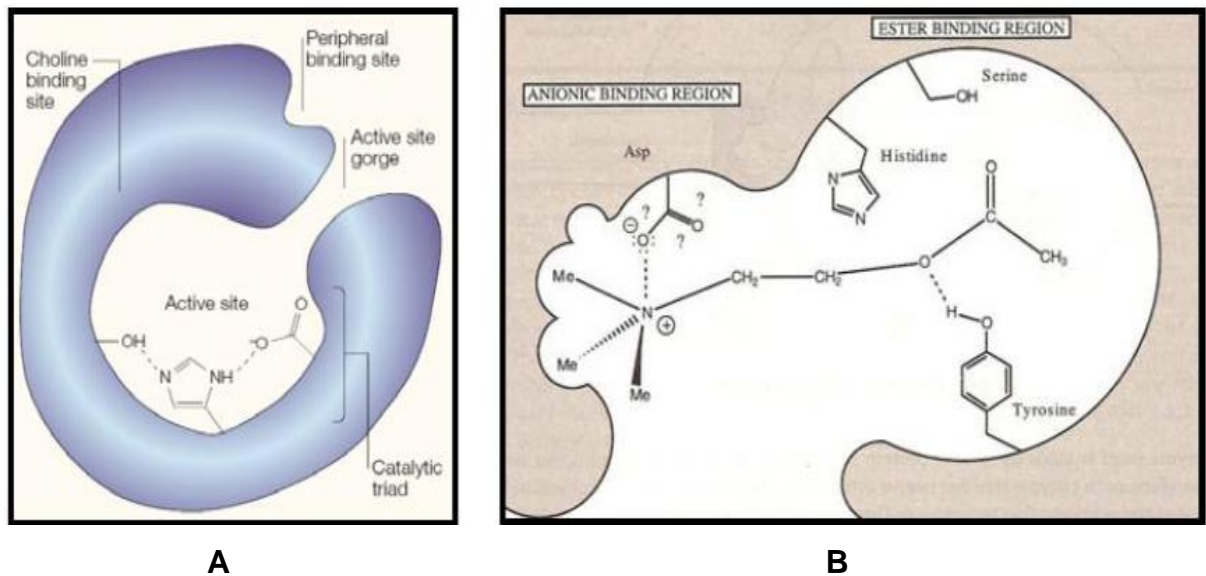


Figura 10 – A) Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio aniônico periférico (PAS). B) Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE.

Fonte: Adaptado de Soreq & Seidman (2001) e adaptado de Patrick (2001).

Na catálise enzimática duas áreas são importantes: a região onde a ACh se liga a AChE por ligação iônica a um resíduo de aspartato ou glutamato e a ligação do hidrogênio ao resíduo de tirosina. A outra região é responsável pelo mecanismo de hidrólise do substrato ACh, composta pelos aminoácidos serina e histidina. A AChE é uma serina hidrolase, seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, sendo a primeira etapa a ligação da ACh ao resíduo de serina no sítio ativo da enzima, formando o intermediário tetraédrico, acetil-AChE, com a liberação concomitante da colina. Em sequência, há a hidrólise deste intermediário liberando acetato, e permitindo o “*turnover*” da enzima (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Esse processo é muito eficiente devido à proximidade do nucleófilo serina e a catálise ácido/básica da histidina, sendo que uma molécula da ACh é hidrolisada em 100 microssegundos (PATRICK, 2001; SILMAN & SUSSMAN, 2005).

Além da AChE presente nos neurônios, verificou-se que essa enzima está presente em outras células como: linfócitos, eritrócitos e células endoteliais, desempenhando múltiplas funções, uma vez que o sistema colinérgico abrange todo o organismo (KAWASHIMA et al., 2007; NEUMAN et al., 2007). Já foi verificada a ação desta enzima na adesão celular, no crescimento dos neuritos, na regulação

estrutural da diferenciação pós-sináptica e na osteogênese (DAY & GREENFIEL, 2002; JONHSON & MOORE, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001).

A AChE eritrocitária, parece estar relacionada à diferenciação hematopoiética, além de estudos indicarem ser uma boa marcadora da integridade e estado funcional da membrana. No sangue, a ACh pode regular várias funções fisiológicas incluindo modulação do sistema imune, sendo uma via “colinérgica anti-inflamatória”, inibindo a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e suprimindo a ativação da expressão do fator nuclear kappa-B (NF-kB) (BOROVIKOVA et al., 2000; RAO et al., 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009). Assim, um aumento na atividade AChE poderia levar à diminuição dos níveis de ACh, reduzindo seus efeitos anti-inflamatórios, devido à ausência do controle de *feedback* negativo exercido por essa molécula (RAO et al., 2007). Dessa forma, é concebível que a atividade dessas enzimas seja reguladora intrínseca da inflamação (DAS, 2007; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009).

Apesar de todos esses danos causados pela exposição ao Cd, ainda não existem terapias específicas contra esse tipo de intoxicação. O uso de agentes quelantes tem sido a base do tratamento médico de intoxicações por metais tóxicos. Desde a década de 40, estes compostos atuam aumentando a excreção destes elementos, diminuindo a toxicidade por prevenir a ligação destes a moléculas celulares alvo (DOMINGO, 1995). O ácido 2,3-dimercapto-1- propanosulfônico (DMPS), o ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) são compostos utilizados nas intoxicações agudas e crônicas, reduzindo a mortalidade, porém gerando inúmeros efeitos secundários nocivos (DOMINGO, 1995; GOYER et al., 1995b; LUCHESE et al., 2007).

Os compostos naturais vêm ganhando preferência no tratamento de diversas doenças e têm sido amplamente pesquisados, pelo fato de serem, na maioria das vezes, mais seguros e possuírem menos efeitos colaterais e associativos. Neste contexto, acredita-se que a utilização de antioxidantes, seria uma alternativa eficaz na tentativa de prevenir ou minimizar os efeitos da intoxicação por Cd (PANDE et al., 2001; TANDON et al., 2003).

A curcumina, quimicamente conhecida como diferuloilmetano, é o principal curcuminóide derivado do rizoma da planta conhecida como cúrcuma (*Curcuma longa Linn*) e pertencente à família Zingiberaceae e contém de 70 a 76% de curcumina. Esta planta é do tipo herbácea e perene, conhecida como açafrão, sendo

originária do sudeste da Ásia, mais precisamente das encostas de morros das florestas tropicais da Índia, a planta foi introduzida no Brasil e é cultivada ou encontrada como subespontânea em vários estados (AGRAWAL et al., 2010; FILHO et al., 2000; KUMAR et al., 2009)



Figura 11 – Formas que a curcumina pode ser encontrada.

Fonte: Adaptado de Aggarwal et al., (2010).

Este polifenol, não-flavonóide, hidrofóbico é um pigmento amarelo alaranjado, usado por milhares de anos como corante e condimento nos alimentos, em países como a Índia e a China. Por ser um composto natural, de baixo custo e de baixo efeito colateral, a curcumina também é muito usada na medicina tradicional indiana, "Ayurveda", pois possui inúmeras propriedades farmacológicas e biológicas, como antivirais, antifúngicas, anti-cancerígenas, além de ser anti-inflamatória e ter um grande potencial antioxidante (AGRAWAL et al., 2010; AMMOM & WAHL, 1991; COLE et al., 2007; GANGULI et al., 2000; KUMAR et al., 2009).

A curcumina possui um carácter altamente lipofílico e, por isso, tem a capacidade de atravessar a BHE, aumentando a sua disposição no cérebro (YANG et al., 2005; ISHRAT et al., 2009). Vários estudos têm demonstrado que a suplementação de curcumina exibe um papel neuroprotector, devido a sua ação antioxidante (KUHAD et al., 2006, 2007). Acredita-se que o potencial antioxidante da curcumina seja atribuído a sua estrutura química (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) conter grupos hidroxilas nas posições orto, anéis aromáticos e da funcionalidade beta-dicetona, sendo a curcumina uma candidata ao tratamento de disfunções neurodegenerativas (AGGARWAL & SUNG, 2009;

DINKOVA-KOSTOVA & TALALAY, 1999; GARCIA-ALLOZA et al., 2007; KAPOOR & PRIYADARSINI, 2001; SETHI et al., 2009; YANG et al., 2005; ZHAO et al., 2008).

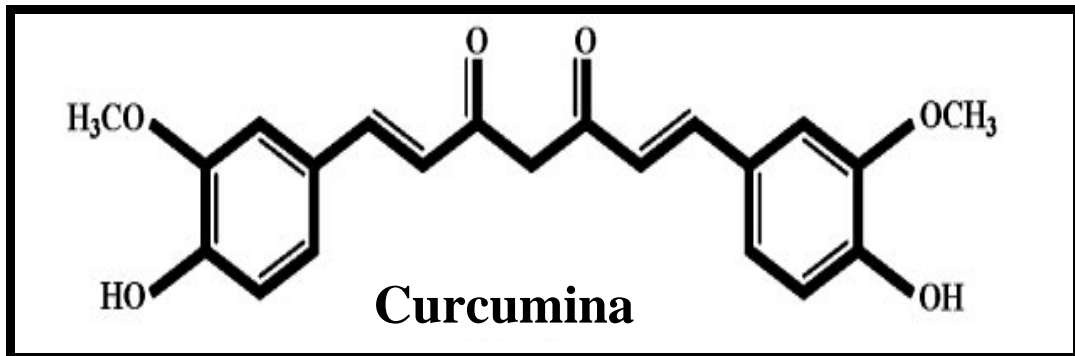


Figura 12 – Estrutura química da curcumina.

Fonte: Adaptado de Ishrat et al., (2009).

Além disso, experimentos recentes têm demonstrado que a curcumina tem efeito protetor contra muitas substâncias tóxicas em cobais e humanos, já que este composto atenuou significativamente os efeitos neurotóxicos como: disfunções colinérgicas e déficits cognitivos associados ao estresse oxidativo, causados por metais como alumínio, chumbo e cádmio (DAIRAM et al., 2007; DANIEL et al., 2004; JAQUES et al., 2011, 2012; SETHI et al., 2009; YADAV et al., 2009). Estudos também evidenciaram que o tratamento com curcumina, preveniu o aumento da atividade da enzima AChE em ratos diabéticos e em demência induzida por estreptozotocina (KUHAD & CHOPRA, 2007; AGGARWAL et al., 2010; KUMAR et al. 2011).

A curcumina também apresenta propriedades anti-inflamatórias, pois é capaz de modular diversos fatores de transcrição e a expressão de diversos fatores inflamatórios, citocinas e moléculas de adesão (AGGARWAL et al., 2010). Também foi verificado que este composto natural foi eficaz em prevenir alterações na atividade da E-NTPDase em linfócitos periféricos usando ATP ou ADP como substrato em ratos expostos a fumaça de cigarro (JAQUES et al., 2011).

Sendo assim, acredita-se que a suplementação de curcumina seria uma forte candidata no combate a disfunções causadas pela intoxicação por Cd devido a sua

propriedade “scavenger” de ERO e de se ligar a íons metálicos (COLE et al., 2007; KAPOOR & PRIYADARDINI, 2001; SINHA, 2003).

Neste contexto, baseando-se nos efeitos tóxicos do Cd e estando este metal amplamente presente no ambiente, são necessárias pesquisas da sua ação toxicológica sobre os organismos, uma vez que estes mecanismos não estão bem estabelecidos. Além disso, tendo em vista os efeitos protetores, da curcumina torna-se importante avaliar se este composto natural pode prevenir ou amenizar os efeitos da intoxicação por Cd.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da intoxicação por cádmio sobre parâmetros comportamentais e de memória, bem como na atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico, além de determinar os níveis de peroxidação lipídica em ratos expostos cronicamente a esse metal e também avaliar o efeito protetor do antioxidante curcumina nesses animais.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os parâmetros comportamentais de retenção de memória, atividade locomotora e exploratória, além de sensibilidade ao choque em ratos controles e ratos expostos ao Cd e/ou tratados com curcumina;
- Verificar a atividade das enzimas acetilcolinesterase, NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos controles e de ratos expostos ao Cd e/ou tratados com curcumina;
- Analisar a atividade da enzima acetilcolinesterase em diferentes estruturas encefálicas, linfócitos e sangue total de ratos controles e de ratos expostos ao Cd e/ou tratados com curcumina;
- Determinar o nível de peroxidação lipídica em estruturas cerebrais de ratos controles e de ratos expostos ao Cd e/ou tratados com curcumina.

3. MANUSCRITO

3.1 Manuscrito 1:

Curcumina atenua os déficits de memória e comprometimento da sinalização colinérgica e purinérgica em ratos cronicamente expostos ao cádmio

Curcumin attenuates memory deficits and the impairment of cholinergic and purinergic signaling in rats chronically exposed to cadmium

Pauline da Costa^a, Jucimara Baldissarelli^a, Thaís R. Mann^b, Fátima H. Abdalla^a, Amanda M. Fiorenza^a, Michelle M. da Rosa^a, Fabiano B. Carvalho^b, Jessié M. Gutierrez^b, Cinthia M. Mazzanti^b, Maribel A. Rubin^a, Maria Rosa. C. Schetinger^a, Jamile F. Gonçalves^{a*}, Vera M. Morsch^{a*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

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

*Corresponding authors

Address correspondence and reprint requests to:

Vera Maria Morsch (veramorsch@gmail.com)

Jamile Fabbrin Gonçalves (jamilefabbrin@yahoo.com.br)

Tel/Fax: + 55-55-3220-9557

Abstract

The present study aimed to investigate the influence of curcumin (Curc) on cadmium (Cd) toxicity by evaluating cognitive performance, acetylcholinesterase (AChE) activity, as well as hydrolysis of adenine nucleotides and TBARS levels of Cd-intoxicated rats and treated with Curc. For this purpose, the rats received Cd (1 mg/kg) and Curc (30, 60 or 90 mg/kg) by gavage five days a week for three months. The animals were randomly divided into eight groups (n=15 per group): saline/oil, saline/Curc 30, saline/Curc 60, saline/Curc 90, Cd/oil, Cd/Curc 30, Cd/Curc 60 and Cd/Curc 90. The findings show that Cd increased lipid peroxidation in different brain structures as well as AChE activity in different brain structures, cerebral cortex synaptosomes, whole blood and lymphocytes. In cerebral cortex synaptosomes, Cd-intoxicated rats showed altered adenine nucleotide hydrolysis. Curc was able to prevent the effects of Cd on cholinergic and purinergic systems which is interesting since the regulation of these enzymes could have potential therapeutic importance. The administration of Curc also prevented memory impairment and lipid peroxidation. Thus, it highlights the possibility to use Curc as an adjuvant against toxicological conditions caused for Cd.

Keywords: Acetylcholinesterase; Cd; Curcumin; Ectonucleotidases; Lipid peroxidation; Memory

1. Introduction

Cadmium (Cd) is considered one of the most toxic metals, both in relation to environmental contamination and human poisoning. It is widespread on the environment due to increased industrial activities such as mining and smelting being found in the manufacture of batteries, plastics, metal alloys, dyes, soldering, fertilizers and cigarettes (Järup and Akesson, 2009; Järup et al., 1998; Méndez-Armenta and Ríos, 2007). This metal is an element of great clinical interest because it is chemically very reactive, has large solubility in water, has a long biological half-life, and its toxicity is difficult to treat (Jones and Cherian, 1990).

Cd induces many toxic effects in various organs such as the lungs, ovaries, bones, testis and especially in the kidneys and liver (Borges et al., 2008; Luchese et al., 2007; Santos et al., 2005, 2006). Cd is able to cause immunotoxic effects, since cells of immune system are particularly sensitive to oxidative stress. These effects have been reported on the development of immune organs, on the differentiation of immune cells, and on specific and nonspecific immune responses (Dong et al., 2001; Gonçalves et al., 2012a; Pathak and Khandelwal, 2009). In addition, although small amounts of this metal reach the brain because of the blood–brain barrier (BBB), Cd is able to cause cellular dysfunction, altered brain neurochemistry and also behavioral disturbances such as memory impairment and increased anxiety and aggression (Gonçalves et al., 2010, 2012b; Gutiérrez-Reyes et al., 1998; Méndez-Armenta and Ríos, 2007).

Some studies on Cd toxicity have found an association with behavioral disturbances and cholinergic and purinergic neurotransmission since an increase or a decrease in the acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7), nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase; E.C 3.6.1.5, CD39), and ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) activity was verified in both animal models and humans that showed behavioral impairments after

exposure to Cd (Abdalla et al., 2013; Gonçalves et al., 2010, 2012b; 2013; Pari and Murugavel, 2007).

Moreover, several studies from our laboratory have demonstrated that these enzymes have important roles in immunomodulation, thromboregulation and neurotransmission, and alterations in their activities have been observed in various diseases and intoxication processes suggesting that it could be an important physiological and pathological parameter (Abdalla et al., 2013; Gonçalves et al., 2010, 2012a, b; Gutierrez et al., 2012; Jaques et al., 2011, 2012; Schmatz et al., 2009).

Interestingly, AChE, NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes respond to oxidative stress and increasing evidence suggests that the imbalance between oxidative stress and antioxidant defenses is related to Cd poisoning (Gonçalves et al., 2010, 2012b; Gutierrez et al., 2012; Méndez-Armenta and Ríos, 2007). Because of that, it has been extensively researched the use of antioxidants in an attempt to reverse, prevent or minimize the damage caused by Cd (Borges et al., 2008; El-Demerdash et al., 2004; Pari and Murugavel, 2007). We recently demonstrated that treatment with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) is able to improve the memory and learning processes of Cd-intoxicated rats and also modulates the activity of AChE, butyrylcholinesterase, NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in different cell types of these poisoned animals (Gonçalves et al., 2010, 2012a). However, NAC is a synthetic drug and currently has increased the study of natural extracts therapies, because they are, in most cases, safe and have few side effects (Shaikh et al., 1999; Tomazzoni et al., 2006).

Curcumin (Curc) is a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome of the plant known as turmeric (*Curcuma longa*) belonging to the family zingiberaceae (Kumar et al., 2009). Because this compound has low side-effect profile, long history of safe use, is able to cross the BBB and to bind redox metal ions it is a promising drug for prophylaxis and treatment of neurodegenerative diseases in future (Sethi et al., 2009; Zhao et al., 2008).

Moreover, recent studies have demonstrated that Curc has protective effects against aluminium, arsenic, lead and Cd-induced neurotoxicity in the brain (Daniel et al., 2004; Kumar et al., 2009; Sethi et al., 2009; Yadav et al., 2009, 2011). However, none of these studies has investigated the effect of Curc against Cd-neurotoxicity on behavioral and biochemical levels.

Based on this background, the present study was carried out to investigate the possible protective influence of Curc on Cd poisoning by evaluating cognitive and motor performance, Cd concentration, lipid peroxidation as well as AChE, NTPDase and 5'-nucleotidase activities of Cd-intoxicated rats and treated with Curc.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Curcumin (C₂₁H₂₀O₆), cadmium chloride monohydrate, acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), nucleotides, Trizma Base, Percoll Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ethopropazine hydrochloride from Aldrich (Steinheim, Germany), Ficoll Hypaque (Lymphoprep™) purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (80 days; 324.6 ± 35 g; n=120) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23±1 °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 UFSM (protocol under number: 114/2013).

2.3. *Experimental procedure*

The body burden of Cd is derived primarily from the ingestion of food and water contaminated with Cd and CdCl₂ is the principal form of Cd associated with oral exposure, as it is highly soluble in water (Zalups and Ahmad, 2003). Thus, in the present study the rats received cadmium as CdCl₂·H₂O (Cd; 1 mg/kg) (Borges, 2008; El-Demerdash, 2004) and Curc (Curc; 30, 60 or 90 mg/kg) (Abbasi, et al., 2012; Kumar, et al., 2009) by gavage five days a week for three months. The animals were randomly divided into eight groups (n=15 per group): saline/oil, saline/Curc 30, saline/Curc 60, saline/Curc 90, Cd/oil, Cd/Curc 30, Cd/Curc 60 and Cd/Curc 90. The last three groups received Curc 30 min after Cd. The Cd and Curc solutions were freshly prepared in saline and corn oil, respectively, and were administered (1 mL/kg) between 9 and 11 a.m.

2.4. *Behavioral procedure*

2.4.1. *Inhibitory avoidance*

One day after the end of the treatment, animals were subjected to training in a step-down inhibitory avoidance apparatus according to Guerra et al. (2006). Briefly, the rats were subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus, which consisted of a 25cm×25cm×35cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7cm×25cm platform, 2.5cm high. Each rat was placed gently on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 2-s 0.4-mA shock was applied to the grid. The retention test took place in the same apparatus 24 h later. Test step-down latency was taken as a measure of retention, and a cut-off time of 600 s was established.

2.4.2. *Open field*

Immediately after the inhibitory avoidance testing session, all animals were transferred to an open field in order to assess exploratory and locomotor activities. Animals were placed on the center quadrant of a round open field (56×40×30 cm) with the floor divided into 12 squares measuring 12×12 cm each. An observer, who was not aware of the pharmacological treatments, manually recorded the number of crossing and rearing responses over 5 min. Crossing was defined as the total number of areas crossed with the four paws and rearing was defined as the total number of stand-up responses on two paws. This test was carried out to identify possible motor disabilities that might have influenced inhibitory avoidance performance at testing.

2.4.3. Foot shock sensitivity test

Reactivity to shock was evaluated in the same apparatus used for inhibitory avoidance, except that the platform was removed. The modified “up and down” method by Rubin et al. (2004) was used to determine the flinch, jump and vocalization thresholds in experimentally naïve animals. Animals were placed on the grid and allowed a 3 min habituation period before the start of a series of shocks (1 s) delivered at 10 s intervals. Shock intensities ranged from 0.1 to 0.6 mA in 0.1 mA increments. The adjustments in shock intensity were made in accordance with each animal’s response. The intensity was raised by one unit when no response occurred and lowered by one unit when there was a response. A flinch response was defined as withdrawal of one paw from the grid floor, and a jump response was defined as withdrawal of three or four paws. Two measurements of each threshold (flinch, jump and vocalization) were taken and the mean of each score was calculated for each animal.

2.5. Blood sample collection

After the behavioral tests, animals were anesthetized and submitted to euthanasia. Blood was collected in vacutainer tubes using EDTA as an anticoagulant to measure AChE activity from whole blood and lymphocytes. The samples of whole blood collected were hemolysed with phosphate buffer, pH 7.4 containing Triton X 100 (0.03%) and stored at -20°C for one week. Lymphocytes were separated on Ficoll–Histopaque density gradients as described by Böyum (1968).

2.6. Brain tissue preparation

The cranium was opened and the structures were gently removed and separated into striatum (ST), cerebral cortex (CO), hippocampus (HC), hypothalamus (HT) and cerebellum (CE). Part of the cerebral cortex was used to obtain the synaptosomes. To verify the cadmium concentration in brain structures, four or five animals per group were randomly chosen. For the other animals, the brain structures were homogenized in a glass potter in a solution of 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, on ice, at a proportion of 1:10 (w/v). The homogenates were centrifuged at 1800 rpm for 10 min and the resulting supernatant was used to determine the AChE activity and TBARS content.

2.7. Cadmium concentration in brain regions

Brain structures were weighted in glass vessels and 3–8 mL of HNO_3 was added for digestion. Digestion was performed using a block (Velp Scientifica, Milano, Italy) heated at 130°C during 3 h. After this time, 2 mL of H_2O_2 was added and the samples were heated for 1 h. Digested samples were then transferred to polypropylene flasks for Cd determination. Cd determination was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS). An ICP-MS equipment (PerkinElmer Sciex, model ELAN DRC II, Thornhill, Canada), equipped with a concentric nebulizer (Meinhard Associates, Golden, USA), a cyclonic spray chamber

(Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) and a quartz torch with an injector tube of 2 mm i.d. was used.

2.8. Synaptosome preparation

Part of cerebral cortex was separated for synaptosomes preparation. The brain was dissected in cerebral cortex, which was homogenized in 10 volumes of an ice cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, pH 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (1984) using a discontinuous Percoll gradient. An aliquot of 0.5 mL of the crude mitochondrial pellet was mixed with 4.0 mL of an 8.5% Percoll solution and layered into an isosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). The supernatant that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The SN fraction was washed twice with an isosmotic solution consisting of 320 mM sucrose, 5.0 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1mM EDTA by centrifugation at 15,000g to remove the contaminating Percoll. The pellet of the second centrifugation was resuspended in an isosmotic solution to a final protein concentration of 0.4-0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0 – 4°C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

2.9. Ectonucleotidases activity in synaptosomes from cerebral cortex

The activity of NTPDase and 5'-nucleotidase in synaptosomes from cerebral cortex was determined according to Schetinger et al. (2000) and Heymann et al. (1984) respectively, with modifications. The proteins of all samples are adjusted to 0.4-0.6 mg/mL. The enzymatic assay of the NTPDase synaptosome was performed in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, sucrose 225 mM and 45 mM Tris HCl

pH 8,0 in a final volume of 200 μ l. The activity of ecto-5'-nucleotidase was determined in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris - HCl, pH 7.5, in a final volume of 200 μ l. 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 the incubation time is 20 min. The reactions were stopped with 200 μ l TCA to give a final concentration of 5% and the release of inorganic phosphate is measured by the method of Chan et al. (1986). All samples were carried out in triplicate and the enzyme activity was expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

2.10. Cerebral AChE enzymatic assay

AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) as previously described by Rocha et al. (1993). The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25 °C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). Protein was determined previously and adjusted for each structure: cerebral cortex synaptosomes (0.4 - 0.6 mg/ml), ST (0.4 mg/mL), CO (0.6–0.8 mg/mL), HC (0.8 mg/mL), HT (0.6 mg/mL) and CE (0.5–0.6 mg/mL). All samples were run in triplicate and the enzyme activity was expressed in μ mol AcSCh/h/mg of protein.

2.11. Whole blood AChE activity

Whole blood AChE activity was determined by the method of Ellman et al. (1961) modified by Worek et al. (1999). With the purpose of reaching the appropriate temperature

and the complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated at 37 °C for 10 min prior to the addition of 0.44 mM AcSCh. The enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. Butyrylcholinesterase (BChE) was inhibited by ethopropazine. The whole blood AChE activity was measured at 436 nm and calculated from the quotient between the AChE activity and hemoglobin content (Hb). Hb was determined using the Zijlstra modified solution. Results are expressed as mU/ μ mol Hb.

2.12. Lymphocytes AChE activity assay

After lymphocyte isolation, AChE activity was determined according to the colorimetric method as described by of Ellman et al. (1961) modified by Fitzgerald and Costa (1993). The proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/mL. One hundred microliters of intact mononuclear cells suspended in saline solution was added a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0). The absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm before and after incubation for 30 min at 27 °C. All samples were run in triplicate and the specific activity of lymphocyte AChE was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content. Results are expressed as μ mol AcSCh /h/mg of protein.

2.13. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement

Brain TBARS levels were determined according to Ohkawa et al. (1979) by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation (LPO) by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Briefly, the reaction mixture, containing 200 μ L of brain supernatants or standard (0.03 mM MDA), 200 μ L of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 500 μ L of 0.8% TBA and 500 μ L of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.4), was

heated at 95 °C for 120 min. The absorbance was measured at 532 nm. TBARS tissue levels were expressed as nmol MDA/mg of protein.

2.14. Protein determination

The protein content was determined colorimetrically according to the Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard solution.

2.15. Statistical analysis

Statistical analysis of training and test step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). All other parameters evaluated were analyzed by two-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests, where $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments.

2. Results

3.1. Behavioral tests

Figure 1 shows the effect of Curc *per se* (30, 60 or 90 mg/kg), as well as its administration in Cd-exposed rats, on step-down latencies. Statistical analysis of testing (nonparametric two-way ANOVA) showed a significant Cd or controls (vehicle and Curc *per se*) vs Curc or saline interaction, revealing that treatment with Curc prevented the impairment of memory induced by Cd. Statistical analysis of training showed no difference between groups.

Because the motivational disparities in the training session may account for differences in inhibitory avoidance at testing, experiments were performed to assess whether Cd or Curc affected the locomotor ability and the shock threshold of the animals. Statistical

analysis of open-field data revealed that neither Cd nor Curc caused gross motor disabilities at testing as demonstrated by the similar number of crossing or rearing responses exhibited by the animals (Table 1). Moreover, Cd or Curc did not alter foot shock sensitivity as demonstrated by the similar flinch, jump and vocalization thresholds exhibited by the rats (Table 2).

3.2. Cd concentration in brain regions

All the brain structures analyzed showed a similar Cd concentration within the same group of rats. Control rats (saline) and rats treated with Curc alone presented Cd concentrations lower than 0.009 $\mu\text{g/g}$ in different brain structures. By the other side, rats exposed to Cd alone or Cd plus Curc showed Cd concentrations of around 0.012 $\mu\text{g/g}$ in different brain structures. Moreover, a significant effect of Cd ($P < 0.05$) and Curc ($P < 0.05$) in Cd concentrations in the different brain structures was observed (data not shown). Results demonstrate that Cd exposure alone or in combination with Curc caused an increase in Cd brain concentration. Therefore, the Curc administration was ineffective in restoring Cd levels to normal values in all the structures evaluated.

3.3. AChE, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from cerebral cortex

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) on AChE activity in cerebral cortex synaptosomes was observed (Fig. 2A). Results demonstrated that Cd exposure caused an increase of 74% in AChE activity in cerebral cortex synaptosomes. The administration of Curc was not able to prevent AChE activity increased induced by Cd.

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) and Curc ($P < 0.05$) on NTPDase activity in cerebral cortex synaptosomes, when ATP was used as substrate, was observed (Fig. 2B). Results demonstrated that the groups saline/Curc 60, saline/Curc 90, Cd/oil, Cd/Curc 60 and

Cd/Curc 90 presented an increase of 31%, 30%, 23%, 27% and 28% in NTPDase activity, respectively. The increased NTPDase activity was abolished by the administration of 30 mg/kg of Curc, but the administration of 60 and 90 mg/kg of Curc was not able to prevent this increase.

A significant Cd×Curc interaction for NTPDase activity on cerebral cortex synaptosomes, when ADP was used as substrate was observed ($F_{3,39} = 10,622$; $P < 0.05$) (Fig. 2C). Results demonstrated that the groups saline/Curc 60, saline/Curc 90, Cd/oil, and Cd/Curc 90 presented an increase of 88%, 93%, 117% and 91% in NTPDase activity. The increased NTPDase activity was abolished totally or partially by the administration of 30 and 60 mg/kg of Curc, respectively.

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) and Curc ($P < 0.05$) in 5'-nucleotidase activity in cerebral cortex synaptosomes was observed (Fig. 2D). Results demonstrated that Cd exposure caused a decrease of 39% in 5'-nucleotidase activity. The decrease in 5'-nucleotidase activity induced by Cd was abolished by the administration of 60 and 90 mg/kg of Curc.

3.4. Activity of AChE in different brain structures

The results obtained for AChE activity in different brain structures are presented in Figure 3.

A significant Cd×Curc interaction for striatum AChE activity was observed ($F_{3,44} = 4.239$; $P < 0.05$) (Fig. 3A). The increase in AChE activity induced by Cd was abolished by all the Curc administrations (30, 60 or 90 mg/kg).

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) and Curc ($P < 0.05$) in AChE activity in cerebral cortex and hippocampus was observed (Fig. 3B and 3C). Results demonstrated that Cd exposure caused an increase of 44% and 58% in AChE activity in cerebral cortex and

hippocampus, respectively. All Curc administrations (30, 60 or 90 mg/kg) showed a tendency to ameliorate AChE activity increased by Cd.

A significant Cd×Curc interaction for hypothalamus AChE activity was observed ($F_{3,40} = 1.729$; $P < 0.05$) (Fig. 3D). Post hoc comparisons demonstrate that rats exposed to Cd presented an increase (58%) in hypothalamus AChE activity. The administration of 30 and 60 mg/kg of Curc showed a tendency to ameliorate AChE activity increased by Cd.

Two-way ANOVA revealed that there were no significant alterations in AChE activity in cerebellum (Fig. 3E).

3.5. *Peripheral AChE activity*

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) in whole blood AChE activity was observed (Fig. 4A). Results demonstrated that Cd exposure caused an increase (67%) in AChE activity of whole blood. The increase in AChE activity induced by Cd was abolished by the administration of 90 mg/kg of Curc.

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) for AChE activity in lymphocytes was observed (Fig. 4B). Post hoc comparisons demonstrate that rats exposed to Cd presented an increase of 46% AChE activity in lymphocytes. The increase in AChE activity induced by Cd was abolished by all the Curc administrations (30, 60 or 90 mg/kg).

3.6. *TBARS in different brain structures*

The results obtained for TBARS in different brain structures are presented in Figure 5.

A significant Cd×Curc interaction for striatum TBARS levels was observed ($F_{3,32} = 8.279$; $P < 0.05$) (Fig. 5A). Post hoc comparisons demonstrate that rats exposed to Cd presented an increase (107%) in striatum TBARS levels. The increase in TBARS levels induced by Cd was abolished by all the Curc administrations (30, 60 or 90 mg/kg).

A significant Cd×Curc interaction for cerebral cortex TBARS levels was observed ($F_{3,42} = 6.699$; $P < 0.05$) (Fig. 5B). Post hoc comparisons demonstrate that rats exposed to Cd presented an increase (92%) in cerebral cortex TBARS levels. The increase in TBARS levels induced by Cd was abolished by the administration of 60 and 90 mg/kg of Curc.

A significant main effect of Cd ($P < 0.05$) and Curc ($P < 0.05$) in TBARS levels in hippocampus was observed (Fig. 5C). Results demonstrated that Cd exposure caused an increase (205%) in TBARS levels in hippocampus. All Curc administrations (30, 60 and 90 mg/kg) showed a tendency to ameliorate TBARS levels increased by Cd.

Two-way ANOVA revealed that there were no significant alterations in TBARS levels in hypothalamus among rats exposed to Cd alone and the other animals (Fig. 5D).

A significant Cd×Curc interaction for cerebellum TBARS levels was observed ($F_{3,37} = 7.210$; $P < 0.05$) (Fig. 5E). Post hoc comparisons demonstrate that rats exposed to Cd presented an increase (226%) in cerebellum TBARS levels. The increase in TBARS levels induced by Cd was abolished by the administration of 60 and 90 mg/kg of Curc.

4. Discussion

To our knowledge, the current study is the first one evaluating whether oral intake of Curc can prevent Cd-induced toxicity in brain and peripheral system of rats. Clearly, understanding the mechanism(s) by which Cd causes injuries in experimental animals will provide insight into its diverse effects in humans (Gonçalves et al., 2010).

Small amounts of Cd reach the brain of adult rats because of the selective permeability of the BBB (Takeda et al., 1999). In agreement with the literature data, in the present study, we found a small amount of Cd in brain of Cd-exposed rats but significantly higher than control values. According to Daniel et al. (2004) there is an interaction between Curc and Cd, with the possible formation of a complex between the metal and this ligand. However, for all

the brain structures analyzed, a similar Cd concentration was found within the same group of rats and co-administration of Curc was ineffective in decreasing this level (data not shown). It is interesting to note that although Cd does not accumulate in significant quantities in the adult rat brain, its concentration is enough to cause brain injury once Cd is able to induce neurotoxicity in animals (Gonçalves et al., 2010, 2012b; Méndez-Armenta and Ríos, 2007).

The inhibitory avoidance test utilized for evaluating learning and memory in rats and mice has a strongly aversive component (Cahill et al., 1986). In the present study, we observed a significant decrease in step-down latency in Cd-intoxicated rats in the inhibitory avoidance test, suggesting learning and memory impairment in these animals. This result corroborates our recently published data where rats orally intoxicated with Cd salt or fed potato grown with Cd showed impaired cognition (Gonçalves et al., 2010, 2012b). However, when the Cd-exposed rats were treated with Curc the step-down latency was similar to that found for rats from the control group. These findings indicate that treatment with Curc was able to prevent learning and memory impairment induced by Cd toxicity. In fact, curcumin attenuated the oxidative damage, improved learning disorder and prevented loss of memory in rats exposed to aluminium chloride and arsenic (Kumar et al., 2009; Yadav et al., 2011).

Immediately after inhibitory avoidance testing sessions, the animals were subjected to an open-field test which is widely used to evaluate motor disorders (Belzung and Griebel, 2001). The open field session revealed that the pharmacological treatment did not alter spontaneous locomotor activity since rats of the different groups showed a similar number of crossing or rearing responses. Moreover, in our study we demonstrated that rats of different treatments did not show altered shock sensitivity as verified by their similar flinch, jump and vocalization thresholds. Thus, these data suggest that neither Cd nor Curc before training of inhibitory avoidance caused motor disabilities nor altered foot shock sensitivity. Thus, we can

exclude the possibility that these parameters may have contributed to the alteration in step-down latencies.

The present study demonstrated that both Cd-intoxicated rats and treated with Curc showed altered purinergic signalling in their cerebral cortex synaptosomes. The purinergic system is a multienzymatic complex that include the enzyme NTPDases, that hydrolyzes ATP and ADP to AMP, which is subsequently hydrolyzed to adenosine by 5'-nucleotidase enzyme (Zimmermann, 2001). The purinergic system has an important role in immune responses, neurotransmission and neuroprotection (Burnstock, 2006; Schetinger et al., 2007).

In this context, the results suggest that Cd causes an increased NTPDase activity in the cortex synaptosomes, leading the rapid hydrolysis of ATP and ADP in AMP, favoring adenosine production, a molecule exerts a protective role on the CNS by modulating the release of the neurotransmitters. However, a decrease in 5'-nucleotidase activity was observed in Cd-exposed rats, this is one of the enzymes that regulates of extracellular levels of adenosine in the synaptic cleft, thus a decrease of 5'-nucleotidase activity reduces the adenosine formation which may lead to impairment on neuroprotective effects (Burnstock, 2006; Gutierrez et al., 2012; Schetinger et al., 2007). In addition, the curc administered in 30 mg/kg in Cd-intoxicated rats prevented the increased NTPDase activity, increasing the extracellular concentration of ATP and ADP. Our results are in disagreement with Gonçalves et al. (2013) who demonstrated that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were increased in the cortex synaptosomes of Cd-poisoned rats leading to a compensatory response in the central nervous system. However, it is important to point out that their experiment was an acute exposure (30 days) and that Cd was administered in a high concentration (2 mg/kg) in relation to the present study. Moreover, our results demonstrated that Curc *per se* (60 and 90 mg/kg) promoted an increase in NTPDase activity in cerebral cortex synaptosomes,

decreasing the levels of ATP and ADP, favoring conversion these nucleotides in adenosine. Also, no differences were observed in the 5'-nucleotidase activity.

The Cd-poisoned rats showed an increased AChE activity in cerebral cortex synaptosomes and in the striatum, cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus structures whereas in cerebellum there was no alteration in AChE activity among the groups. In relation to the AChE enzyme in the whole blood and in the lymphocytes, the results showed that an increase of its activity occurred in Cd-exposed rats. In the literature, both *in vitro* and *in vivo* effects of Cd on AChE activity have been described for different animal models (Carageorgiou et al., 2004; Luchese et al., 2007; Pari and Murugavel, 2007). These results are controversial and the activation as well as the inhibition of the AChE activity has been reported (Carageorgiou et al., 2004; Gonçalves et al., 2010; Luchese et al., 2007; Pari and Murugavel, 2007). The AChE activation found in this study may lead to a fast ACh degradation and a subsequent down stimulation of ACh receptors causing undesirable effects on cognitive and immune functions (Soreq and Seidman, 2001).

Based on our results we can suggest that the activator effect elicited by Cd exposure on the AChE activity could be one of the mechanisms involved in the memory impairment observed in the inhibitory avoidance test in this study once the increased AChE activity caused by Cd leads to a reduction of cholinergic neurotransmission efficiency due to a decrease in ACh levels in the synaptic cleft thus contributing to progressive cognitive impairment (Gonçalves et al., 2010, 2012b; Jaques et al., 2012; Schmatz et al., 2009).

Our findings demonstrate that Curc was totally or partially effective in preventing the enhancement of AChE activity induced by Cd in the cerebral structures studied. In fact, the important finding that Curc crosses the BBB provided further support to its neuroprotective potential in neurotoxicological manifestations. Neuroprotective efficacy of Curc has been studied at different doses (15 to 200 mg/kg) in animal models of neurotoxicity and disease

conditions (Jaques et al., 2012; Kumar et al., 2009; Yadav et al., 2009). The neurotoxic effects including oxidative damage, cholinergic dysfunctions and cognitive deficits of the metals aluminium, arsenic, lead and Cd have been found to be restored following Curc treatment (Daniel et al., 2004; Kumar et al., 2009; Yadav et al., 2009, 2011). In disagree with our results, the chronic Curc treatment restored AChE activity, which arsenic treatment caused a marked reduction (Yadav et al., 2011). Nevertheless, similar to our results, several authors also demonstrated that chronic Curc treatment decreased cholinergic activity, preventing the increase in AChE activity promoted by neurotoxic agents such as smoke, aluminum or diabetic-induced in rats (Jaques et al., 2012; Kuhad and Chopra, 2007; Kumar et al., 2009).

The results of the peripheral AChE activation were similar to the results found in the cerebral regions of the same animal group studied. It has been proposed previously that whole blood and lymphocyte AChE enzyme show functional and structural properties similar to AChE of the synaptic cleft (Thiermann et al., 2005). Thus, in agreement with previous findings of our laboratory we can suggest that the peripheral AChE activity could be a good peripheral marker for Cd toxicity because it permits the evaluation through a more accessible method than the direct evaluation of this enzyme in CNS (Schmatz et al. 2009; Gonçalves et al., 2012a; Jaques et al., 2012). In addition, it is interesting to note that the increased AChE peripheral activity, found in Cd-intoxicated rats may lead to a fast degradation of ACh, which is considered a molecule with anti-inflammatory, contributing to the down stimulation of Ach receptors and a pro-inflammatory response (Soreq and Seidman, 2001; Gonçalves et al., 2012a).

In our study, striatum, cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rats exposed to Cd presented an increase in TBARS levels whereas in hypothalamus there was no alteration in TBARS levels among the groups. Corroborating with our results, other reports have shown that Cd induced an elevation of LPO in brain and also in other tissues (Daniel et al., 2004; El-

Demerdash et al., 2004; Yargiçoglu et al., 1997). In fact, according to Manca et al. (1991) LPO is an early and sensitive consequence of Cd exposure but the mechanism of Cd-induced LPO is still not fully understood. It is believed, that the mechanism is multidirectional, may involve changes in the activities of antioxidant, a decrease in the level of glutathione and the total pool of sulphhydryl groups and enzymes (Nemmiche et al., 2007). These factors can consequently induce a prooxidant state in biological systems and lead to peroxidative damage of membrane structure and changes in associated enzymes, receptors, and physiological functions may ultimately result in disturbances in neuronal functions (Yargiçoglu et al., 1997).

The present data demonstrate that increased LPO in different brain regions following Cd exposure were decreased in rats co-treated with Cd and Curc. This compound has been shown to inhibit LPO in rat liver, erythrocytes and the brain (Daniel et al., 2004; El-Demerdash et al., 2009; Yadav et al., 2009). Curcumin's property to neutralize free radicals must be responsible for inhibiting the metal-induced increase of LPO (Bishnoi et al., 2008; Sethi et al., 2009). Also similar to our findings, some investigators found that the consumption of antioxidants such as vitamin E, diphenyl diselenide, and NAC was able to revert or prevent Cd-induced oxidative stress (Gonçalves et al., 2010; Nemmiche et al., 2007; Santos et al., 2005).

Another important aspect to be discussed here is that the changes in cholinesterases activities might reflect impairment in biosynthesis, degradation, or insertion into the plasma membrane (Kuhad and Chopra, 2007). Authors have demonstrated that AChE is a biological component of the membrane and one of the most important mechanisms responsible for correct cholinergic function (Saravanan and Ponmurugan, 2013). The cholinergic neurons and their projections are widely distributed throughout the central nervous system (CNS) with an essential role in regulating many vital functions, such as learning, memory and cortical

organization of movement (Mesulam et al., 2002; Schmatz et al., 2009). In this regard, alterations in the lipid membrane due to the increased level of free radical formation which promoted increased lipid peroxidation, could be a decisive factor in the modification of the conformational state of the AChE molecules, which would explain changes in their activities (Gonçalves et al., 2010; 2012b; Schmatz et al., 2009).

Above all, it is important to note that cholinergic neurons generally vary in appearance from region to region. For example, the hippocampus and cerebral cortex, which has role to modulate learning and memory, receive cholinergic projections from the nucleus basalis of Meynert and the striatum, so has maximum AChE activity. On the other hand, the cerebellum presents little cholinergic neuron, that may explain the fact that cerebellum have not shown changes in AChE activity among the groups (Das et al., 2001; Schmatz et al., 2009).

Conflict of interest statement

No conflict of interest to be stated for any of the authors.

Acknowledgements

This work is supported by the FINEP research grant (Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00) and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection - MCT/CNPq. In addition, the authors also gratefully acknowledge the Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the research fellowships.

References

Abbasi, M.A., Ilyas, M., Aziz-ur-Rehmana, Sonia, A., Shahwar, D., Razab, M.A., Khan, K.M., Ashraf, M., Afzal, I., Ambreen, N., 2012. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. *Scientia Iranica, Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering* 19, 1580–1583.

Abdalla, F.H., Cardoso, A.C., Pereira, L.B., SCHAMTZ, R., Gonçalves, J.F., Stefanello, N. ; Fiorenza, A. M. ; Gutierrez, J. M., Serres, J.D.S., Zanini, D., Pimentel, V.C., Vieira, J.M., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., 2013. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Mol. Cell. Biochem.* 381, 1-8.

Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 125, 141–149.

Bishnoi, M., Chopra, K., Kulkarni, S.K., 2008. Protective effect of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioral, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 511–522.

Borges, L.P., Brandão, R., Godoi, B., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem. Biol. Interact* 171, 15–25.

Bøyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77–89

Bradford, M.M., 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. Purinergic signaling. *Br J Pharmacol.* 147, 172-181.

Cahill, L., Brioni, J., Izquierdo, I., 1986. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications, *Psychopharmacol.* 90, 454–456.

Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Pantos, C., Mourouzis, C., Zarros, A., Tsakiris, S., 2004. 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.* 94, 112–118.

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

Daniel, S., Limson, J.L., Dairam, A., Watkins, G.M., Daya, S., 2004. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J. Inorg. Biochem.* 98, 266–275.

Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68, 1545–1555.

Dong, S., Shen, H-M., Ong, C-N., 2001. Cadmium-induced apoptosis and phenotypic changes in mouse thymocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 222, 11–20.

El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H., 2004. Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and b-carotene. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1563–1571.

El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Radwan, F.M., 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem. Toxicol.* 47, 249–54.

Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., Flatherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Fitzgerald, B.B., Costa, L.G., 1993. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fun. Appl. Toxicol.* 20, 210-216.

Gonçalves, J.F., Fiorenza, A.M., Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Bochi, G.V., Antes, F.G., Stefanello, N., Rubin, M.A., Dressler, V.L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 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.

Gonçalves, J.F., Duarte, M.M.M.F., Fiorenza, A.M., Spanevello, R.M., Mazzanti, C.M., Schmatz, R., Bagatini, M.D., Antes, F.G., Costa, P., Abdalla, F.H., Dressler, V.L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2012a. Hematological indices and activity of NTPDase and cholinesterase enzymes in rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. *Biometals* 25, 1195–1206.

Gonçalves, J.F., Nicoloso, F.T., Costa, P., Farias, J.G., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Gutierrez, J.M., Abdalla, F.H., Pereira, J.S.F., Dias, G.R.M., Barbosa, N.B.V., Dressler, V.L., Rubin, M.A., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2012b. Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3709–3718.

Gonçalves, J.F., Spanevello, R.M., Fiorenza, A.M., Mazzanti, C.M., Bagatini, M.D., Rosa, C.S., Becker, L.V., Costa, P., Abdalla, F.H., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2013. NTPDase and 5'-nucleotidase activities from synaptosomes and platelets of rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. *Int. J. Devl. Neurosci.* 31, 69–74.

Guerra, G.P., Mello, C.F., Sauzem, P.D., Berlese, D.B., Furian, A.F., Tabarelli, Z., Rubin, M.A., 2006. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacol.* 186, 150–158.

Gutierrez, J.M., Kaizer, R.R., Schmatz, R., Mazzanti, C.M., Vieira, J.M., Rodrigues, M.V., Jaques, J., Carvalho, F., Zanini, D., Morsch, V.M., Rubin, M.A., Schetinger, M.R.C., Spanevello, R.M., 2012. α -Tocopherol regulates ectonucleotidase activities in synaptosomes from rats fed a high-fat diet. *Cell Biochem Funct.* 30, 286–292.

Gutiérrez-Reyes, E.Y., Albores, A., Ríos, C., 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethazone-induced metallothionein. *Toxicol.* 131, 145–154.

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

Jaques, J.A.S, Rezer, J.F.P., Ruchel, J.B., Becker, L.V., Rosa, C.S., Souza, V.C.G., Luza, S.C.A., Gutierrez, J.M., Gonçalves, J.F., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., 2011. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. *Biom. Prev. Nutr.* 1, 109–115.

Jaques, J.A.S., Rezer, J.F.P., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Gutierrez, J.M., Gonçalves, J.F., Schmatz, R., Bairros, A.V., Mazzanti, C.M., Rubin, M.A., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., 2012. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiol. Behav.* 106, 664–669.

Järup, L., Akesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 201–208.

Järup, L., Berglund M., Elinder, C.G, Nordberg, G., Vahter, M., 1998. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scan. J. Work Environ. Health* 42, 1–52.

Jones, M.M., Cherian, M.G., 1990. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* 6, 1-25.

Kuhad, A., Chopra, K., 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 34–42.

Kumar, A., Dogra, S., Prakash, A., 2009. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Behav. Brain Res.* 205, 384–390.

Luchese, C., Brandão, R., Oliveira, R., Nogueira, C.W., Santos, F.W., 2007. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol. Lett.* 173, 181–190.

Manca, D., Ricarda, A.C., Trottierra, B., Chevalier, G., 1991. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 67, 303–323.

Méndez-Armenta, M., Ríos, C., 2007. Cadmium neurotoxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 350–358.

Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639.

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

Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Guiraud, P., 2007. Role of α -tocopherol in cadmium induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chem. Biol. Interact.* 170, 221–230.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351–358.

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.

Pathak, N., Khandelwal, S., 2009. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 52–60.

Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., Pereira, M.E., 1993. Effects of early undernutrition on 15 kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 431–437.

Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L., Fenili, A.C., Mello, C.F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J. Neurosci.* 24, 2328–2334.

Santos, F.W., Graça, D.L., Zeni, G., Rocha, J.B., Weis, S.N., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2006. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reprod. Toxicol.* 22, 546–550.

Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B., Weis, S.N., Fachinetto, J.M., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2005. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem. Biol. Interact.* 151, 159–165.

Saravanan, G., Ponmurugan, P., 2013. Attenuation of streptozotocin-induced alterations in acetylcholinesterase and antioxidant system by S-allylcysteine in rats. *Food Bioscience* 4, 31–37.

Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Bonan, C.D., Wyse, A.T., 2007. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31, 77–98.

Schetinger, M.R.C., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., Da Rocha, J.B., Vieira, V., Moro, F., Neis, R.T., Bittencourt, S., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., 2000. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activity. *Neurochem. Res.* 25, 949-955.

Schmatz, R., Mazzanti, C.M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., Rosa, M.M., Rubin, M.A., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., 2009. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 610, 42–48.

Sethi, P., Jyoti, A., Hussain, E., Sharma, D., 2009. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 31–39.

Shaikh, Z.A., Zaman, K., Tang, W., Vu, T., 1999. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by N-acetylcysteine. *Toxicol. Lett.* 104, 137–142.

Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholine-news roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302.

Srinivasan, R., Ramprasath, C., 2011. Protective role of silibinin in cadmium induced changes of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of albino wistar rats. *J. Ecobiotechnol.* 3, 34–39.

Takeda, A., Takefuta, S., Ijiro, H., Okada, S., Oku, N., 1999. Cd transport in rat brain. *Brain Res. Bull.* 49, 453–459.

Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T., Worek, F., 2005. Correlation between red bloodcell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157, 345–347.

Tomazzoni, M.I., Negrelle, R.R.B., Centa, M.L., 2006. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto Contexto Enferm.* Florianópolis 15, 115-121.

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C.; Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288, 73-90.

Yadav, R.S., Chandravanshi, L.P., Shukla, R.K., Sankhwar, M.L., Ansari, R.W., Shukla, P.K., Pant, A.B., Khanna, V.K., 2011. Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *NeuroToxicology* 32, 760–768.

Yadav, R.S., Sankhwar, M.L, Shukla, R.K., Chandra, R., Pant, A.B., Islam, F., Khanna, V.K., 2009. Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 367–376.

Yargıçoglu, P., Agar, A., Oguz, Y., Izgut-Uysal, V.N., Senturk, U.K., Oner, G., 1997. The effect of developmental exposure to cadmium (Cd) on visual evoked potentials (VEPs) and lipid peroxidation. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 213–219.

Zalups, R.K., Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 163–188.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 46–56.

Zhao, J., Zhao, Y., Zheng, W., Lu, Y., Feng, G., Yu, S., 2008. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1229, 224-232.

Table 1. Rats exposed to cadmium (Cd; 1 mg/kg) and/or treated with curcumin (Curc; 30, 60 or 90 mg/kg) did not demonstrate altered motor abilities.

Group	Crossing	Rearing
saline/oil	15.6 ± 3.7	10.9 ± 2.9
saline/Curc 30	20.2 ± 4.0	15.5 ± 3.6
saline/Curc 60	15.4 ± 3.7	13.0 ± 3.2
saline/Curc 90	19.6 ± 3.9	15.1 ± 2.8
Cd/oil	24.6 ± 2.6	17.2 ± 2.0
Cd/Curc 30	18.1 ± 2.7	13.4 ± 2.4
Cd/Curc 60	21.4 ± 2.7	16.8 ± 2.7
Cd/Curc 90	22.07 ± 2.9	16.8 ± 2.8

Data are means ± SEM of number of crossing and rearing responses (n = 10-15).

Table 2. Rats exposed to cadmium (Cd 1 mg/kg) and/or treated with curcumin (Curc 30, 60 or 90 mg/kg) did not demonstrate altered shock sensitivity.

Group	Flinch	Jump	Vocalization
saline/oil	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.2
saline/Curc 30	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.1 ± 0.2.
saline/Curc 60	1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1
saline/Curc 90	1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Cd/oil	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Cd/Curc 30	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Cd/Curc 60	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Cd/Curc 90	1.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.0 ± 0.1

Data are means ± SEM of flinch, jump and vocalization thresholds expressed in milliamps (mA) (n = 10-15).

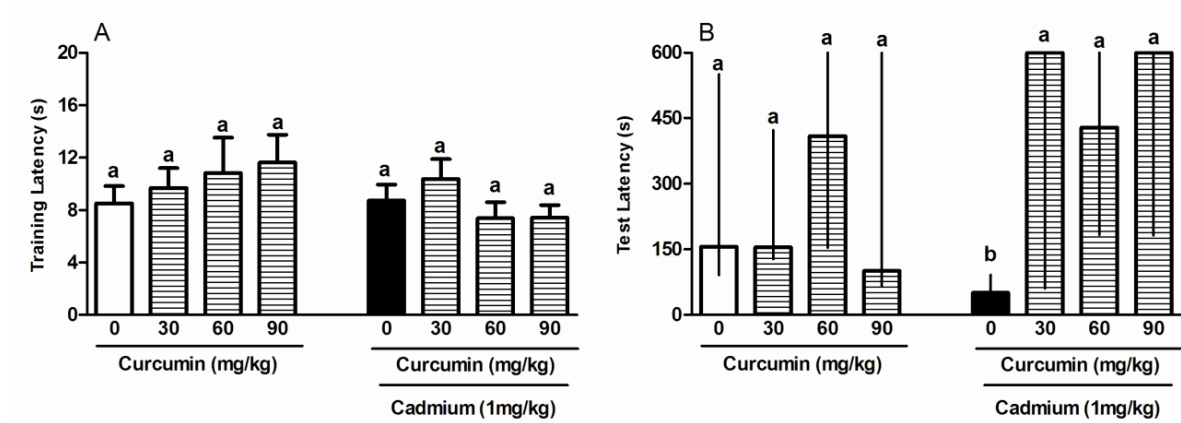


Figure 1. Curcumin (30, 60 or 90 mg/kg) prevented memory impairment in the inhibitory avoidance test in rats exposed to cadmium (1 mg/kg). After one treatment-free day, the animals were subjected to training (A) in a step-down latency test and 24 hours later was realized the retention test (B) in the same apparatus. Different lowercase letters indicate significant difference among the groups at testing by the Dunn's nonparametric multiple comparison task. Data are median \pm interquartile range of training and test. (n = 10-15; $P < 0.05$).

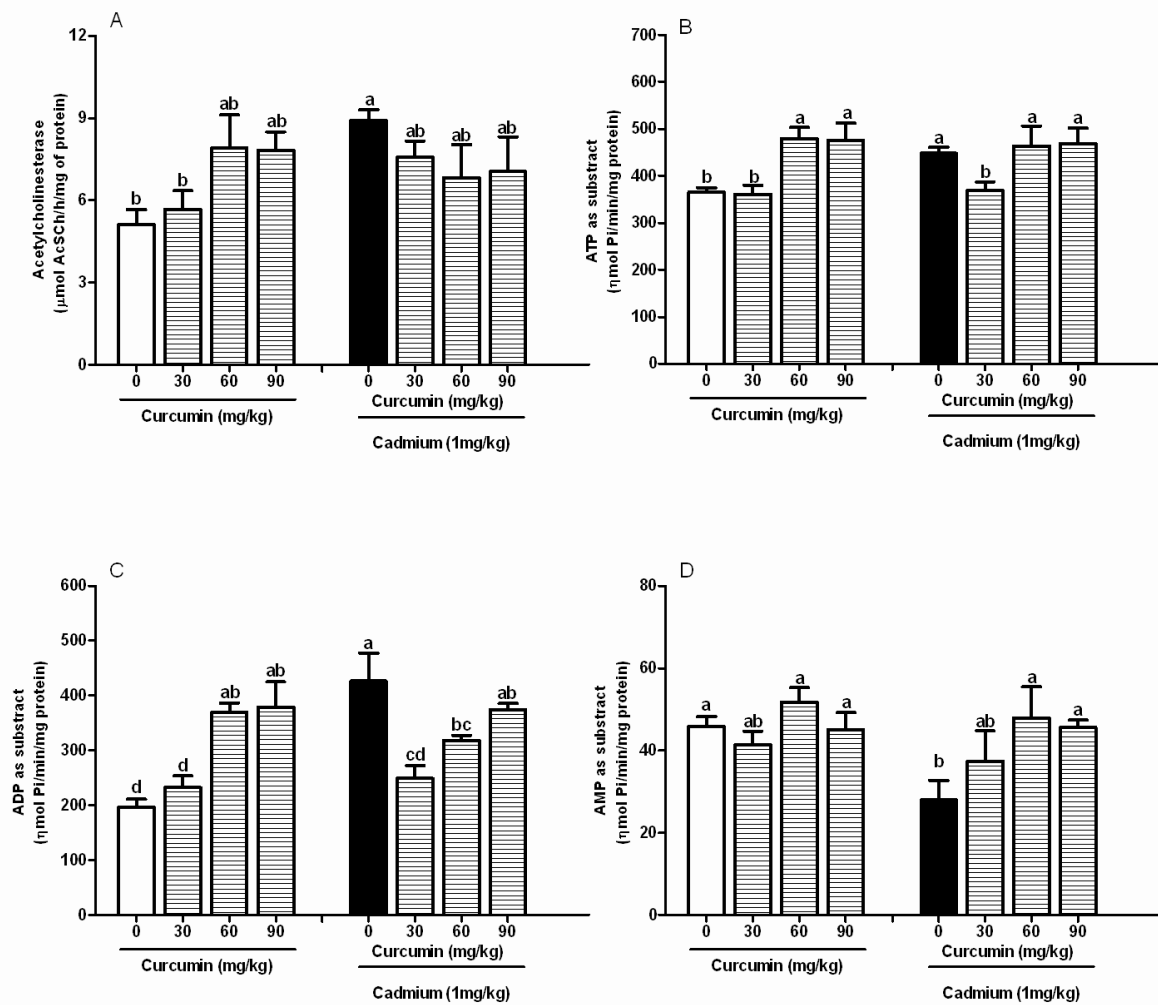


Figure 2. Acetylcholinesterase, NTPDase and 5'-nucleotidase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 and 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan's test ($n = 4\text{--}7$; $p < 0.05$).

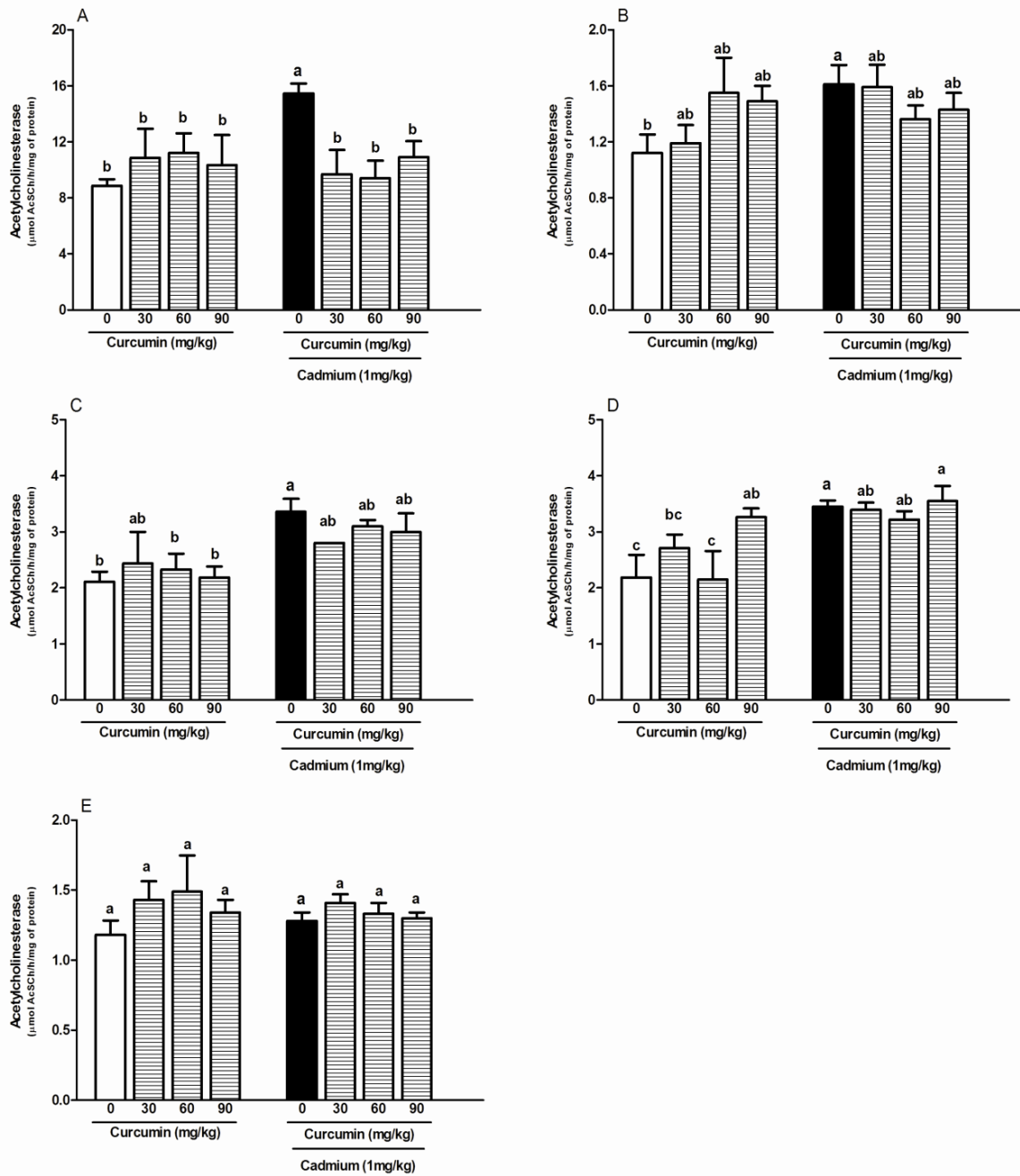


Figure 3. Acetylcholinesterase (AChE) activity in supernatant of striatum (A), cerebral cortex (B), hippocampus (C), hypothalamus (D) and cerebellum (E) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($n = 5–10$; $p < 0.05$).

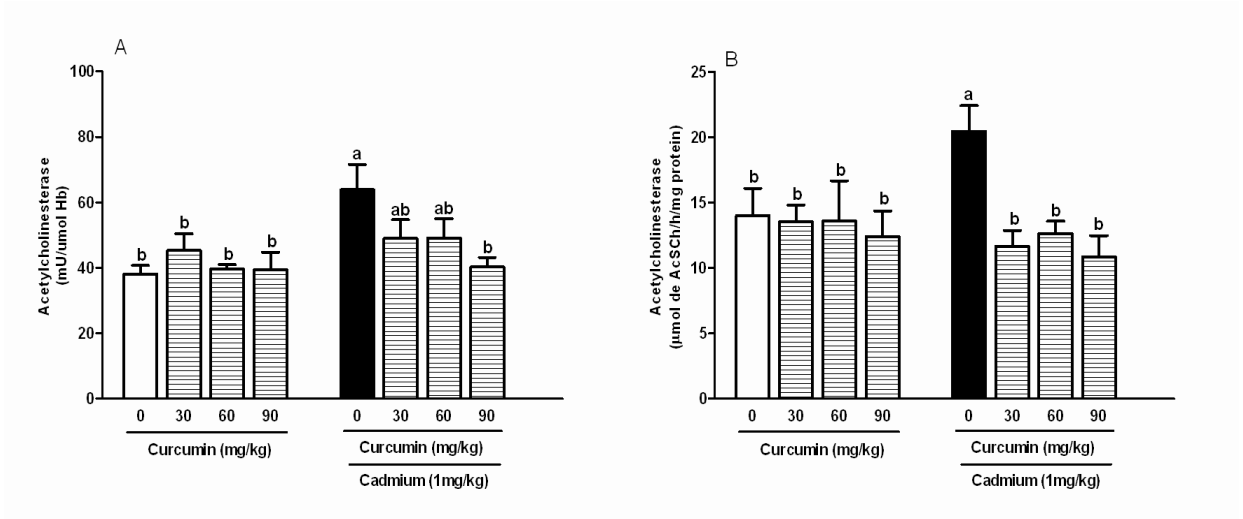


Figure 4. Acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood (A) and lymphocytes (B) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumin (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($n = 4\text{--}10$; $p < 0.05$).

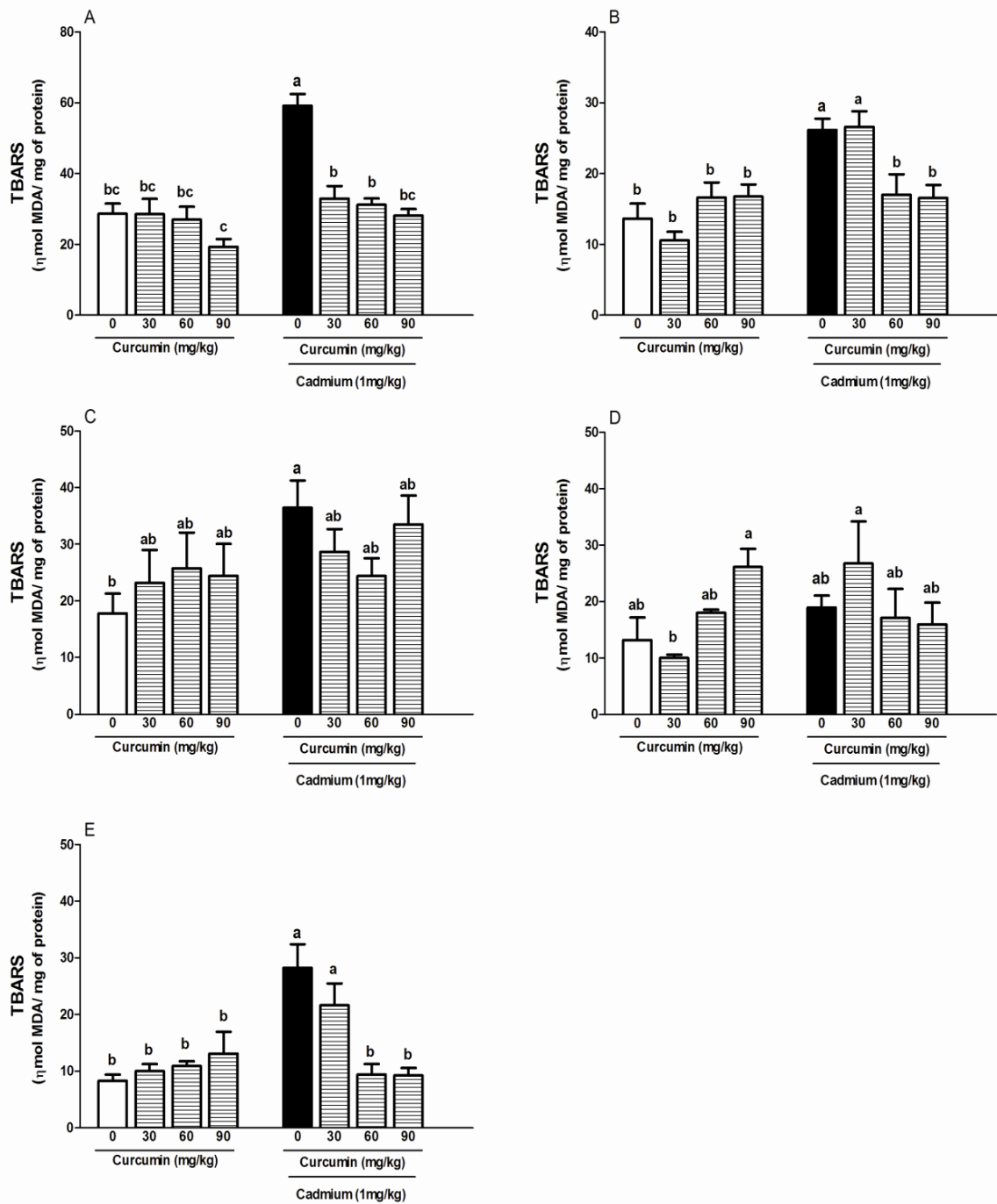


Figure 5. Oxidative stress measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in striatum (A), cerebral cortex (B), hippocampus (C), hypothalamus (D) and cerebellum (E) of cadmium-exposed rats (1 mg/kg) and treated with curcumina (30, 60 or 90 mg/kg). Different lowercase letters indicate significant difference among the groups. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA–Duncan’s test ($n = 5-10$; $p < 0.05$).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a exposição ao Cd diminui o tempo de retenção de memória, sugerindo que este metal provoca uma deficiência na aprendizagem e na memória nestes animais. No entanto, tratamento com curcumina é capaz de prevenir o enfraquecimento da aprendizagem e da memória induzido pela toxicidade do Cd.

Esse metal também pode promover uma modulação do sistema purinérgico e colinérgico, em sinaptossomas de córtex cerebral, uma vez que aumenta a atividade das enzimas AChE e NTPDase (substratos ATP e ADP) e diminui a atividade da enzima 5'-nucleotidase, provavelmente ocasionando uma diminuição da concentração de adenosina a qual possui ação neuroprotetora. E o tratamento crônico com curcumina *per se* e co-administrada com Cd é capaz de alterar a atividade da enzima NTPDase. A intoxicação por Cd também aumenta a atividade da enzima AChE tanto nas estruturas cerebrais quanto em sangue total e linfócitos promovendo, assim, a degradação rápida da acetilcolina, uma molécula com ação anti-inflamatória. Porém, o tratamento com curcumina é eficaz na prevenção parcial ou total desses efeitos, melhorando tanto os processos cognitivos quanto os relacionados ao sistema imune.

Além disso, o Cd promove um aumento nos níveis de peroxidação lipídica nas diferentes estruturas cerebrais podendo ser um fator decisivo para a modificação do estado conformacional das proteínas AChE, NTPDase e 5'-nucleotidase, o que explicaria as mudanças em suas atividades enzimáticas. Por sua vez, a curcumina previne esse efeito devido, provavelmente, a sua propriedade antioxidante.

Assim, conclui-se que este composto natural possa ser considerado, após estudos adicionais, um importante aliado em terapias contra a intoxicação por esse metal.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. H.; CARDOSO, A. C.; PEREIRA, L. B.; SCHAMTZ, R.; GONÇALVES, J. F.; STEFANELLO, N.; FIORENZA, A. M.; GUTIERRES, J. M.; SERRES, J. D. S.; ZANINI, D.; PIMENTEL, V. C.; VIEIRA, J. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. **Mol. Cell. Biochem.** v. 381, p. 1-8, 2013.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR]. **Toxicological profile for cadmium.** Atlanta: US Department of Health and Human Services, 2012.

AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 30, p. 85–94, 2009.

AGRAWAL, R.; MISHRA, B.; TYAGI, E.; NATH, C.; SHUKLA, R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. **Pharmacol. Res.** 61, 247–252, 2010.

ALDUNATE, R.; CASAR, J. C.; BRANDAN, E.; INESTROSA, N. C. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain. Res. Rev.** v. 47, n. 1-3, p. 405-10, 2004.

AMMON, H. P.; WAHL, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Med.** 57, 1–7, 1991.

ARAÚJO, M. C.; ROCHA, J. B.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, p. 421-426, 2005.

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

BERGLUND, M. Intestinal-absorption of dietary-cadmium in women dependson body iron stores and fiber intake. **Environ Health Perspect.** v. 102, n. 12, p. 1058-1066, 1994.

BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate Diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, p. 5511-5519, 2004.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Adv Immunol.** v. 86, p. 1-41, 2005.

BORGES, L. P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chem. Biol. Interact.** v. 171, p. 15–25, 2008.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–62, 2000.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 27, p. 166–176, 2006.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol.** v. 240, p. 31-304, 2004.

CALABRESE, V.; BATES, T. E.; STELLA, A. M. G. NO synthase and NO dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. **Neurochem. Res.** v. 25, n. 9-10, p. 1315–41, 2000.

CHEN, X.; ZHUA, G.; GUA, S.; JIN, T.; SHAO, C. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts in vitro. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 28, p. 232–236, 2009.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. **Turk. J. Biochem.** v. 28, n. 2, p. 54-61, 2003.

COLE, G. M.; TETER, B.; FRAUTSCHY, S. A. Neuroprotective effects of curcumin. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 595, p. 197–212, 2007.

COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling.** v. 2, p. 351–360, 2006.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. **Neurochem. Int.** v. 38, n. 2, p. 107–25, 2001.

DAIRAM, A.; LIMSON, J. L.; WATKINS, G. M.; ANTUNES, E.; DAYA, S. Curcuminoids, curcumin, and demethoxycurcumin reduce lead-induced memory deficits in male Wistar rats. **J Agric. Food Chem.** v. 55, p. 1039-44, 2007.

DANIEL, S.; LIMSON, J. L.; DAIRAM, A.; WATKINS, G. M.; DAYA, S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. **J. Inorg. Biochem.** v. 98, p. 266–75, 2004.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of 677 male and female rats of adult and old age. **Life Sci.** 68, 1545–1555, 2001.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Med. Sci. Monit.** v. 13, n. 12, p. 214-21, 2007.

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.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. **Carcinogenesis** v. 20, p. 911–914, 1999.

DOMINGO, J. L. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. **Rep. Toxicol.** v. 9, p. 105-113, 1995.

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

DVIR, H, SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem. Biol. Interact.** v. 187, n. 1-3, p. 10-22, 2010.

EL-BOSHY, M. E.; RISHA, E. F.; ABDELHAMID, F. M.; MUBARAK, M. S. HADDA, T. B. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. **J Trace Elem. Med. Biol.** 2014.

FILHO, A. B. C.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVAR, M. Curcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 1, p. 171-175, 2000.

FÜRSTENAU, C. R.; TRENTIN, D. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. M.; SARKIS, J. J. F. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**. v. 17, p. 84–91, 2009.

GANGULI, M.; CHANDRA, V.; KAMBOH, M. I.; JOHNSTON, J. M.; DODGE, H. H.; THELMA, B. K.; JUYAL, R. C.; PANDAV, R.; BELLE, S. H.; DEKOSKY, S. T. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo–US Cross-National Dementia Study. **Arch. Neurol.** v. 57, p. 824-830, 2000.

GARCIA-ALLOZA, M.; BORRELLI, L. A.; ROZKALNE, A.; HYMAN, B. T.; BACSKAI, B. J. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. **J. Neurochem.** v. 102, p. 1095–104, 2007.

GESSI, S.; VARINI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**. v. 3, p. 109-116, 2007.

GODT, J.; SCHEIDIG, F.; GROSSE-SIESTRUP, C.; ESCHE, V.; BRANDENBURG, P.; REICH, A.; GRONEBERG, D. A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **J. Occup. Environ. Med.** v. 22, p. 1–6, 2006.

GONÇALVES, J. F.; BECKER, A. G.; CARGNELUTTI, D.; TABALDI, L. A.; PEREIRA, L. B.; BATTISTI, V.; SPANEVELLOI, R. M.; MORSCH, V. M.; NICOLOSO, F. T.; SCHETINGER, M. R. C. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. **Braz. J Plant Physiol.** v. 19, n. 3, p. 223-32, 2007.

GONÇALVES, J. F.; TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; PEREIRA, L. B.; MALDANER, J.; BECKER, A. G.; ROSSATO, L. V.; RAUBER, R.; BAGATINI, M. D.; BISOGNIN, D. A.; SCHETINGER, M. R. C.; NICOLOSO, F. T. Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars. **Biometals**. v. 22, n. 5, p. 779–92, 2009.

GONÇALVES, J. F.; DUARTE, M. M. M. F.; FIORENZA, A. M.; SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C. M.; SCHMATZ, R.; BAGATINI, M. D.; ANTES, F. G.; COSTA, P.; ABDALLA, F. H.; DRESSLER, V. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Hematological indices and activity of NTPDase and cholinesterase enzymes in rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. **Biometals**. v. 25, p. 1195–1206, 2012a.

GONÇALVES, J. F.; FIORENZA, A. M.; SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C. M.; BOCHI, G. V.; ANTES, F. G.; STEFANELLO, N.; RUBIN, M. A.; DRESSLER, V. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. N-Acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chem. Biol. Interact.** v. 186, p. 53–60, 2010.

GONÇALVES, J. F.; NICOLOSO, F. T.; COSTA, P.; FARIAS, J. G.; CARVALHO, F. B.; ROSA, M. M.; GUTIERRES, J. M.; ABDALLA, F. H.; PEREIRA, J. S. F.; DIAS, G. R. M.; BARBOSA, N. B. V.; DRESSLER, V. L.; RUBIN, M. A.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes. **Food Chem. Toxicol.** v. 50, p. 3709–3718, 2012b.

GONÇALVES, J. F.; SPANEVELLO, R. M.; FIORENZA, A. M.; MAZZANTI, C. M.; BAGATINI, M. D.; ROSA, C. S.; BECKER, L. V.; COSTA, P.; ABDALLA, F. H.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. NTPDase and 5'-nucleotidase activities from synaptosomes and platelets of rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. **Int. J. Devl. Neurosci.** v. 31, p. 69–74, 2013.

GOYER, R. A.; CLARKSON, T. W. **Toxic Effects of Metals**. In Caserett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th edition, Ed. Curtis D. Klaassen. New York: McGraw-Hill, 1996.

GOYER, R. A.; CHERIAN, M. G. **Renal effects of metals**, In: R. A. Goyer, C. D. Klaassen, M. P. Waalkes (Eds.), Metal Toxicology, Academic Press, San Diego, p. 389-412, 1995a.

GOYER, R. A.; CHERIAN, M. G.; JONES, M. M.; REIGART, J. R. Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. **Environ. Health Perspect.** v. 103, n. 11, 1048–1052, 1995b.

GUTIERRES, J. M.; KAIZER, R. R.; SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; VIEIRA, J. M.; RODRIGUES, M. V.; JAQUES, J.; CARVALHO, F.; ZANINI, D.; MORSCH, V. M.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; SPANEVELLO, R. M. α -Tocopherol regulates ectonucleotidase activities in synaptosomes from rats fed a high-fat diet. **Cell Biochem. Funct.** v. 30, p. 286–292, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Clarendon Press**, 4th, 2007.

HUFF, J.; LUNN, R. M.; WAALKES, M. P.; TOMATIS, L.; INFANTE, P. F. Cadmium-induced cancers in animals and humans. **Int. J. Occup. Environ. Health**, v. 13, p. 202-212, 2007.

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

ISHRAT, T.; KHAN, M. B.; HODA, M. N.; YOUSUF, S.; AHMAD, M.; ANSARI, M. A.; AHMAD, A. S.; ISLAM, F. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Behav. Brain Res.** v. 171, p. 9-16, 2006.

JAQUES, J. A. S.; REZER, J. F. P.; CARVALHO, F. B.; ROSA, M. M.; GUTIERRES, J. M.; GONÇALVES, J. F.; SCHMATZ, R.; BAIRROS, A. V.; MAZZANTI, C. M.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. **Physiol. Behav.** v. 106, p. 664–669, 2012.

JAQUES, J. A. S.; REZER, J. F. P.; RUCHEL, J. B.; BECKER, L. V.; ROSA, C. S.; SOUZA, V. C. G.; LUZA, S. C. A.; GUTIERRES, J. M.; GONÇALVES, J. F.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Biom. Prev. Nutr.** v. 1, p. 109–115, 2011.

JÄRUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 201–208, 2009.

JÄRUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C. G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. **Scan. J. Work Environ. Health**, v. 42, p. 1-52, 1998.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 258, n. 3, p. 758-62, 1999.

KAPOOR, S.; PRIYADARSINI, K. I. Protection of radiation-induced protein damage by curcumin. **Biophys Chem.** v. 92, p. 119–26, 2001.

KATARANOVSKI, M.; KATARANOVSKI, D.; SAVIC, D.; JOVCIC, G.; BOGDANOVIC, Z.; JOVANOVIĆ, T. Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. **Physiol. Res.** v. 47, p. 453, 1998.

KATARANOVSKI, M.; MIRKOV, I.; BELIJ, S.; NIKOLIC, M.; ZOLOTAREVSKI, L.; CIRIC, D.; KATARANOVSKI, D. Lungs: Remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. **Environ.Toxicol. Pharmacol.** v. 28, p. 225–231, 2009.

KAWASHIMA, K.; YOSHIKAWA, K.; FUJII, Y. X.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life Sci.** v. 80, n. 24-25, p. 2314–2319, 2007.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: **The Basic Science of Poisons**; Sixth Edition; McGraw-Hill; p. 812-837; 2001.

KOLLER, L. D. **Cadmium.** In immunotoxicology of environmental and occupational metals (J. T. Zelikoff and P. T. Thomas, Eds.). p. 41–61, 1998.

KUHAD, A.; CHOPRA, K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. **Eur. J. Pharmacol.** v. 576, p. 34-42, 2007.

KUMAR, A.; DOGRA, S.; PRAKASH, A. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. **Behav. Brain Res.** v. 205, p. 384–390, 2009.

LUCHESE, C.; BRANDÃO, R.; OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, F. W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicol. Lett.** v. 173, p. 181–190, 2007.

LUNKES, G. I.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; SCHETINGER, M. R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Trombosis Research**, v. 109, p. 189-194, 2003.

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

MARIT, L.; DMITRII, R.; JOHAN, O.; ODDMUND, B.; PER, E.; MAGNE, R. Cadmium- induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. **Toxicol. Lett.** v. 193, p. 252–260, 2010.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; AHMED, M.; PEREIRA, L. B.; GONÇALVES, J. F.; CORRÊA, M.; SCHMATZ, R.; STEFANELLO, N.; LEAL, D. B. R.; MAZZANTI, A.; RAMOS, A. T.; MARTINS, T. B.; DANESI, C. C.; GRAÇA, D. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 27, p. 73–80, 2009.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **Int J Alzheimer's Dis.** v. 2012, p. 1-8, 2012.

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

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neurosci.** v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.

MILLAR, J. K.; JAMES, R.; CHRISTIE, S.; PORTEOUS, D. J. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. **Mol. Cell. Neurosci.** v. 30, p. 477-484, 2005.

MINAMI, A.; TAKEDA, A.; NISHIBABA, D.; TAKEFUTA, S.; OKU, N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. **Brain Res.** v. 894, p. 336–339, 2001.

MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; JURCZUK, M.; GAŁAŻYN-SIDORCZUK, M. Evaluation of Some Immunoregulatory Cytokines in Serum of Rats Exposed to Cadmium and Ethanol. **Polish J. of Environ. Stud.** v. 18, n. 4, p. 673- 680, 2009.

NEUMANN, S.; RAZEN, M.; HABERMEHL, P.; MEYER, C. U.; ZEPP, F.; KIRKPATRICK, C. J.; WESSLER, I. The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. **Life Sci.** v. 80, n. 24-25, p. 2361–2364, 2007.

NORDBERG, F. G. Cadmium and health in the 21st century-historical remarks and trends for the future. **BioMetals**. v. 17, p. 485–489, 2004.

NUNES-TAVARES, N.; MATTA, A. N. DA.; BATISTA E SILVA, C. M.; ARAÚJO, G. M.; LOURO, S. R.; HASSÓN-VOLOCH, A. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*(L.) by tricyclic antidepressants. **Int. J Biochem. Cell Biol.** v. 34, n. 9, p. 1071-9, 2002.

OSPAR Commission. Cadmium. **Hazardous Substances Series**. v. 58, 2002.

PANDE, M.; MEHTA, A.; PANT, B. P.; FLORA, S. J. S. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 9, p. 173-184, 2001.

PARI, L.; MURUGAVEL, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium-induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rat. **Toxicology**. v. 234, n. 826, p. 44–50, 2007.

PATRICK, G. L. Medicinal Chemistry. 2nd Ed., **Oxford**, p. 432-82, 2001.

PILLET, S.; D'ELIA, M.; BERNIER, J.; BOUQUEGNEAU, J. M.; FOURNIER, M.; CYR, D. G. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. **Toxicological Sciences**. v. 92, n. 2, p. 423–432, 2006.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A.; PRADO, V. F.; DE MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; DE MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem. Int.** v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002.

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.; HORVÁTH, Z.; JUHÁSZ, A.; KÁLMÁN, J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chem. Biol. Interact.** v. 157-158, p. 233-238, 2005.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Tri Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.** v. 50, p. 413-492, 1998.

RAO, A. A.; SRIDHAR, G. R.; DAS, U. N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Med Hypotheses**, v. 69, n. 6, p. 1272-1276, 2007.

RAO, K. S.; MOHAPATRA, M.; ANAND, S.; VENKATESWARLU, P. Review on cadmium removal from aqueous solutions. **Int J Engin Sci Technol**. v. 2, n. 7, p. 81-103, 2010.

RATHBONE, M.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**. v. 59, p. 663-690, 1999.

REEVES, P. G.; CHANEY, R. L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. **Science of the Total Environment**, v. 398, p.13-19, 2008.

RIKANS, L. E.; YAMANO, T. Mechanisms of cadmium mediated-acute hepatotoxicity. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, n. 2, p. 110-117, 2000.

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

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. **J Inter. Med**. v. 265, n. 6, p. 663-679, 2009.

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

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; WEIS, S. N.; FACHINETTO, J. M.; FAVERO, A. L. M.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem-Biol Interact**. v. 151, p. 159-165, 2005b.

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

SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environ. Health Perspect.** v. 112, p. 1099-1103, 2004.

SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors.** v. 31, n. 2, p. 77–98, 2007.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; ROSA, M. M.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 610, p. 42–48, 2009.

SETHI, P.; JYOTI, A.; HUSSAIN, E.; SHARMA, D. Curcumin attenuates aluminium induced functional neurotoxicity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 93, p. 31–39, 2009.

SHI, J. D.; KUKAR, T.; WANG, C. Y.; LI, Q. Z.; CRUZ, P. E.; DAVOODI-SEMIROMI, A.; YANG, P.; GU, Y.; LIAN, W.; WU, D. H.; SHE, J. X. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 17471-17478, 2001.

SIKORA, T.; ISTAMBOULIE, G.; JUBETE, E.; OCHOTECO, E.; MARTY, J. L.; NOGUER, T. Highly sensitive detection of organophosphate insecticides using biosensors based on genetically engineered acetylcholinesterase and poly (3,4-ethylenedioxythiophene). **J. Sensors.** v. 2011, p. 1-7, 2011.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chem. Biol. Interact.** v. 175, n. 1-3, p. 3–10, 2008.

SINHA, R.; ANDERSON, D. E.; MCDONALD, S. S.; GREENWALD, P. Cancer risk and diet in India. **J. Postgrad. Med.** v. 49, n. 3, p. 222–228, 2003.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholine-news roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 2, p. 294-302, 2001.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; LOKAJ, I.; KANDEFERSZERSZEN, M. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. **Toxicology.** v. 145, p. 135, 2000.

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

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, p. 147-154, 1992.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Molinoff, P. B. (Ed.). **Lippincott-Raven Publishers**, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.

TOHYAMA, C.; SHAIKH, Z. A. Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single anti-body radioimmunoassay. **Fund. Appl. Toxicol.** v. 1, p. 1-7, 1981.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

UNGLESS, M. A.; CRAGG, S. J. A Choreography of nicotinic receptors directs the dopamine neuron routine. **Neuron**, v. 15, p. 815-816, 2006.

VIAENE, M.; MASSCHELEIN, R.; LEEDERS, J.; DE GROOF, M.; SWERTS, L.; ROELS, H. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. **Occup. Environ. Med.** v. 57, p. 19-27, 2000.

WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I.; SEDIK, L.; MELENDRES, J.; DIZIO, S.; WADE, M. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. **Fund Appl Toxicol.** v. 19, n. 1, p. 1-5, 1992.

WHO, World Health Organization. Recommended Health-Based Limits in Occupational Exposure to Heavy Metals. **Tech. Rep.** v. 647. p. 116, 1980.

YADAV, R. S.; SANKHWAR, M. L.; SHUKLA, R. K.; CHANDRA, R.; PANT, A. B.; ISLAM, F.; KHANNA, V. K. Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 240, p. 367-376, 2009.

YANG, F.; LIM, G. P.; BEGUM, A. N.; UBEDA, O. J.; SIMMONS, M. R.; AMBEGAOKAR, S. S. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. **J Biol Chem.** v. 280, p. 5892–5901, 2005.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside - converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-94, 2008.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 186, p. 163–188, 2003.

ZANINI, D.; SCHMATZ, R.; PELINSON, L. P., PIMENTEL, V. C.; DA COSTA, P.; CARDOSO, A. M.; MARTINS, C. C.; SCHETINGER, C.C.; BALDISSARELI, J.; DO CARMO ARAÚJO, M.; OLIVEIRA, L.; CHIESA, J.; MORSCH, V. M.; LEAL, D. B.; SCHETINGER, M. R. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Mol Cell Biochem.** v. 374, p. 137-48, 2013.

ZHAO, J.; ZHAO, Y.; ZHENG, W.; LU, Y.; FENG, G.; YU, S. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats. **Brain Res.** v. 1229, p. 224-232, 2008.

ZIGANSHIN, A. U.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Dev. Res.** v. 32, n. 3, p. 134-46, 1994.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Dev Res.** v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEHEINE, P. L. B. New insights into molecular structure and structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochem. Int.** v. 32, n. 5-6, p. 421-5, 1998.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **An R Acad Nac Farm.** v. 73: p. 537-566, 2007.

ANEXO

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação da atividade das enzimas ectonucleotidases, acetilcolinesterase e estudo do perfil oxidativo em ratos expostos cronicamente ao cádmio e tratados com curcumina."

Número do Parecer: 114/2013

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchior Morsch.

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 03/04/2014.

Santa Maria, 04 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM