



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**EXTRATO DE SEMENTE DE SYZYGIVM CUMINI (L.)
SKEELS REDUZ O DANO RENAL E HEPÁTICO
PROVOCADO PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO
METILMERCÚRIO EM RATOS NEONATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Faida Husein Abdalla

SANTA MARIA – RS, BRASIL

2010

**EXTRATO DE SEMENTE DE SYZYGIVM CUMINI (L.)
SKEELS REDUZ O DANO RENAL E HEPÁTICO
PROVOCADO PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO
METILMERCÚRIO EM RATOS NEONATOS**

por

Faida Husein Abdalla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientadora: Profª. Drª. Maria Beatriz Moretto

SANTA MARIA – RS, BRASIL

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**EXTRATO DE SEMENTE DE SYZYGIUM CUMINI (L.) SKEELS REDUZ
O DANO RENAL E HEPÁTICO PROVOCADO PELA EXPOSIÇÃO
AGUDA AO METILMERCÚRIO EM RATOS NEONATOS**

elaborada por
Faida Husein Abdalla

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz Moretto
(Orientador – Presidente)**

Prof^ª. Dr^ª. Thaís Posser (UFSM)

Prof^º. Dr^º. Jeferson Luis Franco (UNIPAMPA)

Santa Maria, 25 de janeiro de 2010.

“Toda pesquisa é um permanente início-reinício
em ciclos convergentes que representam a
expressão pessoal cada vez mais livre, produtiva e
construtiva em prol do benefício de todos.”

Cerato SMM.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. E aos meus irmãos e o meu namorado Fernando, pela presença amiga e pelas palavras de apoio, em todos os momentos. A vocês que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação para que eu prosseguisse sem medo. A vocês, que me incentivaram, quando tudo parecia impossível e inatingível. Obrigado por fazerem parte da minha vida, por serem profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário. Com muito amor, dedico, esta vitória a vocês!

Amo Vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Maria Beatriz Moretto, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, oferecendo uma oportunidade única, e também por sua ajuda, dedicação e principalmente pela sua amizade e experiência.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Dedico a Deus por tudo que me destes, grato pela vida e família que me concedeste. Pela Sua infinita sabedoria, e pelas oportunidades que me proporcionou.

A toda a minha família, meu porto seguro, que sempre me incentivaram a crescer e proporcionaram a realização dessa conquista. Obrigado pelo o apoio, pelas palavras de incentivo, pela a nossa amizade e união. Amo muito vocês e agradeço a deus por me presentear com pessoas maravilhosas como vocês.

Ao meu namorado Fernando, que pacientemente suportou minha ausência. Pela sua compreensão, pelo exemplo de luta e dignidade, pelo amor, companheirismo, atenção, dedicação e paciência em todos estes anos. Obrigado por estar sempre ao meu lado e suportar as viagens do trecho Cruz Alta – Santa Maria. Te Amo.

A minha orientadora, professora Maria Beatriz Moretto, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, tempo dedicado, por todos os ensinamentos, por toda a confiança e amizade durante estes anos de convivência. Pelas horas de leituras gastas no meu trabalho. Suas sugestões foram sempre bem-vindas e acabaram por constituir-se neste trabalho. Enfim, obrigada por tudo.

A minha querida amiga “irmã”, Luzi, agradeço por tudo, pela a amizade sincera, companheirismo, incentivo, disponibilidade... Por ter guiado meus primeiros passos dentro do nosso laboratório. Por todos esses anos maravilhosos de convivência, e, além disso, por contribuir e participar desse sonho que é nosso. Por toda a sua dedicação, pelos finais de semana trabalhado, festinhas, conversas “fora de hora”, pelos os seus conselhos e enfim por agüentar as minhas “crises”... e por ser minha família ai em Santa. Adoro-te muito, tenho certeza de que sem você teria sido muito mais difícil... Muito Obrigada.

A Paulinha, minha amiga querida, uma pessoa indispensável para a realização desse trabalho, com o seu apoio, positivismo e incentivo para prosseguir tentando...quando tudo parecia impossível. Obrigado por toda a sua dedicação, pelos finais de semana trabalhado, por compartilhar comigo momentos bons e ruins, pela amizade sincera, pelas conversas infundáveis, por sempre transmitir otimismo e

alegria. Enfim pela a parceria perfeita...festinhas, por fazer parte da minha vida. Adoro-Te muito...Muito Obrigada.

A Karine, por me acolher maravilhosamente bem quando cheguei no lab 1207. Pela a sua amizade, apoio nas horas difíceis, pelos momentos de descontração, durante a realização desse sonho, você também faz parte dele, muito obrigado.

Ao Marcel, pelo o apoio e ajuda para que tudo isso fosse concretizado, pelo o incentivo, agradeço de coração pela a amizade e carinho.

Ao Victor, pelo o apoio na realização desse trabalho, momentos compartilhados e pela sua amizade.

A amiga Simone Barbieri, pela a sua amizade, pela sua tranqüilidade, seu apoio, meu sincero Muito Obrigada.

A Francielle, pela a sua amizade e apoio durante a realização desse trabalho.

A uma pessoa muito especial, minha amiga do coração Bárbara, agradeço pelo o “empurrãozinho” inicial para iniciar a minha vida na pesquisa, e sempre me ajudando nos momentos mais difíceis, desde o tempo da graduação. Muito Obrigada, por sempre estar ao meu lado.

As minhas amigas, Beta, Charlene, Cândida, Adri e Carol, pelo convívio, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Thaís Posser, Jefferson Luis Franco e Ricardo Brandão, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos funcionários, Rosane, Ângela, Vivi e Ika pelo atendimento e auxílio sempre prestados com boa vontade e simpatia.

Meu muito obrigado ao Silvandro e ao Elton por cuidar dos animais, pelos finais de semana e feriado trabalhados, sua boa vontade e simpatia.

Aos animais utilizados, todo o meu respeito, pois, sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

Aos muitos amigos que conquistei ao longo desses anos, àqueles que, devido as circunstância, estão longe e também àqueles que continuam por perto.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímica Toxicológica, que contribuíram para a minha formação.

Meus agradecimentos aos amigos e pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram para a realização deste trabalho e que com pesar não mencionei nesses agradecimentos seletivos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que a mim dedicaram seu tempo e esforço, pelas críticas que me ajudaram e certamente ainda ajudarão a crescer. Se fosse citá-las, correria o risco de omitir algumas, e por isso estendo estes agradecimentos no presente parágrafo.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EXTRATO DE SEMENTE DE SYZYGIUM CUMINI (L.) SKEELS REDUZ O DANO RENAL E HEPÁTICO PROVOCADO PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO METILMERCÚRIO EM RATOS NEONATOS

AUTOR: Faída Husein Abdalla

ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto

DATA E LOCAL DE DEFESA: Santa Maria, 25 de janeiro de 2010.

O metilmercúrio (MeHg) é um agente tóxico potente tanto para o sistema nervoso central como para o renal. Provoca danos nos seres humanos e em ratos, particularmente durante o estágio de desenvolvimento. Neste estudo, ratos em desenvolvimento (P2) receberam uma dose única de MeHg (10 mg/kg), por via oral e/ou duas doses do extrato aquoso de sementes de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Scs). Após dois dias (P4), foram investigados os efeitos deste tratamento no córtex cerebral, hipocampo, rim, fígado e urina. Observamos que a atividade da N-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG) nos rins e na urina foi maior no grupo que recebeu MeHg, quando comparado com o grupo controle. Da mesma forma, os níveis de peroxidação lipídica foram maiores no fígado e rim e a atividade da adenosina deaminase (ADA) encontrou-se elevada no hipocampo, rins e fígado, nos ratos tratados com MeHg. Estes resultados indicam que o aumento da atividade da NAG e da ADA, bem como os níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), desempenham um papel importante como marcadores de nefrotoxicidade causada pelo MeHg. Assim, o achado mais relevante na nossa investigação foi a de que o tratamento agudo com MeHg em ratos neonatos pode provocar nefrotoxicidade e a administração do Scs pode reverter estes efeitos provavelmente devido as propriedades antioxidantes de Scs.

Palavra-chave: Metilmercúrio; *Syzygium cumini*; N-acetil- β -d-glucosaminidase; ratos; Adenosina deaminase.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduating Program in Pharmaceutical Sciences

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SYZYGIUM CUMINI SEED EXTRACT PREVENT THE RENAL AND LIVER IMPAIRMENT CAUSED BY ACUTE METHYLMERCURY TREATMENT IN NEONATAL RATS

AUTHOR: Faida Husein Abdalla

ADVISER: Maria Beatriz Moretto

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: January, 25th, 2010, Santa Maria

Methylmercury (MeHg) is a potent neuro and nephrotoxicant in several animal species including humans, particularly during their development. The purpose of this study was to investigate the effects of aqueous seed extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Scc) on the acute MeHg treatment in neonatal rats. Neonatal rats (P2) received orally a single dose of MeHg (10 mg/kg) and also two doses of Scc. After two days, the effects of this treatment were investigated in the cerebral cortex, hippocampus, kidney, liver and urine samples of rats. We observed that N-Acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) activity in the kidney and urine was higher in MeHg-group when compared with the control group. Similarly, the lipid peroxidation levels were higher in the liver and kidney as well as the Adenosine deaminase (ADA) activity increased in the hippocampus, kidney and liver. These results indicate that increased NAG and ADA activities, as well as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels may play a critical role in MeHg nephrotoxicity. The most relevant finding in our investigation was that acute MeHg treatment in neonatal rats caused liver and renal impairment and Scc was able to prevent such effects. It appears that mechanisms related to scavenging activity of Scc could be involved with its protection effect.

Key words: Methylmercury; *Syzygium cumini*; N-Acetyl- β -d-glucosaminidase; rat; adenosine deaminase

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Esquema do ciclo de Intoxicação do Mercúrio	20
FIGURA 2 – Esquema do ciclo de Intoxicação do Mercúrio	21
FIGURA 3 - Estrutura tridimensional da ADA	27
FIGURA 4 - Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina e a 2'-desoxiadenosina	28
FIGURA 5 – Formação de Espécies Reativas de Oxigênio através da redução do oxigênio	32
FIGURA 6 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas	33
FIGURA 7 - <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels (Scc) (sin. <i>Eugenia jambolana</i> Lam. <i>Syzygium jambolanum</i> DC)	35

MANUSCRITO

FIGURE 1 - Chemical characterization of Scc	57
FIGURE 2 (A and B) - <i>N</i> -acetyl- β -d-glucosaminidase activity in kidney and urinary of young rats	58
FIGURE 3 (A and B) - <i>Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)</i> activity in kidney and liver of young rats	59
FIGURE 4 (A and B) - Adenosine deaminase activity in kidney and liver of young rats	60

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 – Effects of MeHg and Scc administration on ADA activity and TBARS levels in the hippocampus and the cerebral cortex of neonatal rats	61
Table 2 - Effects of MeHg exposure and Scc administration on body weight gain of neonatal rats	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Hg – Mercúrio

SNC – Sistema Nervoso Central

MeHg – Metilmercúrio

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GSH – Glutathione

ADA – Adenosina Deaminase

Ado – Adenosina

dADO – 2' desoxiadenosina

Ecto-ADA – Ecto-enzima

DPPIV – Dipeptidil Peptidase IV

SCID – Imunodeficiência Combinada Severa

AIDS – Imunodeficiência Adquirida

LP – Líquido Pleural

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

NAG – N-Acetil- β -d-glucosaminidase

EROS – Espécies reativas de oxigênio

ERNS – Espécies reativas de nitrogênio

NO[•] - Óxido Nítrico

HNOO[•] - Peroxinitrito

DNA - Ácido desoxirribonucléico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Scc - *Syzygium cumini* (L.) Skeels

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS ESPECIAL	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
APRESENTAÇÃO	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Mercúrio	18
2.2 Metilmercúrio	22
2.2.1 Absorção, Metabolismo e Excreção.....	22
2.2.2 Toxicidade.....	23
2.3 Adenosina Deaminase	26
2.3.1 Isoformas da Adenosina Deaminase.....	29
2.4 N-Acetil-β-d-Glucosaminidase	30
2.5 Espécies Reativas	31
2.6 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivo Específico.....	37
4. MÉTODOS E RESULTADOS	38
5. MANUSCRITO	39
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

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

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

1. INTRODUÇÃO:

O mercúrio (Hg) é um metal que em temperatura ambiente é líquido e inodoro. O Hg apresenta três formas diferentes: elementar (Hg^0), inorgânicos (Hg^{+1} e Hg^{+2}) e compostos orgânicos (metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio) (GOLDMAN E SHANNON, 2001). Dentre os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio (MeHg) é o mais tóxico, muito mais que a forma metálica, e é responsável pelos danos mais importantes à saúde observados em humanos (AMIN-ZAKI et al., 1974). É interessante observar que os efeitos tóxicos da exposição ao MeHg são maiores nos organismo em desenvolvimento do que nos de adultos (SAKAMOTO et al., 1993; 2004).

A adenosina deaminase (ADA) (E.C 3.5.4.4), enzima que catalisa a conversão da adenosina à inosina, está presente em quase todos os vertebrados, e no homem é encontrada principalmente nos linfócitos onde está diretamente relacionada à ativação dessas células. Possui um papel importante no sistema imune, alta atividade nos linfócitos T e macrófagos (GORGUNER et al., 2000).

A N-Acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) (E.C. 3.2.1.30), é uma enzima lisossomal, normalmente excretada em baixas quantidades na urina pelo processo normal de exocitose (BAZZI et al., 2002; PRICE, 1992). A NAG está presente em altas concentrações nas células tubulares proximais do rim (HORAK et al., 1981). Desta forma, o aumento na excreção urinária de NAG é um dos mais sensíveis marcadores de dano renal (BOSOMWORTH et al., 1999; NORDBERG et al., 2009) sugerindo que a injúria celular encontra-se nos túbulos proximais, sendo assim esta enzima é também considerada um bom parâmetro para determinar o início da rejeição de rins transplantados (BASTURK et al., 2006; HULTBERG et al., 1990).

O *Syzygium cumini* (L.) skeels [synonym: *Eugenia jambolona* (Myrtaceae)] (Sc) conhecido popularmente como jabolão apresenta propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias, antipiréticas e antioxidantes (MORESCO et al., 2007).

Desse modo, considerando que o MeHg pode desencadear alterações sobre a ADA e a NAG e que Sc apresenta propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da administração do extrato aquoso

de semente de Scc em animais tratados com MeHg sobre a atividade da NAG, ADA e sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mercúrio

O mercúrio (Hg) (é) considerado um poluente ambiental de alto risco à saúde humana, sendo, por isso, um dos metais mais bem estudados. Entre os metais, o Hg é o único que é encontrado no meio ambiente em várias formas físicas e químicas. O Hg é um metal que na temperatura ambiente é líquido e inodoro, apresenta três formas diferentes: elementar (Hg^0), inorgânicos (Hg^{+1} e Hg^{+2}) e compostos orgânicos (metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio) (GOLDMAN E SHANNON, 2001).

Os efeitos biológicos deste metal e seus derivados são extremamente variados. É um produto perigoso quando inalado, ingerido ou em contato, causando irritação na pele, olhos e vias respiratórias. Descargas industriais, queima de carvão e petróleo, mineração, produtos químicos, cosméticos e tintas, são fontes potenciais de intoxicação por mercuriais (AUCOTT et al., 2003; BETSINGER et al., 2000). O mercúrio elementar é encontrado em termômetros, termostatos, amálgamas dentárias, tinta látex e eventualmente na atmosfera no estado de vapor. O mercúrio inorgânico (sais de mercúrio) é encontrado em cosméticos, laxantes, diuréticos e anti-sépticos. Entretanto, a forma mais tóxica e freqüente de exposição, se dá pelos compostos orgânicos, os quais podem ser encontrados em peixes contaminados, pesticidas, fungicidas, inseticidas e timerosal (utilizado como conservante em vacinas) (PATRICK, 2002).

A toxicidade dos mercuriais provoca danos em vários sistemas tais como o cardíaco, renal, gastrointestinal, imune e especialmente no sistema nervoso central (SNC). Entre os sintomas apresentados após a intoxicação por mercuriais estão: tremores, depressão, ansiedade, gosto de metal na boca, dentes moles com inflamação e sangramento nas gengivas, insônia, falhas de memória e fraqueza muscular, nervosismo, mudanças de humor, agressividade, dificuldade de prestar atenção e até demência (AUCOTT et al., 2003). A absorção de sais de mercúrio pode ser fatal, por poder causar ulceração gastrointestinal e hemorragia, podendo também ser acumulado nos rins levando a Síndrome Nefrótica. A exposição ao Hg pode proporcionar o desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, tais

como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e doença de Parkinson (CHUU et al., 2007; ROONEY, 2007). Particularmente, o córtex cerebral e cerebelo são vulneráveis à exposição deste metal provocando necrose focal e destruição das células gliais (COSTA et al., 2004).

No ar, o Hg encontra-se ligado à água e deposita-se nos mananciais aquáticos. Os microorganismos aquáticos e os sedimentos do oceano podem converter mercúrio elementar em compostos orgânicos de Hg (por exemplo, o MeHg), que pode então acumular-se nos peixes entrando na cadeia alimentar (GOLDMAN E SHANNON, 2001), conforme demonstrado na figura 1, o ciclo do Hg no meio ambiente. Acredita-se que a quantidade global de Hg emitida no ambiente devido à atividade humanas seja de 2.000 a 3.000 toneladas/ano conforme a Organização Mundial de Saúde (MICARONI et al., 2000; WHO, 1991) e emissões mundiais de Hg na atmosfera foram estimados em 2.200 toneladas/ano (FERRARA et al., 2000).

Após a exposição ao metal, o mesmo é absorvido pelo trato gastrointestinal e ao chegar à circulação sanguínea, o mercúrio é oxidado formando compostos solúveis, os quais se combinam com proteínas do plasma e com os eritrócitos. Desta forma, eles são distribuídos para os tecidos, depositando-se principalmente nos rins, fígado, sangue, cérebro, ossos e pulmões (GOLDMAN E SHANNON, 2001). O MeHg liga-se aos grupos sulfidrilas existentes nas proteínas dos seres humanos (MICARONI et al., 2000; OSA, 1994).

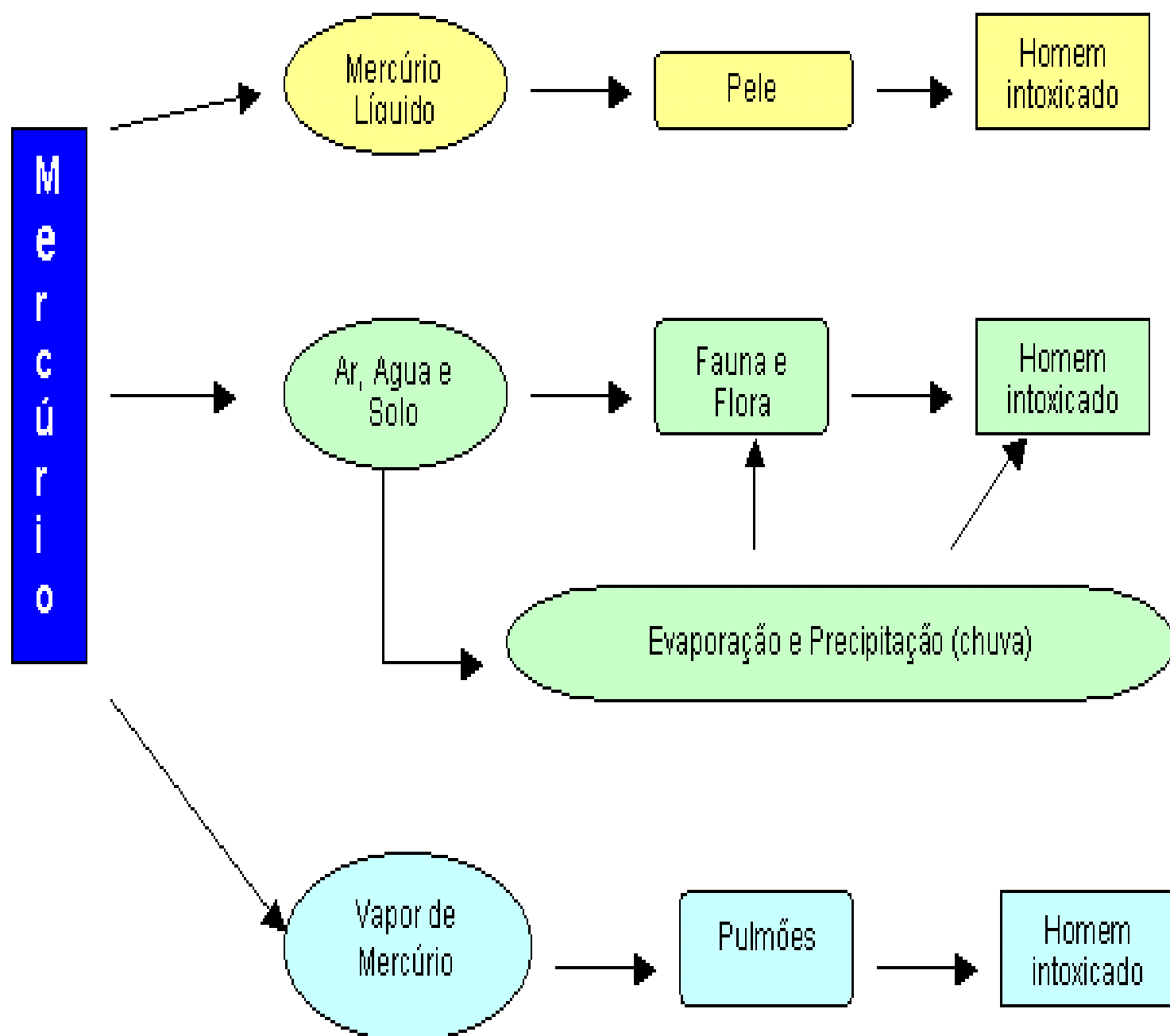


Figure 1. Esquema do Ciclo de Intoxicação do Mercúrio – disponível em <http://www.areaseg.com/toxicos/mercurio.html>;

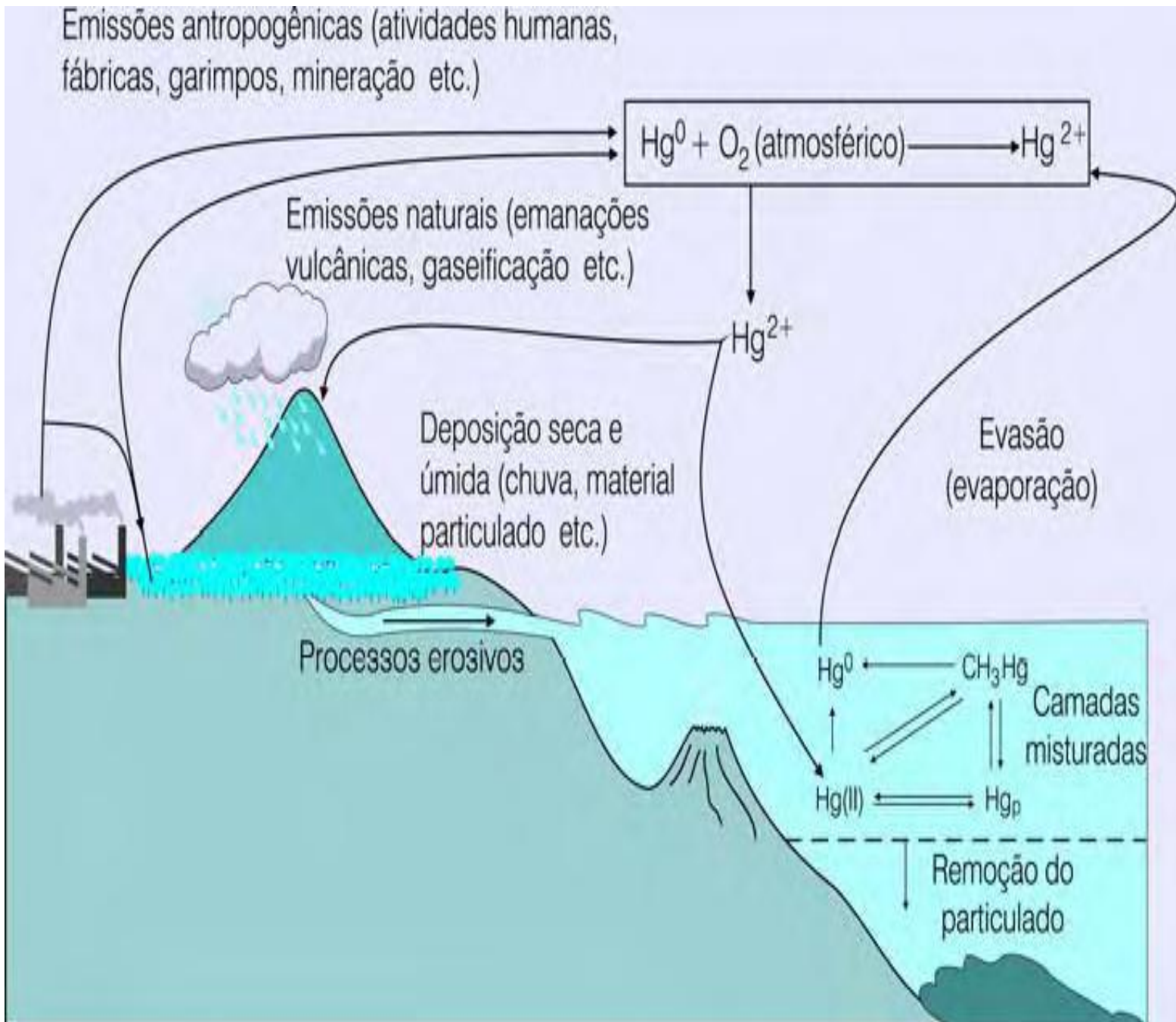


Figura 2. Esquema do Ciclo de Intoxicação do Mercúrio – disponível em <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc12/v12a01.pdf>

Hg^0 – Mercúrio elementar; $Hg(II)$ ou Hg^{+2} – Mercúrio Inorgânico; CH_3Hg – Metilmercúrio; O_2 – Oxigênio

2.2. Metilmercúrio

O MeHg é a forma orgânica de mercúrio mais conhecida, pois é a que predomina no meio ambiente. Geralmente, o MeHg encontrado no ambiente é formado através da ação de microorganismos, os quais metilam o mercúrio elementar presente na água, solo ou ar. O consumo de peixe é uma das principais formas de exposição ao mercúrio orgânico pelo homem (ASCHNER et al., 2007; CARVALHO et al., 2008).

O primeiro caso relatado na literatura de intoxicação de MeHg ocorreu em 1950 na Baía de Minamata–Japão, quando os dejetos de uma indústria química contaminou peixes que foram consumidos em grande parte pela população local. Houve 41 mortes, e pelo menos 30 casos de lesão cerebral profunda em recém-nascidos de mães que ingeriram peixes contaminados durante a gestação. Outro caso relatado na literatura ocorreu na zona rural do Iraque em 1970, onde agricultores e seus familiares ingeriram pão caseiro feito a partir de sementes de trigo contendo MeHg. Cerca de 6.000 pessoas foram hospitalizadas, porém, estima-se que cerca de 40.000 indivíduos possam ter sido envenenados (CLARKSON, 2002; GOLDMAN E SHANNON, 2001). Outros casos ocorreram nas Ilhas Faroé (GRANDJEAN et al., 1997) e nas Ilhas Seychelles (MYERS et al., 2003), onde mulheres grávidas consumiram peixe contaminado.

O MeHg atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica e a placenta, além de aparecer no leite materno e concentrar-se nos rins e SNC (SHANKER et al., 2005; YIN et al., 2007).

2.2.1. Absorção, Metabolismo e Excreção

A maioria dos compostos orgânicos de Hg é facilmente absorvida por ingestão, inalação e através da pele. Em geral, compostos de mercúrio orgânico são solúveis em lipídios, e cerca de 95 % do MeHg ingerido a partir do consumo de peixe contaminado, por exemplo é absorvido no trato gastrointestinal, embora o local exato de absorção não seja conhecido. Uma vez no organismo, ele rapidamente se converte em um complexo protéico, mantendo grande mobilidade através dos

tecidos animais. Sua lipossolubilidade facilita a sua passagem através dos tecidos (CERNICHIARI et al., 1995).

O MeHg é distribuído a todos os tecidos e este processo leva cerca de 30 horas. Cerca de 5% é encontrado na circulação sanguínea e 10%, no cérebro. Noventa por cento do MeHg é excretado através das fezes. O MeHg está presente no corpo como um complexo solúvel em água, ligado principalmente com os grupamentos tióis do átomo de enxofre (CLARKSON et al., 2002), e atravessa a barreira hemato-encefálica complexado com L-cisteína formando uma molécula semelhante a metionina.

O MeHg é absorvido pela placenta e armazenado no cérebro fetal em concentrações que excedem os níveis sanguíneo materno (os níveis no cérebro fetal são cerca de 5-7 vezes maior que os do sangue materno) (CLARKSON, 2002; PATRICK, 2002). Após o MeHg é liberado pelas células complexado com a glutatona reduzida (BALLATORI E CLARKSON, 1985; OSAWA E MAGOS, 1974; PATRICK, 2002), sendo degradado no ducto biliar em forma de complexo com uma L-cisteína. Somente 10% do MeHg é eliminado através dos rins e o restante retorna através da circulação entero-hepática ou é desmetilado pela microflora no intestino e sistema imunológico, sendo que a maior parte de MeHg é eliminado do corpo por desmetilação e através das fezes na forma inorgânica (CLARKSON, 2002; PATRICK, 2002).

O MeHg também se acumula no cabelo, onde a concentração é proporcional às concentrações encontradas no sangue, mas são cerca de 250 vezes superior no cabelo, e também são proporcionais às concentrações do tecido-alvo (SNC). Cabelo e sangue são utilizados como indicador biológico para o MeHg no cérebro adulto e fetal (neste caso, cabelo da mãe ou sangue do cordão umbilical). A meia-vida do MeHg varia de um tecido para o outro, mas geralmente é de 45-70 dias (CLARKSON, 2002).

2.2.2. Toxicidade

A exposição aguda ao MeHg provoca incoordenação motora, parestesia, ataxia, surdez, tremor muscular, coma e até morte (AMIN-ZAKI et al., 1974; GODMAN E SHANNON, 2001).

A Intoxicação crônica por MeHg provoca distúrbio da sensibilidade nas extremidades, parestesia, ataxia, disartria, surdez, constrição do campo visual, fraqueza muscular (CHANG et al., 2008), irritabilidade, falta de memória, ansiedade, depressão (OZUAH, 2000), distúrbios de coordenação e equilíbrio e sinais motores que simula a esclerose lateral amiotrófica (CHUU et al., 2007; CLARKSON E STRAIN, 2003) e também parece aumentar o risco para doença cardiovascular. De fato, filhos de mães contaminadas durante a gestação apresentaram um aumento na pressão arterial (PATRICK, 2002).

O MeHg apresenta diferenças na toxicocinética e toxicodinâmica no cérebro em desenvolvimento, visto que acumula-se mais no cérebro fetal que no materno. No cérebro em desenvolvimento, o MeHg é tóxico para o córtex cerebral e o cerebelo, devido a fatores intrínsecos do cérebro, causando necrose focal da destruição de neurônios e células gliais (DREIEM et al., 2005) e exibe diferentes efeitos em relação ao SNC maduro. No cérebro adulto, a intoxicação por MeHg danifica as chamadas zonas primárias do córtex cerebral, afeta o campo visual, vias auditiva, sensoriais somáticas e córtex motor. Também atinge o hipocampo e o cerebelo, causando uma intensa perda de neurônios nestas regiões do cérebro (DO NASCIMENTO et al., 2008; STEUERWALD et al., 2000).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos neurotóxicos do MeHg. Entre eles incluem-se o dano mitocondrial, indução de estresse oxidativo, interrupção da homeostase do cálcio intracelular, interrupção da função neurotransmissora, inibição dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), a inibição da captação de glutamato e apoptose/necrose (ASCHNER et al., 2007; BELLÉ et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2008; FERRARO et al., 2009; MORETTO et al., 2005; SHANKER et al., 2005; WAKABAYASHI et al., 1995). A conversão de MeHg em mercúrio inorgânico ocorre nas células fagocitárias do fígado ou nas células astrogliais do cérebro (CLARKSON, 2002). O mercúrio inorgânico tem sido encontrado como o principal forma de Hg no tecido cerebral em humanos fatalmente exposto a MeHg (PATRICK, 2002).

O fígado é um órgão de grande importância tendo em vista suas diferentes funções: metabolismo, excreção, secreção, armazenamento, proteção, circulação e coagulação sanguínea. Dentre as funções citadas, uma das mais relevantes consiste na função de desintoxicação, através do sistema microsomal de biotransformação de xenobióticos (sistema citocromo P-450 ou CYP) (MOTTA et al.,

2002). Estudos têm demonstrado a exposição a diferentes metais pesados causando danos ao tecido hepático (BORGES et al., 2008; MISHRA E FLORA, 2008). O fígado pode ser um órgão alvo importante para a toxicidade do MeHg (BRAGADIN et al., 2002; DIAZ et al., 2001). Um dos mecanismos propostos para explicar a toxicidade do MeHg é devido ao estresse oxidativo, devido a sua alta afinidade com os tióis endógenos, resultando na depleção de glutathione (GSH), um importante antioxidante intracelular (FRANCO et al., 2009). MeHg diminui os níveis da GSH e glutathione peroxidase (GSHPx) no tecido hepático, provocando peroxidação lipídica e morte celular (ASHOUR et al., 1993; LIN et al., 1996). O MeHg inicia um processo de peroxidação lipídica, o qual pode produzir alteração nas membranas celulares (FURST E RADDING, 1998).

Além disso, o MeHg induz a abertura do poro de transição da permeabilidade na mitocôndrias de fígado de ratos e este fenômeno representa um importante mecanismo molecular responsável pela morte celular (BRAGADIN et al., 2002). Em células hepáticas, o MeHg forma complexos solúveis com a cisteína e a glutathione, que são secretados na bile e reabsorvido no trato gastrointestinal (CLARKSON et al., 2007).

Pouca evidência foi estabelecida a respeito dos efeitos de baixo nível de exposição ao MeHg na função renal em humanos, embora alguns estudos em animais prova que o MeHg induz a toxicidade renal (ATSDR, 1999; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000). Foram observadas em ratos e camundongos após exposição em longo prazo ao MeHg: nefropatia crônica, degeneração epitelial dos túbulos proximais e fibrose intersticial (MITSUMORI et al., 1990).

Vários estudos reportam que quantidades significativas de Hg se acumulam nos rins após a exposição as formas orgânicas de mercúrio (BRIDGES E ZALUPS 2005; MAGOS et al., 1985; MCNEIL et al., 1988; ZALUPS et al., 1992) sugerindo que o mercúrio orgânico é oxidado a mercúrio inorgânico, antes e/ou após a sua entrada nas células epiteliais dos túbulos renais. No entanto, o nível de acumulação é muito menor do que a que ocorre após a exposição a formas inorgânicas ou elementares do mercúrio. Depósitos de mercúrio inorgânico foram encontrados ao longo do segmento dos túbulos proximais nos rins de ratos e camundongos tratados com formas orgânicas de mercúrio (MAGOS et al., 1985; RODIER et al., 1988).

2.3. Adenosina deaminase

Adenosina deaminase (ADA, adenosina aminohidrolase, EC 3.5.4.4) é uma enzima envolvida no metabolismo de nucleotídeos de purina. A ADA catalisa a desaminação hidrolítica irreversível da adenosina (Ado) à inosina e 2'-desoxiadenosina (dAdo) em 2'-desoxinosina (IBIŞ et al., 2007; IWAKI-EGAWA et al., 2004; POSPISILOVA et al., 2007) (Figura 2 e 3). A ADA está presente em plantas, bactérias (LUPIDI et al., 1992), invertebrados (AIKAWA et al., 1977), vertebrados (MA et al., 1968), mamíferos (LUPIDI et al., 1992), e humanos (DADDONA 1981). Esta enzima está presente em todos os tecidos humanos, altos níveis são encontrados no sistema linfóide (linfonodos, baço e timo) (CHECHIK et al., 1981; VAN DER WEYDEN E KELLEY, 1976). Nos linfócitos a ADA está diretamente relacionada à ativação dessas células (IBIŞ et al., 2007). Possui um papel importante no sistema imune, alta atividade nos linfócitos T e macrófagos (GORGUNER et al., 2000). A ADA tem sido objeto de considerável interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis de adenosina, intra e extracelular. Além de sua localização intracelular clássica, a ADA também está presente como uma ectoenzima (Ecto-ADA) na superfície de muitos tipos celulares incluindo linfócitos e neurônios (FRANCO et al., 1997).

A ADA está presente em todos os tipos celulares, mas a quantidade de enzima difere extensamente entre os tecidos. A ADA é essencial para a proliferação, maturação e diferenciação de linfócitos (TURHAN E DERE, 2007). No cérebro a ADA ocorre principalmente no citosol, podendo ser encontrada também em neurônios e sinaptossomas (FRANCO et al., 1998).

A adenosina é liberada durante os insultos metabólicos ou traumáticos nos animais e humanos, exercendo no cérebro uma ação neuroprotetora, atuando através de quatro receptores (A1, A2A, A2B e A3), acoplados a uma glicoproteína. (FREDHOLM et al., 2005).

A ADA também pode ser encontrada associada à superfície externa de células do SNC, e a sua atividade no SNC é mais proeminente na glia, tendo sido também encontrada em sinaptossomas e vesículas sinápticas (RATHBONE et al., 1999).

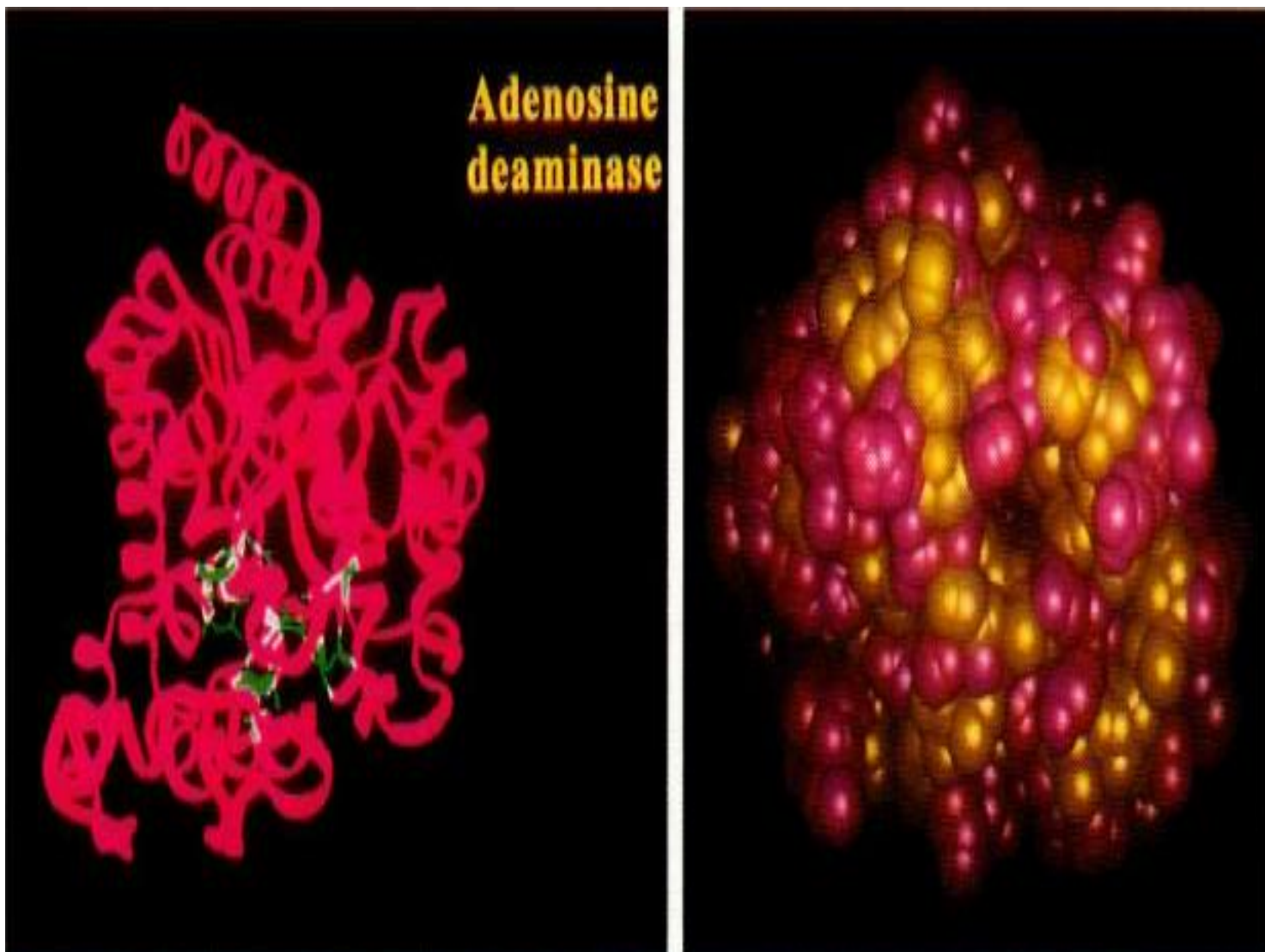


FIGURA 3. Estrutura tridimensional da ADA. As imagens são formadas a partir de dados reportados por WILSON et. al. (1991). A imagem a direita apresenta o sítio ativo no centro da estrutura, e as cadeias laterais polares e não polares estão representadas em rosa e amarelo respectivamente (FRANCO et al., 1998).

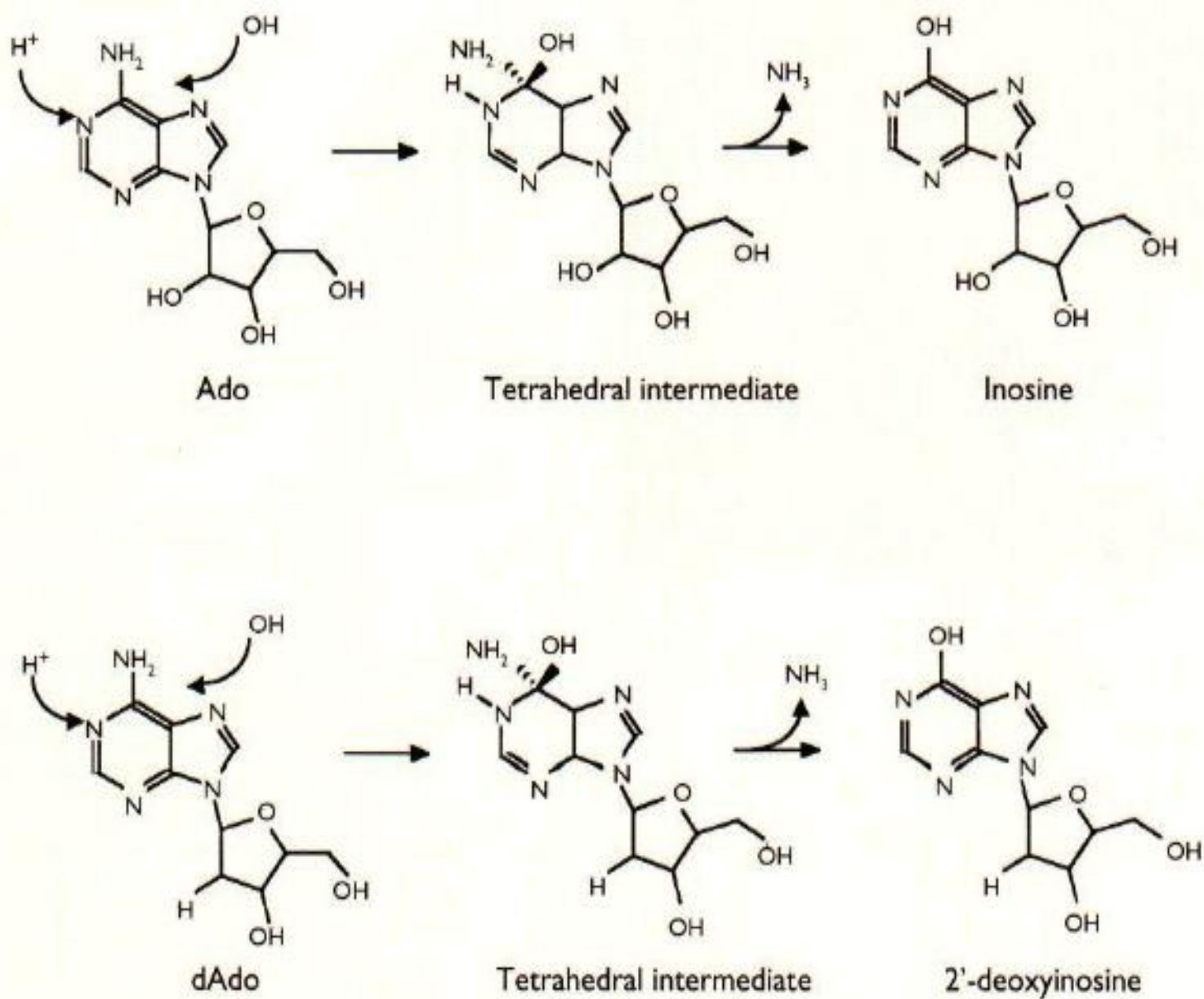


Figura 4- Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina (Ado) e a 2'-desoxiadenosina (d-Ado) (FRANCO et al., 1998).

2.3.1. Isoformas da ADA

Conhece-se duas isoenzimas distintas da ADA, ADA1 e ADA2 (CRISTALLI et al., 2001; VAN DER WEYDEN E KELLEY, 1976). A ADA1 existe em duas formas moleculares principais: um monômero de peso molecular 33.000 KDa (forma pequena) e um dímero-complexado com proteínas com peso molecular total de 280.000 KDa (forma grande) (CRISTALLI et al., 2001; IWAKI-EGAWA et al., 2004). A isoenzima ADA1 é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos, e os seus níveis de atividade são relativamente elevados no timo e duodeno, já no fígado sua atividade foi de mais de 500 vezes menor (VAN DER WEYDEN E KELLEY, 1976). Nos eritrócitos, encontra-se somente a forma menor da isoenzima ADA1, e nos tecidos como fígado, rins e intestino, encontra-se ambas as formas da isoenzima ADA1 e ADA2 (IWAKI-EGAWA et al., 2004).

ADA2 existe somente como um monômero com peso molecular de 100.000 (CRISTALLI et al., 2001). A isoenzima ADA2 está presente principalmente em monócitos, macrófagos (GOURGUNER et al., 2000), e em pequenas quantidades no soro (POSPISILOVA et al., 2007) e no plasma (CRISTALLI et al., 2001; IWAKI-EGAWA et al., 2004; VAN DER WEYDEN E KELLEY, 1976).

A ADA não é apenas uma enzima citosólica, mas pode ser encontrado também como um ecto-enzima (Ecto-ADA) (CIRUELA et al., 1996; FRANCO et al., 1998). A ecto-ADA é responsável por controlar os níveis de adenosina extracelulares (FRANCO et al., 1997). Além disso, é relatado que a ADA liga-se à superfície de células de linfócitos T através do complexo ADA-proteína (ADA-CP) (MORRISON et al., 1993; NAGY et al., 1996), que também é conhecido como Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV) ou CD26 (BLANCO et al., 1998). CD26 cliva peptídeos com Prolina ou Alanina na posição 2, incluindo diversos hormônios, neuropeptídeos e citocinas (HEGEN et al., 1990; ULMER et al., 1990).

Nos seres humanos, um defeito congênito da ADA1 acarreta a síndrome hereditária de imunodeficiência combinada severa (SCID), que se caracteriza pela ausência de células T funcionais e de células B em indivíduos afetados (PACHECO et al., 2005). Esta deficiência genética da ADA em humanos provoca uma grave linfopenia, resultando em SCID durante a infância (HERSHFIELD, 2000).

Outro papel importante desempenhado pela ADA relaciona-se ao fato de que sua atividade encontra-se elevada em doenças caracterizada pela proliferação de

linfócitos T e é um marcador inespecífico de ativação de células T (ÍBIŞ et al., 2007). Alteração desta enzima também tem sido observada na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), tuberculose, meningite bacteriana, leishmaniose, pneumonia, hepatites virais, algumas leucemias, anemia hemolítica hereditária, congênitas, anemia hipoplásica de Diamond e Blackfan, na artrite reumatóide, esclerose múltipla, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, Síndrome de Down, doença de Parkinson e angina de peito (CRISTALLI et al., 2001).

A dosagem da atividade da ADA no líquido pleural (LP) e no líquido cefalorraquidiano (LCR) é um método sensível e específico para o diagnóstico de tuberculose, peritonite infecciosa, mononucleose infecciosa, febre tifóide, sinusite, meningite e AIDS (TITARENKO et al., 2006) e seu uso rotineiro pode reduzir a necessidade de realização de biópsias pleural na abordagem inicial de um derrame pleural (KAISEMANN et al., 2004).

2.4. N-Acetil- β -d-glucosaminidase

A N-Acetil- β -d-glucosaminidase (2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucoside acetamidodeoxiglucohidrolase, (NAG) EC 3.2.1.30), com massa molecular de 130 KDa, é normalmente excretada em baixas quantidades na urina pelo processo normal de exocitose (BAZZI, et al., 2002; PRICE, 1992). A NAG está presente em altas concentrações nas células tubulares proximais do rim (HORAK et al., 1981). Devido ao seu peso molecular (130KDa), é uma molécula que não sofre o processo de filtração glomerular. Desta forma, o aumento na excreção urinária de NAG é um dos mais sensíveis marcadores de dano renal (BOSOMWORTH et al., 1999; NORDBERG et al., 2009), sugerindo que a injúria celular encontra-se nos túbulos proximais, sendo assim um bom parâmetro para determinar o início da rejeição de rins transplantados (BASTURK et al., 2006; HULTBERG, et al., 1990).

A NAG apresenta quatro isoenzimas, sendo as mais importantes as isoformas A presente no compartimento intralisossomal e solúvel na urina que é normalmente secretada por exocitose (GIBEY et al., 1984) e B ligada à membrana lisossomal e excretada na urina durante dano tubular (MANDIĆ et al., 2005). Suas isoenzimas representam um parâmetro muito importante na detecção de lesões renais na prática clínica. As alterações na atividade da NAG urinárias são indicadores do efeito

de nefrotoxicidade de diversas substâncias como: solventes orgânicos, medicamentos (OBATOMI e PLUMMER, 1995), metais como o chumbo, manganês (BAIRATI et al., 1997), cádmio (JIN et al., 1999), Hg (DJURDJIC´ et al., 1992; MANDIC´ et al., 2005) e doenças glomerulares como a nefropatia diabética (PÉREZ-BLANCO, 1997).

Na exposição ao MeHg, a NAG urinária é freqüentemente usada como marcador de dano tubular renal, especialmente para a avaliação nefrotóxica da exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico ou vapor de mercúrio (ELLINGSEN et al., 2000; LANGWORTH et al., 1992).

Em doenças glomerulares, a análise das isoenzimas da NAG demonstra que o aumento na excreção urinária desta enzima é devido a um aumento na liberação de células tubulares renais e não do aumento da filtração através da parede lesada dos capilares glomerulares (BAZZI et al., 2002). A análise da atividade da NAG pode ser verificada com uma única amostra urinária, pois há (a) pouca excreção da NAG diurna (b) a variação da concentração urinária pode ser minimizado com a relação da atividade NAG urinária com a concentração de creatinina na urina, (c) atividade da NAG urinária não aumenta em presença de colônias de bactérias na urina e (d) a atividade da NAG é geralmente normal em indivíduos com proteinúria postural (HORAK et al., 1981).

2.5. Espécies reativas

O balanço entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes é crucial para a sobrevivência e funcionamento dos organismos aeróbicos. Um desequilíbrio favorecendo pró-oxidantes e/ou desfavorecendo antioxidantes é denominado estresse oxidativo sendo potencialmente nocivo (SIES, 1986; THOMAS, 1994).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e as de nitrogênio (ERNS) estão envolvidas em importantes processos patológicos. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares (BARATA et al., 2005) e as não-radicalares (SIES, 1997). Os passos intermediários da redução do oxigênio consistem na formação do radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila correspondendo aos passos de redução por um, dois e três elétrons, respectivamente (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999) (Figura 4).

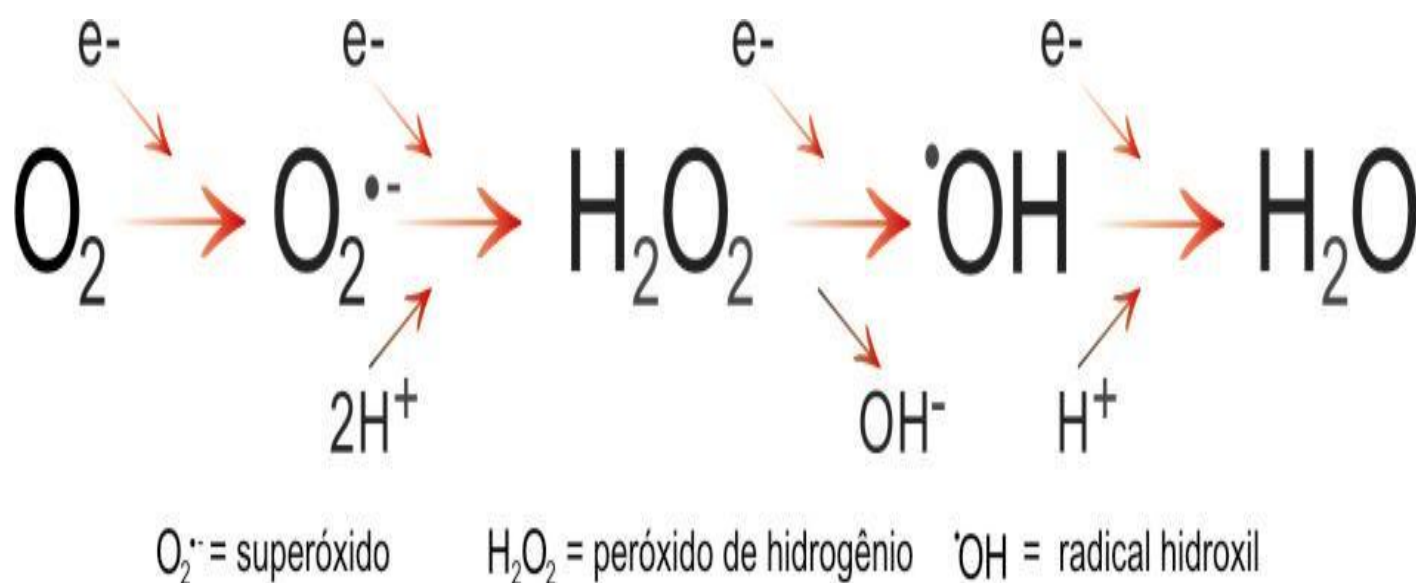


Figura 5. Formação de Espécies Reativas de Oxigênio através da redução do oxigênio (Adaptado de NORDBERG E ÀRNER, 2001).

As EROs são produzidas durante a função celular normal de células aeróbicas e, além disso, elas podem ser geradas como consequência do metabolismo intracelular de compostos exógenos. A excessiva produção intracelular desses oxigênios intermediários interfere na integridade de várias biomoléculas como as proteínas (STADTMAN, 2000), lipídios (YLA^ˆ-HERTTUALA, 1999) e DNA (MARNETT, 2000) (Figura 5), modulando, assim, as vias de transdução de sinal, e em geral, a função celular normal (BRENNEISEN et al., 2005). Devido a isso, o estresse oxidativo tem sido implicado em várias doenças como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, bem como no processo de envelhecimento (KOVACIC E JACINTHO, 2001; VALKO et al., 2007), por induzir danos no DNA mitocondrial e por outros mecanismos (CADENAS E DAVIES, 2000; FINKEL E HOLBROOK, 2000; NORDBERG E ARNÉR, 2001).

Mercúrio é conhecido por induzir a formação de ROS, morte celular e danos ao DNA (ASCHNER et al., 2007; GROTTTO et al., 2009). Há uma série de estudos sobre estresse oxidativo e o papel protetor de enzimas antioxidantes contra neurotoxicidade do MeHg. Em fatias de córtex cerebral de ratos exposto ao MeHg houve um aumento da formação de ROS (ROOS et al. 2009). Além disso o MeHg também pode induzir a geração de peróxido de hidrogênio e diminuir viabilidade

mitocondrial em mitocôndrias isoladas de cérebro de camundongos (FRANCO et al. 2007).

Dentre os lipídios, os ácidos graxos poliinsaturados são os mais sensíveis ao ataque das EROs (LUSHCHAK E BAGNYUKOVA, 2006). O processo de peroxidação lipídica influencia na fluidez da membrana e na integridade das biomoléculas associadas com a membrana (ALMROTH et al., 2005). A intensidade da peroxidação lipídica pode ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; RICE-EVANS et al., 1991).

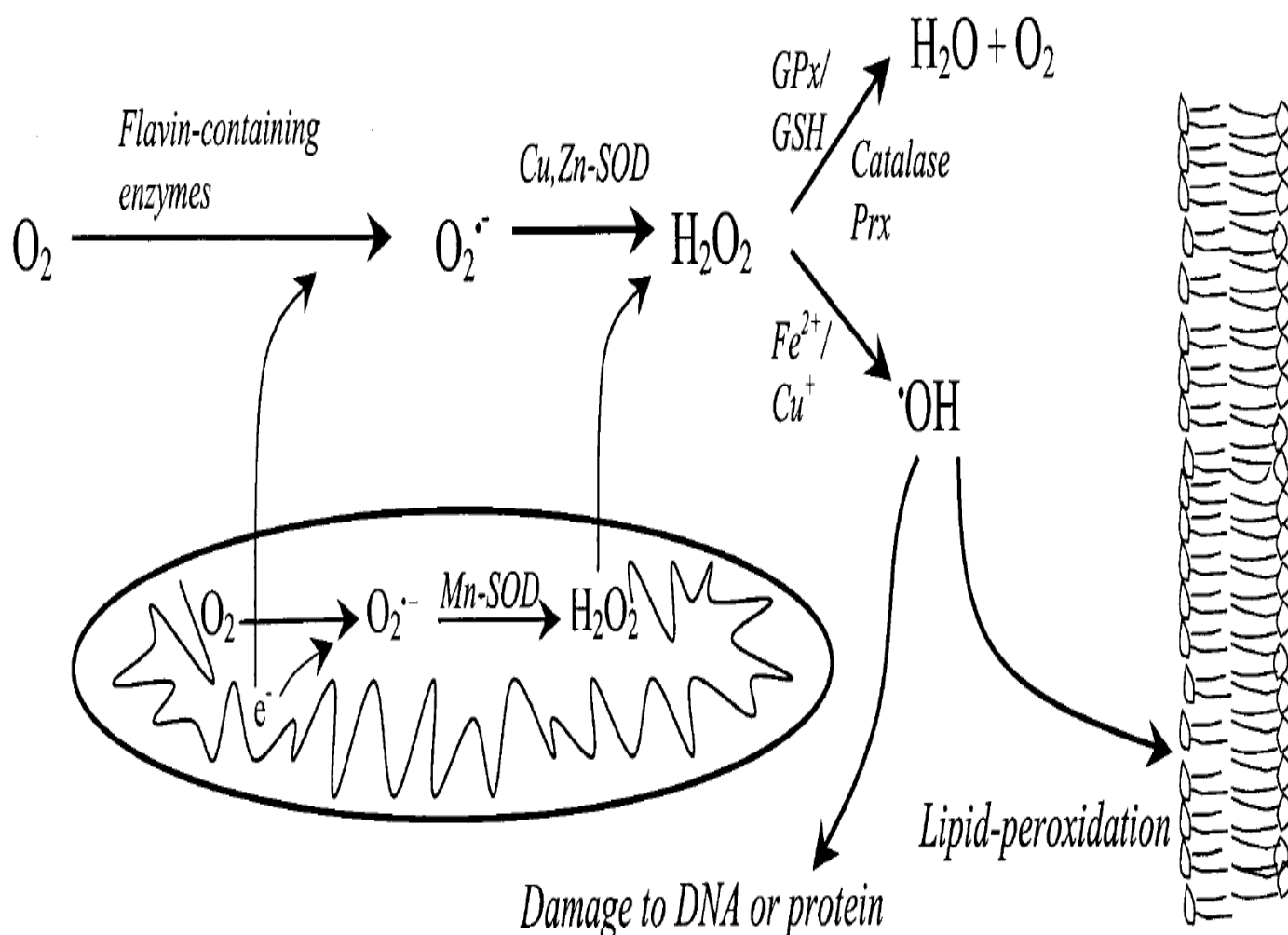


Figura 6. Efeitos das EROs sobre lipídios, proteínas e DNA (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001).

2.6 *Syzygium cumini* (L.) Skeels:

As plantas medicinais são importantes fontes de drogas potencialmente terapêuticas (COX E BALICK, 1994). O *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Scc) (sin. *Eugenia jambolana* Lam. *Syzygium jambolanum* DC) é uma planta originária da Índia, conhecida popularmente como Jambolão, e pode ser encontrado em diversos estados do Brasil, incluindo Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (BRAGANÇA, 1996) (Figura 6). A planta possui em seus constituintes os flavonóides, as saponinas, os ácidos graxos, o tanino, o eugenol, a antimielina e os triterpenos. Todas as partes da planta são utilizadas para fins medicinais e tem grande tradição na medicina alternativa (SIANI et al., 2000). Apresenta propriedades hipoglicêmicas (OLIVEIRA et al., 2005), antiinflamatórias, antipiréticas, hipolipidêmicas e antioxidantes (STANLEY et al., 2003). Diferentes componentes como sementes, casca, fruta e o chá preparado com as folhas, têm sido utilizados em diversos países (TEIXEIRA et al., 2006). O extrato de sementes de Scc é usado para tratar tosse, frio, febre e problemas de pele tais como erupções cutâneas e da boca, garganta, intestinos e úlceras do trato geniturinário (infectados por *Candida albicans*) (CHANDRASEKARAN E VENKATESALU, 2004).

Muita atenção tem sido voltada à atividade de antioxidante naturais presente em frutas e vegetais, pois estes componentes podem reduzir o nível de estresse oxidativo (HASSIMOTTO et al., 2005). Prince *et al.* (2003) constataram que a administração oral do extrato aquoso das sementes de jambolão por seis semanas causou a diminuição significativa dos lipídios e TBARS no cérebro de ratos diabéticos.



Figura 7 - *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) (sin. *Eugenia jambolana* Lam. *Syzygium jambolanum* DC) disponível em <http://www.medicinaisplantas.com/2009/10/plantas-mediciniais-oliva-azeitona.html>

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Tendo em vista que o metilmercúrio afeta o rim, o fígado e o SNC, e o *Syzygium cumini* (L.) skeels pode afetar os efeitos provocados pelo o metilmercúrio, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do extrato aquoso de sementes de *Syzygium cumini* (L.) skeels sobre a atividade da NAG, ADA e a lipoperoxidação em ratos neonatos após a exposição ao MeHg.

3.2. Objetivos específicos

Em ratos neonatos:

- Determinar a atividade da ADA em córtex cerebral, hipocampo, fígado e rim.
- Avaliar a atividade da NAG urinária e renal.
- Investigar o índice de lipoperoxidação, através da determinação de TBARS no tecido hepático, renal, córtex cerebral e hipocampo.
- Investigar o efeito de extrato aquoso de sementes de *Scs* sobre a atividade da NAG, ADA e a lipoperoxidação.

4. MÉTODOS E RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que está sendo submetido para publicação na Revista Toxicological Sciences.

5. MANUSCRITO

Syzygium cumini seed extract (Scc) prevent the renal and liver impairment caused by acute methylmercury treatment in neonatal rats

Abdalla, F. H.¹, Bellé, L.P.¹, Bitencourt, P. E. R.¹, De Bona, K. S.¹,
Boligon, A.A.¹, Athayde, M. L.¹, Pigatto, A.S.², Moretto, M.B.¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Health Science Centre

Federal University of Santa Maria

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

²Franciscan University Center–UNIFRA-Santa Maria –RS - Brazil

¹Correspondent author:

Maria Beatriz Moretto

Beatriz@smail.ufsm.br

Fax: +55 - 3220 8018

Abstract:

Methylmercury (MeHg) is a potent neuro and nephrotoxicant in several animal species including humans, particularly during their development. The purpose of this study was to investigate the effects of aqueous seed extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Scc) on the acute MeHg treatment in neonatal rats. Neonatal rats (P2) received orally a single dose of MeHg (10 mg/kg) and also two doses of Scc. After two days, the effects of this treatment were investigated in the cerebral cortex, hippocampus, kidney, liver and urine samples of rats. We observed that N-Acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) activity in the kidney and urine was higher in MeHg-group when compared with the control group. Similarly, the lipid peroxidation levels were higher in the liver and kidney as well as the Adenosine deaminase (ADA) activity increased in the hippocampus, kidney and liver. These results indicate that increased NAG and ADA activities, as well as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels may play a critical role in MeHg nephrotoxicity. The most relevant finding in our investigation was that acute MeHg treatment in neonatal rats caused liver and renal impairment and Scc was able to prevent such effects. It appears that mechanisms related to scavenging activity of Scc could be involved with its protection effect.

Key words:

Methylmercury; *Syzygium cumini*; N-Acetyl- β -d-glucosaminidase; rat; adenosine deaminase.

1. Introduction

Methylmercury (MeHg) is a ubiquitous, environmentally hazardous chemical, which is bioaccumulated through the food chain which also increases human risk of poisoning (Castoldi et al., 2008; Costa et al., 2004; Clarkson, 1997). MeHg may be ingested through gastrointestinal and distributed around the body, but its preferential target is the central nervous system (CNS), especially during the developing stage (Clarkson, 1997). Of special importance, is the fact that the infants are more susceptible to MeHg as they would be more easily exposed to MeHg through the consumption of human milk (Björnberg et al., 2005) and their nervous systems are still under development (Aschner et al., 2009; Costa et al., 2004; Rice and Barone, 2000; Sakamoto et al., 1998).

The MeHg-exposed individuals exhibit severe forms of neurological disease which include a collection of cognitive, sensory, and motor disturbances (Clarkson and Strain, 2003; Takeuchi et al., 1979). Furthermore, nephrotoxicity and gastrointestinal toxicological effects have been reported. Following exposure to MeHg, significant accumulation of mercuric ions occurs along renal proximal tubules. Thus, when the burden of mercury exceeds the capacity of proximal tubular epithelial cells to cope, cellular degeneration and necrosis ensues (Zalups and Bridges, 2009). Consequently, toxicological studies have focused on the mechanism responsible for the effects of MeHg. In fact, MeHg induces the glutamate uptake inhibition (Liu et al., 2009; Moretto et al., 2005), the increase the influx of intracellular Ca^{2+} and also the production of reactive oxygen species (ROS) (Liu et al., 2009; Mori et al., 2007; Stringari et al., 2008). Moreover, the neurotoxicity of MeHg may result from a number of interferences with critical processes in the cells, e. g., mitochondrial activity, cell membrane properties, or cytoskeletal integrity (Castoldi et al., 2001; Moretto et al., 2004; Sanfeliu et al., 2003).

It is well established that adenosine modulates the proliferation, survival and apoptosis of many different cell types (Jacobson et al., 1999; Wardas, 2002). The enzyme responsible for the degradation of endogenous adenosine to its inactive metabolite inosine is Adenosine deaminase (ADA). It is important in the acute and protracted inflammatory responses (Conlon and Law, 2004; Desrosiers et al., 2007). A particular importance of normal level of ADA activity for T-cell development is demonstrated dramatically by the fact that a genetic deficiency of the enzyme in humans is associated with a form of severe combined immunodeficiency disease (SCID). The lymphospecific toxicity that results is thought to be due largely to the accumulation of the ADA substrate 2'-deoxyadenosine and its subsequent

conversion to dATP which inhibits ribonucleotide reductase, a key enzyme in DNA synthesis (Cohen et al., 1978; Hirshhorn, 1995).

In spite of this role for ADA, it stimulates the release of excitatory amino acids through a mechanism that is independent of adenosine depletion (Cristalli et al., 2001). In addition to it, ADA abnormalities have been reported as bacterial meningitis, viral hepatitis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, among others (Cristalli et al., 2001; Kaya et al., 2007; Titarenko et al., 2006).

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG: EC 3.2.1.30) is a lysosomal enzyme present in high concentrations in renal proximal tubular cells. The increasing urinary NAG excretion is one of the most sensitive markers of renal disease and the cell injury is in the renal proximal tubules (Bosomworth et al., 1999; Nordberg et al., 2009).

Currently, plants and/or their isolated compounds have received new attention, mainly protective effects in relief of diseases (Bhat et al., 2008; Brito et al., 2007). In this context, *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) is a well-known plant because of its several pharmacological actions, such as anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, among other actions (Migliato, et al., 2006; Prince et al., 2004; Veigas et al., 2008). The particular importance in this matter is the fact that the Sc leaf extract protected rats from the hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (Moresco et al., 2007). Despite that, the effects of Sc extract are still unclear.

There are few studies in the literature on Sc effects on the heavy metal toxicity. However, an improvement of cell viability in rat hepatocytes was observed (Veigas et al., 2008). Taking that into account, the aim of this study was to investigate whether the treatment with Sc could attenuate the effects MeHg-induced on the ADA activity, TBARS production in the brain (the cerebral cortex, hippocampus), liver and kidney and NAG activity (in the kidney and urine) in neonatal rats.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Methylmercury (II) chloride was obtained from Aldrich Chemical Co (98% of purity; Milwaukee, WI). *N*-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) and thiobarbituric acid reactive substances were obtained from Sigma. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Plant material and aqueous seed extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels preparation

The seeds of *Syzygium cumini* were collected fresh locally, and they were cleaned, dried and powdered. Eighty (80 g) grams of the seed powder were extracted with 400 mL of distilled water for 1 h under reflux as described by Prince *et al.* (1998). The extract was lyophilized and store at -20 C until further use. The yield of the extract was 6.2 % w/w.

2.2.1. HPLC characterization of the extract

Chromatographic analyses were carried out in isocratic conditions using RP-C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles. The mobile phase was methanol-acetonitrile-water (40:15:45, v/v/v) containing 1.0% acetic acid. The flow rate was 0.8 mL/min, injection volume 20 μ l and the wavelength 257 nm. The mobile phase was filtered through a membrane filter 0.45 μ m and then degassed by an ultrasonic sound before use. The solutions of standards (rutin, kaempferol, chlorogenic acid and gallic) were prepared in the same mobile phase of HPLC to the standard curve in the concentration range of 0.0125 to 0.200 mg/ml. The chromatographic peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and quantification was performed by peak integration using the external standard method. The calibration curve for chlorogenic acid was: $Y = 30153x - 214576$ ($r = 0.9998$), the curve of gallic acid was: $Y = 16324x - 661582$ ($r = 0.9967$), and the curve of rutin was: $Y = 19217x - 16949$ ($r = 1$). All chromatographic operations were performed at room temperature and in triplicate.

2.3. Experimental design

The study was in accordance with the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria which approved the experimental protocol (23081.007418/2007-75).

Rats Wistar 2 days of age (P2) were obtained from our own breeding colony. Animals were kept in separate animal rooms, on a 12-h light: 12-h dark cycle, at a room temperature, and with free access to food and water.

Four groups of rats were administrated orally for one day with:

G1) NaCl 0,9% (n=10), as the control group, with the aid of a Microman pipette (Gilson Medical Electronics) according to Sakamoto et al. 2004 method.

G2) MeHg (10mg/Kg - in this group about 30% of the treated animals died; n = 10).

G3) Pups received only Scc (0.9 mg/kg) orally and second dose 12 hours later. The doses were given according to Moresco et al. (2004).

G4) Soon after the MeHg administration, pups received Scc orally and a second dose 12 hours later, as described in G3. Then they were sacrificed two days after the final administration (P4).

2.4 Sample preparation

Wistar rats were euthanized and their brains were promptly removed and hippocampus and cerebral cortex, liver and kidney of neonatal (P4) were carefully separated and processed as described previously (Bellé et al., 2009; Robic, 1995) with some modifications. All the procedures described above were performed at 0° – 4° C. A urinary sample was withdrawn by direct puncture of the bladder during euthanasia, with the aid of a syringe with modifications according to Kavlock et al. (1981).

2.5. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels

The tissues were homogenized in 10 fold volume of 10 mM Tris-HCl buffer solution pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 1000 × g for about 10 min. Lipid peroxidation levels were measured as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels by a modification of the method of Buege and Aust (1978).

2.6. Enzymatic assays

2.6.1. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity (NAG)

The NAG is added to an enzyme reaction mixture that consists of a substrate (p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide) dissolved in sodium citrate buffer (pH 4.4). During incubation at 37 °C for 15 minutes, enzymatic hydrolysis of the substrate liberates p - nitrophenylate ion. The reaction is stopped by adding 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) buffer (pH 10.25), and the reaction product is measured by spectrophotometry at 405 nm. The urinary NAG activity is proportional to the absorbance of the liberated p –nitrophenylate ion, after correction of absorbance of a urine “blank” sample (Horak et al., 1981)

2.6. 2. Adenosine deaminase determination

Tissue ADA activities were estimated spectrophotometrically by the method of Giusti, (1974) which is based on the direct measurement of the ammonia produced when AD acts in excess of adenosine. Results were expressed as units per g protein in the tissue, and calculated as mean \pm standard deviation. All samples were assayed in duplicate.

2.7. Statistical analysis

Statistical differences among groups were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Tukey’s multiple range test when appropriate. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. NAG activity in the kidney and the urine

We observed that NAG activity in the kidney and the urine was higher in MeHg-group when compared to the control group. The urine of neonates which received Scc had a decrease in the NAG activity after MeHg-treatment (Figure 2B). However, the administration of Scc did not altered the effects caused by MeHg in the neonatal rats kidney (Figure 2A).

3.2. TBARS levels in the hippocampus, cerebral cortex, kidney and liver

Our experiments showed that TBARS levels did not have an effect in the hippocampus and cerebral cortex of neonate rats MeHg-treated when compared to the control group (Table 1). In contrast, the TBARS levels were higher in the kidney and in the liver when compared with the control group and the administration of Scc completely prevented MeHg-induced only in the renal tissue (Figure 3 B, C).

3.3. ADA activity in the hippocampus, cerebral cortex, kidney and liver

ADA activity increased in the hippocampus, but did not change in the cerebral cortex (Table 1). Meanwhile, in the kidney and the liver, we observed the increase of ADA activity. However, in the liver, the administration of Scc could not avoid the increase of ADA activity. While in the kidney of MeHg group that received the Scc, this increase of ADA activity was prevented (Figure 4 B, A).

Furthermore, Table 2 shows that MeHg caused a significant decrease in the body weight gain, in the weight of the hippocampus and the cerebral cortex at the end of the treatment when compared to the control group (one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, $P < 0.05$). The administration of Scc did not affect the weight loss in the body and in the hippocampus and the cerebral cortex which were weighed after the MeHg-treatment. Whereas Scc was able to avoid the weight loss in the liver and in the kidney of the MeHg group.

3.4. Chemical characterization of the extract

HPLC fingerprinting of the aqueous seed extract Scc showed an elution diagram when the peaks were grouped into three regions based on the UV absorption profile. These regions showed typical patterns of UV absorption, supporting the presence of gallic acid (1), Kaempferol (2), chlorogenic acid (3) and rutin (4) in Scc (Figure 1), in the concentrations of 2,632%, no quantified, 0,0568% and 0,0841%, respectively. Molecular structures are shown in Figure 1. Therefore, HPLC analysis revealed that hydrolyzable tannins (galic), flavonoids (rutin) and phenolic are the major components of the extract. The results are similar to other studies (Alberton et al., 2001; Damasceno et al., 2002; Mahmoud et al., 2001; Migliato et al., 2006; Sharma et al., 2003; Timbola et al., 2002).

4. Discussion

The results of this study show that the acute treatment with MeHg affected all tissues analyzed. First, both urinary/renal NAG activity increased, but in urine of the group treated with Scc, this effect was not observed. Also, in the kidney of the MeHg group, TBARS levels and ADA activity increased when compared with the control group, and the administration of Scc prevented this effect.

Second, in relation to the liver, both TBARS levels and ADA activity increased, but the administration of Scc significantly attenuated only these effects on the TBARS levels. Third, in both the cerebral cortex and hippocampus we did not observe this effect in TBARS levels. However, ADA activity increased only in the hippocampus of the MeHg group when compared with the control group, and in the MeHg group, Scc did not cause any effect.

The kidneys serve to maintain fluid and electrolyte homeostasis by adapting renal excretion to bodily needs. Besides the systemic neurohumoral control, primary local mechanisms are important for renal function and integrity (Vallon, 2008). Significant amounts of mercury may accumulate in the kidneys after exposure to organic forms of mercury (Prickett et al., 1950; Norseth and Clarkson, 1970; Magos et al., 1985). Furthermore, the elimination of heavy metals in animals and human subjects are nephrotoxic as numerous studies have documented (Magos et al., 1985; McNeil et al., 1988; Zalups et al., 2004). The mechanisms of MeHg-induced renal toxicity have not been exactly established yet. The increased release of lysosomal enzyme NAG, after MeHg oral administration causes rapid biochemical effects at the distal tubule level. This way, the results obtained in the present study reveal a renal impairment. In fact, the significant increase observed in the levels of TBARS and in the urinary excretion and renal NAG as well as in the ADA activity indicate the occurrence of tubular cell injury in MeHg-treated rat kidneys.

The most relevant finding in our investigation was the effects observed on the NAG and ADA activity. These two enzymes may be considered as the indicators of renal tubular dysfunction and of DNA catabolism. These high enzyme activities may indicate that there might be possible cell and nucleic acid destruction due to MeHg toxicity in renal tissue. Changes in the ADA activity may modify the local concentration of adenosine, and as a consequence, they influence the effects of adenosine actions. As elegantly reviewed by Fredholm (2007) and Jacobson et al., (1999), Wardas (2002), Abbracchio and Ceruti (2007), adenosine is an important modulator. Adenosine downregulation in the inflammatory and immune responses in injured tissues plays a crucial role in the beneficial effects induced by

this nucleoside. Therefore, these results may indicate that the pathogenesis of MeHg toxicity is closely related to the adenosine metabolism, and that ADA plays a key role in this model. Scc administration in the present study significantly attenuated the increase of the ADA and NAG activities of the renal tissue. These data indicate that the presence of increased NAG and ADA activity may be an important factor in the process of free radical generation in MeHg-induced renal damage.

Prince et al., 1998 showed that the Scc contains a free radical-scavenging activity, and the decreased levels of TBARS show that Scc reverts the formation of lipid peroxy radicals in a number of tissues, thereby protecting them. As being evidenced by chemical characterization of the extract, rutin, which is one of the major representatives of flavonoids present in the extract, has scavenging activity and antioxidant capacity (Gong et al., 2009; Korkmaz and Kolankaya, 2009). Thus, rutin could be responsible for the Scc effects.

Liver has one of the highest antioxidant enzyme activities in the body and is involved in major detoxification functions (Mahesh et al., 2009). MeHg has been shown to exit from liver cells into bile as a complex with glutathione on the endogenous carriers for glutathione (Ballatori and Clarkson, 1982, 1985; Osawa and Magos, 1974). It has been known that the inability of the neonatal liver to excrete MeHg into the bile, which is a key step for its elimination in adults (Ballatori and Clarkson, 1982). Although, both TBARS levels and ADA activity increased in the liver, we observed that only these effects on the TBARS levels were reverted by the administration of Scc. The main compounds present in the Scc (gallic acid, chlorogenic acid and rutin) can be responsible by these effects, since they have been known by their antioxidant capacity. The protection effect of Scc observed in the present study is consistent with the beneficial results found by Moresco et al., (2007) and Stanley et al., (2003).

Although the developing nervous system also appears to be more sensitive to MeHg (Dreiem et al., 2005), the TBARS levels in the cortex cerebral and hippocampus did not change in the MeHg-group. It is possible that the acute treatment (two days) was not long enough to activate the lipid peroxidation. Nevertheless, the hippocampus was more sensible to MeHg treatment as ADA activity increased, and the administration of Scc did not prevent this effect. ADA activity may represent a physiological mechanism by which the brain protects itself by overactivating the immune system or it may represent the intense enzymatic activity in this period of development of the rats (Bellé et al., 2009).

In conclusion, the results of this study revealed that TBARS levels, NAG and ADA activity may play an important role in the pathogenesis of MeHg-induced damage. It is also

important to point out that in our investigation the NAG activity increased two days after MeHg administration, revealing that the NAG activity can be an early marker of renal toxicity. Moreover, the results show that MeHg-induced renal injury and lipid peroxidation were significantly ameliorated in Scc-treated rats, which confirm the antioxidant property of this extract. In spite of the potent free radical scavenger, further studies should be conducted to elucidate the exact protection mechanism of Scc against MeHg-induced toxicity.

Acknowledgments

This study was funded by the Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and supported by the Research and Graduate Provost Office (PRPPG – Pró Reitoria de Pesquisa - UFSM), Brazil.

5. References

- Abbracchio, M.P., and Ceruti, S. (2007). P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal*. **3**, 13-25.
- Aschner, M., Syversen, T., Souza, D. O., Rocha, J. B., and Farina, M. (2007). Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. Review. *Braz J. Med. Biol. Res.* **40**, 285-91.
- Aschner, M., and Ceccatelli, S. (2009). Are Neuropathological Conditions Relevant to Ethylmercury Exposure? *Neurotox. Res.* [Epub ahead of print]
- Ballatori, N.; Clarkson, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. (1982). *Science* **216**, 61-3, 1982.
- Ballatori, N.; Clarkson, T.W. Sulfobromophthalein inhibition of glutathione and methylmercury secretion into bile. (1985). *Am. J. Physiol.* **248**, 238-45.
- Bellé, L. P., De Bona, K. S., Abdalla, F. H., Pimentel, V. C., Pigatto, A. S., and Moretto, M. B. (2009). Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **104**, 408-13.
- Björnberg, K. A., Vahter, M., Berglund, B., Niklasson, B., Blennow, M., Sandborgh-Englund, G. (2005). Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1381-5.
- Bosomworth, M. P., Aparicio, S. R., and Hay, A. W. (1999). Urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase—A marker of tubular damage? *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 620–6.
- Bhat, M., Zinjarde, S.S., Bhargava, S.Y., Kumar, A.R., Joshi, B.N. (2008). Antidiabetic Indian Plants: a Good Source of Potent Amylase Inhibitors. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* (In press).
- Brito, F.A., Lima, L.A., Ramos, M.F., Nakamura, M.J., Cavalher-Machado, S.C., Siani, A.C., Henriques, M.G., Sampaio, A.L. (2007). Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Braz J. Med. Biol. Res.* **40**, 105-15.
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302–310.

- Castoldi, A. F., Coccini, T., Ceccatelli, S., and Manzo, L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. Review. *Brain Res. Bull.* **55**, 197-203.
- Castoldi, A. F., Onishchenko, N., Johansson, C., Coccini, T., Roda, E., Vahter, M., Ceccatelli, S., and Manzo, L. (2008). Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **51**, 215-29.
- Chang, J. W., Pai, M. C., Chen, H. L., Guo, H. R., Su, H. J., and Lee, C. C. (2008). Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. *Environ. Res.* **108**, 334-339.
- Clarkson, T. W. (1997). The toxicology of mercury. Review. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **34**, 369-403.
- Clarkson, T. W., Strain, J. J. (2003). Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. *J. Nutr.* **133**, 1539-43.
- Cohen, A., Hirschhorn, R., Horowitz, S.D., Rubinstein, A., Polmar, S.H., Hong, R., Martin, D.W. Jr. (1978). Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 472-6.
- Conlon, B. A., and Law, W. R. (2004). Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 14-20.
- Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., and Soldin, O. P. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 87-110.
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.* **21**, 105-28. Review.
- Desrosiers, M. D., Cembrola, K. M., Fakir, M. J., Stephens, L. A., Jama, F. M., Shameli, A., Mehal, W. Z., Santamaria, P., and Shi, Y. (2007). Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol.* **179**, 1884-92.

- Dreiem, A., Gertz, C. C., and Seegal, R. F. (2005). The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. *Toxicol. Sci.* **87**, 156-62.
- Fredholm, B.B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell. Death Differ.* **14**, 1315-23. Review.
- Giusti, G. (1974). Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HV (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. 1092-9.
- Gong, G., Qin, Y., Huang, W., Zhou, S., Yang, X., Li, D. (2009). Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* [Epub ahead of print].
- Hirschhorn, R. (1995). Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, 219-27.
- Horak, E., Hopfer, S. M., and Sunderman, F. W. Jr. (1981). Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clin. Chem.* **27**, 1180-5.
- Jacobson, K. A., Hoffmann, C., Cattabeni, F., and Abbracchio, M. P. (1999). Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis* **4**, 197-211.
- Kavlock, R. J., Rogers, E. H., and Rehnberg, B. F. (1981). Renal functional teratogenesis resulting from adriamycin exposure. *Teratology* **33**, 213-220.
- Korkmaz, A., and Kolankaya, D. (2009). Protective Effect of Rutin on the Ischemia/Reperfusion Induced Damage in Rat Kidney. *J. Surg. Res.* (In press).
- Liu, W., Wang, X., Zhang, R., and Zhou, Y. (2009). Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats. *Toxicol. Lett.* **188**, 230-5.
- Lunkes, G. I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V., Mazzanti, C. M., and Schetinger, M. R. C. (2004). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* **109**, 189-194.

- Magos, L., Brown, A.W., Sparrow, S., Bailey, E., Snowden, R.T., Skipp, W.R. (1985). The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. *Arch. Toxicol.* **57**, 260-7.
- Mahesh, R., Bhuvana, S., Begum, V.M. (2009). Effect of *Terminalia chebula* aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats. *Cell. Biochem. Funct.* **27**, 358-63.
- McNeil, S.I., Bhatnagar, M.K., Turner, C.J. (1988). Combined toxicity of ethanol and methylmercury in rat. *Toxicology* **53**, 345-63.
- Migliato, K.F., Baby, A.R., Zague, V., Velasco, M.V.R., Corrêa, M.A., Sacramento, L.V.S., Salgado, H.R.N. (2006). Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta Farm. Bonaerense* **25**, 310-304.
- Mori, N., Yasutake, A., and Hirayama, K. (2007). Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.* **81**, 769-76.
- Moresco, R. N., Sperotto, R. L., Bernardi, A. S., Cardoso, R. F., and Gomes, P. (2007). Effect of the aqueous extract of *Syzygium cumini* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* **21**, 793-5.
- Moretto, M. B., Franco, J., Posser, T., Nogueira, C. W., Zeni, G., and Rocha, J. B. (2004). Ebselen protects Ca²⁺ influx blockage but does not protect glutamate uptake inhibition caused by Hg²⁺. *Neurochem. Res.* **29**, 1801-6.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Santos, A. Q., Gottfried, C., Boff, B., Zeni, G., Pureur, R. P., Souza, D. O., Wofchuk, S., and Rocha, J. B. (2005). Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺. *Toxicology* **214**, 57-66.
- Nordberg, G. F., Jin, T., Wu, X., Lu, J., Chen, L., Lei, L., Hong, F., and Nordberg, M. (2009). Prevalence of kidney dysfunction in humans - relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors. *Biochimie.* **91**, 1282-5.
- Norseth, T., Clarkson, T.W. (1970). Biotransformation of methylmercury salts in the rat studied by specific determination of inorganic mercury. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2775-83.
- Prickett, C.S., Laug, E.P., Kunze, F.M. (1950). Distribution of mercury in rats following oral and intravenous administration of mercuric acetate and phenylmercuric acetate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**, 585-8.

- Prince, P. S., Menon, V. P., and Pari, L. (1998). Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: Effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **61**, 1–7.
- Prince, P.S., Kamalakkannan, N., Menon, V.P. (2004). Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzygium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* **91**, 209-213.
- Osawa, M., and Magos, L. (1974). The chemical form of the methylmercury complex in the bile of the rat. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1903-5.
- Rice, D., and Barone, S. Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108**, 511-33.
- Robic, D., Bens, M., Loko, F., Vandewalle, A., and Bourbouze, R. (1995). N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) isoenzymes in primary cultures of rabbit kidney proximal tubule cells: a cellular model for studies on nephrotoxicity?. *Toxicology* **103**, 37-44.
- Sanfeliu, C., Sebastià, J., Cristòfol, R., and Rodríguez-Farré, E. (2003). Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.* **5**, 283-305.
- Sakamoto, M., Wakabayashi, K., Kakita, A., Hitoshi, Takahashi., Adachi, T., and Nakano, A. (1998). Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type minamata disease. *Brain Res.* **784**, 351-4.
- Sakamoto, M., Kakita, A., de Oliveira, R. B., Sheng Pan, H., and Takahashi, H. (2004). Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **152**, 171-6.
- Stanley, M.P., Kamalakkannan, N., Menon, P.V. (2003). *Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. *Journal of Ethnopharmacology.* **84**, 205-9, 2003.
- Stringari, J., Nunes, A. K., Franco, J. L., Bohrer, D., Garcia, S. C., Dafre, A. L., Milatovic, D., Souza, D. O., Rocha, J. B., Aschner, M., and Farina, M. (2008). Prenatal methylmercury

exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **227**, 147-54.

Takeuchi, T., Eto, N., and Eto, K. (1979). Neuropathology of childhood cases of methylmercury poisoning (Minamata disease) with prolonged symptoms, with particular reference to the decortication syndrome. *Neurotoxicology* **1**, 1-20.

Titarenko, O. T., Potapenko, E. I., Kokkanen, B. M., Prokhorovich, N. A., Oleĭnik, A. N., Nakonechnyi, G. D., and Molodykh, A. Z. (2006). Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* **11**, 14-8.

Vallon, V. (2008). P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, 10-27. Review.

Veigas, J. M., Shrivasthava, R., and Neelwarne, B. (2008). Efficient amelioration of carbon tetrachloride induced toxicity in isolated rat hepatocytes by *Syzygium cumini* Skeels extract. *Toxicol. In Vitro* **22**, 1440-6.

Zalups, R.K., Aslamkhan, A.G., Ahmad, S. (2004). Human organic anion transporter 1 mediates cellular uptake of cysteine-S conjugates of inorganic mercury. *Kidney Int.* **66**, 251-61.

Zalups, R. K., and Bridges, C. C. (2009). MRP2 involvement in renal proximal tubular elimination of methylmercury mediated by DMPS or DMSA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235**, 10-7.

Wardas, J. (2002). Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol.* **54**, 313-26.

Wakabayashi, K., Kakita, A., Sakamoto, M., Su, M., Iwanaga, K., Ikuta, F. (1995). Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. *Brain Res.* **705**, 267-72.

Legends:***Figure 1******Chemical characterization of Scc:***

HPLC fingerprint of the Scc; A) showing typical patterns of gallic acid (1), chlorogenic acid (3) and rutin (4) in the 257 nm.

Figure 2***NAG activity in the kidney and urine of neonatal rats:***

NAG activity in the kidney (A) and urinary samples (B) of neonatal rats treated with 10 mg/kg of MeHg and/or 0.9mg/Kg of Scc, as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM of ten animals expressed as U per L of urine. *Statistically significant differences from Control group ($P < 0.001$), as determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

Figure 3***TBARS levels in the kidney and liver of neonatal rats:***

Results depict the effects in the kidney (A), in the liver (B). Results are expressed as means \pm SEM of ten animals expressed as nMol per g of tissue. *Statistically significant differences from Control group ($p < 0.01$), # is different from MeHg+Scc ($P < 0.05$), as determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

Figure 4***ADA activity in the kidney and liver of neonatal rats:***

Effects of acute exposure to MeHg and/ or Scc in neonatal rats on the ADA activity in the kidney (A), in the liver (B) as described in Materials and Methods. Results are expressed as means \pm SEM of ten animals expressed as U per mg of protein. *Statistically significant differences from Control group ($P < 0.001$), # is different MeHg+Scc ($P < 0.001$), as determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

Figure 1

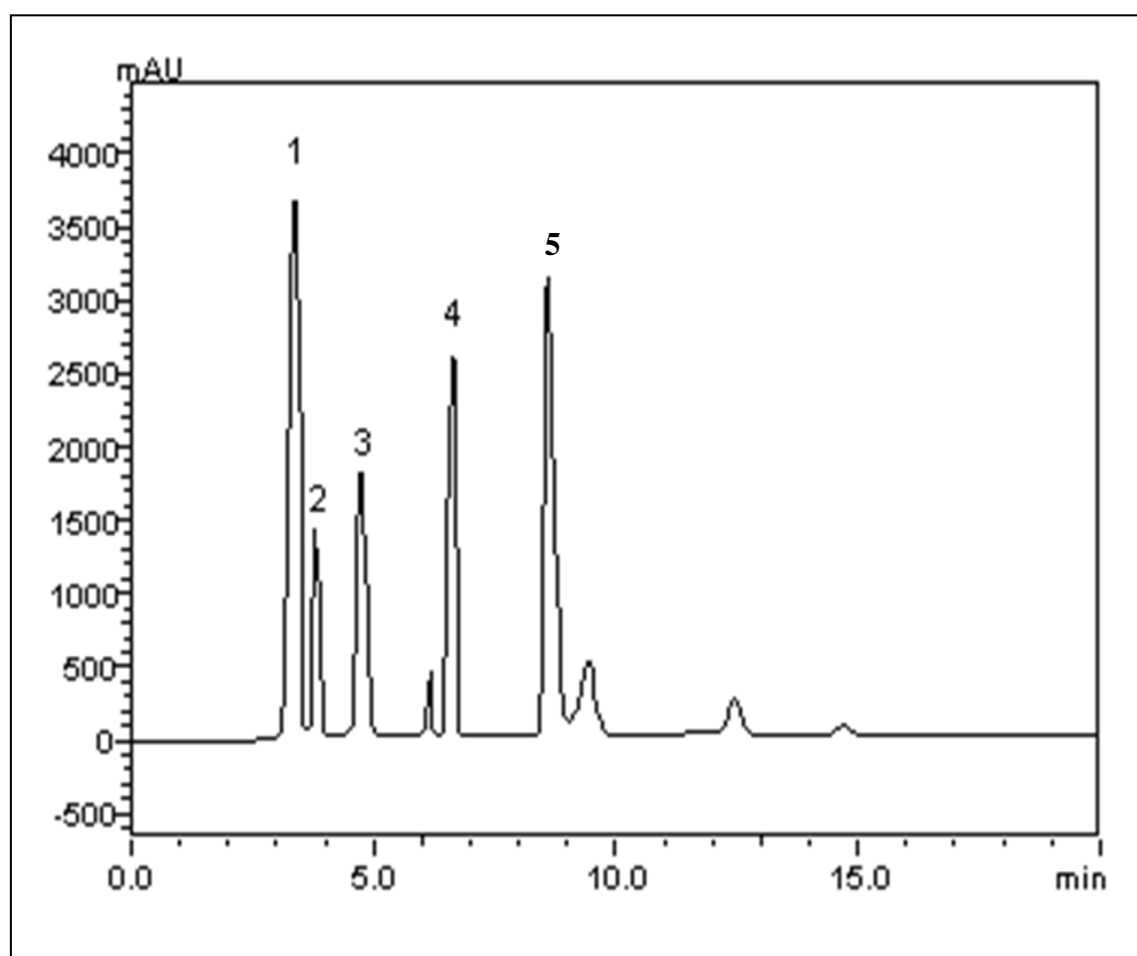
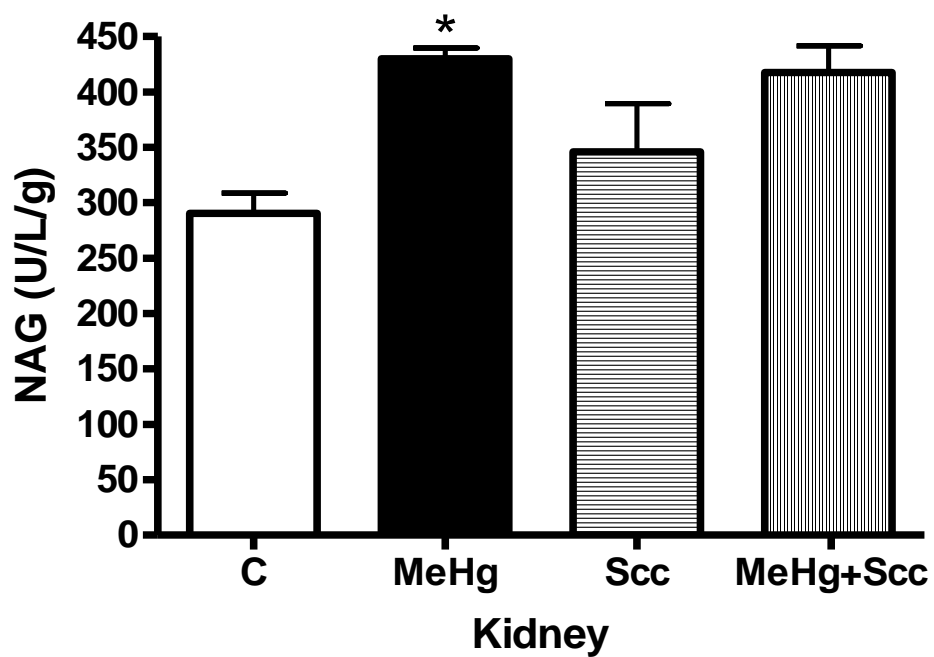


Figure 2

2A)

Figure 2A



2B)

Figure 2B

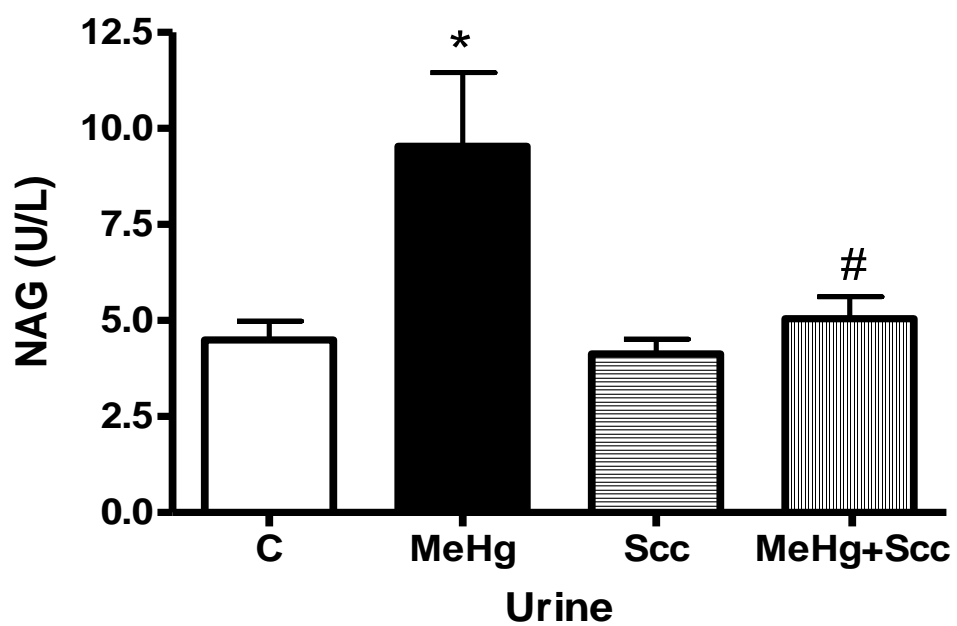
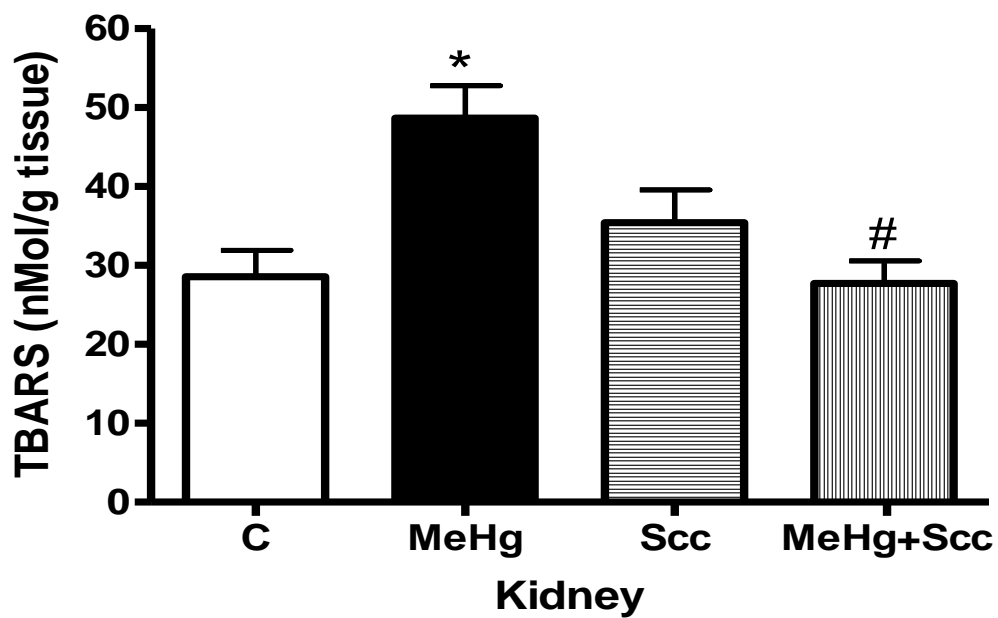


Figure 3

3A)

Figure 3A



3B)

Figure 3B

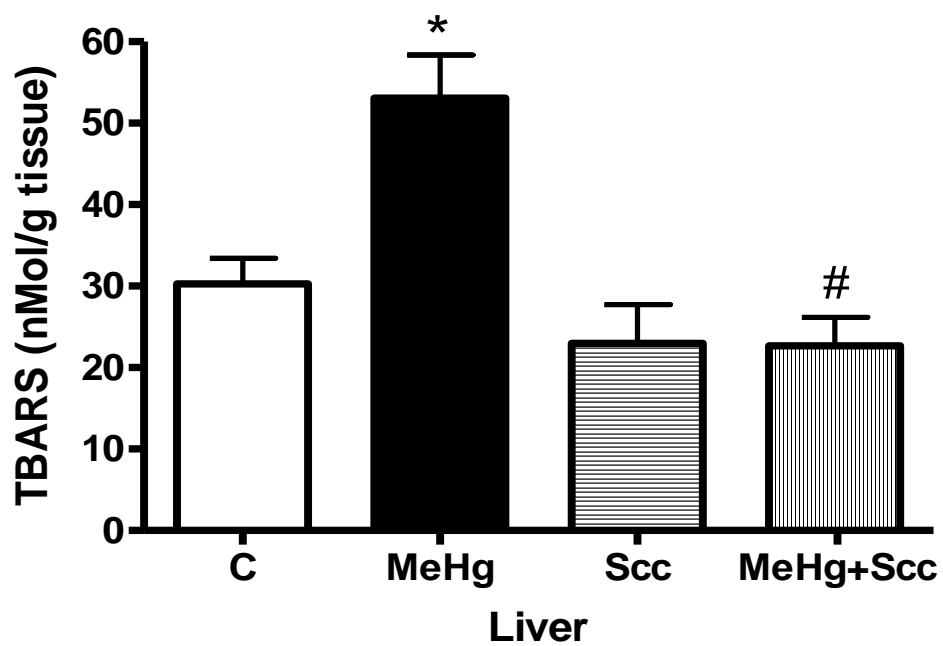
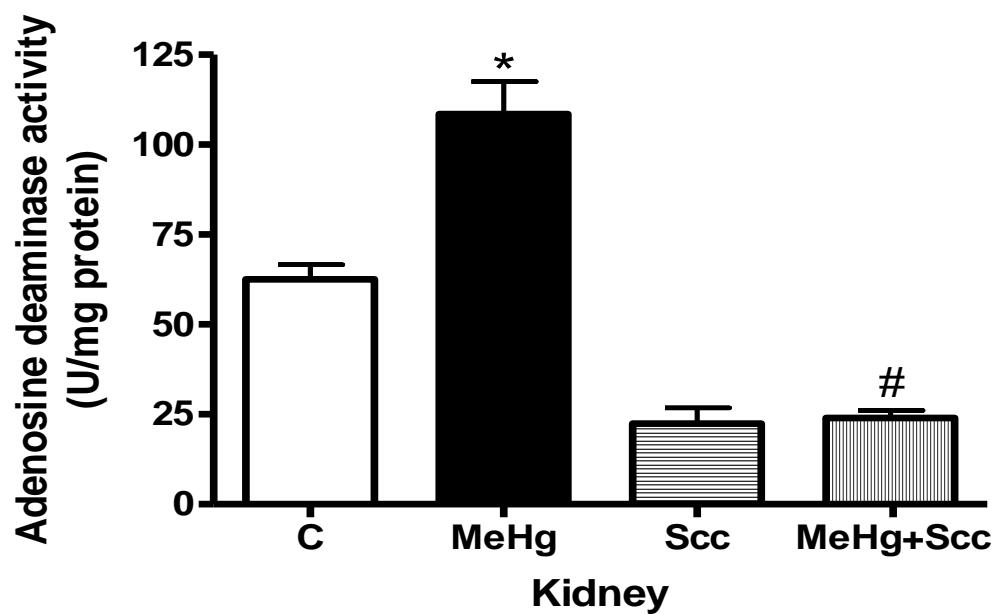


Figure 4

4A)

Figure 4A



4B)

Figure 4B

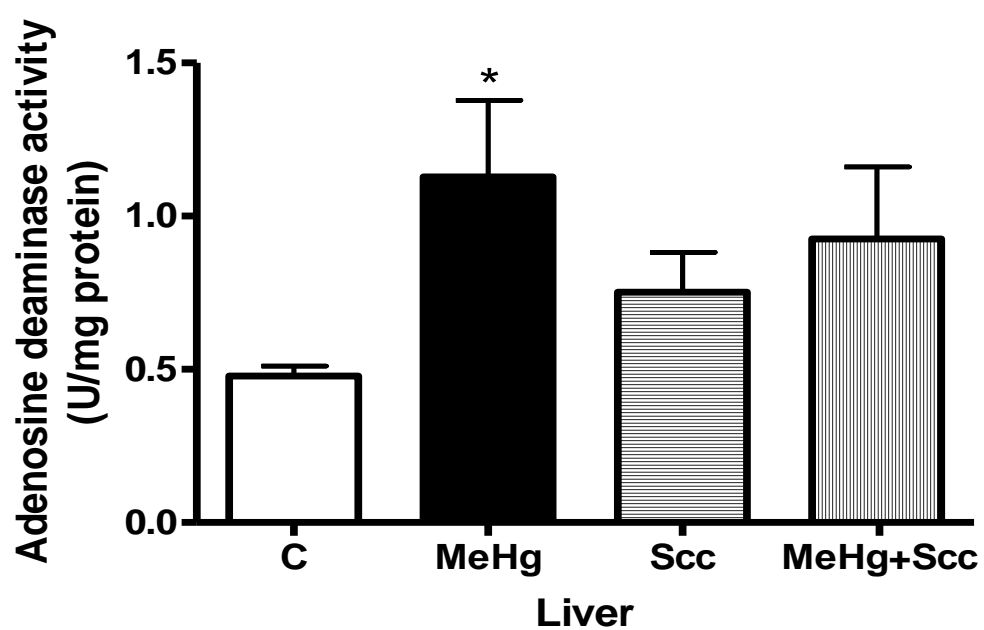


Table 1

Effects of MeHg and Scc administration on ADA activity and TBARS levels in the hippocampus and the cerebral cortex of neonatal rats.

Groups	ADA (U/mg protein)		TBARS (Mmol/g tissue)	
	Hippocampus	Cerebral Cortex	Hippocampus	Cerebral Cortex
Control	26.73±2.17	8.23±0.35	57.76±1.82	10.85±1.30
MeHg	40.55±1.92*	7.81±0.48	64.41±9.88	11.52±3.55
Scc	40.85±4.70	6.07±0.37	72.10±9.76	8.59±2.48
MeHg+Scc	47.75±6.91	6.57±0.48	63.13±7.24	8.10±2.11

Values are expressed as means ± SEM for ADA activity and TBARS levels after the MeHg treatment ($n= 10$ rats/group). *Values statistically different compared to Control group ($p<0.05$), by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

Table 2*Effects of MeHg exposure and Scc administration on body weight gain of neonatal rats.*

Groups	Control	MeHg	Scc	MeHg+Scc
Initial body weight (g)	6.85±0.23	6.57±0.29	6.85±0.23	7.35±0.19
Hippocampus weight (g)	0.021±0.0009	0.018±0.0008*	0.017±0.0009*	0.018±0.0008*
Córtex weight (g)	0.200±0.004	0.170±0.003*	0.194±0.007*#	0.189±0.006
Kidney weight (g)	0.100±0.002	0.059±0.0032*	0.093±0.004#	0.096±0.004#
Liver weight (g)	0.30±0.018	0.20±0.000*	0.30±0.011#	0.30±0.014#
Body weight gain (g)	10.54±0.29	6.53±0.31*	8.06±0.33*#	8.64±0.38*#

Values are expressed as means \pm SEM for body weight gain between P2 and P4 days of treatment ($n= 10$ rats/group). * Values statistically different compared to Control group, # is different compared to MeHg group ($p<0.01$), by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

6. DISCUSSÃO

A toxicidade de metais exógenos em ratos em neonatos difere consideravelmente dos efeitos observados em ratos adultos. Resultados prévios em nosso laboratório, demonstraram que a administração oral de MeHg (1 mg/kg e 4 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos aumentou a atividade da ADA, NAG, NTPDase e TBARS em córtex cerebral, hipocampo, fígado e rim de ratos em desenvolvimento. Porém, a análise histológica do tecido renal dos animais tratados com MeHg não apresentou alterações histológicas. Baseado nestes resultados foi desenvolvido esta forma de exposição ao MeHg em que se objetivou investigar um efeito agudo nos parâmetros citados acima em diversos tecidos e ao mesmo tempo avaliar a ação de um composto sobre estes efeitos.

Os rins servem para manter a homeostasia de líquidos e eletrólitos através da adaptação da excreção renal às necessidades corporais (VALLON, 2008). Quantidades significativas de Hg podem-se acumular nos rins após a exposição a formas orgânicas de mercúrio (MAGOS et al., 1985; NORSETH E CLARKSON, 1970; PRICKETT et al., 1950). Vários estudos demonstram que o processo de eliminação de metais pesados em animais e seres humanos é nefrotóxico (MAGOS et al., 1985; MCNEIL et al. 1988, ZALUPS et al., 2004). O aumento significativo observado nos níveis de TBARS e na excreção urinária da NAG e da NAG renal, bem como na atividade da ADA pode indicar uma injúria das células tubulares dos rins dos ratos tratados com o MeHg.

A adenosina é um importante modulador que atua na resposta inflamatória e imune em tecidos lesionados. Alterações na atividade da ADA podem alterar a concentração local de adenosina e influenciar seus efeitos. Também é possível considerar que o aumento da atividade desta enzima possa estar relacionada a uma destruição das células e eventualmente dos ácidos nucleicos, devido à toxicidade do MeHg no tecido renal.

O fígado é um órgão que tem grande quantidade de enzimas antioxidantes e tem a função de desintoxicação (MAHESH, 2009). O MeHg é liberado pelas células hepáticas complexado com a glutatona para a bile (BALLATORI E CLARKSON, 1982, 1985; OSAWA E MAGOS, 1974). Embora ambos os níveis de TBARS e atividade da ADA aumentaram no fígado, observamos que apenas os níveis de TBARS foram revertidos com a administração de Scc. Os principais compostos

presentes no extrato Scc (ácido gálico, ácido clorogênico e rutina) podem ser responsáveis por esses efeitos. Similarmente, MORESCO et al., 2007 também observaram efeito protetor do extrato das folhas de Scc contra os efeitos do tetracloreto de carbono em ratos.

Quanto aos efeitos no SNC, embora o sistema nervoso em desenvolvimento, parece ser mais sensível ao MeHg (DREIEM et al., 2005), no córtex cerebral e hipocampo não houve nenhuma alteração nos níveis de TBARS no grupo tratado com MeHg. É possível que o tratamento agudo (dois dias) não foi suficiente para ativar a peroxidação lipídica. No entanto, a atividade da ADA no hipocampo do grupo MeHg aumentou enquanto que no córtex este resultado não foi observado. A atividade da ADA pode ser representada pelo mecanismo fisiológico que o cérebro protege-se do sistema imunológico ou uma intensa atividade enzimática, no período de desenvolvimento do rato (BELLÉ et al., 2009). Além disso, a administração de Scc não reverteu o aumento da atividade da ADA induzido pelo MeHg.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste estudo após administração oral ao MeHg e o extrato de sementes de Scc no tratamento agudo em ratos neonatos podemos concluir:

- A exposição oral ao MeHg em ratos neonatos provocou alterações nas atividades da NAG, ADA e níveis de TBARS. Além disso, reduziu o peso dos animais tratados com MeHg.
- O aumento da atividade da ADA pode representar uma estimulação acentuada do sistema imune, como uma reação á exposição ao metal pesado.
- O aumento da atividade da NAG após dois dias da administração oral de MeHg pode indicar de forma precoce uma toxicidade renal.
- As atividades da NAG e da ADA bem como o TBARS podem desempenhar um papel importante na patogênese da exposição ao MeHg em ratos neonatos e a administração de Scc pode reverter estes efeitos provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes.
- Em resumo pela a primeira vez na literatura no nosso conhecimento até o momento o extrato de sementes de Scc foi capaz de diminuir os efeitos provocados pela a administração oral do MeHg no tratamento agudo em ratos neonatos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AIKAWA, T.; UMEMORI-AIKAWA, Y.; FISHER, J.R. Purification and properties of the adenosine deaminase from the midgut gland of a marine bivalved mollusk *Atrina* spp. **Comp Biochem Physiol**, v. 58, p. 357-364, 1977.

ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 171-180, 2005.

AMIN-ZAKI, L.; ELHASSANI, S.; MAJEED, M.A.; CLARKSON, T.W.; DOHERTY, R.A.; GREENWOOD, M. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. **Pediatrics**, v. 54, p. 587–595, 1974.

ASCHNER, M.; SYVERSEN, T.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.; FARINA, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz J Med Biol Res**. V. 40, p. 285-91, 2007.

ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY), 1999. Toxicological Profile for Mercury. **US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA** /<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>S.

AUCOTT, M.; MCLINDEN, M.; WINKA, M. Release of mercury from broken fluorescent bulbs. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 53, p. 143-51, 2003.

BAIRATI, C.; GOI, G.; BOLLINI, D.; ROGGI, C.; LUCA, M.; APOSTOLI, P.; LOMBARDO, A. Effects of lead and manganese on the release of lysosomal enzymes in vitro and in vivo. **Clin Chim Acta**, v. 261, p. 91–101, 1997.

BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. **Science**, v. 216, p. 61-3, 1982.

BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Sulfobromophthalein inhibition of glutathione and methylmercury secretion into bile. **Am J Physiol**, v. 248, p. 238-45, 1985.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S.; PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comp Biochem Physiol C**, v. 140, p. 175-186, 2005.

BASTURK, T.; ALTUNTAŞ, Y.; KURKLU, A.; AYDIN, L.; EREN, N.; UNSAL, A. Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. **Renal Failure**, v. 28, p. 125-28, 2006.

BAZZI, C.; PETRINI, C.; RIZZA, V.; ARRIGO, G.; NAPODANO, P.; PAPARELLA, M.; D'AMICO, G. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor outcome in primary glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 1890-96, 2002.

BELLÉ, L.P.; DE BONA, K.S.; ABDALLA, F.H.; PIMENTEL, V.C.; PIGATTO, A.S.; MORETTO, M.B. Comparative Evaluation of Adenosine Deaminase Activity in Cerebral Cortex and Hippocampus of Young and Adult Rats: Effect of Garlic Extract (*Allium sativum* L.) on Their Susceptibility to Heavy Metal Exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 408–413, 2009.

BETSINGER, G.; BROSSEAU, L.M.; GOLDEN. Occupational health and safety in household hazardous waste management facilities. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 61, p. 575-83, 2000.

BLANCO, J.; DRIESSEN, A.J.; COQUE, J.J.; MARTIN, J.F. Biochemical characterization of the SecA protein of *Streptomyces lividans*--interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and in vitro translocation of proAmy protein. **Eur J Biochem**, v. 257, p.472-8, 1998.

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.

BOSOMWORTH, M.P.; APARICIO, S.R.; HAY, A.W. Urine N-acetyl-beta-d-glucosaminidase—A marker of tubular damage? **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, p. 620–6, 1999.

BRAGADIN, M.; MARTON, D.; MANENTE, S.; GRASSO, M.; TONINELLO, A. Methylmercury induces the opening of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. **J Inorg Biochem**, v. 89, p. 159-62, 2002.

BRAGANÇA, L.A.R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de planta e fitoterápicos hipoglicemiantes. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**, p. 105-22, 1996.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Mol Aspects Med**, Review. v. 26, p. 256-67, 2005.

BRIDGES, C.C.; ZALUPS, R.K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, p. 274-308, 2005.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic. Biol. Med.** v. 29, p. 222–230, 2000.

CARVALHO, C.M.L.; MATOS, A.I.N.M.; MATEUS, M.L.; SANTOS, A.P.M.; BATOREU, M.C.C. High-fish consumption and risk prevention: assessment of exposure to methylmercury in Portugal, **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 71, p. 1279–1288, 2008.

CERNICHIARI, E.; BREWER, R.; MYERS, G.J.; MARSH, D.O.; LAPHAM, L.W.; COX, C.; SHAMLAYE, C.F.; BERLIN, M.; DAVIDSON, P.W.; CLARKSON, T.W. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **Neurotoxicology** v. 16, p. 705–710, 1995.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J Ethnopharmacol**. v. 91, p.105-8, 2004.

CHANG, J.W.; PAI, M.C.; CHEN, H.L.; GUO, H.R.; SU, H.J.; LEE, C.C. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. **Environmental Research**, v. 108, p. 334-9, 2008.

CHECHIK, B.E.; SCHRADER, W.P.; MINOWADA, J. An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. **J. Immunol**, v.126, p. 1003-1007, 1981.

CHUU, Y.Y.; LIU, S.H.; LIN-SHIAU, S. Differential neurotoxic effects of methylmercury and mercuric sulfide in rats. **Toxicology Letters**, v. 169, p.109–120, 2007.

CIRUELA, F.; SAURA, C.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. **FEBS Lett**, v. 380, p. 219-223, 1996.

CLARKSON, T.W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T.W.; STRAIN, J.J. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. **J Nutr**, v. 133, p. 1539-43, 2003.

CLARKSON, T.W.; VYAS, J.B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am J Ind Med**, Review. v. 50, p. 757-64, 2007.

COSTA, L.G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O.P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annun. Reviews Pharmacology Toxicology**, v. 44, p. 87-110, 2004.

COX, P.A.; BALICK, M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery. **Scientific American**, p. 82-87, 1994.

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E. Adenosine Deaminase: functional implications of inhibitors. **John Wiley & Sons, Inc. Med Res Rev**, v. 21, p. 105-128, 2001.

DADDONA, P.E. Human adenosine deaminase. **J Biol Chem**, v. 256, p. 12496-12501, 1981.

DÍAZ, D.; KREJSA, C.M.; WHITE, C.C.; KEENER, C.L.; FARIN, F.M.; KAVANAGH, T.J. Tissue specific changes in the expression of glutamate-cysteine ligase mRNAs in mice exposed to methylmercury. **Toxicol Lett**. v. 122, p. 119-29, 2001.

DJURDJIC´, V.; MANDIC´, L.J.; MAKSIMOVIC´, R.; MILIVOJEVIC´, R. Urinary Nacetyl-h-d-glucosaminidase activity in occupational Hg and Cr exposition. **Metal Ions Biol Med**, v. 2, p. 442-4, 1992.

DO NASCIMENTO, J.L.; OLIVEIRA, K.R.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; MACCHI, B.M.; MAUÉS, L.A.; PINHEIRO, MDA.C.; SILVEIRA, L.C.; HERCULANO, A.M. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian J Med Res**, v. 128, p. 373-82, 2008.

DREIEM, A.; GERTZ, C.C.; SEEGAL, R.F. The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. **Toxicol Sci**, v. 87, p. 156-62, 2005.

ELLINGSEN, D.G.; EFSKIND, J. BERG, K.J.; GAARDER, P.I.; THOMASSEN, Y. Renal and immunologic markers for chloralkali workers with low exposure to mercury vapor. **Scand J Work Environ Health**, v. 26, p. 427-35, 2000.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **Am J Clin Nutr**, v. 57, p. 779–785, 1993.

FERRARA, R.; MAZZOLAI, B.; LANZILLOTTA, E.; NUCARO, E.; PIRRONE, N. Temporal trends in gaseous mercury evasion from the Mediterranean seawaters. **Sci Total Environ**, v. 259, p. 183-90, 2000.

FERRARO, L.; TOMASINI, M.C.; TANGANELLI, S.; MAZZA, R.; COLUCCIA, A.; CARRATU`, M.R.; GAETANI, S.; CUOMO, V.; ANTONELLI, T. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 27, p. 165–174, 2009.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

FRANCO, R.; CASADOÁ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progr Neurobiol**, v. 52, p. 283-294, 1997.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol Rev**, v. 161 p. 27-42, 1998.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; STRINGARI, J.; MISSAU, F.C.; POSSER, T.; MENDES, B.G.; LEAL, R.B.; SANTOS, A.R.; DAFRE, A.L.; PIZZOLATTI, M.G.; FARINA, M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem Res Toxicol**. v. 20, p. 1919-26, 2007.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; DICKSON, P.W.; MATTOS, J.J.; MARTINS, R.; BAINY, A.C.; MARQUES, M.R.; DAFRE, A.L.; FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic Biol Med**. v. 47 p. 449-57, 2009.

FREDHOLM, B.B.; CHEN, J.F.; MASINO, S.A.; VAUGEOIS, J.M. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Review.v. 45, p. 385-412, 2005.

GIBEY, R.; DUPOND, J.L.; HENRY, J.C. Urinary N-acetyl-h-d-glucosaminidase (NAG) isoenzyme profile: a tool for evaluating nephrotoxicity of aminoglycosides and cephalosporins. **Clin Chim Acta**, v. 137, p. 1–11, 1984.

GOLDMAN, L.R.; SHANNON, M.W. American Academy of Pediatrics: Committee on Environmental Health Technical report: mercury in environment: implications for pediatricians. **Pediatrics**, v. 108, p. 197–205, 2001.

GORGUNER, M.; CERCI, M.; GORGUNER, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions. **Respirology**. v. 5, p. 321-324, 2000.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P.J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 19, p. 417–428, 1997.

GROTTO, D.; BARCELOS, G.R.; VALENTINI, J.; ANTUNES, L.M.; ANGELI, J.P.; GARCIA, S.C.; BARBOSA, F.JR. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Arch Toxicol.** v. 83, p. 249-54, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress: adaption, damage, repair and death. In: Free radicals in Biology and Medicine. **3 th ed. Oxford: Oxford University Press**, p. 246-349, 1999.

HASSIMOTTO, N.M.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, p.2928-2935, 2005.

HEGEN, M.; NIEDOBITEK, G.; KLEIN, C.E.; STEIN, H.; FLEISCHER, B. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl peptidase IV activity. **J. Immunol**, v. 144, p. 2908–2914, 1990.

HERSHFIELD, M.S. Immunodeficiency caused by deficiency of adenosine deaminase. **Immunol. Allergy Clin. North Am**, v. 20, p. 161–175, 2000.

HORAK, E.; HOPFER, S.M.; SUNDERMAN, J.W. Spectrophotometric assay for urinary n-acetyl-b-d- glucosaminidase activity. **Clinical Chemical**, v. 27, p. 1180-85, 1981.

HULTBERG, B.; ISAKSSON, A.; STERNER, G.; WEIBUL, H. Enzyme immunoassay of urinary h-hexosaminidase isoenzymes in patients with renal transplants. **Clin Chim Acta**, v. 192, p. 107–14, 1990.

IBIŞ, M.; KÖKLÜ, S.; YILMAZ, F.M.; BAŞAR, O.; YILMAZ, G.; YÜKSEL, O.; YILDIRIM, E.; OZTÜRK, Z.A. Serum Adenosine Deaminase Levels in Pancreatic Diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526–530, 2007.

IWAKI-EGAWA, S.I.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 137, p. 247–254, 2004.

JIN, T.; NORDBERG, G.; WU, X.; YE, T.; KONG, Q.; WANG, Z.; ZHUANG, F.; CAI, S. Urinary N-acetyl-beta-d-glucosaminidase isoenzymes as biomarker of renal dysfunction caused by cadmium in a general population. **Environ Res**, v. 81, p. 167–73, 1999.

KAISEMANN, M.C.; KRITSKI, A.L.; PEREIRA, M.F.; TRAJMAN, A. Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. Pleural fluid adenosine deaminase detection for the diagnosis of pleural tuberculosis. **J Bras Pneumol**, v. 30, p. 549-56, 2004.

KOVACIC, P.; JACINTHO, JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr Med Chem**, Review. v. 8, p. 773-96, 2001.

LANGWORTH, S.; ELINDER, C.G.; SUNDQUIST, K.G.; VESTERBERG, O. Renal and immunological effects of occupational exposure to inorganic mercury. **Br J Ind Med**, v. 49, p. 394-401, 1992.

LIN, T.H.; HUANG, Y.L.; HUANG, S.F. Lipid peroxidation in liver of rats administrated with methyl mercuric chloride. **Biol Trace Elem Res**, v. 54, p. 33-41, 1996.

LUPIDI, G.; MARMOCCHI, F.; FALASCA, M.; VENARDI, G.; CRISTALLI, G.; GRIFANTINI, M.; WITHEHEAD, E.; RIVA, F. Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1122, p. 311-316, 1992.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comp Biochem Physiol B**, v. 44, p. 283-289, 2006.

MAGOS, L.; BROWN, A.W.; SPARROW, S.; BAILEY, E.; SNOWDEN, R.T.; SKIPP, W.R. The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. **Arch Toxicol**, v. 57, p. 260-7, 1985.

MAHESH, R., BHUVANA, S., BEGUM, V.M. Effect of Terminalia chebula aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats. **Cell. Biochem. Funct.** v. 27, p. 358-63, 2009.

MANDIĆ, L.M.; AĆIMOVIĆ, J.M.; JOVANOVIĆ, V.B. The possibility of determining N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes under alkaline conditions. **Clinical Biochemistry**. v. 38, p. 384–389, 2005

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361–370, 2000.

MCNEIL, S.I.; BHATNAGAR, M.K.; TURNER, C.J. Combined toxicity of ethanol and methylmercury in rat. **Toxicology**, v. 53, p. 345-63, 1988.

MICARONI, R.C.M.; BUENO, M.M.S.; JARDIM, W.F. Mercury Compounds. Review on Determination, Treatment and Disposal Methods. **Departamento de Química Analítica-Instituto de Química-UNICAMP**. p. 487-494, 2000.

MISHRA, D.; FLORA, S.J. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. **Biol Trace Elem Res**, v. 122, 137-47, 2008.

MITSUMORI, K.; HIRANO, M.; UEDA, H.; MAITA, K.; SHIRASU, Y. Chronic toxicity and carcinogenicity of methylmercury chloride in B6C3F1 mice. **Fundam. Appl. Toxicol**, v. 14, p. 179–190, 1990.

MORESCO, R. N., SPEROTTO, R. L., BERNARDI, A. S., CARDOSO, R. F., AND GOMES, P. Effect of the aqueous extract of Syzygium cumini on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Phytother. Res.** v. 21, p. 793-5, 2007.

MORETTO, M.B.; FUNCHAL, C.; SANTOS, A.Q.; GOTTFRIED, C.; BOFF, B.; ZENI, G.; PUREUR, R.P.; SOUZA, D.O.; WOFCHUK, S.; ROCHA, J.B. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺. **Toxicology**, v. 214, p. 57–66, 2005.

MORRISON, M.E.; VIJAYASARADHI, S.; ENGELSTEIN, D.; ALBINO, A.P.; HOUGHTON, A.N. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. **J. Exp. Med.** v. 177, p. 1135–1143, 1993.

MOTTA, G.; VIANELLO, F.; MENIN, C.; DE NICOLO, A.; AGATA, S.; ALTAVILLA, G.; PIETROGRANDE F.; GIROLAMI, A. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma presenting with immune-mediated thrombocytopenia and hemolytic anemia (Evans' syndrome). **Am J Hematol**, v. 69, p. 272-6, 2002.

MYERS, G.J.; DAVIDSON, P.W.; COX, C.; SHAMLAYE, C.F.; PALUMBO, D.; CERNICHIARI, E.; SLOANE-REEVES, J.; WILDING, G.E.; KOST, J.; HUANG, L.S.; CLARKSON, T.W. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. **Lancet**, v. 361, p. 1686–1692, 2003.

NAGY, J.I.; YAMAMOTO, T.; UEMURA, H.; SCHRADER, W.P. Adenosine deaminase in rodent median eminence: detection by antibody to the mouse enzyme and co-localization with adenosine deaminase-complexing protein (CD26). **Neurosci**, v. 73, p. 459-471, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Toxicological Effects of Methylmercury. **National Academy Press, Washington, DC, 2000.**

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-312, 2001.

NORDBERG, G.F.; JIN, T.; WU, X.; LU, J.; CHEN, L.; LEI, L.; HONG, F.; NORDBERG, M. Mini-review. Prevalence of kidney dysfunction in humans – Relationship to cadmium dose,metallothionein, immunological and metabolic factors. **Biochimie**, v. 91, p. 1282–1285, 2009.

NORSETH, T.; CLARKSON, T.W. Biotransformation of methylmercury salts in the rat studied by specific determination of inorganic mercury. **Biochem Pharmacol**, v. 19, p. 2775-83, 1970.

OBATOMI, D.K.; PLUMMER, D.T. Renal damage caused by gentamicin—A study of the effect in-vitro using isolated rat proximal tubular fragments. **Toxicol Lett**, v. 75, p. 75– 83, 1995.

OHNO, T.; SAKAMOTO, M.; KUROSAWA, T.; DAKEISHI, M.; IWATA, T.; MURATA, K. Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. **Environ Res**, v. 103, p. 191-7, 2007.

OLIVEIRA, A.C.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A., DAS GRAÇAS, L.; BRANDÃO, M.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 465-469, 2005.

OSA, R. H., ed., “Mercury Atmospheric Processes: A Synthesis Report”, **Workshop Proceedings**, Tampa, Flórida, E.U.A. 1994.

OSAWA, M.; MAGOS, L. The chemical form of the methylmercury complex in the bile of the rat. **Biochem Pharmacol**, v. 23, p. 1903-5, 1974.

OZUAH, P.O. Mercury poisoning. **Curr Probl Pediatr**, Review. v. 3, p. 91-9, 2000.

PACHECO, R.; MARTINEZ-NAVIO, J.M.; LEJEUNE, M.; CLIMENT, N.; OLIVA, H.; GATELL, J.M.; GALLART, T.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 9583-8, 2005.

PATRICK, L.N.D. Mercury Toxicity and Antioxidants:Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. **Alternative Medicine Review**. v. 7, p. 456-471, 2002.

PÉREZ-BLANCO, F.J.; GARBIN-FUENTES, I.; PÉREZ-CHICA, G.; MORENO-TERRIBAS, G.; RODRÍGUEZ-CUARTERO, A. Urinary activity of N-acetyl-b-D-glucosaminidase and progression of retinopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin Nephrol**, v. 48, p. 388–389, 1997.

POSPISILOVA, S.; FREBORT, Y. Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 151, p. 3–10, 2007.

PRICE, R.G. The role of NAG (N-acetyl-b-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clin Nephrol**, v. 38, p. 14-19, 1992.

PRICKETT, C.S., LAUG, E.P., KUNZE, F.M. Distribution of mercury in rats following oral and intravenous administration of mercuric acetate and phenylmercuric acetate. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 73, p. 585-8, 1950.

PRINCE, P.S.M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V.P.; Syzigium cumini seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 205-209, 2003.

RATHBONE, M.P.; 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. **Prog Neurobiol**, Review. v. 59, p. 663-90, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: Burton, R.H., Knippenberg, P.H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam, p. 147-149, 1991.

RODIER, P.M.; KATES, B.; SIMONS, R. Mercury localization in mouse kidney over time: autoradiography versus silver staining. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 92, p. 235-45, 1988.

ROONEY J.P.K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**. Review 234:145-156, 2007.

ROOS, D.H.; PUNTEL, R.L.; SANTOS, M.M.; SOUZA, D.O.; FARINA, M.; NOGUEIRA, C.W.; ASCHNER, M.; BURGER, M.E.; BARBOSA, N.B.; ROCHA, J.B. Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: involvement of oxidative stress and glutamatergic system. **Toxicol In Vitro**. V. 23 p. 302-7, 2009.

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; KAJIWARA, Y.; NARUSE, I.; FUJISAKI, T. Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. **Environ Res**, v. 61, p. 43-50, 1993.

SAKAMOTO, M.; KAKITA, A.; DE OLIVEIRA, R.B.; SHENG PAN, H.; TAKAHASHI, H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research**, v. 152, p. 171-176, 2004.

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

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais, potencial antiinflamatório, **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, p.38-43, 2000.

SIES, H. Biochemie des oxidativen Stress. **Angew Chem**, v. 98, p. 1061–1075, 1986.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, Review.v. 82, p. 291-5, 1997.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 899, p. 191–208; 2000.

STANLEY, M.P; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, P.V. Syzygium cumini seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**. v.84, p.205-9, 2003.

STEUERWALD, U.; WEIHE, P.; JORGENSEN, P.J.; BJERVE, K.; BROCK, J.; HEINZOW, B.; BUDTZ-JØRGENSEN, E.; GRANDJEAN, P. Maternal seafood diet, methylmercury exposure and neonatal neurologic function. **J Pediatr**, v. 136, p. 599-605, 2000.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D.; WEINERT, L.S.; ESTEVES, J. The efficacy of folk medicines in the management of type 2 diabetes mellitus: results of a randomized controlled trial of Syzygium cumini (L.) Skeels. **Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 31, p. 1-5, 2006.

THOMAS, J.A. Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. In Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed.; Lea and Febiger: **Philadelphia, PA**, v. 1, p 501-512, 1994.

TITARENKO, O.T.; POTAPENKO, E.I.; KOKKANEN, B.M.; PROKHOROVICH, N.A.; OLEĀNIK, A.N.; NAKONECHNÝĀ, G.D.; MOLODYKH, A.Z.. Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. **Probl Tuberk Bolezn Legk**. Review. v. 11, p. 14-8, 2006.

TURHAN, A.; DERE, E. The effect of benzene on the activity of adenosine deaminase in tissues of rats. **J Biochem Mol Biol**, v. 40, p. 295-301, 2007.

ULMER, A.J.T.; MATTERN, A.C.; FELLER, E.; HEYMANN, FLAD, H.D. CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. **Scand. J. Immunol**, v. 31, p. 429–435, 1990.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, Review. v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J Biol Chem**, v. 251, p. 5448–56, 1976.

VALLON,V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. Review. v. 294, p. 10-27, 2008.

WAKABAYASHI, K.; KAKITA, A.; SAKAMOTO, M.; SU, M.; IWANAGA, K.; IKUTA, F. Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. **Brain Res**, v. 705, p. 267-72, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Inorganic mercury. Geneva. **Environmental Health Criteria**, v. 118, p.168, 1991.

YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 874, p. 134-7, 1999.

YIN, Z.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, J.L.; SYVERSEN, T.; ROCHA, J.B.; SOUZA, D.O.; SIDORYK, M.; ALBRECHT, J.; ASCHNER, M. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. **Brain Res**, v. 1131, p. 1-10, 2007.

ZALUPS, R.K.; BARFUSS, D.W.; KOSTYNIAK, P.J. Altered intrarenal accumulation of mercury in uninephrectomized rats treated with methylmercury chloride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 115, p. 174-82, 1992.

ZALUPS, R.K.; ASLAMKHAN, A.G.; AHMAD, S. Human organic anion transporter 1 mediates cellular uptake of cysteine-S conjugates of inorganic mercury. **Kidney Int.** v. 66, p. 251-61, 2004.