

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE TECIDOS CEREBRAIS ATRAVÉS DA
MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR
REFLEXÃO TOTAL

Renata de Faria Barbosa Serpa

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

Prof^a. Ana Maria Blanco Martinez, D.Sc.

Prof. Delson Braz, D.Sc.

Prof^a. Mônica Santos Rocha, D.Sc.

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2007

SERPA, RENATA DE FARIA BARBOSA

Análise multielementar de tecidos
cerebrais através da Microfluorescência
de Raios X e Fluorescência de Raios X
por Reflexão Total [Rio de Janeiro] 2007

XVIII, 196 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Nuclear, 2007)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. TXRF
2. μ XRF
3. Tecidos cerebrais
4. Elementos químicos

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Ao meu querido avô Yelny (*in memoriam*),
pela minha educação e formação;
A minha mãe e minha avó,
pelo amor, carinho e dedicação em tempo integral;
Aos meus padrinhos Zeila e Almir,
pela credibilidade, pelo incentivo e carinho dispensados a
mim desde a minha graduação.

*"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim".*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem o auxílio dessa força divina eu não teria conseguido.

Ao meu orientador, professor Edgar Francisco Oliveira de Jesus pelo incentivo, pela paciência, pela dedicação, pelo carinho e pela amizade, dispensados a mim durante todo o período de elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Agradeço também pela credibilidade e oportunidade de ter sido sua orientada.

Ao meu segundo orientador, professor Marcelino José dos Anjos, pela orientação, pelo auxílio, pelas críticas construtivas e pelo apoio durante o transcorrer deste trabalho.

Ao chefe do laboratório de Instrumentação Nuclear, professor Ricardo Tadeu Lopes, pela atenção, pela disponibilidade e pela oportunidade de utilizar a instalação e os recursos do laboratório em prol da minha tese e da minha formação.

A professora Maria das Graças Tavares do Carmo, do Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ, pela disponibilidade das instalações de seu laboratório, pelo fornecimento dos ratos Wistar, pela paciência durante o sacrifício dos animais, pelo carinho, pela amizade e pela credibilidade no meu trabalho.

A professora Ana Maria Blanco Martinez, do Departamento de Histologia e Embriologia - UFRJ, pelo comprometimento e responsabilidade com este trabalho, pela participação efetiva durante o sacrifício dos animais e na redação dos artigos, pela disponibilidade das instalações de seu laboratório, pela paciência diante dos meus erros, pela amizade, pelo incentivo e pelo carinho.

A professora Mônica dos Santos Rocha, do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica - UFRJ, pela realização dos testes nos animais, pela disponibilidade das instalações de seu laboratório, pela maratona realizada na dissecação do cérebro em diferentes regiões, pela dedicação e pelo carinho.

Ao professor José Dias Corrêa Junior, do Departamento de Morfologia –UFMG, pelo comprometimento durante o primeiro ano de execução desse trabalho, pelos cortes coronais, pela paciência e pelo incentivo.

A professora Claudia Maria de Castro Batista, do Departamento de Histologia e Embriologia - UFRJ, pela disponibilização dos animais transgênicos, pelo auxílio no preparo das amostras e pela dedicação.

Ao Dr. Carlos Pérez, LNLS/CNPq, pelo suporte e orientação oferecidos nas medidas de fluorescência no LNLS.

Aos amigos, pois sem o apoio deles, tudo se tornaria mais difícil. Agradeço em especial ao Luciano de Azedias Marins, sempre presente em todos os momentos da minha vida, ao auxílio durante o sacrifício dos animais, na preparação e no transporte das amostras e equipamentos. Agradeço também a Gabriela, a Eara, a Inayá e a Cristiane pelo constante incentivo e pela presença em momento extremamente difíceis e delicados. Não posso deixar de lembrar também da Nívia e do Edson, pelo apoio, pelo auxílio, pelo incentivo, pelas brincadeiras, tornando esse trabalho mais agradável.

Agradeço com muito carinho a todos os funcionários do laboratório de Instrumentação Nuclear, pelo transporte de materiais e equipamentos, pela confecção e compra de materiais. Em especial, agradeço ao Josué, ao Marques, ao Sandro, ao Carlos e ao Edilson.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, pela oportunidade de trabalhar com equipamentos de alta tecnologia para a obtenção dos resultados essenciais à este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Centro Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo apoio financeiro essencial no decorrer do estudo.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

ANÁLISE MULTIELEMENTAR DE TECIDOS CEREBRAIS ATRAVÉS DA
MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR
REFLEXÃO TOTAL

Renata de Faria Barbosa Serpa

Fevereiro/2007

Orientador: Edgar Francisco Oliveira de Jesus

Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

O estudo do envelhecimento e do desempenho cognitivo em função da concentração dos elementos, é de extrema relevância, pois, a idade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) e de Parkinson. Além disso, o dano cognitivo é um dos fatores mais severos que acometem o indivíduo idoso. O objetivo desse estudo foi determinar a concentração e a distribuição dos elementos traço e majoritários em tecidos cerebrais de ratos Wistar em função do envelhecimento e do desempenho cognitivo, e em camundongos transgênicos com a doença de Huntington (DH), através da Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) e da Microfluorescência de Raios X (μ XRF). As medidas de fluorescência foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo. Os resultados obtidos pela μ XRF mostraram que os elementos encontram-se distribuídos heterogeneamente no cérebro, e que houve um acúmulo nos níveis de Fe, Cu e Zn, em função da idade, nos ratos Wistar machos e fêmeas. Também houve um acúmulo nos níveis de Al, Fe, Cu, Zn e Br no hipocampo das fêmeas em função da idade e em função do desempenho cognitivo. Em relação à DH, observou-se um aumento apenas nos níveis de Cl, Ca, P, S, Fe, Zn, Cu e Br no corpo estriado. Através dos resultados, verificamos que o envelhecimento, a deficiência cognitiva e a doença de Huntington podem ser caracterizados através do acúmulo nos teores de Fe, Cu, Zn e Br.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

MULTIELEMENTAL ANALYSIS IN TISSUES OF BRAINS BY X-RAY
MICROFLUORESCENCE AND X-RAY TOTAL REFLECTION FLUORESCENCE

Renata de Faria Barbosa Serpa

February/2007

Advisors: Edgar Francisco Oliveira de Jesus

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

The study of aging and cognitive performance as a function of elemental concentration is of great importance, for age is the biggest risk factor for the development of both Alzheimer and Parkinson's Disease (AD)/(PD). Furthermore, cognitive impairment is one of the most severe factors which affect the aged. The aim of this work was to determine the concentration and distribution of trace and major elements in tissues of brains of Wistar rats in relation to aging and cognitive performance and in transgenic mouse with the Huntington Disease (HD), by X-Ray Total Reflection Fluorescence (TXRF) and X-Ray Microfluorescence (μ XRF). The fluorescence measurements were carried out at the National Synchrotron Light Laboratory in Campinas, São Paulo. The results obtained from μ XRF showed that the elements were heterogeneously distributed in the brain, and there was an increase in Fe, Cu and Zn levels in relation to age, in the male and female Wistar rats. There was also an increase in Al, Fe, Cu, Zn and Br levels in the hippocampus of the females as a function of aging and cognitive performance. An analytical view of the HD revealed an upsurge in the levels of Cl, Ca, P, S, Fe, Zn, Cu and Br in the striatum. By the results we observed that old age, cognitive impairment and HD can be traced through an increase in the Fe, Cu, Zn and Br levels.

ÍNDICE

	página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
LISTA DE NOMENCLATURAS	1
<i>CAPÍTULO 1</i>	<i>1</i>
INTRODUÇÃO	1
<i>CAPITULO 2</i>	<i>4</i>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Envelhecimento e Aprendizagem	6
2.2. Suplementação Mineral	9
2.3. Doenças Neurodegenerativas	11
2.3.1. Doença de Huntington	15
2.3.1.1. Modelo Transgênico em Camundongos	17
2.4. Principais elementos envolvidos nos processos biológicos	17
2.4.1. Ferro	17
2.4.1.1. Distribuição do ferro em regiões do cérebro	17
2.4.1.2. Ferro Nonheme	20
2.4.1.3. Estresse Oxidativo e as doenças neurodegenerativas	21
2.4.2. Zinco	22
2.4.2.1. Função do zinco	22
2.4.2.2. A toxicidade do zinco	23
2.4.2.3. Distribuição de Zinco cerebral	24
2.4.2.4. Zinco, as doenças neurodegenerativas e o envelhecimento	25
2.4.3. Alumínio	26
2.4.3.1. Alumínio versus envelhecimento e doenças neurodegenerativas	26
2.4.4. Cobre	26
2.4.5. Manganês	28
2.5. Técnicas Analíticas	28
2.5.1. Histórico	29
2.6. Microfluorescência	30
2.6.1. Histórico	30
2.6.2. Os principais avanços tecnológicos da μ XRF nos últimos 10 anos	31
2.7. Radiação Síncrotron	32
<i>CAPITULO 3</i>	<i>34</i>

FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	34
3.1. Sistema Nervoso Humano.....	34
3.2. Sistema Nervoso Central (SNC).....	37
3.3. Vesículas Encefálicas Primárias.....	38
3.3.1. Prosencéfalo.....	38
3.3.2. Mesencéfalo.....	39
3.3.3. Rombencéfalo.....	40
3.4. Organização do sistema nervoso - Funções básicas das sinapses e das substâncias transmissoras.....	40
3.4.1. Sinapses Elétricas.....	42
3.4.2. Sinapses Químicas – Processamento de Sinais.....	42
3.4.3. Neurotransmissores.....	44
3.4.4. Os receptores e os potenciais sinápticos.....	45
3.5. Sistema Nervoso Central do Rato.....	45
3.5.1. Comparação do SNC humano e do rato.....	45
3.6. Estrutura Cerebral e suas Funções.....	49
3.6.1. Córtex Cerebral.....	49
3.6.2. Sistema Límbico.....	49
3.6.2.1. Córtex pré-frontal.....	50
3.6.2.2. Hipocampo.....	51
3.6.2.3. Hipotálamo.....	51
3.6.2.4. Tálamo.....	52
3.6.2.5. Amígdala.....	52
3.6.2.6. Cerebelo.....	53
3.7. Memória e Aprendizagem.....	54
3.7.1. Estrutura envolvida nos processos da memória.....	57
3.7.2. Os lobos temporais e o processamento da memória.....	58
3.8. Fluorescência de Raios X.....	58
3.9. Fundamentos da Fluorescência de Raios X.....	60
3.9.1. Excitação dos elementos.....	61
3.9.2. Energia de Corte de Absorção e Transição Eletrônica.....	62
3.9.3. Radiação Síncrotron.....	67
3.10. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDXRF).....	69
3.11. Microfluorescência de Raios X.....	70
3.11.1. Microfluorescência de Raios X e outras técnicas analíticas.....	73
3.12. Análise Quantitativa por EDXRF e μ XRF.....	73
3.12.1. Amostras com absorção total muito grande.....	78
3.12.2. Amostras com absorção total muito pequena.....	79
3.13. Métodos de correção dos efeitos de absorção nas amostras.....	80
3.13.1. Método de transmissão da radiação.....	80
3.14. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.....	82
3.14.1. Aplicações.....	83
3.15. Análise Quantitativa por TXRF.....	83
3.16. O Limite de Detecção em TXRF.....	85

<i>CAPITULO 4</i>	87
MATERIAIS E MÉTODOS	87
4.1. Microfluorescência de Raios X	87
4.1.1. Preparação das amostras	87
4.1.2. Amostragem.....	88
4.1.2.1. Ratos Wistar	88
4.1.2.2. Camundongos Transgênicos	88
4.1.3. Cortes coronais	89
4.1.4. Instrumentação.....	92
4.1.5. Concentração elementar.....	93
4.2. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	94
4.2.1. Preparação das amostras	94
4.1.2.1. Ratos Wistar	94
4.1.2.2. Branco.....	94
4.1.2.3. Amostras Certificadas.....	95
4.1.2.4. Camundongos.....	95
4.2.2. Instrumentação.....	95
4.3. Avaliação cognitiva	96
<i>CAPITULO 5</i>	98
RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1. Análise quantitativa por TXRF.....	98
5.1.1. Sensibilidade do sistema.....	99
5.2. Limite de detecção.....	100
5.3. Análise estatística	103
5.4. Concentração elementar nas regiões cerebrais do cérebro de rato Wistar	103
5.4.1. Determinação dos níveis dos elementos em função da idade	103
5.4.2. Determinação dos níveis dos elementos em função do desempenho cognitivo.....	116
5.4.3. Determinação dos níveis dos elementos em função da doença de Huntington.....	124
5.5. Mapeamento bidimensional da concentração elementar em cérebros de animais - μ XRF.....	127
5.5.1. Sensibilidade do sistema.....	127
5.5.2. Absorção.....	128
5.5.3. Concentração elementar.....	129
5.6. Amostras certificadas	144
5.7. Discussão geral dos resultados dos principais elementos envolvidos nos processos de neurodegeneração.....	144
5.7.1. Alumínio.....	145
5.7.2. Ferro	145
5.7.3. Cobre	147
5.7.4. Zinco.....	148
<i>CAPITULO 6</i>	149

CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
APÊNDICE A	178
ANEXO A.....	185
ANEXO B.....	191

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
3.1 Ilustração do neurônio e seus componentes	35
3.2 Referenciais anatômicos básicos no sistema nervoso do rato. (a) Vista lateral, (b) Vista dorsal	36
3.3 Planos anatômicos de secção.....	37
3.4 Representação dos lobos cerebrais	39
3.5 Representação da sinapse	41
3.6 Comparação entre o encéfalo do rato e o encéfalo humano. (a) Vista dorsal. (b) Vista sagital média. (c) Vista lateral. OBS: os encéfalos não estão desenhados na mesma escala	48
3.7 Representação das estruturas cerebrais constituintes do sistema límbico.....	50
3.8 Esquema básico da espectroscopia de raios X.....	59
3.9 Esquema de produção de raios X característico	61
3.10 Energia de ligação ou corte de absorção dos elétrons nos níveis K, L e M em função do número atômico	62
3.11 Diagrama de energias para as linhas K, L, M e N	65
3.12 Diagrama dos níveis energéticos e intensidades relativas de emissão dos raios X característicos emitidos pelo ferro.....	65
3.13 Representação esquemática do efeito Auger.....	66
3.14 Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico.....	67
3.15 Esquema simplificado de produção da luz síncrotron.....	68
3.16 Visão aérea do anel de armazenamento de elétrons do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil	69
3.17 Representação esquemática da varredura de uma amostra	72
3.18 Geometria para a análise quantitativa da fluorescência de raios X.....	74
3.19 Geometria usada no método de transmissão. (a) Medidas de I_0 . (b) Medidas de I	81
3.20 Representação Esquemática de um espectro em energia para um pico de fluorescência de raios X	86
4.1 Mapa de orientação de corte da secção cerebral obtida nos ratos Wistar	89
4.2 Equipamento para liofilização - LIN/UFRJ.....	90
4.3 (a) Micrótomo manual. (b) Secção coronal do encéfalo do rato Wistar	91
4.4 Arranjo Experimental da microfluorescência de raios X.....	93
4.5 Esquema de preparação das amostras	95
4.6 Arranjo experimental para as medidas de TXRF.....	96
4.7 (a) Labirinto Aquático; (b) Diagrama das diferentes posições de largada do animal	97
5.1 Espectro característico do corpo estriado de camundongo através da TXRF	98
5.2 Espectro característico do hipocampo de ratos Wistar através da TXRF	99
5.3 Curva de calibração para os elementos da série K utilizando TXRF.....	100
5.4 Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de cérebro de rato, utilizando TXRF	102

5.5 Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de cérebro de camundongo, utilizando TXRF.....	102
5.6 Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	104
5.7 Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	105
5.8 Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	105
5.9 Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	106
5.10 Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	106
5.11 Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	107
5.12 Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	107
5.13 Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	108
5.14 Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	108
5.15 Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	109
5.16 Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	111
5.17 Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	111
5.18 Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	112
5.19 Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	112
5.20 Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	113
5.21 Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	113
5.22 Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	114
5.23 Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$	114
5.24 Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao	

envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.	115
5.25 Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.	115
5.26 Média das tentativas entre os dois grupos analisados: grupo cognitivamente saudável (n=6) e com deficiência (n=6).	117
5.27 Desempenho cognitivo apresentado pelos dois grupos analisados	117
5.28 Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	118
5.29 Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	119
5.30 Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	119
5.31 Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente.	120
5.32 Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	120
5.33 Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	121
5.34 Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	121
5.35 Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	122
5.36 Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	122
5.37 Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	123
5.38 Concentração dos elementos majoritários no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	125
5.39 Concentração dos elementos traço no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	125
5.40 Concentração de ferro e zinco no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	126
5.41 Concentração de Cu, Br e Rb no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice a indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.	126
5.42 Espectro característico de uma amostra de cérebro de rato através da microXRF.	127
5.43 Sensibilidade dos elementos para a série K utilizando padrões monoelementares através da microXRF.	128
5.44 Curva de absorção para as amostras de cérebro usando microXRF.	129
5.45 Mapeamento bidimensional da concentração de fósforo em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.	130
5.46 Mapeamento bidimensional da concentração de fósforo em ratos Wistar machos jovens e	

idosos.....	131
5.47 Mapeamento bidimensional da concentração de cloro em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.....	132
5.48 Mapeamento bidimensional da concentração de cloro em ratos Wistar machos jovens e idosos.....	133
5.49 Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.....	134
5.50 Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em ratos Wistar machos jovens e idosos.....	135
5.51 Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.....	136
5.52 Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em ratos Wistar machos jovens e idosos.....	137
5.53 Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.....	138
5.54 Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em ratos Wistar machos jovens e idosos.....	139
5.55 Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.....	140
5.56 Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em ratos Wistar machos jovens e idosos.....	141
5.57 Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.....	142
5.58 Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.....	143
5.59 Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.....	143
5.60 Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.....	144

ÍNDICE DE TABELAS

	página
2.1 Vantagens e desvantagens de algumas técnicas analíticas utilizadas no estudo da concentração elementar em tecidos cerebrais.....	30
5.1 Concentração final (mg.mL^{-1}) os elementos utilizados na solução padrão para a determinação da curva de sensibilidade para os elementos da série K.....	99
5.2 Limite Mínimo detectável para os elementos da série K, nas amostras de cérebro de rato e de camundongo, utilizando SR-TXRF.....	101
A1 Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas, em função da idade, através da SR-TXRF.....	178
A2 Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar fêmeas, em função da região, utilizando SR-TXRF.....	179
A3 Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar machos, em função da idade, utilizando SR-TXRF.....	180
A3 (CONT.) Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar machos, em função da idade, utilizando SR-TXRF.....	181
A4 Concentração Elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em função do desempenho cognitivo, utilizando TXRF.....	182
A5 Concentração Elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no corpo estriado de camundongos transgênicos com a doença de Huntington e saudáveis, utilizando TXRF.....	183
A6 Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no material certificado – fígado bovino, NIST1577b.....	184

LISTA DE NOMENCLATURAS

AAS – Espectrômetro por Absorção de Chama Atômica
DA – Doença de Alzheimer
DH – Doença de Huntington
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DNTC – Emaranhados neurofibrilares com calcificações
DP – Doença de Parkinson
EDXRF – Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia
ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
GABA – Ácido gama-aminobutírico
ICP-MS – Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
INAA – Ativação Instrumental por Ativação Neutrônica
LA-ICPMS – Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Excitação por Laser
LCR – Líquido céfalo-raquidiano
LD – Limite de detecção
MPTP – 1 - metil – 4 – fenil – 1, 2, 3, 6 – tetrahidrofridrina
MTLE – Epilepsia Mesial Lobo Temporal
NFTs – Emaranhado neurofibrilar
MicroXanes – Espectroscopia de absorção de raios X próximo a borda de absorção
PIXE – Prótons induzindo Fluorescência de Raios X
ppm – parte por milhão
ppb – parte por bilhão
SN – Substância negra
SOD – Superóxido dismutase
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SPs – Placas senis
SR – Radiação Síncrotron
TXRF – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total
XRF – Fluorescência de Raios X
WD-XRF – Fluorescência de Raios X por Dispersão em Comprimento de Onda
 μ XRF – Microfluorescência de Raios X

Neste capítulo descreveremos sucintamente o assunto estudado neste trabalho, ressaltando os objetivos e a relevância do estudo.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O presente estudo visa fornecer subsídios para o melhor entendimento dos processos envolvidos no envelhecimento cerebral, em distúrbios no aprendizado e na doença de Huntington através da determinação qualitativa e quantitativa dos elementos traço e majoritários presentes no cérebro de ratos Wistar e camundongos transgênicos.

Analisar os níveis dos elementos traço em tecidos biológicos é bastante relevante no diagnóstico e tratamento de determinadas patologias [1-3], uma vez que é possível correlacionar seus níveis de concentração ao desenvolvimento de certas patologias e tumores [4]. Essa correlação é possível, pois a deficiência ou o excesso de certos elementos traço, como por exemplo, manganês, ferro, níquel, cobre, zinco e chumbo podem resultar em distúrbios neurológicos [5, 6] afetando a vida de muitos pacientes.

A literatura científica descreve um acúmulo na concentração de zinco no cérebro, em especial no hipocampo, de pacientes com a doença de Alzheimer (DA) [7]. Além do zinco, excesso de alumínio no cérebro está relacionado com o desenvolvimento da DA, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e a doença de Parkinson (DP) [7]. Verificou-se, também, que tanto em cérebros parkinsonianos quanto com a doença de Huntington há um aumento nos níveis de ferro na substância negra, mais especificamente na zona compacta. Além dessa região, o globo pálido também apresentou um acúmulo nos teores de ferro em cérebros parkinsonianos [7, 8]. As principais patologias que vêm sendo estudadas mediante a quantificação dos elementos presentes no cérebro são: doença de Alzheimer, isquemia cerebral, doença de Parkinson e demência.

Outro enfoque importante na análise de elementos traço e majoritários no cérebro é o envelhecimento. Há diversos estudos correlacionando os níveis dos diversos elementos (Al, S, P, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn) presentes no cérebro ao envelhecimento [7-18], sendo eles de extrema relevância, uma vez que a maioria das

doenças descritas anteriormente, são doenças degenerativas que surgem com o avanço da idade.

Em linhas gerais, este estudo visa determinar a concentração elementar regional e espacial em cérebros de ratos Wistar e de camundongos transgênicos, em relação ao envelhecimento e a doença de Huntington, respectivamente.

O presente trabalho foi dividido em três partes:

1ª parte: análise da concentração elementar em relação ao envelhecimento. Analisou-se desde animais na fase de desenvolvimento pós-natal até a fase idosa. Nesta etapa, secções coronais do cérebro de ratos Wistar machos e fêmeas foram avaliadas por Microfluorescência de Raios X (μ XRF), obtendo o mapeamento bidimensional da concentração elementar.

2ª parte: avaliação da concentração elementar, em cérebros de ratos idosos em função do desempenho cognitivo apresentado por eles. Uma adaptação do teste Morris Water Maze foi utilizada com o intuito de avaliar o desempenho cognitivo dos animais idosos. Analisaram-se, então, algumas regiões cerebrais envolvidas nos processos de memória e aprendizado (hipocampo e córtex entorrinal), relacionadas à emoção (hipotálamo e tálamo), regiões corticais (córtices visual e temporal) através da Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF).

3ª parte: análise da concentração elementar em relação à doença neurodegenerativa – doença de Huntington: nesta etapa obtiveram-se mapas bidimensionais das concentrações elementares de uma secção coronal (especificamente no corpo estriado) do cérebro de camundongos transgênicos com a doença de Huntigton (DH) através da μ XRF, sendo também realizada uma análise pontual dessa mesma região cerebral, o corpo estriado, utilizando a TXRF.

O caráter pioneiro neste estudo deve-se ao emprego da μ XRF para obter o mapeamento bidimensional da concentração elementar no estudo do envelhecimento e em relação à doença de Huntigton. A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total também foi utilizada. Porém, neste caso, estudou-se pontualmente determinadas regiões cerebrais, associando os níveis elementares com o envelhecimento seguido de avaliação cognitiva e em patologia cerebral – doença de Huntigton.

O uso da μ XRF deve-se ao fato dela ser uma técnica de análise multielementar, altamente sensível, capaz de mapear a área desejada para estudo. A μ XRF tornou-se a partir dos anos 90, uma técnica analítica bastante atrativa na análise local e mapeamento elementar de vários tipos de materiais [19, 20]. Embora existam outras técnicas que utilizam elétrons ou partículas carregadas para análise multielementar, as vantagens em utilizar-se Raios X como fonte de excitação são: baixa energia de dissipação e praticamente nenhum dano térmico na amostra a ser analisada, logo não há perda de elementos voláteis; as amostras podem ser analisadas sem a necessidade de vácuo e baixo background, resultando em melhores limites de detecção.

A TXRF, por sua vez, não possui essa característica de mapeamento. Através dela, é possível determinar a concentração regional elementar. A grande vantagem no uso dessa técnica, é que os efeitos de absorção da radiação podem ser desprezados, uma vez que ela necessita de diminutas quantidades para análise: da ordem de μ L para amostras líquidas e μ g para amostras sólidas, conseqüentemente temos para a análise um filme fino formado no centro de um suporte refletor. Dessa forma, o background é bastante reduzido, melhorando assim, os limites de detecção. Além disso, como as regiões analisadas neste estudo, em geral, são muito pequenas, o emprego da TXRF foi ideal neste tipo de análise, na medida que esta técnica, como já mencionado, necessita de pequenas quantidades de material para a análise.

A fonte de excitação utilizada neste trabalho, para ambas as técnicas, foi a radiação síncrotron (SR), uma vez que ela oferece características peculiares em detrimento às fontes convencionais de raios X, tornando-a um modo ideal de excitação para a fluorescência de raios X [20].

Neste capítulo descreveremos os diversos estudos sobre os níveis dos elementos traço e majoritários tanto em cérebros humanos como de animais, mediante o uso de diferentes técnicas analíticas.

CAPÍTULO 2

2. Revisão Bibliográfica

Os elementos traço, ou micronutrientes estão intimamente envolvidos na função fisiológica e na disfunção em todos os níveis de organização nos seres vivos.

Os elementos são classificados em três categorias quanto aos níveis de concentrações presentes em uma determinada amostra, como: elementos ultra-traço ($<0,01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), traço ($0,01-100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), e majoritários ($>100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [21].

À sua essencialidade ou toxicidade para um determinado organismo relaciona-se com a sua função no mesmo. Assim, não é adequado definir um grupo de elementos tóxicos, porque a toxicidade é função da concentração do elemento presente na amostra [22]. O que determina o caráter essencial de um elemento químico é o grau de sua participação em uma ou mais reações bioquímicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde [23], o termo essencial não é o mais correto para classificar os elementos traço, sendo mais plausível chamá-los de benéfico ao organismo quando uma deficiência na dieta reduz o crescimento e a vitalidade em todos os organismos vivos (humanos, animais e plantas). Baseado nesta definição torna-se coerente definir que o caráter essencial de um elemento é um conceito relativo, ou seja, depende de sua concentração no organismo. Por exemplo, elementos que a priori são bem conhecidos pela sua toxicidade, como o arsênico e o chumbo, são necessários em diminutas quantidades para o normal funcionamento do metabolismo celular, embora sejam altamente tóxicos em concentrações elevadas [23].

Inúmeros estudos vêm sendo realizados para a determinação dos elementos traço e majoritários em amostras biológicas aplicando diferentes técnicas analíticas. Tais estudos apresentam diferentes enfoques, dentre os quais destacamos: doenças neurológicas – correlação dos níveis dos elementos presentes em tecidos saudáveis e doentes – Doença de Alzheimer [24-30], Doença de Parkinson [31-34], Esclerose

Lateral Amiotrófica [34] e doença de Huntington [31, 35], envelhecimento – influência da idade na concentração elementar no cérebro [7-18, 36], suplementação mineral - influência de uma determinada dieta nos níveis dos elementos no cérebro [6, 9, 37- 43].

As principais técnicas analíticas utilizadas para quantificar e qualificar os elementos traço e majoritários em amostras biológicas são: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS ou ICP-AES) [7, 18, 14, 15, 24, 31, 44-49], Análise Instrumental por Ativação Neutrônica (INAA) [10, 16, 24, 42, 46, 48, 50-53], Espectrometria por Absorção Atômica (AAS) [8, 9, 12, 38-41], Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) [54], Fluorescência de Raios X (XRF) [6, 39, 55-57] e Prótons induzindo Fluorescência de Raios X (PIXE) [13,17, 26, 28, 33, 39, 58-62].

Apesar de intensas pesquisas a respeito dos níveis dos elementos químicos em tecidos, poucos estudos vêm sendo realizados na determinação da distribuição elementar em tecidos biológicos. A literatura descreve algumas análises da distribuição elementar bidimensional realizadas em cérebros utilizando a Microfluorescência de Raios X (μ XRF) [34, 58, 63] e em tecidos cerebrais humanos utilizando o Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com excitação por Laser LA-ICPMS [64].

A relevância nesses estudos baseia-se no fato de que níveis específicos de elementos traço e majoritários são necessários em um grande número de processos metabólicos e fisiológicos no corpo humano [65], uma vez que, tanto a deficiência quanto o excesso nas concentrações desses elementos podem induzir o aparecimento de diferentes desordens metabólicas [27]. Alguns elementos têm sido considerados bons indicadores dos estados fisiológicos ou patológicos das células [59]. Em geral as células apresentam alta concentração de potássio e baixa de sódio e, ainda menor de cálcio. Em contrapartida, os espaços extracelulares possuem níveis baixos de potássio, elevados de sódio e ainda mais elevado de cálcio. Em cérebros com distúrbios neurológicos, por exemplo, verifica-se na região extracelular, um aumento de potássio e um decréscimo de sódio e cálcio [59].

Sabe-se ainda, que deficiências nos níveis de ferro, cobre, selênio, zinco, manganês, molibdênio, cobalto e níquel em tecido humano resultam em doenças. Certos elementos traço, como, por exemplo, ferro, cobre e zinco estão envolvidos em certas doenças neurológicas (Ataxia de Freiderich, Doença de Wilson, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e Esclerose Múltipla) através do estresse oxidativo [66, 67].

Portanto, determinar as concentrações regionais e/ou a distribuição de elementos traço em tecidos (cérebros, placenta, etc.) ou líquidos (soro, plasma, sangue) biológicos é de extrema importância no entendimento e caracterização de determinadas patologias.

Quanto à distribuição dos elementos em tecidos biológicos, a literatura descreve que os metais: cobre, ferro, zinco, selênio, manganês, cálcio, magnésio, dentre outros, e não metais como o enxofre e o potássio encontram-se distribuídos heterogeneamente nos tecidos biológicos [64], como por exemplo, o cérebro [16, 51]. Esta distribuição heterogênea ocorre para diversos elementos traço essenciais e pode ser interpretada como expressão das diferenças funcionais, em um determinado momento, em diferentes regiões de um órgão [16].

O cérebro dos mamíferos é o órgão mais complexo e altamente especializado no organismo [50], sendo considerado particularmente viável para a análise de elementos traço [16, 51].

2.1. Envelhecimento e Aprendizagem

O envelhecimento é caracterizado por uma gradual e progressiva perda neuronal ao longo do tempo [13], além de estar associado a deficiências neurocomportamentais [50]. Além disso, evidências indiretas sugerem que o declínio na memória episódica relacionado ao envelhecimento está associado a alterações na integridade funcional do córtex pré-frontal [68].

Uma das características do envelhecimento é o aumento da ativação das células da glia, no dano oxidativo das proteínas e lipídios, na irreversibilidade da proteína *glycation* e no dano do ácido desoxirribonucléico (DNA). Tais mudanças podem ser devidas em parte à incidência de certas doenças neurodegenerativas, como por exemplo, Alzheimer e Parkinson, ambas associadas ao avanço da idade nos indivíduos [69].

A literatura descreve também um declínio no desempenho cognitivo com o aumento da idade [70-71], apresentando problemas na memória e em outras capacidades cerebrais [70]. Todavia, ainda não se sabe se esse processo é meramente uma consequência do envelhecimento ou se está relacionado a outros fatores. Estudos realizados através de autópsia e mais recentemente por ressonância magnética têm mostrado que há um decréscimo no volume e na massa cerebral em indivíduos acima de

60 anos de idade. Essa perda de volume é acompanhada por um aumento no volume ventricular e em outros espaços do fluido cerebrospinal [71]. Alguns autores também reportaram que os danos na memória associados ao avanço da idade ocorrem mesmo em pessoas saudáveis sob o ponto de vista neurológico [72]. Há também evidências de que todas essas alterações relacionadas à idade são também acompanhadas por mudanças físicas.

Três fatores estão envolvidos no processo de envelhecimento e na degeneração do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos: estresse oxidativo, depósito irregular de metais de transição, em especial o ferro, e insuficiência mitocondrial [73].

As regiões cerebrais mais afetadas com o avanço da idade são o hipocampo e os lobos frontais. Embora ainda haja controvérsia sobre a perda neuronal, existe, em geral, um consenso de que neurônios são perdidos em certas áreas cerebrais, como por exemplo, o hipocampo, o córtex cerebral e a amígdala [71]. Sabe-se também, que o córtex pré-frontal é dentre as regiões do cérebro, a mais sensível aos efeitos nocivos provocados pelo envelhecimento [74].

A possibilidade de que os elementos traço desempenham uma função especial no processo de envelhecimento foi originalmente sugerida mediante a observação de que com o avanço da idade, pelo menos nos humanos, há uma considerável variação nos hábitos alimentares, sendo praticamente inevitável uma absorção irregular de vários micronutrientes [75].

O cálcio e o ferro são mediadores nos processos de envelhecimento no cérebro normal [2]. Verificou-se que um aumento nos níveis de Ca^{2+} pode estar associado à apoptose, um processo de morte celular possivelmente envolvido no envelhecimento cerebral [76]. Além disso, a literatura também relata mudanças significativas nos níveis dos minerais em função da idade [77].

Neste trabalho, além de associar os níveis dos elementos presentes no cérebro em relação à idade, também foram feitos testes para avaliar a capacidade cognitiva dos animais idosos, pois o dano cognitivo é considerado um dos fatores mais severos associados ao envelhecimento [78].

Inúmeros estudos, na literatura científica, em tecidos cerebrais vêm mostrando um aumento ou um decréscimo nos níveis de certos elementos em função da idade utilizando diversas técnicas analíticas.

Diversos estudos utilizando a AAS, por exemplo, mostraram um acúmulo em função da idade nos níveis de Fe, Cu e Zn no cérebro de camundongos [8], nos níveis de

Fe e Zn no córtex de ratos adultos (290 dias de idade) em relação aos jovens (22 dias de idade), nos teores de Fe e Cu no cerebelo, no mesencéfalo e no hipotálamo de ratos e nos níveis de Zn no hipocampo e no estriado [9]. Em concordância com os dados apresentados por KISHI *et al.* [9], PALM *et al.* [12] também observaram um acúmulo de Zn no corpo estriado e no córtex de ratos em função da idade e um aumento nos níveis de Cu em função da idade em todas as estruturas cerebrais dos ratos analisadas no estudo.

Um outro estudo, ainda utilizando essa mesma técnica, mostrou que os níveis de Ca não sofreram alterações estatisticamente significativas em função da idade [7].

HILL e SWITZER [11] verificaram que a concentração de Fe no cérebro de ratos Sprague –Dawley aumenta com a idade e é maior na fêmea. Além disso, observaram também que o Fe encontra-se distribuído desigualmente ao longo do cérebro e está presente em diferentes concentrações e em diferentes áreas cerebrais.

Uma outra técnica, também bastante utilizada na quantificação de elementos é a INAA. Um estudo realizado em cérebros humanos mostrou que as concentrações de Ag, Al, P, K, Cs, Cr, Fe, Hg, Mn, Rb e Zn aumentaram em função da idade, ao passo que os níveis de Cl, Br, Co, Na e Sb diminuíram em relação à idade [10].

Dois estudos realizados em humanos [13] e em ratos [14], utilizando técnicas analíticas distintas, INAA [13] e ICP-MS [14], concordam entre si quanto ao decréscimo nos níveis de K e Rb, em relação à idade. Todavia, os elementos que aumentaram com a idade foram: Fe [13,14], Cu, Sr e Co [14], Zn nas estruturas corticais e núcleos da base em relação à idade [13] e Ca [13].

Dois estudos mostraram, apesar de utilizarem técnicas analíticas diferentes, níveis de Fe, Cu e Zn similares no córtex frontal de pacientes entre 65-75 anos de idade, ANDRÁSI *et al.* [48] e ZECCA *et al.* [54], utilizando a TXRF e a ICP-AES, respectivamente, determinaram níveis de: Fe $\sim 190 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Cu $\sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e Zn $\sim 65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Outro estudo realizado em regiões cerebrais humanas na faixa etária dos 50-60 anos de idade, utilizando a ICP-AES, mostrou que os elementos traço encontram-se distribuídos heterogeneamente no cérebro, e que suas concentrações variaram significativamente dentre as regiões estudadas. Além disso, mostrou também que o P foi o elemento mais abundante dentre as regiões analisadas, seguido do Na e K, enquanto o Cd foi o elemento que apresentou as mais baixas concentrações. As concentrações de Na, K e P variaram entre 1,17 a 4,4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em todas as regiões. Os níveis de Ca, Mg e

Al variaram entre 58 a 196 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Já os teores de Fe, Zn, Si e Cu foram compreendidos entre 3,5 a 59,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Um estudo recente utilizando a ICP-MS, mostrou que as maiores concentrações de Mn, Fe e Zn estão presentes na substância negra em detrimento as regiões vizinhas. Além disso, os níveis de Zn aumentaram após o nascimento, mantendo-se constantes ao longo da fase adulta. O Zn foi localizado principalmente no hipocampo, no globo pálido e na substância negra. As concentrações de Cu aumentaram rapidamente no cérebro de animais num intervalo de 5 a 14 dias de idade, decrescendo em seguida, enquanto que os níveis de Mn aumentaram no cérebro de animais entre 1 a 21 dias de idade, decrescendo em seguida, e os teores de Fe aumentaram ao longo da idade [15].

Recentemente, um estudo analisou a magnetita biogenética no hipocampo de pacientes com Epilepsia Mesial Lobo Temporal (MTLE) com idades entre 09 e 78 anos comprando seus níveis com pessoas sadias. Esse estudo mostrou que não há correlação significativa entre a idade e a concentração de magnetita biogenética. Contudo, em relação ao gênero, esse estudo verificou que há um aumento na concentração de magnetita biogenética nos machos em função da idade. Por outro lado, mas fêmeas não houve qualquer alteração nos níveis da magnetita em relação à idade [79].

Além desses estudos descritos pela literatura em relação a determinação da concentração dos elementos no cérebro como um todo ou em regiões cerebrais específicas, a literatura reporta também alguns estudos a respeito da distribuição espacial dos elementos ao longo de secções cerebrais em relação à idade. A literatura relata dois estudos utilizando a Fluorescência de Raios X em secções cerebrais de ratos e a LA-ICPMS na determinação simultânea e quantitativa da distribuição dos elementos em secções finas de tecidos humanos cerebrais [64].

2.2. Suplementação mineral

Muitos estudos em cérebros de ratos vêm sendo realizados mediante a suplementação mineral, como por exemplo, suplementação de Fe, Mn, Pb e Li, com o intuito de avaliar a influência desses minerais sobre os demais, assim como estudar a sua absorção no cérebro.

A AAS foi utilizada para determinar a distribuição regional de Pb em ratos Wistar jovens (22 dias) e adultos (290 dias) com suplementos à base de Pb. Esse estudo mostrou que as concentrações de Pb foram maiores nos filhotes do que nos adultos. O nível de Fe no córtex foi reduzido à metade nos jovens em relação aos adultos. Além disso, não houve qualquer diferença regional nos animais jovens. Os níveis de Zn foram superiores no hipocampo e na medula espinhal dos adultos. Todavia, praticamente não existiu alteração nos níveis de Cu, exceto na medula espinhal, onde foi superior nos animais adultos [9]. Essa mesma técnica foi utilizada em outro estudo, para estudar as alterações nas concentrações dos elementos no fígado e no cérebro após uma exposição ao ferro por via oral, intravenosa ou intraperitoneal. Verificaram que independentemente da taxa de ferro administrada nestes ratos, houve um aumento de Fe, Zn e Mn no fígado, enquanto que no cérebro as concentrações desses metais permaneceram constantes [38].

A EDXRF, também foi utilizada para investigar se uma dieta a base de Pb+Li seria capaz de alterar as concentrações dos elementos nos cérebros de ratos fêmeas Porton. Esse estudo mostrou que a administração de Pb + Li resultou em mudanças nas concentrações de todos os elementos estudados. Contudo, as alterações nas concentrações de K, Cu, e Br foram independentes da taxa de Pb ou do tempo de administração [6].

Recentemente, um estudo aplicou três técnicas analíticas diferentes: a INAA para determinar selênio; iodo e bromo; a PIXE e a XRF para analisar os seguintes elementos: K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e Rb. Essa análise foi feita em função de uma suplementação de iodo e/ou selênio em ratos. Esse estudo mostrou que a suplementação de iodo e/ou selênio pode melhorar o metabolismo do hormônio da tireóide (T_4 , FT_4 e rT_3), porém ele também afeta as concentrações de Mn, Zn, Cu e Rb no cérebro [39].

Também recentemente, a eletrotermal e a AAS foram utilizadas num estudo realizado em ratos Wistar machos, cuja dieta foi a base de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, em duas concentrações diferentes: 300 e 1200 ppm na H_2O durante 90 dias. Esse estudo mostrou um aumento significativo nos níveis de Ni nos rins, pulmão e plasma, e um decréscimo nos níveis de Ni no fígado e no cérebro. A administração de 300 ppm de $NiCl_2$ não alterou as concentrações de Zn e Cu nos órgãos estudados, exceto no plasma, onde essas concentrações foram reduzidas. Porém, a administração de 1200 ppm de $NiCl_2$ diminuiu as concentrações dos metais no fígado, rins (Cu) e plasma (Zn) [40].

Dois estudos, utilizando a AAS [41] e a INAA [42], realizados em tecidos cerebrais de ratos submetidos a dietas com níveis de Zn diferentes: controle, deficiência

de Zn e excesso de Zn, mostraram respostas diferentes quanto a influência da dieta nos teores de Zn. Um estudo [41] mostrou que não houve diferença nos níveis de Zn no córtex cerebral, no hipocampo e no cerebelo dos ratos Wistar machos submetidos a dieta controle e a dieta com deficiência em Zn, enquanto o outro mostrou que as concentrações de Zn foram bem mais elevadas nas estruturas cerebrais dos animais submetidos a uma dieta com deficiência de Zn do que nos animais submetidos as demais dietas: teor de Zn adequado e em excesso [42].

A Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron foi empregada para determinar as concentrações e as distribuições dos elementos traço em cérebros de ratos Wistar fêmeas em função de uma dieta com deficiência em iodo. Analisaram o hipocampo (HI), córtex cerebral (CT) e tálamo (TA). Verificaram que o TA dos animais com deficiência em iodo apresentaram níveis inferiores de Ca (16%) em relação ao grupo controle. Por outro lado, o HI do grupo com deficiência em iodo apresentou níveis superiores de P (24%), S (28%), K (13%), Rb (16%), Br (41%), Cl (65%), Zn (95%), Ca (69%) e Cu (30%) em comparação com o grupo controle. O TA dos animais com deficiência em iodo também apresentaram níveis mais elevados de Br (10%), Cl (56%), Zn (45%), e Ca (26%) e níveis inferiores de Cu (13%) e Fe (24%) em relação ao grupo controle [80].

KAMEO *et al.* [43] estudou a influência do vapor de mercúrio, nas concentrações de Hg, Zn e Cu no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo em camundongos. Observaram que os níveis de Zn e de Cu sofreram variações apenas no cerebelo. Todavia, os níveis de Hg em cada região do cérebro estudada foram significativamente maiores nos animais expostos ao vapor de mercúrio.

2.3. Doenças Neurodegenerativas

De acordo com a literatura, variações nas concentrações de Fe, Cu e Zn, estão envolvidas em determinadas doenças neurodegenerativas (Ataxia de Friederich, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Wilson e esclerose múltipla) através do estresse oxidativo [81]. Existem duas reações relevantes envolvendo os íons metálicos nas doenças neurodegenerativas: a primeira é a respeito da associação da metaloproteína levando a agregação da proteína; esta reação pode envolver íons metálicos redox-inertes, como por exemplo, o Zn^{2+} , ou os íons metálico redox-ativos, como por

exemplo, o Cu^{2+} e o Fe^{3+} . A segunda reação relaciona-se à oxidação da proteína via catalisação do metal, levando a danificação e a desnaturação da proteína; esta reação envolve os íons metálicos redox-ativos, como por exemplo, o Cu^{2+} , Fe^{3+} ou Mn^{2+} [82].

A doença de Parkinson (DP) é uma degeneração progressiva do sistema nervoso, caracterizada pelo tremor, pela bradicinesia, pela rigidez, pela perda de equilíbrio e pela perda da dopamina na substância negra, particularmente na zona compacta, danificando o sistema motor [83,84].

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neuropsiquiátrica que afeta principalmente as pessoas idosas, como descrito por Alois Alzheimer, psiquiatra e neuropatologista alemão, em 1906. A DA é uma progressiva deterioração mental caracterizada pela perda da memória, inabilidade para realizar cálculos, distúrbios espaciais visuais, confusão mental e desorientação [85, 86]. As características dessa neuropatologia incluem: atrofia cortical e subcortical, formação intraneuronal, emaranhado neurofibrilar (NFTs), depósito do peptídeo $\text{A}\beta$ amilóide nas placas neuríticas ou placas senis (SPs), perda da função sináptica, estresse oxidativo e apoptose, induzindo a perda neuronal [85]. Estes eventos têm sido mais comumente observados nas estruturas corticais e no hipocampo dos cérebros com DA [85]. Além desses eventos, um dos indicativos patológicos na DA é o acúmulo da proteína $\text{A}\beta$ -amilóide, na forma de placas senis e depósito amilóide cerebrovascular [87].

Além dessas alterações enzimáticas, a neurotoxicidade de elementos traço é uma das hipóteses para a explicação do aparecimento da doença [88]. Ela tem sido correlacionada a distúrbios nas concentrações de diversos elementos [69], incluindo o aumento de Al, Si, Pb, e Zn [10, 53, 87]. Apesar de intensas pesquisas, a causa desta doença ainda é desconhecida [27].

Além desses acúmulos, tem sido reportado que Cu, Zn e Fe estão concentrados na e ao redor das placas amilóides no cérebro com a DA [25] e altos teores de Zn [89] e Fe [90] tem sido descritos nas placas amilóides em camundongos transgênicos Tg2576 para o modelo de Alzheimer.

Diversas análises elementares vêm sendo realizadas em função de doenças neurodegenerativas em cérebros humanos e de animais, através do uso de diversas técnicas analíticas.

Através da PIXE, foi observado um decréscimo nos níveis de K e Rb no lobo frontal, no núcleo caudado e na substância negra de pacientes com a DA. Por outro lado,

os níveis de Fe e Mn foram superiores no lobo frontal e os teores de Ca foram superiores no núcleo caudado dos pacientes com a DA em relação aos sadios [61]. Utilizando essa mesma técnica, um outro estudo, mostrou um aumento nos teores de P, S, Cl, Fe e Zn no cérebro de pacientes com a DA [26].

LOVELL *et al.* [25], também verificaram através da MicroPixe um acúmulo nos níveis de Fe, Cu e Zn na neuropil dos pacientes com a DA em relação aos sadios. Ainda utilizando PIXE, verificou-se que a amígdala, o hipocampo e o cerebelo, de pacientes com a DA, também foram caracterizados por um acúmulo de Zn [28].

MORAWSKI *et al.* [33] também utilizaram a técnica analítica PIXE para determinar as concentrações elementares intra e extraneuronal em cérebros humanos, em particular, nos pares compacto (PC) da substância negra (SN) *versus* os pares reticulados (PR) de cérebros com DP e controle. Observaram um aumento de 1,7 na concentração total de Fe na SN do grupo com a DP. No grupo controle, os níveis de Fe foram superiores nos PR do que nos PC. Por outro lado, esta relação se inverte no grupo com a DP. A concentração de Fe intraneuronal nos neurônios com DP é superior em relação ao tecido sadio.

Um estudo utilizando a INAA reportou um aumento nos níveis de Ag, Br, Co, Cr, Fe e Hg no cérebro de pacientes com a DA [53]. Aumento nos níveis de Al, Cu, Mn e Fe em áreas corticais também foi observado em cérebros de pacientes com a DA, utilizando a INAA [24]. Além disso, um outro estudo, utilizando INAA, ICP-AES e ICP-MS, reportou que as concentrações de Na e K no córtex frontal parasigital, no córtex frontal basal, no parietal e no tálamo foram superiores no grupo com a DA em relação ao controle [27].

Estudos utilizando a microscopia nuclear, na análise da substância negra lesionada através de injeção de 6-OHDA em ratos machos Sprague Dawley, observaram níveis superiores de Na, P, Cl e K na região lesionada em relação à intacta [91] e níveis de Fe também superiores na região lesionada em relação à sadia [91, 32].

Um outro estudo realizado em macacos mostrou também um acúmulo de Fe na substância negra lesionada através de uma injeção intracarótida arterial de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidrofidrina (MPTP) em relação à intacta [92].

Um estudo recente, aplicou a ICP-MS, para investigar os efeitos da idade e da proteína precursora Amilóide (PPA) e/ou excesso da expressão de A β nos níveis dos metais, através da determinação dos níveis de Cu, Zn, Fe e Mn em cérebros de camundongos normais e transgênicos (Tg) ao longo do seu desenvolvimento (2-18

meses). Utilizaram duas linhagens transgênicas: Tg2576 e sua linhagem controle BL6/SJL e TgC100 e sua linhagem controle BL6/DBA. Analisaram os dados em função da idade nas linhagens controle e analisaram os dados comparando a linhagem controle com sua transgênica. Na linhagem BL6/SJL e BL6/DBA verificaram que os níveis de Fe, Cu e Co aumentaram com o avanço da idade, e que estes aumentos independem do gênero, ou seja, são similares tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Na comparação da linhagem transgênica Tg2576 com a BL6/SJL, observaram que os níveis de Cu e Zn diminuíram na transgênica. Por outro lado, os cérebros dos camundongos da linhagem transgênica apresentaram maiores concentrações de Mn em comparação com a linhagem controle. Os níveis de Fe e Co foram constantes nos dois grupos: transgênicos e controle. Contudo, na análise entre os grupos de fêmeas e de macho, verificou-se que os teores de Fe foram superiores no cérebro dos camundongos fêmeas transgênicos com 18 meses de idade em comparação com o controle. Em contrapartida, os níveis de Fe foram reduzidos no cérebro dos camundongos machos transgênicos com 11 meses de idade em relação ao controle.

Na comparação da linhagem transgênica TgC100 com a BL6/DBA, observaram significativas reduções nos níveis de Cu e Fe na linhagem transgênica em comparação com o controle. Foi verificado também, um pequeno, mas significativo aumento nos níveis de Zn na linhagem transgênica em relação a controle. Os teores de Co foram superiores no cérebro dos camundongos transgênicos com 18 meses de idade em relação ao controle. E, as concentrações de Mn foram superiores nos cérebros dos camundongos transgênicos em relação ao controle [49].

Há poucos estudos na literatura a respeito da distribuição dos elementos em tecidos cerebrais. Recentemente, estudos utilizando a μ -XRF, mostraram um acúmulo de Pb, Hg, Zn e Ca nos córtex frontal e temporal de pacientes com com emaranhados neurofibrilares com calcificações (DNTC) [56], um acúmulo nos níveis de Cu nos neurônios da SN em relação às áreas vizinhas em cérebros com a DP, e no caso de pacientes com ELA, a distribuição de Cu em partes dos neurônios e fora dos corpos celulares foi uniforme. Tanto em cérebros com a DP e com a ELA, a distribuição de Ca foi heterogênea. Esse estudo revelou que em ambos os casos, nos nervos dos corpos celulares na SN houve um acúmulo dos seguintes elementos: S, Cl, K, Fe, Zn, Se e Rb [34].

Outro estudo recente combinou a μ -XRF e a micro-XANES, para quantificar elementos metálicos e avaliar seu estado de oxidação, respectivamente no córtex cerebral e na substância negra, de pacientes com a DP e ELA. Os corpos dos nervos celulares na SN e na substância branca do caso DP apresentaram maiores níveis de Ca, Fe e Zn em relação ao grupo controle. Já no córtex cerebral, houve um aumento de Ca e Zn nos pacientes com a DP em relação ao grupo controle. Esse estudo mostrou também que a maior parte de Cu existente na SN em todas as amostras investigadas ocorre no segundo estado de oxidação (Cu^{2+}) [94].

A Fluorescência de Raios X também foi utilizada para determinar as concentrações de Fe, Cu e Zn, em tecidos de camundongos normais e transgênicos para a DA. Dentre os camundongos normais, os machos apresentaram maiores concentrações de Fe no coração e menores no cérebro, rins, fígado e baço comparadas com as fêmeas. As concentrações de Cu foram superiores no fígado, porém foram inferiores no cérebro e no fêmur dos machos em relação às fêmeas. Por sua vez, as fêmeas apresentaram maiores concentrações de Zn no cérebro, no fêmur e no fígado do que os machos. Dentre os camundongos transgênicos, os machos apresentaram maiores concentrações de Fe no cérebro e no coração e menores nos rins e fígado em relação as fêmeas. Por outro lado, os níveis de Cu nos rins e os níveis de Zn no pulmão foram superiores nas fêmeas. Dentre as fêmeas, os camundongos transgênicos mostraram maiores níveis de Fe no fêmur e no coração e menores concentrações de Zn no fêmur, coração e fígado em relação aos camundongos normais. Além disso, as concentrações de Cu foram inferiores no coração dos camundongos transgênicos do que os normais. Dentre os machos, os camundongos transgênicos apresentaram maiores concentrações de Fe no cérebro, no coração, no baço e testículos e menores níveis de Zn no coração e testículos comparados com os camundongos normais. Além disso, as concentrações de Cu foram maiores no cérebro e no fêmur dos camundongos transgênicos em relação aos normais [29].

2.3.1. Doença de Huntington

Esta doença foi descrita pela primeira vez por George Huntington em 1872 [95]. Esse médico fez sua primeira publicação a respeito dessa doença, chamando por "coréia" hereditária, originada da palavra grega para "dança". Coréia se refere aos movimentos involuntários que estão dentre os sintomas comuns da DH [96]. A doença

de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa progressiva e fatal, caracterizada pela disfunção irreversível motora, declínio cognitivo e distúrbios psiquiátricos, o que leva a progressiva demência e morte aproximadamente 15-20 anos após o início da doença [97].

A mutação do gene da DH é uma expansão do trinucleotídeo CAG que codifica um ácido não essencial, o ácido amino glutamino na codificação de uma proteína de aproximadamente 350 Kb. Contudo, ainda não se sabe a causa da mutação do gene da DH que resulta na disfunção neurológica [95]. A mutação DH produz uma seqüência poliglutamina (CAG) expandida com a proteína huntingtina codificada. Huntingtina está onipresente no corpo e no cérebro, mas a principal degeneração ocorre no corpo estriado [98]. Na DH, a neurodegeneração causada pela liberação do ácido Gama-Aminobutírico, afeta principalmente as projeções dos neurônios do estriado [97, 98], embora a perda de neurônios em outras áreas cerebrais, como por exemplo, cortical, também tem sido descrita [98].

A DH é uma doença degenerativa cujos sintomas são causados pela perda marcante de células em uma parte do cérebro denominada gânglios da base. Este dano afeta a capacidade cognitiva (pensamento, julgamento, memória), movimentos e equilíbrio emocional. Os sintomas aparecem gradualmente, em geral na meia-idade, entre as idades de 30 e 50 anos. Entretanto, a doença pode atingir desde crianças pequenas até idosos [96].

Em relação aos elementos químicos, a literatura científica descreve um aumento nos níveis de Fe nos cérebros de pacientes com a DH em relação ao grupo controle [103], em especial no núcleo caudado [31]. Além desse acúmulo, tem sido descrito também que distúrbios na homeostase de ferro, estresse oxidativo e lesões mitocondriais estão presentes nos cérebros de pacientes com a DH [73]. Portanto, a DH está associada com anormalidades no ferro, mediante seu acúmulo, além de alterações locais, resultando em dano oxidativo e neurodegeneração [104]. Além do aumento nos níveis de ferro, há também um aumento nos níveis de Cu no putâmen de pacientes com a DH em relação aos sadios [31]. Contudo, DEXTER *et al.* [31] não observaram nenhuma diferença estatisticamente significativa nos níveis de Zn no núcleo caudado, putâmen, e no cerebelo entre os dois grupos: sadios e com a DH.

2.3.1.1. Modelo Transgênico em Camundongos

O modelo utilizado nesse estudo foi o R6/2. Ele possui um pequeno fragmento N-terminal de huntingtina com aproximadamente 150 CAG repetidos [95]. Esse modelo é bem caracterizado por um fenótipo homogêneo e tem sido utilizado em muitas drogas pré-clínicas. Uma das vantagens de utilizar o modelo R6/2 em camundongos é a possibilidade de realizar estudos em aproximadamente três meses. Esse modelo possui muitas das características temporal, comportamental e neurológicas que são observadas em pacientes com a DH, como por exemplo, movimentos trêmulos e atrofia no estriado [95].

Embora a clareza e a eficiência nos experimentos com camundongos transgênicos usando o modelo R6/2 sejam, vantajosas, estes animais não possuem a genética e problemas neuropatológicos fiéis aos dos humanos com a DH. R6/2 tem uma agregação mais extensa da distribuição de huntingtina, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo do que na doença propriamente dita, ele é resistente à excitotoxicidade, o que pode ter relação com o aumento na capacidade de processar cálcio e mostram pequena perda celular [95].

Neste modelo transgênico, a formação da proteína huntingtin agregada precedeu a manifestação clínica do movimento desordenado [99], e também foi encontrado que esse modelo é associado com morte celular em modelos de cultura celular de DH [100], assim como em outras desordens caracterizadas pela repetição do CAG [101].

O camundongo R6/2 é um transgênico para o exon 1 do gene humano com a DH com mais de 150 CAG repetidos [99]. O camundongo desenvolve movimentos desordenados similares aos apresentados pelos pacientes com a DH, aos 2 meses de idade aproximadamente, e após essa idade a doença se desenvolve rapidamente [102].

2.4.Principais elementos envolvidos nos processos biológicos

2.4.1. Ferro

2.4.1.1. Distribuição do ferro em regiões do cérebro

A distribuição heterogênea de ferro no cérebro foi demonstrada pela primeira vez através de técnicas histoquímicas (Prussian blue ou Perls' stain), as quais mostraram

uma intensa mancha de ferro iônico em partes do sistema extrapiramidal, suaves manchas no córtex cerebral e nenhuma detectável na substância cinzenta [103]. Gelman [105] comentou o seguinte: “Em relação ao gânglio basal existe uma mancha menos intensa de ferro na substância branca do hemisfério cerebral e córtex”.

Utilizando a coloração de Perls's stain, Drayer et al. [106] não encontraram ferro na porção mais superior da cápsula interna. Contudo, encontraram maior quantidade de ferro na região frontal do que na substância branca occipital.

Ao contrário dos resultados obtidos através das técnicas histoquímicas, as técnicas bioquímicas indicam que a substância branca, em geral apresenta níveis similares de ferro da substância cinzenta cortical (aproximadamente $30-40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ao passo que em determinadas regiões, como, por exemplo, o córtex motor, pode-se ter mais ferro na substância branca do que na substância cinzenta cortical adjacente [107].

Estudos indicam que no cérebro humano, poucas regiões apresentam altas concentrações de Fe, com exceção das estruturas compreendidas nos núcleos da base [108], globo pálido [103], substância negra, núcleo denteado e córtex motor [104]. O Fe encontra-se, portanto, distribuído desigualmente no cérebro e em diferentes concentrações [11]. As estruturas dos núcleos da base têm um envolvimento primário na função motora, e, além disso, possuem altos níveis de dopamina (DA) e ácido gama-aminobutírico (GABA). Esta última tem sido indicada como sendo reguladora da homeostase de ferro no cérebro. O ferro, como um elemento traço, é importante no transporte de elétrons, como catalisador de enzimas, e no desenvolvimento neuronal. Distúrbios na homeostase de ferro poderiam, conseqüentemente, induzir a múltiplas disfunções no metabolismo dos neurônios [108].

Concentrações de ferro não-heme (maioria ferritina) aumentam no putâmen, córtex motor, córtex pré-frontal, córtex sensorial e tálamo durante os primeiros 30-35 anos de vida, e diversas mudanças são observadas em indivíduos mais velhos [109]. Estudos recentes têm mostrado que níveis de H-ferritina em indivíduos mais velhos (67-88 anos de idade) foram maiores do que em indivíduos mais jovens (27-66 anos de idade) no córtex frontal, núcleo caudado, putâmen, substância negra e globo pálido. No caso da L-ferritina, este aumento é observado somente na substância negra e no globo pálido [110,111].

No parieto-occipital lobo do córtex, o *Haem oxigenase-1* e a ferritina aumentam com a idade, ao passo que no hipocampo somente *haem-oxigenase-1* aumenta. *Haem-oxigenase-1* é encontrado tanto na glia quanto nos neurônios, porém a ferritina é

encontrada apenas na glia. O aumento do *haem-oxigenase-1* pode vir a contribuir para um aumento na susceptibilidade do estresse oxidativo em pessoas idosas [112].

O Fe estimula importantes processos metabólicos no cérebro, contudo ele também está associado com a produção de danos via radicais livres, podendo induzir a neurodegeneração através da peroxidação lipídica [113]. O Fe, no cérebro, está armazenado na proteína ferritina, a qual está presente em altas concentrações nos núcleos subcorticais, especificamente o globo pálido, substância negra e núcleo vermelho. Além disso, uma acumulação de ferro, na forma de radicais livres estáveis, tem sido também detectada nos neurônios dopaminérgicos da substância negra na associação com o pigmento neuromelanina [113]. Estudos mostraram que o nível de Fe aumenta com a idade e é maior nas fêmeas [11].

O aumento na concentração de Fe em determinadas áreas cerebrais pode ser resultado da alteração da vascularização observada durante o envelhecimento e nas doenças neurodegenerativas [114, 115]. O aumento nos níveis de ferro nos neurônios, astrócitos e microglia, a qual normalmente apresenta pequeno aumento nos níveis de ferro na meia idade, é tipicamente apresentado nas regiões como o córtex, hipocampo e substância negra, a qual é particularmente susceptível a mudanças neuropatológicas que caracterizam a DA e a DP [116]. Esta “invasão” e “ocupação de ferro nas áreas vizinhas” pode danificar diretamente estas células ou perturbar o ambiente celular, aumentando a susceptibilidade a toxinas e processos de ativação de um tipo patogênico (por exemplo, inflamação, alteração morfológica ou apoptose) [117].

Pacientes com a doença de Parkinson [88, 104, 108-117], doença de Huntington [117] e degeneração estriatonigral [88, 117] apresentam aumento no nível de ferro na substância negra. Além disso, o alto teor do Fe estaria envolvido nas desordens no gânglio basal, principalmente na DP [108]. A função do Fe como um fator etiológico foi sugerido quando se descobriu que o Fe foi elevado em aproximadamente 77% nos pares compactos da substância negra (SNc) em cérebros humanos parkinsonianos. Experimentos realizados em modelos parkinsonianos de ratos e macacos parecem assegurar esta hipótese [108].

2.4.1.2. Ferro não heme

Existem duas categorias de ferro no cérebro: ferro heme, na hemoglobina e algumas enzimas como peroxidase, e ferro não heme. Os tipos de ferro não heme no cérebro caracterizam-se:

- a) Por baixo peso molecular;
- b) Pelas metaloproteínas: transferrina, melanotransferrina e lactoferrina;
- c) Pelo armazenamento de proteínas como ferritina e hemosiderina
- d) Pelo ferro iônico [103].

Desses componentes os dois mais importantes no controle do ferro são a transferrina (transporta ferro) e a ferritina (armazena ferro) [107].

A transferrina carrega ferro do sangue para o interior do cérebro via receptores-transferrina localizados em microvasculaturas cerebrais [118].

A ferritina armazena o excesso de átomos de ferro, que não estão imediatamente participando nas atividades metabólicas [44-46, 52, 53, 56, 57, 103]. A ferritina tem um amplo revestimento esférico protéico, aproximadamente 12 nm de diâmetro, que envolve um núcleo cristalino de hidróxido férrico [$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] [105]. Ela pode armazenar mais de 4500 átomos de ferro de uma proteína ferritina na sua cavidade interna, de 8 nm de diâmetro. O ferro (II) passa para o interior do núcleo através de seis poros no revestimento protéico e é oxidado para ferro (III) para armazenagem. O peso molecular da ferritina é 474 kg/mol [119].

O revestimento apoferritina (ferritina sem um núcleo interno de ferro) é composto por 24 subunidades contendo combinações variadas de duas proteínas homologadas, derivadas de genes separados, referentes a L-ferritina (leve) e H-ferritina (pesada). Variação na composição da ferritina H e L produz isoformas de ferritina concedendo propriedades físicoquímicas específicas que melhor compreende as particularidades de células e tecidos. H-ferritina é eficiente na captura de ferro e é predominante em órgãos com alto teor de ferro em atividade e baixo teor de ferro armazenado. O oposto ocorre com a L-ferritina, ela é eficiente na nucleação de ferro e é associada com o armazenamento de ferro [120, 121].

Hemosiderina, considerada como um produto da degradação da ferritina [13, 103] é um ferro-armazenado relacionado a um material que seja insolúvel em água. Isto está associado com o excesso de ferro nas desordens e hemorragias [13, 103].

2.4.1.3. Estresse oxidativo e as doenças neurodegenerativas

Sabe-se que a acumulação de ferro ocorre no cérebro de pessoas com doença de Huntington (DH), doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), esclerose múltipla, hemorragia crônica, derrame cerebral, anemia, talassemia, hemocromatose, síndrome de down e AIDS [103]. Além disso, tem se estabelecido que o progressivo acúmulo de ferro no cérebro com a idade, e a indução do estresse oxidativo via ferro pode causar neurodegeneração [116]. O acúmulo de ferro em função da idade é um processo específico e envolve o acúmulo de ferro nas moléculas de determinadas células, particularmente as das regiões cerebrais (córtex, hipocampo e substância negra) que são alvos preferenciais nas doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson [116].

Além da DA e da DP, distúrbios na homeostase de ferro, estresse oxidativo e lesões mitocondriais têm sido descritos em outras lesões neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Huntington [73]. DP e DH estariam associadas com anormalidades no ferro, através do acúmulo desse elemento, e alterações locais resultando em dano oxidativo e neurodegeneração [104].

A contribuição do Fe no desenvolvimento da DA é similar à do Cu. Estudos *in vitro* na β -amilóide sintética mostraram que o Fe induz a agregação e potencializa a neurotoxicidade da β -amilóide [122]. A β -amilóide agrega e reduz o Fe^{3+} em Fe^{2+} , seguida da formação do H_2O_2 através de mecanismo similares ao do Cu [122]. A produção de Fe^{2+} e H_2O_2 criam condições ideais para a reação Fenton, a qual induz a formação de radicais altamente reativos de hidroxila [122]. Embora o Fe não contribua para a neurotoxicidade da β -amilóide na mesma proporção que o Cu, há hipóteses de que esse elemento tem uma participação significativa na DA [123].

Altos teores de ferro no cérebro está associado com o estresse oxidativo, a produção de radicais livres [103] e conseqüentemente a morte celular através da conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em hidroxila ($\cdot\text{OH}$) [35], pela reação Fenton ou peroxinitrato e a subseqüente morte dos neurônios pela apoptose [103]. A toxicidade do ferro livre Fe^{2+} é reduzida pela sua oxidação em Fe^{3+} . O Fe^{3+} , por sua vez, pode ser encaminhado a transferrina (TF) e transportado para dentro das células carregando receptores TF [35], onde é armazenado e incorporado ao interior da célula como proteína ou armazenado como ferritina [35].

Altos níveis de ferro vêm sendo mostrados em diversas doenças neurodegenerativas. Na DP, há um aumento de ferro na substância negra [103] e no globo pálido [103]. Um aumento de Fe (III) em relação ao Fe (II) sugere que estas mudanças podem contribuir para processos patofisiológicos da DP [103].

2.4.2. Zinco

O zinco é o segundo elemento de transição mais abundante no organismo [124]. Para os nutricionistas, é um micronutriente essencial, para os bioquímicos, é um componente enzimático e de outras proteínas, enquanto que para os ambientalistas e biólogos marinhos, o zinco livre na água é um tóxico poluente [87]. Para os neurocientistas, este elemento não é somente um micronutriente e um componente de proteínas, mas também um sinal iônico. O Zn^{+2} move-se pelos canais da membrana e dentre as diversas organelas, sendo armazenado nas células. Assim como o cálcio, o zinco livre em excesso nos tecidos é tóxico [87].

2.4.2.1. Função do zinco

O zinco desempenha um papel importante como um elemento traço essencial em diversas funções biológicas. Dentre as mais relevantes descobertas, podemos destacar o papel do zinco como sendo um componente catalisador de mais de 200 enzimas e um constituinte estrutural de várias proteínas, além de sua função na prevenção da formação dos radicais livres [75]. O zinco é necessário para a replicação e transcrição do DNA e a síntese de proteínas [104]. Além disso, ele é um componente nutricional crucial necessário para o desenvolvimento normal e na manutenção de funções imunológicas em humanos e animais [75].

O zinco é essencial para o desenvolvimento cerebral e sua deficiência provoca severas disfunções. Sua deficiência altera o crescimento celular e a regulação hormonal da divisão celular e causa tanto o decréscimo do crescimento do cérebro como a redução do DNA, do ácido ribonucléico (RNA) e concentrações de proteína nos filhotes. Além disso, a deficiência de zinco no feto e na criança implica na má formação do cérebro e em influências comportamentais [39]. Ele também participa de diversas funções, como, por exemplo, sustentar estruturas protéicas, participar nas reações enzimáticas e não enzimáticas, e modular canais de íons receptores [125].

Além dessas funções citadas acima, ele também regula os canais dos íons de receptores excitatórios e inibitórios dos aminoácidos [125]. O zinco é um componente essencial para várias metaloenzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, incluindo aqueles envolvidos na replicação, reparação e transcrição do DNA [75].

O zinco é liberado de fatias hipocâmpais quando a atividade sináptica é ativada. Zinco exógeno é um modulador de receptores glutamato e GABA *in vitro*. Além disso, existem indicações para uma modulação do glutamato através da transmissão pelo zinco endógeno *in vivo*. O zinco poderia também ter um efeito modulatório no aminoácido neurotransmissor em idades tenras [39].

O zinco também pode ser relacionado com a morte da célula *in vivo* e *in vitro*. Degenerações neuronais após isquemia mostram uma acumulação de zinco previamente à degeneração. E a entrada de zinco parece acelerar a morte celular. Contudo é preciso ter em mente que a concentração de zinco nas sinapses é apenas uma pequena fração da quantidade total de zinco no cérebro [39].

O zinco possui uma função especial no cérebro, na memória e na aprendizagem, além disso, é conhecido seu papel em um número de metaloenzimas de zinco. Há evidências de que o zinco é armazenado nas vesículas sinápticas nos terminais nervosos. A interação do zinco com os neurotransmissores receptores aminoácido excitatório e inibitório indicam que este cátion pode agir como um neuromodulador [37]. Reforçando o estudo da função do zinco na memória e no aprendizado, estudos mostraram que uma notável concentração de liberação glutamato-zinco nos terminais do neocórtex e estruturas límbicas (o septo e a amígdala) indicaria que as sinapses de liberação glutamato-zinco podem ter uma especial função na plasticidade sináptica, na memória e no aprendizado [87].

2.4.2.2. A toxicidade do zinco

A idéia de que a toxicidade do zinco poderia contribuir para danos neuronais *in vivo* foi sugerida, pela primeira vez, em 1988, baseada em análises de secções cerebrais adjacentes, de ratos que sofreram isquemias transientes cerebrais, mostrando que existe uma forte correlação entre a acumulação de zinco nos corpos celulares com a morte celular [87].

Estudos posteriores mostraram que tanto a morte neuronal quanto a acumulação de zinco na isquemia transiente cerebral foram reduzidas ou prevenidas através do quelante de cálcio – EDTA (CaEDTA), mas não pelo quelante de zinco-EDTA (ZNEDTA) [87]. Ao contrário do Fe e do Cu (metais redox-ativos), o Zn é um metal redox-inerte. A função do Zn no cérebro de pacientes com a DA é precipitar a β -amilóide e inibir a produção de H_2O_2 [123].

Contudo, os efeitos antioxidantes do zinco podem ser desprezados para altos níveis de zinco, passando a ser altamente tóxico, quando presente em altas concentrações [125]. Estudos mostraram que a exposição de zinco em doses não-fisiológicas ($\geq 600 \mu M$) durante 15 min resultou em morte neuronal em culturas mistas de células cortical e glia, enquanto que, a exposição por um período maior (18-24 h) em doses mais baixas de zinco ($\leq 300 \mu M$) induziu a morte das células glia [126, 127].

2.4.2.3. Distribuição de Zinco cerebral

O cérebro é dentre os órgãos do corpo humano, o que apresenta as mais altas concentrações de zinco. A quantidade total de zinco no cérebro foi estimada de ser aproximadamente $150 \mu mol/L$ [124]. A substância cinzenta apresenta maiores concentrações de zinco do que a substância branca, e os mais altos níveis de zinco podem ser encontrados no hipocampo, amígdala e neocórtex [128].

O transporte de zinco para o interior cerebral ocorre através de um sistema de barreira cerebral, ou seja, através de duas barreiras hemato-encefálica e hemato-liquórica cerebrospinal [129]. A ligação de zinco para L-histidina (His) tanto no plasma quanto no fluido cerebrospinal parece estar envolvida na transferência de zinco para outros locais, os quais regulam sua absorção através dos sistemas de barreira cerebral [130].

Com o intuito de manter a homeostase, as células e capilares endoteliais do cérebro respondem a alterações nos níveis de zinco, aumentando sua absorção, caso haja baixa concentração de zinco no sangue ($[Zn^{++}]_b$) e diminuindo seus níveis, caso haja alto teor de zinco ($[Zn^{++}]_b$) [131].

No cérebro, o zinco – Zn^{+2} é abundante, apresentando, depois do ferro, as maiores concentrações dentre todos os metais de transição.

A concentração de zinco no cérebro aumenta após o nascimento, mas mantém-se constante ao longo da fase adulta [10]. Aproximadamente 90% do total de zinco

presente no cérebro localiza-se nas metaloproteínas [132, 133]. Além disso, a maioria dos neurônios contém uma quantidade significativa de zinco iônico reativo [133]. Grandes quantidades de quelante de Zn^{+2} também são concentrados, na região límbica, notavelmente na formação hipocampal [134]. O hipocampo é uma das áreas que contém as mais altas concentrações de quelante de zinco [125]. Aproximadamente 10% do Zn^{+2} total no cérebro, provavelmente zinco iônico, existe nas vesículas sinápticas [125, 133].

O zinco vesicular participa na neurotransmissão sináptica no cérebro dos mamíferos, funcionando como um neuromodulador endógeno de diversos importantes receptores [121]. O quelante de zinco no SNC é principalmente detectado no telencéfalo [125].

Estudos histoquímicos revelam que o zinco encontra-se distribuído nos botões sinápticos através do cérebro. Eles são proeminentes no telencéfalo, particularmente no neo-córtex, formação hipocampal, complexo amidalóide, estriado e septo [39]. Ele é altamente concentrado nas fibras hipocampais do cérebro, e várias investigações histoquímicas e microscopia eletrônicas tem indicado que ele é encontrado nas vesículas sinápticas das fibras terminais. Associa-se a esta vesícula algumas importantes funções no SNC. Estudos nas fibras hipocampais durante a atividade neuronal tem sugerido que o Zn pode atuar como um neuromodulador [135].

Nas fibras terminais no hipocampo assim como em outras regiões cerebrais, acredita-se que o zinco vesicular esteja localizado nos neurônios que usam glutamato como um neurotransmissor [125]. Glutamato é o principal aminoácido excitatório neurotransmissor no hipocampo e no córtex [125]. Contudo nem todos os neurônios que utilizam o glutamato como um transmissor contém quelante de zinco [125].

2.4.2.4. Zinco, doenças neurodegenerativas e o envelhecimento

Alterações na homeostase de Zn^{+2} estão relacionadas a diversas desordens neurológicas [134]. Pacientes com epilepsia apresentaram um acúmulo de Zn no cérebro [133]. Além disso, alterações no metabolismo do zinco também têm sido relatadas em pacientes com a doença de Alzheimer. Estas observações incluem decréscimo nos níveis de zinco no lobo temporal [53,135], e aumento de zinco - Zn^{+2} extracelular no hipocampo [136].

2.4.3. Alumínio

Os estudos pioneiros investigando a neurotoxicidade do Al em experimentos com animais foram inicialmente descritos por Siem e Dollken em 1886 [85]. O Al é um elemento altamente neurotóxico e pode causar degeneração nos nervos celulares no cérebro de humanos e de animais de laboratório [137].

O Al está presente tanto na dieta normal quanto em um número de diferentes medicações [7]. Uma vez que o rim é a principal via de excreção do Al, deve-se ter uma atenção especial em indivíduos com insuficiência renal crônica, pois estes terão maior probabilidade de acumular este elemento nos tecidos [7].

2.4.3.1. Alumínio, o envelhecimento e doenças neurodegenerativas

Embora se saiba que o envelhecimento está associado a deficiências neurocomportamentais, é também bem estabelecido que o alumínio é um elemento neurotóxico em mamíferos [7]. Markesbery et al., 1984, reportaram um aumento nos níveis de alumínio em relação a idade. Tal aumento pode ser devido a uma exposição gradual proveniente do meio externo em relação ao tempo [10]. Além disso, este elemento tem sido apontado como um agente causador da demência [7, 137], e como sendo responsável pelo decréscimo das habilidades neurocognitivas seguidas de exposição ocupacional de Al [7]. O Al também está envolvido na esclerose lateral amiotrófica, na doença de Alzheimer [7, 137] e na doença de Parkinson [7].

Tem sido proposto que a doença de Alzheimer pode ser causada pela irreversível acumulação de Al no cérebro, especialmente no núcleo celular cerebral [137]. Estudos vêm mostrando um aumento de Al em cérebros de pacientes com DA [53].

2.4.4. Cobre

O cobre, dentre outros elementos tais quais o zinco e o selênio, é um componente indispensável para certas enzimas responsáveis por vários processos metabólicos em diferentes tecidos incluindo o cérebro [133]. Ele é tanto um importante componente de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) quanto no transporte de proteínas com propriedades antioxidantes, ceruloplasmina (Crl) (uma banda protéica de cobre), provendo proteção contra danos

via radicais superóxidos peroxidativos. Através de ações indiretas ou enzimáticas, ele impede a alteração destrutiva de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos pelos derivados dos radicais livres, da radiação, de certos metais pesados e de outras substâncias tóxicas [133].

O cobre (Cu^{2+}) está envolvido em um número de enzimas com reações catalisadoras e oxidativas. Alguns estudos reportam uma relação entre os níveis de Cu^{2+} e Zn^{2+} no soro e na atividade CuZn-SOD e a concentração de Se^{2+} no soro [134]. A Ceruloplasmina - Crl possui duas propriedades antioxidantes: a banda Cu^{2+} funcionando na prevenção da decomposição do hidroperóxido catalisante em radicais e a segunda função – a *Crl oxidase ferrous* ferro para férrico e concomitantemente convertendo O_2 em H_2O , inibindo, dessa maneira, a dependência de ferro no lipídio peroxidação [41].

É um metal traço bivalente, e tem capacidade pro-oxidante. O cobre está relacionado com certas desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Wilson [31].

Em relação ao envelhecimento, Loeffler et al. 1996 [35], reportaram um aumento na concentração de cobre com o avanço da idade, no caudado, no putâmen e no córtex frontal. Contudo em relação às doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Huntington, a concentração de cobre decresceu na substância negra de pacientes com DP e com DH [35]. Todavia, o neuropilo de pacientes com DA mostraram níveis superiores de Cu em relação aos sadios.

Além disso, esse elemento interage com a β -amilóide através de duas maneiras significativas com a DA. Primeiramente, o Cu atua como um mediador na agregação da β -amilóide em meio levemente ácido. Outra forma de interação e a mais importante, é que o Cu funciona como um co-fator à β -amilóide, facilitando a produção do estresse oxidativo [123].

ATWOOD *et al.* [138], realizaram um estudo de grande significância, no qual estabeleceram que a β -amilóide sintética na presença de Cu produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Experimentos com espectrofotômetros mostraram que a β -amilóide agrega e reduz Cu^{2+} em Cu^{1+} , seguido pela formação de H_2O_2 através da dupla transferência de elétron em oxigênio (O_2) [139]. Além disso, a produção de H_2O_2 e Cu^{1+} propicia condições ideais para a produção de radicais de hidroxilas altamente reativos (via reação química fenton) [123]. Quando esses radicais estão desregulados, eles podem iniciar a peroxidação lipídica e danos no DNA através da quebra das ligações e

modificações nas bases [123]. Estudos têm mostrado que a β -amilóide funciona como sendo um substrato para o radical hidroxila [140].

O cobre desempenha um papel funcional em muitas enzimas que requerem reações redutivas-oxidativas. Por exemplo, este metal é encontrado no sítio catalítico de citocromo c oxidase do canal de transporte de elétron mitocondrial e superóxido dismutase Cu-Zn (SOD). A entrada de Cu para o cérebro é controlada principalmente pela ceruloplasmina (CP) [66].

2.4.5. Manganês

Manganês é um elemento traço essencial, encontrado em diversos níveis em todos os tecidos, e é um dos mais utilizados na indústria. Ele é um constituinte das metaloenzimas e um ativador de enzimas. A exposição excessiva ao manganês pode provocar distúrbios psicológicos e motores. Além disso, sintomas de neurotoxicidade crônica de manganês são similares aos associados com a doença de Parkinson; contudo clinicamente eles são diferentes [141].

Em relação à sua distribuição cerebral, verificou-se um aumento de manganês no cérebro principalmente nas áreas onde há maior concentração de ferro, como por exemplo, putâmen, caudado, globo pálido, substância negra, e núcleo subtalâmico. Estas regiões constituem os núcleos da base [141].

2.5. Técnicas Analíticas

A necessidade de técnicas capazes de determinar as concentrações de elementos traço, em uma diversidade de espécimes cresceu bastante nos últimos 15 anos [142]. Na biologia, os elementos denominados essenciais, em baixas concentrações, desempenham um papel importante em organismos vivos, e os elementos tóxicos influenciam negativamente esses organismos, daí a importância de quantificá-los. Na geologia, a abundância de elementos traço em rochas e sedimentos permite registrar sua história de formação em termos de temperatura e pressão presentes durante a formação. Nas ciências dos materiais e em especial, na indústria dos semicondutores, existe uma crescente necessidade por materiais altamente puros. A monitoração dos processos de

produção e a determinação do produto final demandam processos com precisão nos resultados quantitativos [142].

2.5.1. Histórico

A análise dos minerais em cérebros de ratos teve início nos anos 70, utilizando um método de microeletrodos, o qual permitia apenas obter informações a respeito das atividades iônicas extracelulares. Desde então, diversos estudos têm mostrado um grande aumento dos íons de potássio e um decréscimo nas atividades iônicas do sódio e do cálcio no espaço extracelular em cérebros danificados [143]. Devido a essas alterações, houve a necessidade de desenvolver outros métodos capazes de medir as concentrações elementares no tecido como um todo. Dentre os métodos utilizados, podemos citar a AAS e a ICP. Estes métodos quantificam elementos traço, dentre outros, em amostras biológicas. Eles permitem determinar tanto os níveis dos elementos presentes em cérebros humanos e de ratos, tanto em tecidos normais [9, 45] quanto sob condições patológicas, como por exemplo, em isquemia [57], tumor [46], mal de Alzheimer ou Parkinson [144] e envelhecimento [12, 57]. Para utilizar esses métodos é necessário dissolver o tecido em um meio ácido.

Atualmente algumas técnicas estão sendo empregadas para avaliar a distribuição espacial em duas ou três dimensões, tanto de elementos traço quanto majoritários em cérebro animal [57]. A tabela 2.1 apresenta resumidamente algumas vantagens e desvantagens das principais técnicas analíticas que vem sendo utilizadas na quantificação de elementos em tecidos biológicos.

Tabela 2.1. Vantagens e desvantagens de algumas técnicas analíticas utilizadas no estudo da concentração elementar em tecidos cerebrais.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Mancha Histoquímica	Foi utilizada para determinar as concentrações de potássio em secções histológicas de cérebros isquêmicos e níveis de ferro em cérebros parkinsonianos	A sensibilidade é relativamente baixa e torna-se difícil a análise multielementar.
(PIXE)	É um método adequado para análise de elementos tanto a níveis de traço quanto majoritários em materiais biológicos.	Instrumentação de alto custo econômico, por exemplo, acelerador de próton. Danifica a amostra via aquecimento durante a radiação nas amostras de tecido.
ICP		
INAA	Análise multielementar,	Necessidade de grandes quantidades de amostra para análise
Imagem por Ressonância Magnética	Análise multielementar,	Alto custo operacional
	Capacidade de visualização tridimensional da distribuição de H, C, F, Na e P.	Viável apenas para análise de um determinado número de elementos.
TXRF	Efeitos de absorção da radiação pode ser desprezado simplificando dessa forma o cálculo da concentração elementar. Análise multielementar e alta sensibilidade para a maioria dos elementos na faixa de $Z > 15$.	Dependendo das condições experimentais, possui baixa sensibilidade para a detecção de elementos leves, como por exemplo, Na, Mg, N, O, etc.
μXRF	Capacidade de mapear bidimensionalmente a concentração elementar	Absorção deve ser levada em consideração. Dependendo das condições experimentais, baixa sensibilidade para elementos leves, como por exemplo, o sódio.

2.6. Microfluorescência

2.6.1. Histórico

Nichols e Ryon [145], em 1987, foram os percussores na aplicação da μ XRF, descrevendo a capacidade da instrumentação de linhas scans de ouro e platina. Este instrumento foi o primeiro utilizado no desenvolvimento comercial da instrumentação. No ano seguinte, mapas elementares geológicos foram demonstrados por Boehme [145].

Colaborações entre esses autores e KeveX resultaram em um estudo comparativo entre um instrumento construído em um laboratório e o primeiro instrumento comercial [146], com a finalidade de analisar a capacidade de resolução e o potencial analítico. Contudo, o primeiro equipamento comercial disponível fez com esta nova tecnologia fosse expandida para um maior número de aplicações. O equipamento comercial tem sido fortemente tendenciado a utilizar radiação síncrotron como fonte de excitação. Há uma série de aplicações que utilizam equipamentos construídos em laboratório incluindo: aperfeiçoamento da microeletrônica, mapas de seções de ossos, filmes supercondutores, cabelo humano, ligas de metal, amostras geológicas e minerais, tecidos de osso, partículas ambientais, anéis de árvore e fragmentos de vidro [146].

2.6.2. Os principais avanços tecnológicos da μ XRF nos últimos 10 anos

A μ XRF é uma ferramenta versátil, aplicada em diversos campos, como por exemplo, a arqueometria, ciências ambientais, geologia, ciências da vida e dos materiais.

Atualmente existem diferentes espectrômetros de μ XRF. Em geral, podemos separá-los em três grupos: de um lado os espectrômetros de “laboratório”: portáteis e os fixos em laboratório (*table-top*) e do outro os espectrômetros que trabalham utilizando radiação síncrotron. Os dois primeiros utilizam tubos de raios X como fontes de excitação e utilizam capilares ópticos como condensadores do feixe dos raios X incidente [146].

O progresso da μ SR-XRF está relacionado ao desenvolvimento significativo na instrumentação, tais como capilares com lentes de raios X, tubos de raios X com micro-foco resfriados a ar. Além disso, estão disponíveis sistemas de detector compactos com boa resolução (ajustados para altas contagens) e que não exigem, por um período adicional, resfriamento com nitrogênio líquido [147].

Nos anos 80, por exemplo, avanços foram realizados nos espectrômetros *table-top* através da focalização dos feixes de raios X mediante um *micro-spot*. Em 1999, foram construídos os primeiros espectrômetros portáteis. Para isso, foi necessário implementar novos componentes, como por exemplo, um tubo micro-focus e um detector com câmara resfriada em conjunto com os policapilares ópticos.

A grande vantagem no uso do tubo micro-focus e do detector com câmara resfriada, é que eles não necessitam de uma extensiva refrigeração, o que era

extremamente necessários nos tubos convencionais de raios X e nos detectores de Si(Li) e HPGe, viabilizando então o uso do espectrômetro portátil. Devido ao alto brilho, a tunelamento de energia dos fótons e seu pequeno tamanho de feixe, a radiação síncrotron é uma fonte extraordinária para a μ XRF. Especialmente, nas máquinas de terceira geração com um Kirkpatrick-Baez óptico, um feixe altamente intenso com um tamanho de apenas 5 μ m pode ser obtido [146].

Resumidamente, os avanços mais recentes ligados a esta técnica foram quanto à otimização do sistema ótico e do tamanho cada vez menor do feixe, abaixo de 5 μ m [148].

2.7. Radiação Síncrotron

Na década de 70, trabalhos envolvendo o desenvolvimento da análise elementar por fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SRXRF) foram realizados utilizando diversas fontes de SR [148].

A primeira microsonda analítica, usando radiação síncrotron como fonte de excitação, foi descrita por Horowitz e Howell, em 1971, em um acelerador de Elétron em Cambridge [148, 149]. Eles focalizaram os raios X através de um espelho cilíndrico curvo e definiram o tamanho do feixe utilizando um colimador do tipo pinhole, posicionado na frente do alvo [149].

Em 1976, Sparks et al. [150], foi dentre os primeiros trabalhos em SRXRF, o mais importante e o mais conhecido. Eles utilizaram um feixe de SR monocromático do anel de armazenamento SPEAR, Stanford-EUA, demonstrando inúmeras possibilidades de utilização para este novo método.

Em 1981/82 um número de aplicações e estudos metodológicos da XRF foram realizados, incluindo a análise multielementar de amostras geológicas e médicas para uma energia superior a 50 keV com um limite de detecção de 30 ppb [114]. Estes estudos foram realizados no anel de armazenamento VEPP-3, Novosibirsk, USSR.

Desde 1981, vários outros experimentos envolvendo os dispositivos óticos e design de microsondas de raios X têm sido feitos [148, 151]. Na maioria dos casos, um feixe branco de radiação síncrotron é colimado através de fendas vertical e horizontal, ou através de um cristal duplo curvado para focalizar a radiação [148]. Tamanhos de

feixe da ordem de micra podem ser obtidos utilizando cristais curvados duplos de Si ou Ge, para focalizar a radiação [152]. Em geral, a área do feixe de radiação varia entre 700 e 2500 μm^2 .

Experimentos realizados por Iida e Goshi [148], utilizando uma combinação de espelhos para reflexão e transmissão para focalizar e monocromatizar o feixe, conseguiram alcançar uma área do feixe de 3500 μm^2 e um limite mínimo detectável de 0,03 pg para o zinco.

Underwood e Thompson [148] obtiveram uma área do feixe de aproximadamente 10 μm^2 com um fluxo de 104 ph./ $(\text{s mA } \mu\text{m}^2)$ para uma energia de 10 keV, utilizando uma microsonda baseada no Kirkpatrick-Baez, com a inserção de multicamadas curvadas utilizadas para focalizar e monocromatizar o feixe [151].

No Factory Fóton, no Japão, um microsonda de fluorescência de raios X, com a habilidade de realizar varredura, foi desenvolvido baseado no então chamado Wolter tipo I ópticos, com um espelho revestido por platina, funcionando como um focalizador para refletir os raios X com energia superior a 10 keV [151]. Goshi tem reportado um tamanho de feixe ainda menor – 14 μm (vertical) e 30 μm (horizontal), com um fluxo de fótons de 103 ph./ $(\text{s mA } (\text{m}^2))$ [151].

O uso da SR em aplicações biológicas é descrito por Van Langevelde et al. [153].

Este capítulo é subdividido em duas partes. Na primeira parte, será abordado o sistema nervoso, seus componentes e suas funções, assim como os conceitos básicos de sua anatomia. A Segunda parte descreve os fundamentos da Fluorescência de Raios X, enfatizando a Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e a Microfluorescência de Raios X.

CAPÍTULO 3

3. Fundamentos Teóricos

3.1. Sistema Nervoso Humano

O encéfalo humano é extremamente complexo, contudo ele é apenas uma variação de uma estrutura comum a todos os mamíferos.

O sistema nervoso dos mamíferos divide-se em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é formado pelo encéfalo e pela medula espinal. O encéfalo divide-se em cérebro, cerebelo e tronco encefálico. O cérebro é constituído pelo telencéfalo e pelo diencefalo, enquanto que o tronco encefálico divide-se em mesencéfalo, ponte e bulbo. O SNP se constitui pelos nervos espinhais e cranianos, gânglios e receptores.

Os nervos são estruturas especializadas em conduzir impulsos para o SNC (impulsos aferentes) e para o SNP (impulsos eferentes). São formados por prolongamentos de células altamente especializadas, os neurônios. Estes possuem um corpo celular com projeções denominadas dendritos, palavra de origem grega que significa “pequenos ramos de árvore”, e um prolongamento principal, o axônio (figura 3.1). É através dos dendritos que cada neurônio recebe as informações provenientes dos demais a que se associam. O impulso nervoso propaga-se no sentido dendrito-axônio.

Os gânglios são aglomerados de corpos celulares de neurônios encontrados no SNP. Receptores são estruturas que se encontram nas terminações dos neurônios e que captam informações do ambiente levando-as ao SNC através dos nervos.

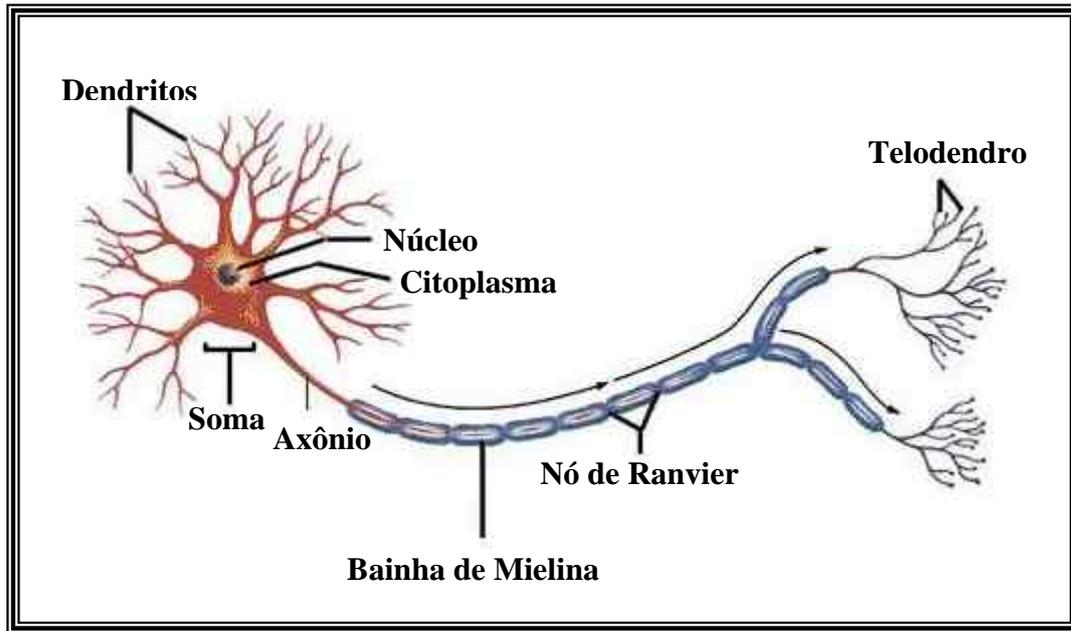


Figura 3.1. Ilustração do neurônio e seus componentes [155].

Para entender o sistema nervoso é necessário conhecer as estruturas do encéfalo assim como se situar nele através do uso de termos denominados como referências anatômicas. Consideremos o sistema nervoso do rato apresentado na figura 3.2. Na cabeça situa-se o encéfalo, e a medula espinhal percorre o canal vertebral em direção à cauda. A direção que aponta para o focinho do rato é denominada anterior ou rostral. A que aponta para a cauda é chamada de posterior ou caudal, enquanto que a direção que aponta para cima é denominada de dorsal e a que aponta para baixo recebe o nome de ventral [155].

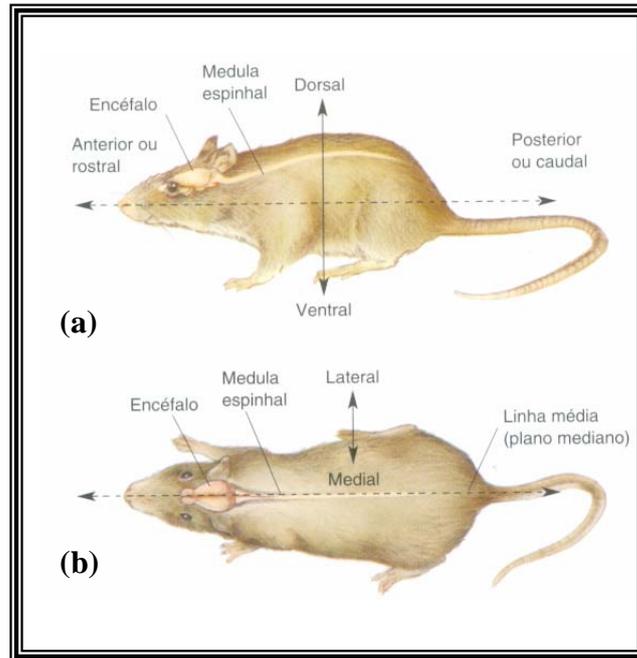


Figura 3.2. Referenciais anatômicos básicos no sistema nervoso do rato. **(a)** Vista lateral. **(b)** Vista dorsal [155].

A figura 3.2b, mostra a simetria existente no sistema nervoso. O lado direito do encéfalo e da medula espinhal é uma imagem especular do lado esquerdo. Essa característica é conhecida como simetria bilateral. A linha que atravessa o sistema nervoso longitudinalmente pelo meio é chamada de linha média, onde podemos dizer que, estruturas mais próximas da linha média são as mediais, ao passo que, as mais afastadas, são chamadas de laterais.

É uma prática comum seccionar o encéfalo, a fim de visualizar sua estrutura interna. Na linguagem dos anatomistas, uma fatia é uma secção e cortar em fatias é seccionar. A abordagem padrão consiste em realizar cortes paralelos em um dos três planos de secção anatômicos. Esses planos estão representados na figura 3.3 e são descritos abaixo:

- a) Plano mediano: é o plano de secção que divide o encéfalo em metades, direita e esquerda, cortes paralelos ao plano mediano estão em planos sagitais;
- b) Plano horizontal: é um plano paralelo ao chão. As secções horizontais dividem o encéfalo nas porções dorsal e ventral;

- c) Plano coronal: é perpendicular ao chão e ao plano sagital. Este plano divide o encéfalo em partes anterior e posterior. As secções dos cérebros de ratos realizadas neste estudo foram feitas em um plano coronal [155].

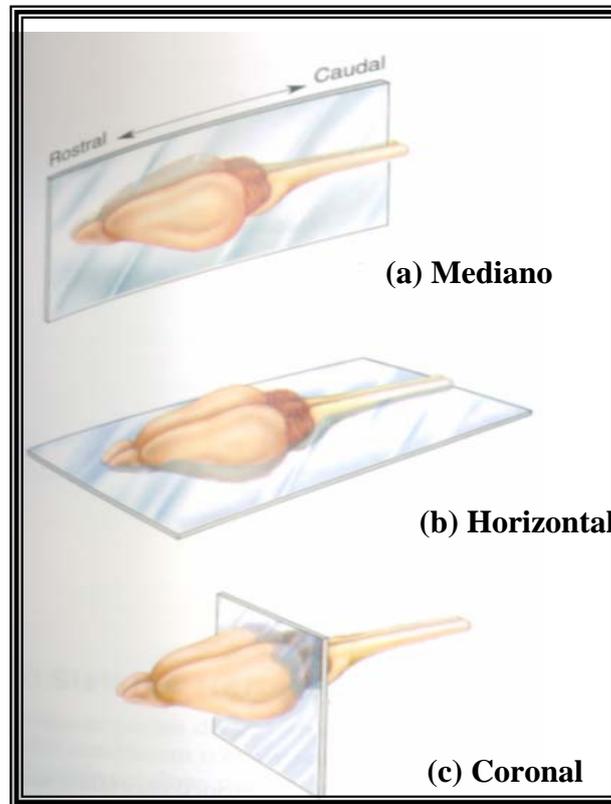


Figura 3.3. Planos anatômicos de secção [155].

3.2. Sistema Nervoso Central (SNC)

As porções do sistema nervoso que estão envoltas por um revestimento ósseo são o encéfalo e a medula espinhal. O encéfalo é constituído pelo cérebro, cerebelo e tronco encefálico.

- a) Cérebro:** é a porção mais rostral e mais larga do encéfalo. É dividido em dois hemisférios cerebrais, separados pela profunda fissura sagital. Ambos os hemisférios direito e esquerdo, recebem sensações, porém cabe ao direito controlar os movimentos do lado esquerdo do corpo, e ao esquerdo controlar os movimentos do lado direito do corpo.

- b) Cerebelo:** palavra originada do latim “cérebro pequeno”, está localizado atrás do cérebro. Apesar do cerebelo ser realmente menor do que o cérebro possui tantos neurônios quanto ambos os hemisférios cerebrais juntos. Ele é basicamente um centro de controle do movimento que possui extensivas conexões com o cérebro e a medula espinhal. Ao contrário dos hemisférios cerebrais, o lado esquerdo do cerebelo está relacionado com os movimentos do lado esquerdo do corpo, e o lado direito relaciona-se com os movimentos do lado direito do corpo.
- c) Tronco Encefálico:** compreende a porção restante do encéfalo. Ele constitui o “talo” e onde os hemisférios e o cerebelo se originam. O tronco encefálico é um conjunto complexo de fibras e células, que enviam informação do cérebro à medula espinhal e ao cerebelo, assim como de ambos ao cérebro. Além disso, ele é responsável pelo controle das funções vitais, como por exemplo, a respiração, a temperatura, dentre outras. Apesar de ser considerado a porção mais primitiva no encéfalo dos mamíferos, é imprescindível para a vida [155].

3.3 Vesículas Encefálicas Primárias

O encéfalo primitivo ou arquencéfalo dá origem às três vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O prosencéfalo dá origem ao telencéfalo e ao diencéfalo. O mesencéfalo continua com a mesma denominação e o rombencéfalo origina o metencéfalo e o mielencéfalo. O metencéfalo, por sua vez, origina o cerebelo e a ponte, enquanto que o mielencéfalo origina o bulbo.

3.3.1 Prosencéfalo

Do prosencéfalo surgem vesículas secundárias, denominadas de vesículas ópticas e as telencefálicas. O prosencéfalo é formado por duas vesículas ópticas, duas vesículas telencefálicas e o diencéfalo.

O prosencéfalo é a região das percepções conscientes, da cognição e da ação voluntária. Sem dúvida, a estrutura mais importante do prosencéfalo é o **córtex cerebral**. O córtex foi a estrutura que mais se desenvolveu ao longo da evolução humana. É a parte cinzenta exterior dos hemisférios; ele possui terminações de fibras aferentes, neurônios de associação dos dois hemisférios e neurônios de projeção, que

direcionam os impulsos que serão integrados para os diversos setores do SN [156]. Os neurônios corticais recebem informação sensorial, constroem as percepções do mundo exterior e comandam os movimentos voluntários.

O telencéfalo é formado pelos hemisférios cerebrais e por comissuras que se situam próximo ao plano mediano: o corpo caloso, a lâmina terminal, a comissura anterior, o fórnix e a comissura posterior ou comissura epitalâmica. Divide-se em lobos frontal, temporal, parietal, occipital (figura 3.4) e, mais internamente, o lobo da insula.

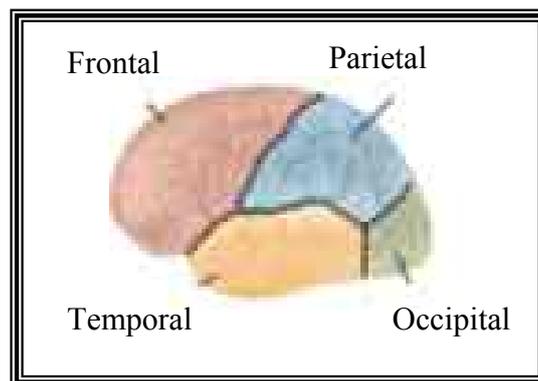


Figura 3.4. Representação dos lobos cerebrais.

O telencéfalo possui sulcos que delimitam giros. A localização dos sulcos e giros é variável. Entretanto, alguns são mais comuns e sua identificação facilita o estudo do telencéfalo em suas diferentes regiões.

O giro frontal inferior esquerdo também é conhecido como giro de Broca, centro cortical da palavra falada. Na face medial do cérebro encontra-se uma estrutura branca e arqueada que une os dois hemisférios. É o corpo caloso, a maior das comissuras inter-hemisféricas. Inferiormente ao corpo caloso encontra-se o fórnix que, juntamente com a cápsula interna, une o córtex aos centros subcorticais através de suas fibras de projeção.

O diencéfalo é formado pelo hipotálamo, tálamo, subtálamo e epitalamo. O tálamo encontra-se localizado profundamente no prosencéfalo, e é assim denominado, pois este nome em grego significa leito. O hipotálamo compreende também o quiasma óptico, o túber cinéreo, o infundíbulo e os corpos mamilares.

3.3.2 Mesencéfalo

Situa-se atrás do prosencéfalo. É também chamada de encéfalo médio.

Ao contrário do prosencéfalo, o mesencéfalo não se modifica muito durante o desenvolvimento do cérebro. A superfície dorsal da vesícula mesencefálica transforma-se em uma estrutura denominada de tecto, o assoalho do encéfalo médio origina o tegmento e finalmente o espaço preenchido pelo Líquido céfalo-raquidiano (LCR), situado entre essas duas regiões, contrai-se formando um canal estreito chamado de aqueduto cerebral.

3.3.3. Rombencéfalo

Possui três importantes estruturas: cerebelo, ponte e bulbo raquídeo ou medula oblonga, que também é chamado apenas por bulbo. O cerebelo e a ponte originam-se da metade rostral do rombencéfalo, chamado de metencéfalo, o bulbo deriva da metade caudal, chamado de mielencéfalo. A cavidade preenchida com LCR originará o quarto ventrículo, que está em continuidade com o aqueduto cerebral do mesencéfalo.

3.4. Organização do sistema nervoso - Funções básicas das sinapses e das substâncias transmissoras.

O Sistema Nervoso controla as funções do nosso organismo. É através dele que recebemos informações do meio, muitas vezes nos recordamos dessas informações e até mesmo respondemos de maneira específica interagindo, assim, com o meio que nos envolve de forma precisa e altamente elaborada.

Os impulsos nervosos seguem através dos neurônios em sentido anterógrado, indo no sentido do dendrito para o axônio. O axônio, por sua vez, leva esse impulso aos dendritos do neurônio subsequente ou a uma célula efetuidora como, por exemplo, uma célula muscular.

Entre um neurônio e outro existe um espaço denominado **sinapse** (Figura 3.5). O termo sinapse, definido como o local de contato entre dois neurônios, foi criado pelo fisiologista britânico Charles Sherrington. A expressão, transmissão sináptica, definida como a passagem de informação através da sinapse, também foi criada por ele [157].

A sinapse estabelece a ligação funcional entre dois neurônios, sendo importante para a modulação dos impulsos que aí seguem além de ser considerada o ponto de união entre esses neurônios. Poderíamos considerar a sinapse como uma união mais funcional

que física entre neurônios uma vez que a ligação física fica relegada a um plano aparentemente "virtual". As sinapses atuam de forma seletiva na transmissão do impulso nervoso, além de direcionar cada um desses impulsos para o local de atuação.

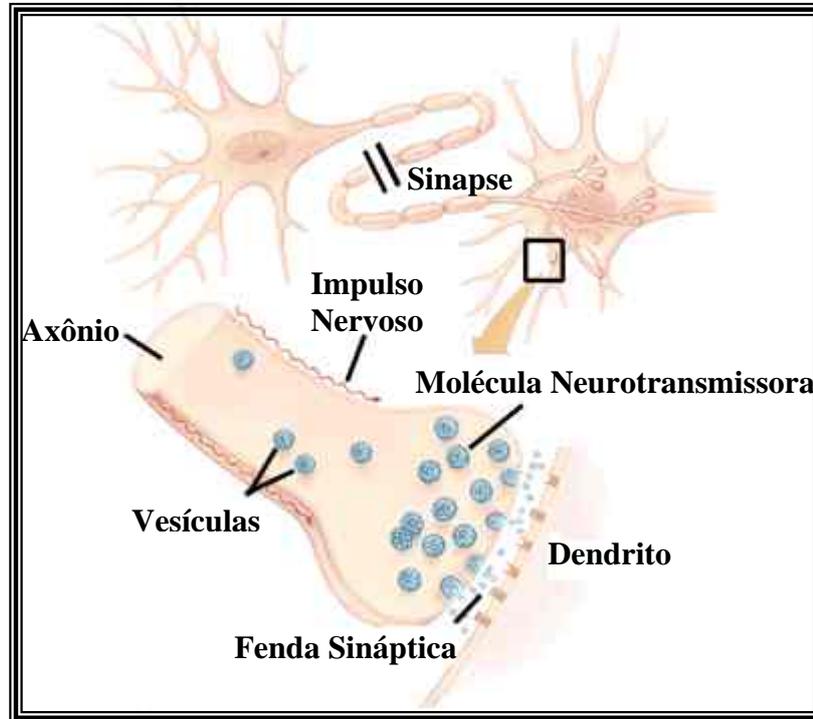


Figura 3.5. Representação da sinapse [157].

Cabe ressaltar que a árvore dendrítica de um neurônio pode receber diversas conexões sinápticas enquanto o axônio transmite o impulso de uma maneira centralizada. O axônio possui ramificações que se propagam a várias regiões do sistema nervoso periférico em direção aos efetadores, além de propagar o impulso aos dendritos do neurônio seguinte.

Os neurônios do SN podem ser divididos de acordo com sua função, que pode ser sensitiva, integradora ou motora.

- a) Os neurônios sensitivos recebem informações provenientes dos receptores e as levam aos neurônios integradores ou de associação, localizados no córtex cerebral.
- b) Os neurônios de associação selecionam as informações sensitivas e elaboram a resposta, a qual deve seguir pelos neurônios motores ou efetadores. A maior parte das informações sensitivas que têm acesso ao nosso sistema nervoso não é utilizada na elaboração de uma resposta. Grande parte das informações restantes

é armazenada para poder depois serem reutilizadas nos processos de pensamento ou de resposta através do processo conhecido como memória. A maior parte deste armazenamento ocorre no córtex cerebral.

Quanto às sinapses, elas podem ser classificadas em químicas e elétricas. Quase todas as sinapses utilizadas pelo sistema nervoso central no ser humano são sinapses químicas.

3.4.1. Sinapses elétricas

A estrutura dessas sinapses foi descoberta através do microscópio eletrônico e outras técnicas, e predominou o nome junção comunicante para caracterizá-las.

A junção comunicante é uma região de aproximação entre duas células onde as membranas ficam separadas por um espaço exíguo de cerca de 3nm. A membrana dessa região, em ambas as células, possui canais iônicos especiais (os conexons) formados por seis subunidades protéicas idênticas chamadas conexinas, que em certas situações se acoplam quimicamente formando poros de 2nm de diâmetro. Por isso, quando um conexon se acopla a outro situado na célula contígua, por eles passam várias espécies iônicas e até mesmo moléculas pequenas. Diz-se então, que as duas células estão acopladas. Portanto, quando uma das células entra em atividade, isto é, produz potenciais de algum tipo, as correntes iônicas correspondentes passam diretamente pelas junções comunicantes para a outra célula.

Apesar das sinapses elétricas serem incapazes de processar informação, mas apenas de transmiti-las, sua utilidade está na rapidez de transmissão, que permite a sincronização de numerosas populações de células acopladas [157].

3.4.2. Sinapses Químicas – Processamento de sinais

Nas sinapses químicas o neurônio secreta uma substância conhecida como neurotransmissor, o qual age sobre proteínas receptoras na membrana do próximo neurônio para excitar o neurônio, inibi-lo ou modificar a sua sensibilidade de algum outro modo. Entre os neurotransmissores mais conhecidos temos a acetilcolina, noradrenalina, serotonina, histamina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato.

O processo evolutivo, que presumivelmente ocorreu das sinapses elétricas para as sinapses químicas tornou vantajoso para o processamento de informação o aparecimento entre dois neurônios adjacentes de uma região especializada de *contaton* por contigüidade, mas sem continuidade. O espaço entre as membranas nessa região é conhecido como fenda sináptica e mede 20-50nm, bem maior que o das junções comunicantes. Esse espaço é ocupado por uma matriz protéica adesiva que favorece a fixação das duas células, mas também a difusão de moléculas no interior da fenda.

Como a transmissão sináptica é unidirecional chamaremos a região sináptica da primeira célula de elemento pré-sináptico e a região sináptica da segunda célula de elemento pós-sináptico. O elemento pré-sináptico é, em geral, um terminal axônico, e o elemento pós-sináptico, é em geral, um dendrito.

A informação que chega ao elemento pré-sináptico vem na forma de potenciais de ação conduzidos pelos axônios até os terminais. A seguir, como a larga fenda sináptica e a ausência de conexons impedem a passagem direta de correntes iônicas para a célula pós-sináptica, ocorre a conversão da informação elétrica conduzida pelos potenciais de ação em informação química. Os potenciais de ação causam a liberação, na fenda sináptica, de uma determinada quantidade de substância armazenada no interior das vesículas. A essa substância damos o nome de **neurotransmissor** ou **neuromediador**. As moléculas do neurotransmissor, uma vez na fenda sináptica, difundem-se até a membrana pós-sináptica, onde ocorre a reconversão da informação química para informação de natureza elétrica: a ação do neurotransmissor resulta em um potencial pós-sináptico na membrana da segunda célula, e este poderá produzir nela potenciais de ação que serão conduzidos pelo axônio correspondente até uma terceira célula, onde o processo se repetirá.

Quanto à função, as sinapses podem ser **excitatórias** ou **inibitórias**.

As excitatórias têm como resultado da transmissão um potencial pós-sináptico despolarizante que tende a aproximar do limiar o potencial de repouso da zona de disparo do neurônio. Dessa forma, fica mais fácil a ocorrência de potenciais de ação no neurônio pós-sináptico, e por isso diz-se que ele foi excitado.

As inibitórias, por sua vez, o resultado da transmissão é um potencial pós-sináptico hiperpolarizante que afasta do limiar o potencial de repouso da zona de disparo do neurônio. Assim, torna-se mais difícil para o neurônio pós-sináptico produzir potenciais de ação, e por isso diz-se que ele foi inibido [157].

3.4.3. Neurotransmissores

Os neurotransmissores são substâncias cuja ação se exerce diretamente sobre a membrana pós-sináptica (excitatório ou inibitório). Usava-se, pela “Lei de Dale”, um sufixo próprio para os neurônios de acordo com o seu neurotransmissor: colinérgicos, aqueles que empregam a acetilcolina; adrenérgicos, os que empregam a noradrenalina; seotoninérgicos, aqueles que usam a serotonina, e assim por diante. O neurônio motor – colinérgico – é excitatório porque a acetilcolina produz, na membrana da célula muscular esquelética, um potencial despolarizante. Já o neurônio que inerva o coração – também colinérgico – é inibitório porque a mesma acetilcolina produz na membrana da célula muscular cardíaca um efeito diferente, hiperpolarizante.

Recentemente, essa lei está ultrapassada, pois se descobriu que um mesmo neurônio pode alojar diversas substâncias que atuam na transmissão sináptica. Contudo, manteve-se o termo neurotransmissor referente à substância cuja ação se exerce diretamente sobre a membrana pós-sináptica, produzindo nela um potencial pós-sináptico: excitatório ou inibitório. Manteve-se também o uso correspondente do sufixo *-érgico*. Entretanto, criou-se o termo neuromodulador para um tipo de substância atuante na sinapse, não somente na membrana pós-sináptica, mas também na membrana pré-sináptica e até mesmo nas vesículas sinápticas. O neuromodulador influencia a ação do neurotransmissor sem modificá-la, ou seja, modula a transmissão sináptica.

Os neurotransmissores possuem três tipos químicos: aminoácidos, aminas e purinas. Os neuromoduladores são peptídeos e gases. Mas vale lembrar, que essa diferença não é absoluta, pois há peptídeos que atuam como verdadeiros neurotransmissores e aminoácidos que atuam como neuromoduladores.

Para que a sinapse funcione corretamente, ambos os neurônios (pré e pós-sináptico) devem manter um complexo sistema de síntese e armazenamento das substâncias relevantes à transmissão sináptica. O neurônio pré-sináptico deve ser capaz de sintetizar seu neurotransmissor e os neuromoduladores. Essa síntese, em geral, é realizada por sistemas enzimáticos existentes no corpo celular, ou então no próprio terminal.

Os aminoácidos, por exemplo, são normalmente sintetizados no citoplasma de todas as células, geralmente a partir da glicose ou de proteínas decompostas em seus elementos constituintes. É o que ocorre com o glutamato e a glicina. A exceção é o ácido gama-aminobutírico (GABA), sintetizado especificamente pelos terminais dos

neurônios que o utilizam como neurotransmissor, a partir do glutamato. As aminas são também sintetizadas no citoplasma do terminal sináptico. A acetilcolina, por exemplo, é sintetizada pela enzima colina-acetil-transferase a partir da colina proveniente da alimentação, ou resultante da degradação da própria Ach, e do acetato que o citoplasma normalmente possui. As indolaminas têm como principal representante as serotonina, que é sintetizada a partir de um aminoácido, o triptofano, utilizando uma cadeia de duas reações enzimáticas.

Finalmente, as catecolaminas, grupo que inclui a dopamina, a adrenalina e a noradrenalina, são sintetizadas em seqüência a partir do aminoácido tirosina, que é normalmente captado pra o citoplasma do terminal, utilizando diferentes sistemas enzimáticos para cada etapa da síntese [157].

3.4.4. Os receptores e os potenciais sinápticos

O resultado final da ação do neurotransmissor é o aparecimento de uma alteração no potencial da membrana pós-sináptica, chamada potencial pós-sináptico, ou simplesmente potencial sináptico. De fato, a reação química entre o neurotransmissor e o seu receptor é que provoca o potencial pós-sináptico. Receptor é um complexo molecular de natureza protéica, embutido geralmente na membrana pós-sináptica e capaz de estabelecer uma ligação química específica com um neurotransmissor ou um neuromodulador [157].

3.5. Sistema Nervoso Central do Rato

3.5.1 Comparação do SNC humano e do rato

A figura 3.6 compara os encéfalos de ratos e de humanos. Primeiramente ressaltaremos as similaridades:

- a) A vista dorsal de ambos os encéfalos mostra os hemisférios pareados do telencéfalo, figura 3.6a;
- b) Uma visão mediana dos dois encéfalos mostra que o telencéfalo estende-se rostralmente com relação ao diencéfalo. Este envolve o terceiro ventrículo, o

mesencéfalo está ao redor do aqueduto cerebral e o cerebelo, a ponte e o bulbo circundam o quarto ventrículo.

A maioria das diferenças observáveis a olho nu entre o cérebro humano e o de rato estão no telencéfalo, referentes aos hemisférios cerebrais. Algumas dessas diferenças são justificadas pela filogênese, como a menor quantidade de giros no cérebro do rato.

Os itens a, b e c, descrevem algumas das diferenças que podem ser observadas entre os encéfalos do rato e do humano:

- a) Analisando a figura 3.6a, verifica-se uma diferença importante entre o encéfalo humano e do rato: as diversas circunvoluções existentes na superfície cerebral. As ranhuras chamam-se de sulcos, e as saliências de giros, características observadas apenas no encéfalo humano. O córtex cerebral é uma fina camada sobre a superfície do cérebro. Sulcos e giros resultam da grande expansão da área da superfície do córtex cerebral durante o desenvolvimento fetal. O córtex cerebral humano mede cerca de 1100 cm² e para caber dentro das limitações cranianas ele deve dobrar-se e franzir-se. O aumento da área cortical é uma das distorções do encéfalo humano. A tendência é de que quanto mais primitivo seja um animal, menor seja o volume de seus hemisférios cerebrais, bem como de outras partes mais recentes no encéfalo. Esse volume está relacionado à importância do papel dessas estruturas (dominante) no comportamento do animal. No roedor, não há giros, embora possam ser vistas marcas de dobras. Já no ser humano, e nos primatas de uma forma geral, existe a maior quantidade de giros cerebrais que se encontra no grupo dos mamíferos. Evidências clínicas e experimentais indicam que o córtex é o único local de raciocínio e de conhecimento humano [155];

- b) É na ponte, (região do encéfalo, no mesencéfalo) que podemos observar a origem de diversos nervos cranianos. De uma maneira geral, pode-se afirmar que, no rato, todos os nervos cranianos têm origem na medula oblonga. Na observação do sistema nervoso do rato, é difícil distinguir a ponte, porém a função dos nervos cranianos é comum em ambos, com mínimas distinções [155];

- c) A estrutura do cerebelo é semelhante no homem e no rato, porém, observa-se que o arque-cerebelo do rato é mais desenvolvido. Há, também, uma diferença quanto ao posicionamento do cerebelo na caixa craniana: como no homem, os hemisférios são muito maiores, o cerebelo é obrigado a permanecer numa posição abaixo do lobo occipital. No rato, já que o volume dos hemisférios é consideravelmente menor, o cerebelo fica dorsalmente quase que nivelado aos hemisférios [155];
- d) Analisando a figura 3.6c, verificam-se outras diferenças nos encéfalos de rato e humano: o tamanho do bulbo olfatório humano é menor do que o do rato, porém os hemisférios cerebrais humanos são maiores. Os bulbos olfatórios do rato são extremamente desenvolvidos, devido à dependência vital que esse animal tem do seu olfato, para se localizar no meio. Seu trato olfatório é proporcionalmente tão desenvolvido que chega a formar um novo lobo, ou lobo olfatório. Já nos humanos os hemisférios arqueiam-se posteriormente, depois ventrolateralmente e, então, anteriormente, assemelhando-se a um corno de carneiro. A ponta do “corno” situa-se bem abaixo do osso temporal do crânio (a têmpora), sendo esta porção do cérebro denominada de lobo temporal. A porção anterior do cérebro, que se encontra sob o osso frontal, é chamada de lobo frontal. O profundo sulco central marca a borda posterior do lobo frontal; caudalmente a ele temos o lobo parietal, sob o osso parietal. Caudalmente a esse, no cérebro posterior, sob o osso occipital, localiza-se o lobo occipital. O corpo pineal, no rato, está localizado visivelmente na parte superior do cérebro, enquanto no ser humano ele está abaixo do esplênio do corpo caloso, já no interior do cérebro [155-156].

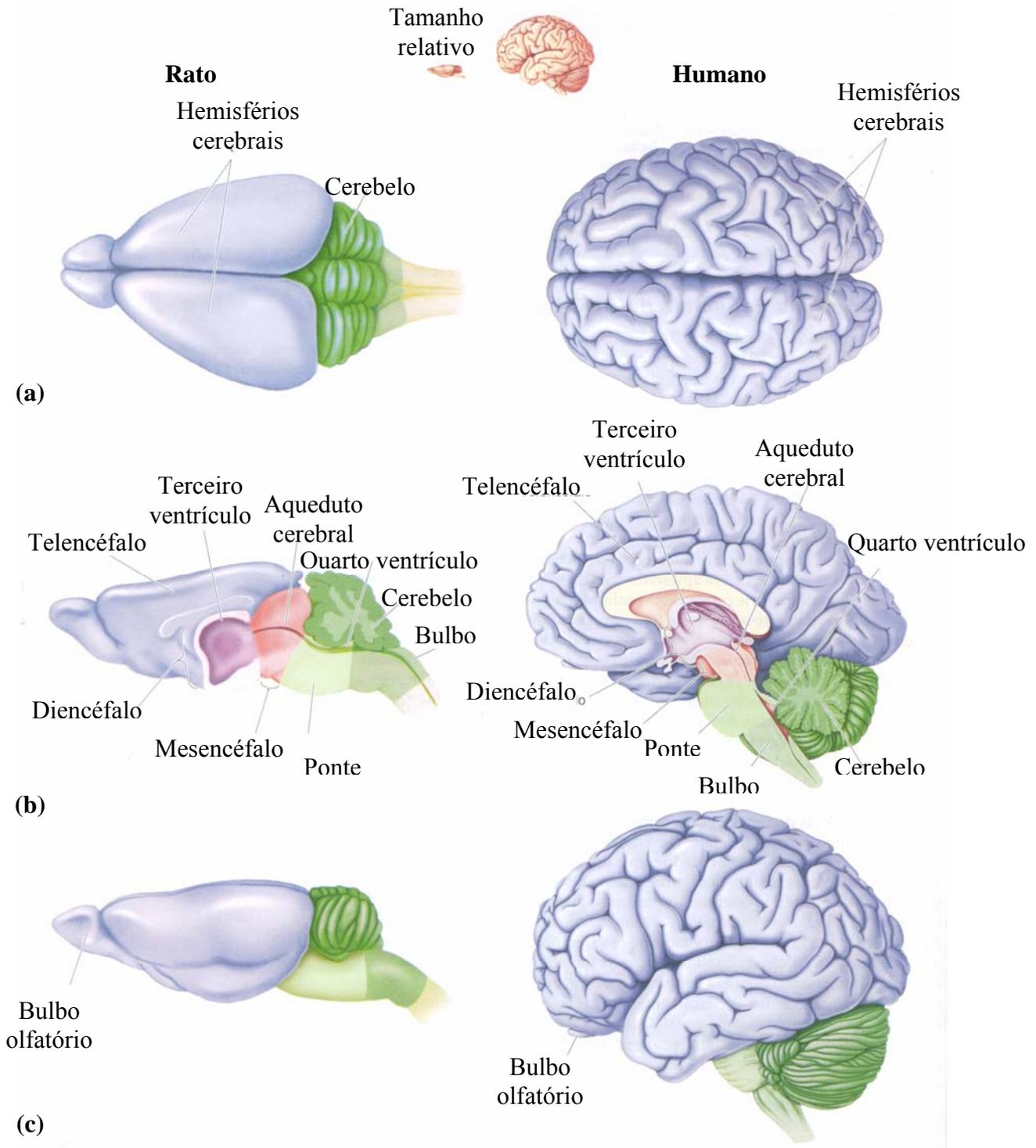


Figura 3.6. Comparação entre o encéfalo do rato e o encéfalo humano. (a) Vista dorsal. (b) Vista sagital média. (c) Vista lateral. OBS. Os encéfalos não estão desenhados na mesma escala [155].

3.6. Estruturas cerebrais e suas funções

3.6.1. Córtex Cerebral

A palavra córtex vem do latim significa "casca". Isto porque o córtex é a camada mais externa do cérebro. A espessura do córtex cerebral varia de 2 a 6 mm. Os lados esquerdo e direito do córtex cerebral são ligados por um feixe grosso de fibras nervosas chamado de corpo caloso. São funções do córtex cerebral: pensamento, movimento voluntário, linguagem, julgamento e percepção [158].

3.6.2. Sistema Límbico

Alegria, tristeza, medo, prazer e raiva caracterizam fenômenos emocionais e, portanto, estão diretamente relacionados com o sistema límbico. As manifestações de caráter emocional realizam-se através do tronco encefálico. Além do tálamo e hipotálamo, a área pré-frontal também está relacionada com o comportamento emocional.

Entre as principais funções do Sistema Límbico estão a regulação dos processos emocionais, do sistema nervoso autônomo e dos fatores motivacionais essenciais à sobrevivência da espécie e do indivíduo. A figura 3.7 ilustra as estruturas que constituem o sistema límbico.

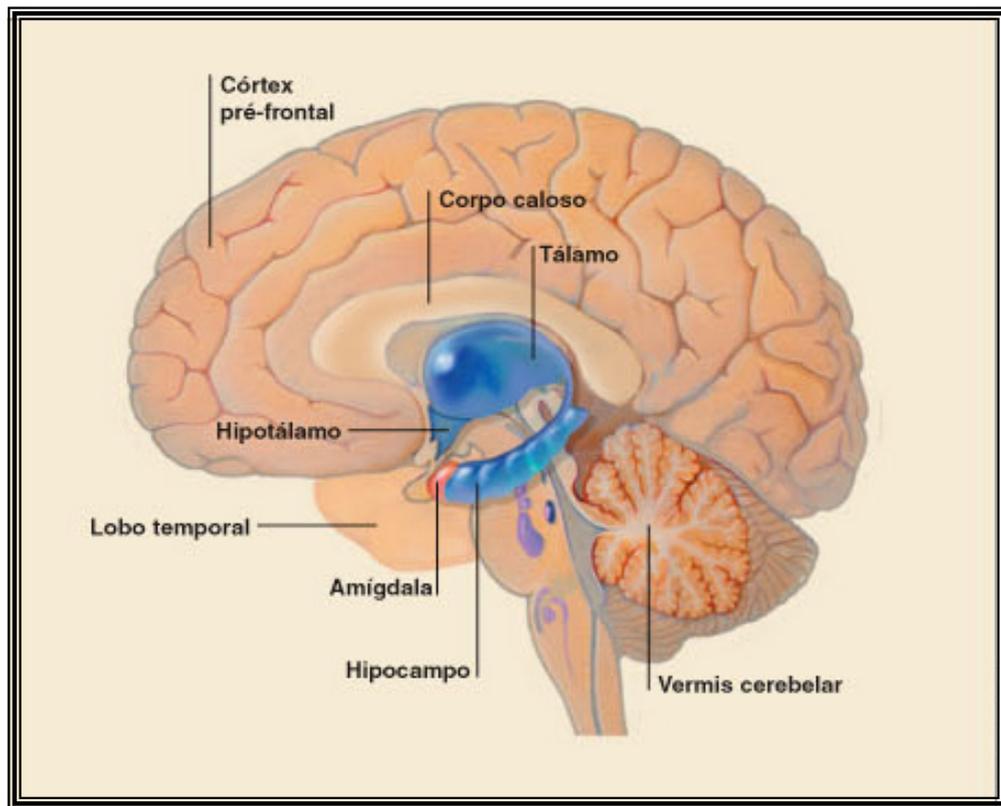


Figura 3.7. Representação das estruturas cerebrais constituintes do sistema límbico [159].

Funções do sistema límbico: comportamento emocional, memória, aprendizado, emoções, vida vegetativa (digestão, circulação, excreção, etc.) [159]. Dentre as estruturas do sistema límbico, destacamos: o hipocampo, a amígdala, o tálamo, o hipotálamo e o córtex pré-frontal.

3.6.2.1. Córtex pré-frontal

A área pré-frontal compreende toda a região anterior não motora do lobo frontal. Ela se desenvolveu muito, durante a evolução dos mamíferos, sendo particularmente extensa no homem e em algumas espécies de golfinhos. Não faz parte do circuito límbico tradicional, mas suas intensas conexões bi-direcionais com o tálamo, amígdala e outras estruturas sub-corticais, explicam o importante papel que desempenha na gênese e, especialmente, na expressão dos estados afetivos. Quando o córtex pré-frontal é

lesado, o indivíduo perde o senso de suas responsabilidades sociais, bem como a capacidade de concentração e de abstração. Quando se praticava a lobotomia pré-frontal, para tratamento de certos distúrbios psiquiátricos, os pacientes entravam em estado de "tamponamento afetivo", não mais evidenciando quaisquer sinais de alegria, tristeza, esperança ou desesperança. Em suas palavras ou atitudes não mais se vislumbravam quaisquer resquícios de afetividade [160].

3.6.2.2. Hipocampo

Qualquer estímulo sensorial causa a estimulação de pelo menos alguma área do hipocampo; desse modo, o hipocampo é uma porta de entrada para o sistema límbico, pois dele saem fibras (pelo fórnix) para o hipotálamo, tálamo e outras estruturas do sistema límbico. Cada parte do hipocampo se relaciona com partes diferentes do sistema límbico para produzir respostas comportamentais diferentes; pequenos estímulos podem hiperexcitar o hipocampo devido a sua formação cortical diferenciada [159].

Está particularmente envolvido com os fenômenos de memória, em especial com a formação da chamada memória de longa duração (aquela que persiste, às vezes, para sempre). Quando ambos os hipocampos (direito e esquerdo) são destruídos, nada mais é gravado na memória. O indivíduo esquece, rapidamente, a mensagem recém recebida. Um hipocampo intacto possibilita ao animal comparar as condições de uma ameaça atual com experiências passadas similares, permitindo-lhe, assim, escolher qual a melhor opção a ser tomada para garantir sua preservação [160].

3.6.2.3. Hipotálamo

O Hipotálamo é composto de várias áreas na base do cérebro. São funções do hipotálamo: regular a temperatura corporal, controle de emoções, da fome, da sede e dos ritmos biológicos [158]. É responsável pelo controle vegetativo e endócrino:

- a) Regulação cardiovascular: responsável pela modificação da pressão arterial e da frequência cardíaca. Esses estímulos são conduzidos para a formação reticular da ponte e bulbo;
- b) Regulação da temperatura: o sangue que passa no hipotálamo determina a temperatura corporal e faz com que o hipotálamo tente regular a temperatura;

- c) Regulação da hídrica: controla de duas formas, estimulando a sede no indivíduo ou retendo a água na urina. Quando os eletrólitos do hipotálamo se tornam mais concentrados essa área é estimulada;
- d) Contração do útero e ejeção do leite: relaciona-se com a produção de ocitocina.
- e) Regulação gastrointestinal: o hipotálamo possui uma área que é o centro da fome e está relacionada com a ingestão de alimentos e saciedade da fome;
- f) Controle sobre a hipófise: o hipotálamo secreta hormônios que atuam como liberadores dos hormônios da hipófise anterior [159].

Estão relacionados com o hipotálamo diversos aspectos da sensibilidade, regulação da homeostase interna do organismo utilizando-se para isso do sistema nervoso autônomo além de necessidades de manutenção da vida e da espécie como a sede, a fome e o sexo.

3.6.2.4. Tálamo

O tálamo consiste de duas massas ovais, cada uma encaixada em um hemisfério cerebral, ligados por uma ponte. Ele contém células nervosas que levam a informação dos quatro sentidos (audição, visão, paladar e tato) para o córtex cerebral. Sensações de dor, temperatura e pressão são também enviadas através do tálamo [159].

Funcionalmente, o tálamo relaciona-se com a sensibilidade, motricidade e comportamento emocional. Ele é responsável também pela codificação, armazenagem e acesso ao arquivo de memória a longo prazo.

Tem sido proposto que lesões na área talâmica provoquem amnésia retrógrada, ou seja, a incapacidade de lembrar de memórias acumuladas nos depósitos de memória a longo prazo, reforçando a idéia de que o tálamo seja o principal responsável por tal acesso [161].

3.6.2.5. Amígdala

Pequena estrutura em forma de amêndoa, situada dentro da região antero-inferior do lobo temporal, se interconecta com o hipocampo, os núcleos septais, a área pré-frontal e o núcleo dorso-medial do tálamo. Essas conexões garantem seu importante desempenho na mediação e controle das atividades emocionais de ordem maior, como

amizade, amor e afeição, nas exteriorizações do humor e, principalmente, nos estados de medo e ira e na agressividade. A amígdala é fundamental para a auto-preservação, por ser o centro identificador do perigo, gerando medo e ansiedade e colocando o animal em situação de alerta, aprontando-se para se evadir ou lutar. A destruição experimental das amígdala (são duas, uma para cada um dos hemisférios cerebrais) faz com que o animal se torne dócil, sexualmente indiscriminativo, afetivamente descaracterizado e indiferente às situações de risco. O estímulo elétrico dessas estruturas provoca crises de violenta agressividade. Em humanos, a lesão da amígdala provoca, dentre outras coisas, com que o indivíduo perca o sentido afetivo da percepção de uma informação vinda de fora, como a visão de uma pessoa conhecida. Ele sabe quem está vendo, mas não sabe se gosta ou desgosta da pessoa em questão [160].

A amígdala é, portanto, a estrutura do sistema límbico que está envolvida diretamente na aquisição do medo condicionado, assim como na sua expressão motora e neuroendócrina [161].

Mantém amplas conexões com o hipotálamo e o restante do sistema límbico. É considerada a janela do sistema límbico, onde se vê o indivíduo no mundo; seu estímulo pode causar alguns efeitos parecidos aos vegetativos do hipotálamo e pode, ao ser estimulada, causar algumas experiência comportamentais como: prazer, raiva, sexualidade e medo. Função global da amígdala: responsável pela percepção semiconsciente; parece padronizar as respostas comportamentais apropriadas para cada ocasião [159].

3.6.3. Cerebelo

O cerebelo encontra-se na fossa posterior do crânio abaixo da tenda do cerebelo, a qual separa o lobo occipital do cérebro, superiormente, do cerebelo inferiormente. É a maior das estruturas que compõem o rombencéfalo.

Quanto aos aspectos funcionais, o cerebelo caracteriza-se por trabalhar de modo inconsciente, estando relacionado com a manutenção do equilíbrio e da postura, controle do tônus muscular, controle dos movimentos voluntários e aprendizagem motora.

3.7. Memória e Aprendizagem

Aprendizado é a aquisição de novas informações ou novos conhecimentos. Ao passo que memória é a retenção da informação aprendida [162].

São três os processos mnemônicos: aquisição, seleção e retenção.

- a) Aquisição – consiste na entrada de um evento qualquer nos sistemas neurais ligados à memória. Por evento, entendemos qualquer coisa memorizável: um objeto, um som, uma emoção, um acontecimento, um pensamento, uma seqüência de movimentos.
- b) Seleção – ocorre durante a aquisição. Como os eventos são geralmente múltiplos e complexos, os sistemas de memória só permitem a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição, mais marcantes para a emoção, mais focalizados pela nossa atenção, mais fortes sensorialmente, ou simplesmente priorizados por critérios desconhecidos.
- c) Retenção – após a aquisição dos aspectos selecionados de um evento, estes são armazenados por algum tempo: às vezes por muitos anos, às vezes por não mais que alguns segundos. Esse é o processo de retenção da memória, durante o qual os aspectos selecionados de cada evento ficam de algum modo disponíveis para ser lembrado. Esquecimento: com o passar do tempo, alguns desses aspectos ou até mesmo todos podem desaparecer da memória – é o esquecimento. A retenção nem sempre é permanente, na maioria das vezes, ela é temporária. [163].

A memória pode ser classificada quanto a diferentes aspectos, por exemplo, quanto ao conteúdo e quanto ao tempo de duração.

Quanto ao conteúdo, as memórias podem ser classificadas como:

- a) Memória declarativa e não-declarativa – a memória declarativa reúne tudo o que só podemos evocar por meio de palavras, por isso o termo declarativa. É a memória para fatos e eventos [162]. - que são aquelas que conseguimos verbalizar, como um fato;
- b) Procedimento - são aquelas memórias que não conseguimos verbalizar. Exemplos: atividades motoras complexas, como dirigir um automóvel, tocar piano, andar de bicicleta, etc.

O aprendizado e a formação desses dois tipos de memória dependem basicamente de diferentes estruturas cerebrais. As memórias de procedimento são menos estudadas, porque parecem ser menos suscetíveis ao esquecimento. Assim, pacientes com dificuldade de lembrar fatos podem, com frequência, não ter dificuldade para dirigir um carro ou andar de bicicleta.

As memórias declarativas, por outro lado, são bastante estudadas e são classificadas quanto ao tempo de duração como: ultra-rápida, de curta e de longa duração.

- a) Memória ultra-rápida – a retenção não dura mais que alguns segundos [162]. Ex: memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que geralmente esquecemos logo após tê-lo digitado. Este tipo de memória não deixa "traços", ou seja, não forma "arquivos"; e parece depender da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal [164].
- b) As memórias de curta duração (que duram poucas horas) e as memórias de longa duração (que duram meses, ou anos), por outro lado, formam "traço" de memória. O período em que ocorre a formação do traço de memória é chamado de período de "consolidação". Durante esse período (que na memória de longa duração corresponde a algumas horas após o aprendizado), a memória é lábil e sensível a vários tratamentos (fármacos e drogas de abuso, por exemplo) ou eventos, como um traumatismo craniano.

Assim, quando sofremos um acidente de carro em uma viagem, é freqüente que esqueçamos não só de como aconteceu o acidente, mas também de eventos que tenham ocorrido alguns minutos antes do mesmo, como uma parada para abastecimento do carro, por exemplo [164].

Há evidências de que formamos memória por mais de um mecanismo bioquímico, dependendo do tipo da memória formada. Além disso, os mecanismos pelos quais formamos a memória de um fato (aprendemos) são diferentes dos mecanismos pelos quais a evocamos (lembramos deste fato).

Experiências em moluscos, camundongos e ratos mostraram que a memória depende, de fato, da síntese protéica, uma vez que a injeção nestes animais de um inibidor deste processo (anisomicina) prejudica o aprendizado e a formação de memória. Isto não significa que codificamos a memória de longa duração em proteínas,

mas que a formação da memória depende de eventos relacionados à síntese protéica, particularmente de proteínas específicas, chamadas "proteínas de adesão celular". Aliás, é de se salientar que a memória de longa duração depende de tal síntese protéica, enquanto que a de curta duração, não.

O aumento na síntese protéica decorre de outras alterações no cérebro, e é apenas uma das modificações cerebrais observadas durante o processo de formação de memória. De fato, alterações na liberação de neurotransmissores (substâncias que fazem a comunicação entre os neurônios) pelos neurônios e na eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas cerebrais, antecedem a alteração da síntese protéica, e parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória.

Um dos principais neurotransmissores liberados pelos neurônios localizados nas estruturas cerebrais envolvidas na formação da memória é o glutamato. O glutamato liberado se liga a receptores específicos, denominados receptores AMPA, NMDA e mRGLU, que estão localizados no neurônio que recebe a informação (neurônio-alvo).

Quando o glutamato se liga a tais receptores, provoca alterações no neurônio-alvo, abrindo canais iônicos e ativando enzimas (proteína quinase A, proteína quinase C, MAP quinase, CREB, etc.), que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese protéica descrita acima, e no aumento na efetividade da transmissão de informações entre estes neurônios e outros neurônios, aos quais o neurônio-alvo se comunica. Tal alteração nas conexões entre os neurônios tem sido denominada "plasticidade sináptica".

Todos esses processos estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato (dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, GABA, poliaminas), que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura (no caso, hipocampo) ou em estruturas adjacentes, como a amígdala. Tal gama de alternativas de modulação permite que o processo de formação de memória seja muito variável, de tal forma que uma maior facilidade ou dificuldade para formar memórias de dados e eventos dependeria, entre outros fatores, do seu significado biológico. Se esse evento fosse de pouca relevância, ele estaria fadado ao esquecimento.

Há que se considerar, também, que a evocação da memória não é tão somente a "reativação" do traço de memória. É freqüente que, quando evocamos uma dada memória, somente parte dela seja restituída, ou podemos confundir pensamentos e associações ligadas diretamente à memória evocada. Assim, o processo de evocação da

memória implica também em uma "reconsolidação" da memória prévia, uma vez que a informação armazenada é modificada durante a sua evocação. Isto avança um pouco o conceito de memória, porque faz com que o traço de memória seja suscetível a transformações. De fato, a memória é extremamente dinâmica, e conforme afirma Dalmaz e Netto *"lembrar implica num processo ativo de reconstrução e não se assemelha a assistir a uma fita de vídeo do passado"*. Enfim, tão dinâmica quanto a própria memória, é a plasticidade cerebral que a acompanha, a qual parece ser o mecanismo pelo qual aprendemos e lembramos [164].

3.7.1. Estrutura envolvida nos processos da memória

A memória recente é armazenada provisoriamente em circuitos envolvendo o hipocampo e o giro para-hipocampal, sendo muito mais fácil de ser perdida que a memória remota. Esta, por sua vez, é armazenada em circuitos corticais da área pré-frontal e dificilmente é perdida. A comunicação entre os circuitos relacionados com a memória recente e a remota se dá através da área entorrinal localizada no giro para-hipocampal.

O hipocampo acompanhado dos corpos mamilares, núcleos anteriores do tálamo, colunas anteriores dos fórnices e núcleos mediais dorsais do tálamo é o conjunto responsável pela gravação da memória a longo prazo.

A formação hipocampal no lobo temporal, parte do sistema límbico, é importante no mecanismo da memória, principalmente para transferir a memória a curto prazo para memória a longo prazo. Essa afirmativa deriva de experiências efetuadas com pessoas que foram submetidas à remoção de ambos os hipocampos (ou de outras estruturas límbicas associadas) e que conseguem manter a memória pré-existente sem nenhuma alteração, desenvolvendo, porém, o fenômeno da amnésia anterógrada, ou seja, incapacidade de formar novas memórias.

O mesmo tipo de amnésia anterógrada foi observado em pacientes que sofreram lesões: 1) dos corpos mamilares; 2) dos núcleos anteriores do tálamo; 3) das colunas anteriores dos fórnices; 4) dos núcleos mediais dorsais do tálamo. Tais observações mostraram que, para se consolidar a memória, todas essas estruturas cerebrais são essenciais e que a falta de uma só delas impossibilita tal processo [161].

3.7.2. Os lobos temporais e o processamento da memória

O lobo temporal localiza-se sob o osso temporal. Os lobos temporais contêm o neocórtex temporal, que pode ser um sítio de armazenamento da memória de longa duração. Também dentro do lobo temporal estão o hipocampo e outras estruturas que são críticas para a formação das memórias declarativas [162].

No lobo temporal medial, um grupo de estruturas interconectadas parece ter grande importância para a consolidação da memória declarativa. As estruturas-chaves são o hipocampo, as áreas corticais próximas: córtex entorrinal, o córtex perirrinal e o córtex para-hipocampal e as vias que conectam essas estruturas com outras partes do cérebro [162].

3.8. Fluorescência de Raios X

A análise multielementar instrumental por **Fluorescência de Raios X**, (*XRF-X-Ray Fluorescence*) é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes de uma amostra, quando devidamente excitados. A figura 3.8 representa uma ilustração dos processos básicos (excitação, produção e detecção dos raios X característicos e a subsequente informação da composição elementar da amostra através da análise do espectro dos raios X característicos) da XRF.

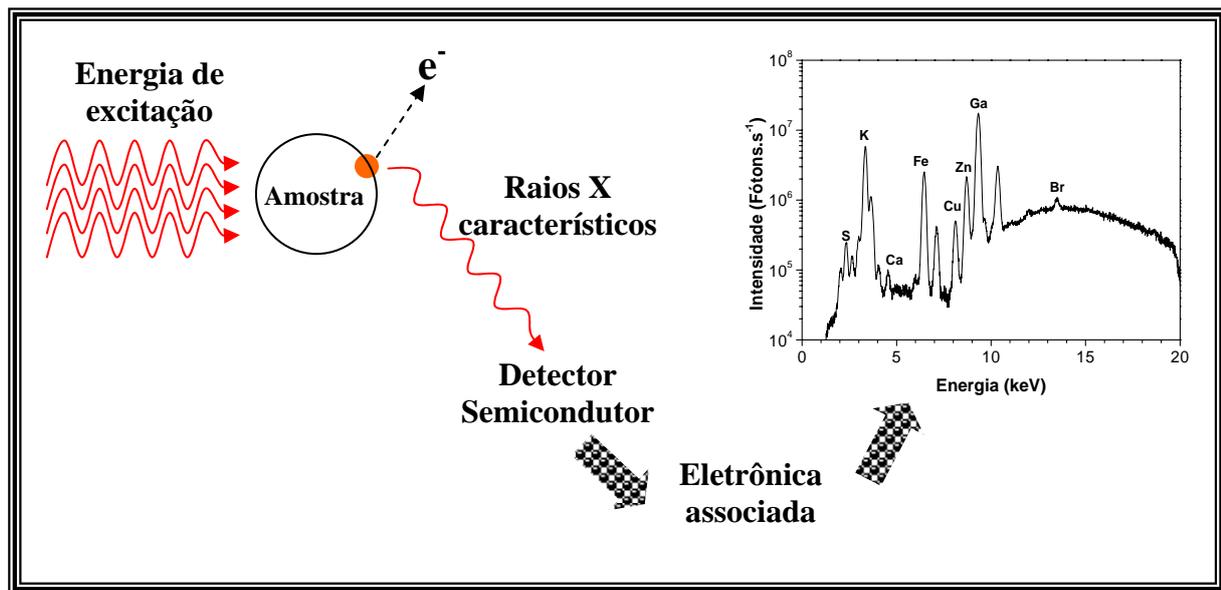


Figura 3.8. Esquema básico da espectroscopia de raios X.

Até 1966 a XRF era realizada unicamente por espectrômetros por **dispersão por comprimento de onda** (WD-XRF, abreviação de *wave-length dispersive X-ray fluorescence*), baseados na lei de Bragg, os quais necessitam de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector [166].

Com o desenvolvimento do detector semicondutor de Si(Li), capaz de discriminar raios X de energias próximas, foi possível o surgimento da fluorescência de raios X por **dispersão de energia** (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), com instrumentação menos dispendiosa e emprego mais prático [167]. Esta técnica vem sendo utilizada principalmente para amostras sólidas, permitindo a determinação simultânea ou seqüencial da concentração de vários elementos, sem a necessidade de destruição da amostra, ou seja, de modo instrumental, sem nenhum pré-tratamento químico. Para amostras líquidas pode-se recorrer a uma pré-concentração, empregando-se troca iônica, precipitação, quelação, etc.

Uma variante da fluorescência de raios X por dispersão de energia, denominada de **Reflexão Total** (TXRF), vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de ng.g^{-1}) em amostras líquidas (da ordem de μL) e em amostras sólidas (μg) precedidas por digestão química [168], em pesquisas relacionadas ao Monitoramento Ambiental, Oceanografia, Biologia, Medicina, Indústria, Mineralogia,

etc. [166].

Em análises quantitativas a ED-XRF, assim como a WD-XRF, tem a desvantagem de requerer métodos para correção do efeito de matriz, como absorção e reforço (*enhancement*) dos raios X característicos, devido às interações entre os elementos componentes da amostra [169].

Dentre as vantagens da XRF na análise química de elementos estão: adaptabilidade para automação, análise rápida multielementar, muito importante devido a interdependência entre os micronutrientes nos sistemas biológicos, preparação simplificada da amostra e limite de detectabilidade dentro do exigido por muitas amostras biológicas [166].

3.9. Fundamentos da Fluorescência de Raios X

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida da intensidade (números de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característico emitidos pelos elementos que constituem uma amostra.

Os raios X emitidos por tubos de raios X, ou raios X ou radiação gama por uma fonte radioativa, excitam os elementos constituintes da amostra, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características do elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.

Quando um átomo é irradiado por um fóton incidente de energia igual ou superior à energia de ligação do elétron de um determinado orbital, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, produzindo uma vacância. Essa configuração caracteriza um desequilíbrio eletrônico. No rearranjo eletrônico um elétron de um orbital mais externo realiza um salto quântico para preencher a vacância oriunda da ejeção do elétron. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X, de energia igual à diferença entre as energias de seu estado inicial e de seu estado final. Esta energia é característica e bem definida para cada elemento, por isso são chamados de raios X característicos. A figura 3.9 ilustra tal mecanismo, para as emissões de raios X característicos.

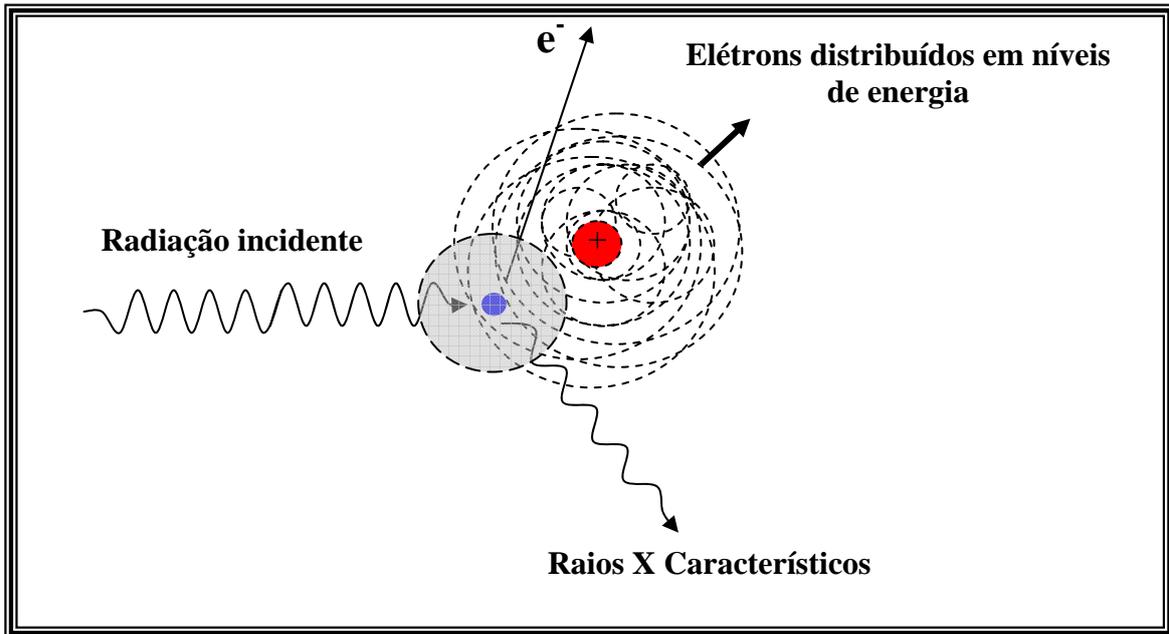


Figura 3.9. Esquema de produção de raios X característicos.

Resumidamente, podemos dizer que a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.

Dois processos físicos são importantes na fluorescência de raios X: efeito fotoelétrico e espalhamentos Compton e Rayleigh. O primeiro influencia positivamente na análise por fluorescência, enquanto que o segundo é um processo físico indesejável, pois aumenta o background espectral. Tais processos encontram-se amplamente discutidos na literatura [171-172].

3.9.1. Excitação dos elementos

A emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem uma amostra pode ser obtida através da excitação por partículas carregadas (elétrons, prótons, partículas alfas e íons) e radiação eletromagnética (Raios X e Radiação Gama). Os raios X podem ser gerados em tubos e através do uso da radiação síncrotron.

Nos processos onde se utilizam elétrons, prótons ou íons, e também máquinas geradoras de raios X, há necessidade de se ter instrumentação eletro-eletrônica capaz de produzir altas diferenças de potencial elétrico (alta tensão), extremamente estáveis, e, portanto são sofisticadas e caras. Quando se empregam fontes radioativas, emissoras de

partículas alfa, beta negativas, raios X ou gama de baixa energia, não há necessidade desse equipamento eletro-eletrônico e são baratas e extremamente compactas, mas tem as desvantagens de requererem blindagem radiológica devido à exposição contínua e de terem intensidades relativamente inferiores às máquinas geradoras de raios X [166].

3.9.2. Energia de Corte de Absorção e Transição Eletrônica

Como mencionado anteriormente, para que ocorra uma transição entre dois estados quânticos é necessário que um elétron seja liberado do átomo. Para que isso ocorra, a energia de excitação mínima deve ser igual ou superior à energia de ligação do elétron ao átomo naquele orbital. Essa energia de ligação eletrônica é também denominada energia de corte de absorção. Por exemplo, para um elétron do nível K, o corte de absorção será E_K . A figura 3.10 representa a energia de ligação (ou corte de absorção) dos elétrons nos níveis K, L e M em função do número atômico.

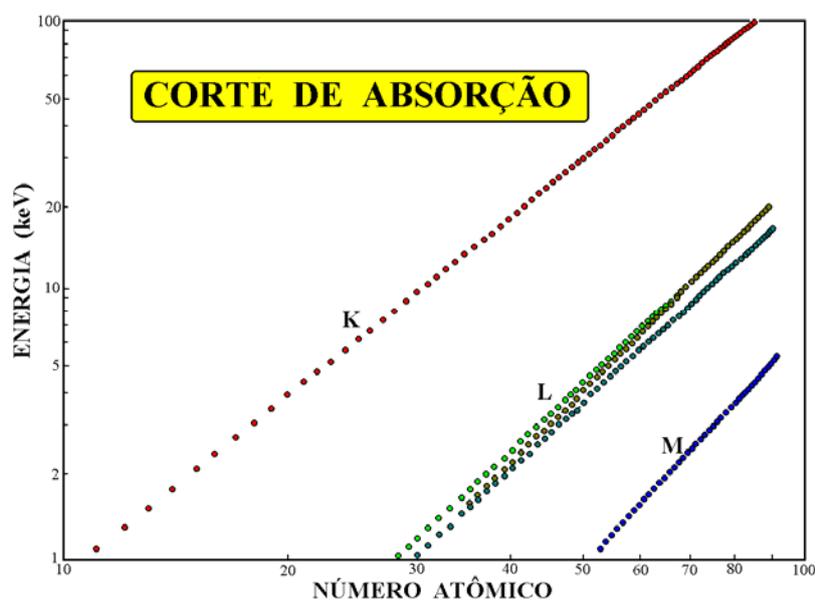


Figura 3.10. Energia de ligação ou corte de absorção dos elétrons nos níveis K, L e M em função do número atômico [165].

Logo, para que ocorra emissão de raios X característicos é necessário que a energia da radiação incidente seja igual ou superior a estas energias críticas.

Em geral, encontramos a denominação de energia crítica de excitação, referindo-se à energia de ligação, visto que essa representa a menor energia que deve ser

necessária para que elétrons possam ser ejetados de um átomo. Nessa condição, o átomo com carência de um ou mais elétrons, passa a um estado instável ou ionizado, a qual é a condição necessária para que se inicie o processo que permite a emissão de raios X característicos.

O cálculo aproximado da energia de ligação dos elétrons dos níveis K e L, dos átomos de um elemento, pode ser obtido através da aplicação da teoria de Bohr para o átomo de hidrogênio, levando-se em conta algumas considerações das experiências de Moseley. Esta energia de ligação pode ser calculada através da equação (3.1).

$$E \cong \frac{m \cdot e^4 (Z - b)^2}{8 \epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (3.1)$$

onde:

E é a energia de ligação do elétron no nível, medida em J;

m é a massa de repouso do elétron, $m = 9,11 \times 10^{-31}$ kg;

e é o valor absoluto da carga elétrica do elétron, $e = 1,60 \times 10^{-19}$ C;

Z é o número atômico do átomo;

b é a constante de Moseley, $b = 1$ (nível K) ou $b = 7,4$ (nível L);

ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo, $\epsilon_0 = 8,8534 \times 10^{-12}$ C.N⁻¹.m⁻²;

h é a constante de Planck, $h = 6,625 \times 10^{-34}$ J.s;

n é o número quântico principal do nível eletrônico.

Substituindo os valores (SI) de m , e , ϵ_0 , e h na equação 3.1, obtemos:

$$E = 2,18 \times 10^{-18} \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (3.2)$$

Reescrevendo a equação 3.2, em termos de elétron-volt, ($1 \text{ eV} = 1,60 \times 10^{-19}$ J), temos que:

$$E = 13,65 \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (3.3)$$

Ao analisarmos as equações (3.1) ou (3.3), verificamos que a energia de ligação, para um dado nível, é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento. Para retirar elétrons do átomo do ferro ($Z = 26$), são necessários 7,114 keV de energia e, para o nível L, desse mesmo elemento, precisamos de 0,723 keV.

Os fótons emitidos (radiação característica) durante a transição eletrônica, realizada no preenchimento da vacância resultante da ejeção do elétron é igual à diferença entre as energias dos estados quânticos envolvidos (estado mais externo para um menos interno). Por exemplo, se ocorrer uma transição de um elétron do nível L_3 para o nível K, por exemplo, o fóton emitido tem uma energia expressa por:

$$E_{K-L_3} = E_K - E_{L_3} \quad (3.4)$$

Nesse tipo de transição, do nível L_3 para o nível K, os fótons emitidos representam emissões da linha ou série K. Para as linhas L, o processo se dá de forma semelhante, sendo a vacância preenchida por elétrons oriundos dos níveis M, N, O etc. O mesmo ocorre para a série M.

Porém, nem todas as transições entre estados quânticos são permitidas. Existem, portanto as seguintes regras de seleção para a variação dos números quânticos.

$$\begin{pmatrix} \Delta l = \pm 1 \\ \Delta j = 0, \pm 1 \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

Somente, transições que satisfazem as regras representadas na equação 3.5, são permitidas. Exemplo: O nível L possui 3 subníveis L_1 , L_2 e L_3 . Apenas as transições K- L_2 e K- L_3 ocorrem. A transição K- L_1 é proibida ($\Delta l = 0$ e $\Delta j = 0$).

As transições entre estados quânticos são representadas em termos de um diagrama de níveis de energia. A Figura 3.11 mostra, esquematicamente, as principais linhas até $n = 4$. A figura 3.12 mostra, esquematicamente, as transições para o átomo de ferro.

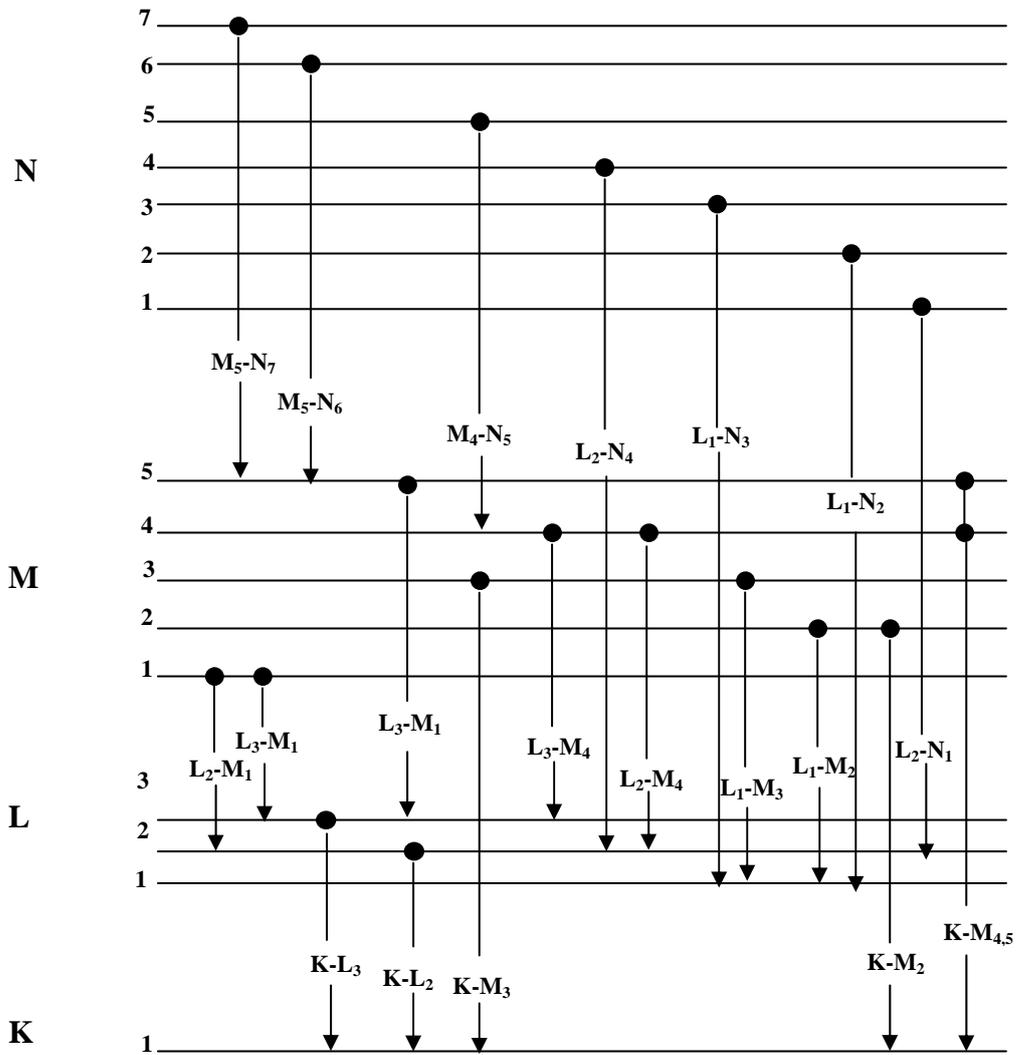


Figura 3.11. Diagrama de energias para as linhas K, L M e N.

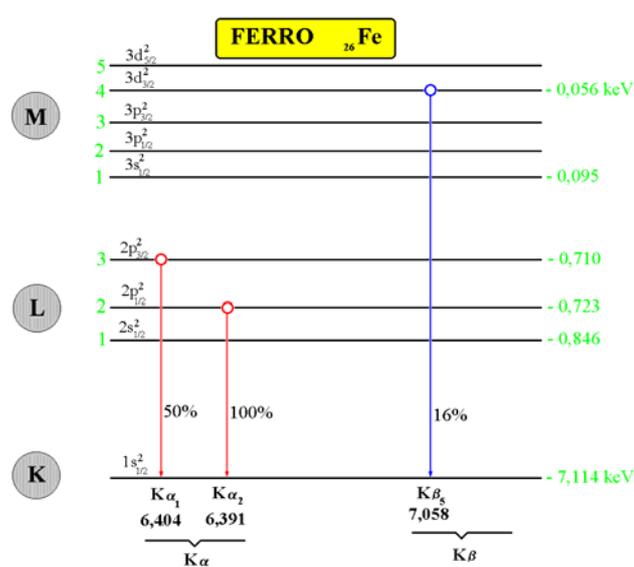


Figura 3.12. Diagrama dos níveis energéticos e intensidades relativas de emissão dos raios X característicos emitidos pelo ferro [165].

Assim, quando um elétron no átomo de ferro salta do sub-nível L_2 para o nível K, há emissão do raio X $K\alpha_2$ de 6,391 keV, enquanto que no salto $L_3 \rightarrow K$ a energia do raio X $K\alpha_1$ seria de 6,404 keV, devendo ainda ser considerado que a transição $L_1 \rightarrow K$ não ocorre, sendo chamada "transição proibida" [166].

A transição $L_3 \rightarrow K$ e a $L_2 \rightarrow K$ tem energias muito próximas, não sendo possível separar esses raios X, mesmo utilizando um detector de alta resolução, como Si(Li). Assim, normalmente essas duas transições são englobadas em uma chamada $K\alpha$, com energia média de 6,40 keV. O mesmo acontece para as energias dos raios X oriundos dos saltos quânticos dos sub-níveis da camada M para a camada K, sendo englobados com a denominação genérica de raios X $K\beta$.

Algumas vezes, os raios X característicos interagem com elétrons mais externos do próprio átomo, e desse modo, ao invés de serem emitidos raios X característicos são emitidos elétrons, denominados elétrons Auger, conforme pode ser visualizado na figura 3.13, de energias também características, base da espectroscopia Auger.

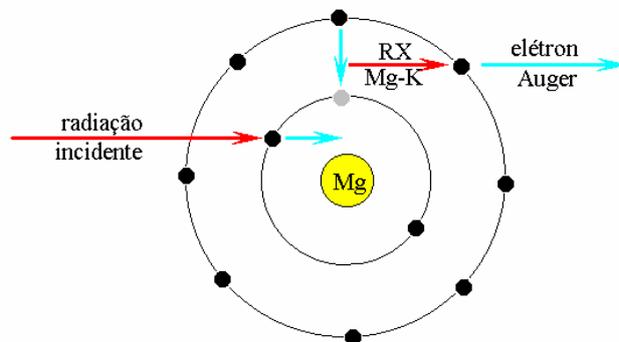


Figura 3.13. Representação esquemática do efeito Auger [166].

O rendimento de fluorescência pode ser definido como sendo o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em uma dada camada, representado na figura 3.14. Nota-se que há um baixo rendimento de fluorescência no nível K para os elementos leves (de número atômico abaixo de 20), no nível L até para os elementos de número atômico 60 e no nível M para praticamente todos os elementos [166].

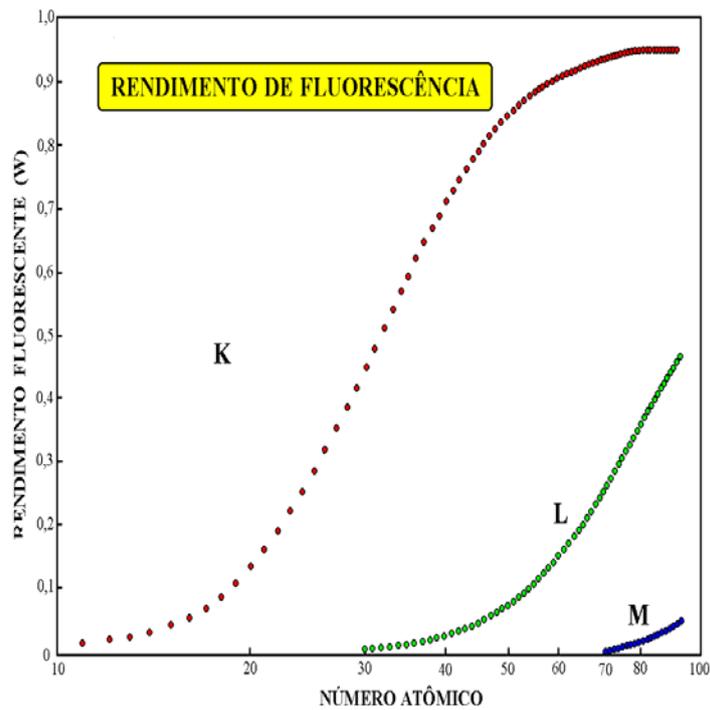


Figura 3.14 - Rendimento da fluorescência das camadas K, L e M em função do número atômico [165].

3.9.3. Radiação Síncrotron

A radiação síncrotron é a radiação eletromagnética emitida por partículas carregadas aceleradas em direção ao centro de uma órbita circular [173]. Estas partículas, ao mudarem sua direção através da ação de dipolos magnéticos, emitem uma intensa radiação eletromagnética, de alto brilho espectral, denominada radiação síncrotron. Dipolo é um eletroímã que curva a trajetória do elétron no acelerador circular. O acelerador do LNLS possui doze dipolos. Cada um deles curva a trajetória dos elétrons em 30 graus. A figura 3.15 mostra a produção de luz síncrotron.

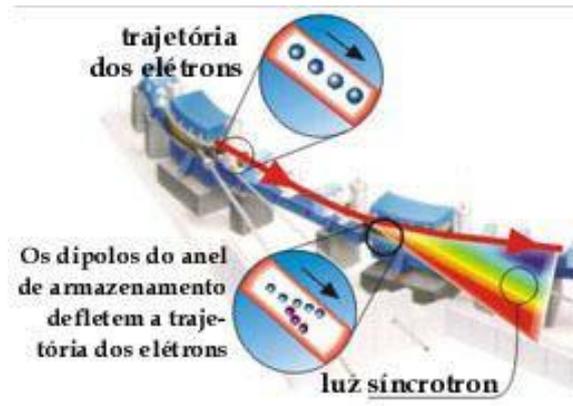


Figura 3.15. Esquema simplificado de produção de luz síncrotron.

As vantagens do uso da radiação síncrotron e seu mecanismo de produção encontram-se detalhadas em Serpa 2002 [174].

A radiação é naturalmente colimada na direção tangencial da órbita dos elétrons com uma divergência angular de aproximadamente 0,1 mrad no plano orbital dos elétrons [174]. A luz é linearmente polarizada – esta propriedade é útil quando se usa um detector do estado sólido, onde o fator limitante é a saturação da taxa de contagem pelo espalhamento da radiação. O espalhamento é minimizado quando a amostra é analisada ao longo da direção de polarização [175].

A baixa divergência vertical permite uma eficiente monocromatização do feixe [20]. Devido ao alto brilho, à energia tunelada, à polarização da radiação paralela ao plano do anel de armazenamento de elétrons e ao baixo depósito de energia na amostra, a radiação síncrotron é uma fonte de excitação bastante atrativa na análise de fluorescência de raios X [176].

A figura 3.16 ilustra o anel de armazenamento de luz síncrotron do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

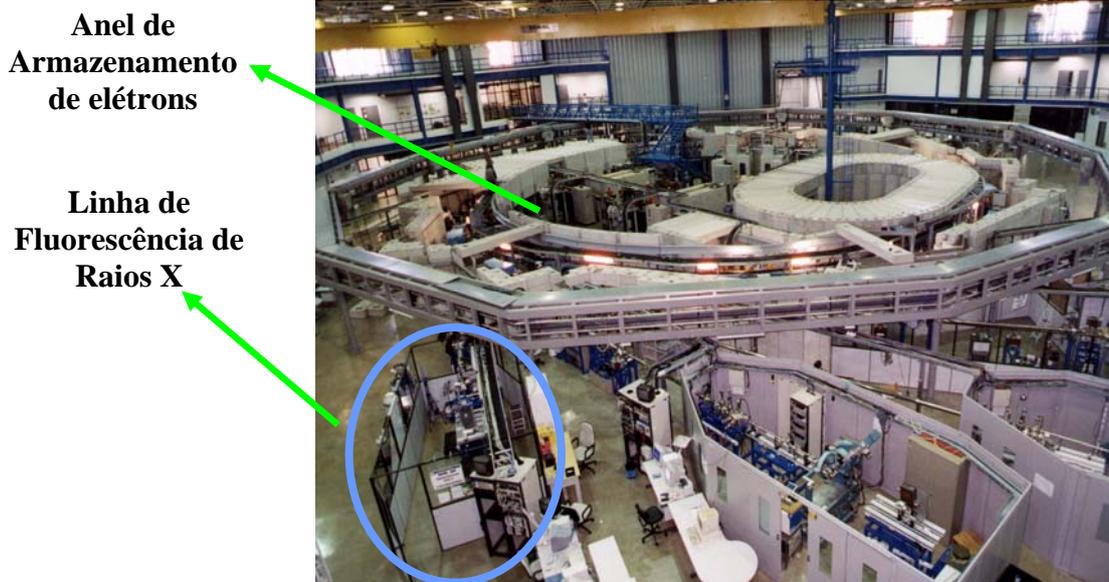


Figura 3.16. Visão aérea do anel de armazenamento de elétrons do laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil.

Através do desenvolvimento da SRXRF em diferentes centros de pesquisa, foi possível perceber que ela possui as seguintes vantagens:

- Alta sensibilidade (1 ng.g^{-1} para fluorescência por dispersão em comprimento de onda e 10 ng.g^{-1} para fluorescência por dispersão em energia);
- Pequena quantidade de amostra necessária para a análise;
- Aplicação multielementar (do Na até os elementos do final da tabela periódica, podem ser medidos, levando em consideração as características do arranjo experimental de cada centro de pesquisa);
- Rápida obtenção de resultados;
- A possibilidade de medidas da distribuição elementar na superfície e volume;
- Várias aplicabilidades: geologia, indústria, medicina, etc [149].

3.10. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (ED-XRF)

Na Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia os raios X são selecionados através dos pulsos eletrônicos produzidos em um detector, estes pulsos são

diretamente proporcionais às energias dos raios X. Em geral utiliza-se detectores semicondutores de Si(Li) ou HP(Ge).

3.11. Microfluorescência de Raios X

Com o advento da radiação síncrotron, foi possível desenvolver novos avanços na aplicação da XRF, principalmente em sistemas biológicos [177]. Dentre esses avanços, a microfluorescência de raios X (μ XRF) vem sendo utilizada no mapeamento elementar em amostras biológicas.

A μ XRF é uma técnica bastante atrativa para análise local e para o mapeamento elementar em vários tipos de materiais [178], sendo uma variante da EDXRF, diferindo principalmente na geometria e nas dimensões do feixe. As principais diferenças entre ela e outras variações da XRF convencional é exatamente sua capacidade de análise espacial, ou seja, é capaz de produzir mapas elementares bidimensionais, a geometria utilizada (em geral 45°/45°), e as dimensões bastante reduzidas do feixe incidente (da ordem de μ m).

Três diferentes tipos de informação podem ser obtidos através da aplicação da μ XRF:

- a) Informação pontual do espectro: a análise pontual fornece uma rápida comparação de materiais heterogêneos os quais são rapidamente analisados através de questões comparativas. Aplica-se na análise de: inclusões, diferenças entre cores, depósitos, fraturas, áreas corrosivas e particulados. A vantagem deste tipo de análise é a capacidade de analisar diretamente uma região específica, isolando espacialmente esta área de interesse. Possui recursos para analisar partículas pequenas e depósitos sem necessidade de preparo da amostra [145].
- b) Perfis: são umas séries de pontos espectrais os quais são, em geral, transversos em uma amostra. É uma análise seqüencial que fornece informação a respeito da homogeneidade da amostra. Perfis podem ser usados para efetuar medidas da distribuição elementar no interior de materiais e possíveis associações que não podem ser determinadas através de um único espectro ou uma análise apenas.

Ela pode ser aplicada em materiais cerâmicos e para verificar a homogeneidade em ligas metálicas [145].

- c) Mapas elementares: É uma combinação de múltiplas linhas. A vantagem de um mapa elementar é analisar a composição de uma superfície inteira. Isto permite analisar a heterogeneidade em macroescala (mm^2 a cm^2). Ele também fornece um impacto visual convergindo em uma significativa quantidade de informações sem a necessidade do uso de extensivas tabelas ou números. Isto é válido quando mapas coloridos são utilizados. As variações nas cores indicam a presença em maior ou menor escala ou a ausência de um elemento na amostra. Na maioria das aplicações não é necessária a quantificação. A análise qualitativa é suficiente para fornecer a informação de homogeneidade da amostra ou associações interelementares. Os mapas elementares são realizados através de varreduras na amostra com um feixe de raios X e pela coleta dos dados em regiões seccionada de energia. A imagem e a intensidade podem ser melhoradas através da aquisição sucessiva de novos quadros que serão somados aos quadros anteriores. Uma imagem pode ser rapidamente adquirida, contudo para elementos em baixas concentrações ou áreas muito grandes, menores taxas de aquisição aumentam o tempo necessário para obter uma imagem razoável. Um compromisso entre a sensibilidade e a velocidade é determinado pelo tempo disponível para resolver o problema [145]. Este trabalho utilizou a capacidade de mapeamento elementar da μXRF .

Para obter um mapeamento elementar, a área de interesse é dividida em elementos [179]. Em cada elemento, é obtido um espectro de fluorescência de raios X. Para um mapa razoável, são necessários no mínimo 1000 pixels. Com um tempo de medida de 10 s por elemento, e dependendo do tamanho da amostra (matriz) e das dimensões do feixe, um tempo total de aproximadamente 3-5 horas é necessário para medir a área. A figura 3.17 esquematiza o mapeamento de uma amostra.

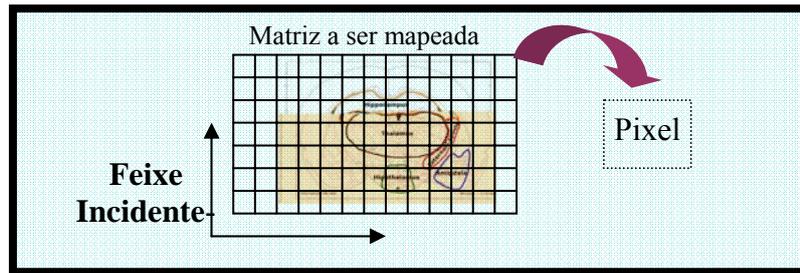


Figura 3.17. Representação esquemática da varredura de uma amostra.

Microsondas de elétrons e prótons também podem ser utilizados para realizar análises de elementos traço com boa resolução. A restrição no uso de microsondas de elétrons em amostras biológicas é o alto limite de detecção e no uso de prótons é a dissipação de energia e o dano térmico na amostra. Isto resulta em uma possível perda de elementos traço devido à volatilização, assim como na redistribuição dos elementos ao longo da amostra [142, 178-179]. Em contrapartida, a μ XRF não danifica a amostra durante a irradiação, sendo este o principal diferencial da μ XRF perante as demais técnicas.

O uso de raios X como fonte de excitação para a radiação característica tem algumas vantagens em relação a outras fontes (elétrons e partículas pesadas carregadas): baixa energia de dissipação e praticamente nenhuma dano térmico na amostra a ser analisada; a amostra pode ser analisada no ar, então não há perda de elementos voláteis, e redução do background, melhorando os limites de detecção [179].

A μ XRF é um poderoso método para análise em amostras biológicas, tendo as seguintes vantagens: limite de detecção é baixo ($0,01 \mu\text{g g}^{-1}$), o tempo de medida é relativamente baixo (alguns segundos em cada ponto), o dano via aquecimento é pequeno em relação ao produzido por elétrons ou íons e a medida pode ser feita tanto no ar como no vácuo [180].

Um dos avanços na μ XRF é baseado na aplicação da radiação síncrotron, a qual é colimada através de sistema de fendas ou colimada e monocromatizada por cristais curvos [178].

Neste trabalho, a microfluorescência foi utilizada para obter o mapeamento de seções coronais de cérebros de ratos Wistar jovens, adultos e idosos e de camundongos transgênicos com a doença de Huntington.

3.11.1. Microfluorescência e outras técnicas analíticas

A maioria dos métodos analíticos como o espectrômetro de massa por íon secundário (SIMS), emissão de raios X induzidos por prótons (μ -PIXE) e microanálise de raios X por elétron (EPXMA) combinam um número de qualidade com uma ou mais propriedades. Isto também se aplica à SRXRF, contudo, a SRXRF também apresenta peculiares combinações de propriedades vantajosas que não são encontradas nestas técnicas. Analogamente à SIMS, a SRXRF é capaz de analisar elementos traço, porém não possui nenhuma desvantagem associada com a destrutividade do espectrômetro de massa. Além disso, o dano que é causado pelo feixe de íon na superfície da amostra, outra significativa desvantagem da SIMS é que as intensidades de íons secundários coletados são muito difíceis de serem quantificadas. A combinação da capacidade de realizar mapeamentos elementares com acurácia e reprodutibilidade de análise quantitativa por XRF torna a SRXRF uma técnica bastante interessante [181].

A fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SRXRF) é um poderoso método para análise de elementos traço. Comparada com outras técnicas similares, como a fluorescência de raios X (XRF) ou PIXE e Microsonda de Elétron (EM), a SRXRF possui as seguintes vantagens reportadas: menor dissipação de energia na amostra para atingir o mesmo limite de detecção; melhoras nos níveis da sensibilidade tanto em amostras espessas quanto em amostras finas; alto fluxo de fótons incidentes comparados com outras fontes de raios X; energia de excitação tunelada e redução do espalhamento devido à polarização [182].

3.12. Análise Quantitativa por EDXRF e μ XRF

A análise quantitativa por EDXRF, assim como por μ XRF requer métodos para correção do efeito matriz, como absorção e reforço (*enhancement*) dos raios X característicos, devido às interações entre os elementos componentes da amostra.

A análise por fluorescência de raios X constitui-se por duas etapas, a primeira consiste apenas na identificação elementar dos componentes presentes em uma amostra. A segunda etapa consiste em uma análise elementar mais profunda da amostra, baseada

na determinação das proporções em que tais elementos se apresentam em um dado objeto de estudo.

Para determinarmos a relação entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração W_i de um elemento i em uma amostra [183, 184], devemos assumir uma amostra homogênea com espessura uniforme D . A intensidade da linha $K\alpha$ de um elemento produzida numa camada dx a uma profundidade x (figura 3.18) é produto de três probabilidades:

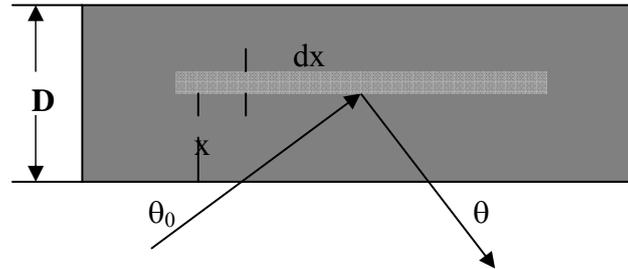


Figura 3.18. Geometria para a análise quantitativa da fluorescência de raios X.

- a) A probabilidade P_1 (Pnível): é a probabilidade da radiação de excitação atingir a camada dx a uma profundidade x :

$$P_1 = e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen} \theta_0} \quad (3.6)$$

onde: μ_0 é o coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) na energia dos fótons incidentes, ρ_0 é a densidade da matriz ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) e θ_0 é o ângulo de incidência entre a direção do feixe incidente e a superfície da amostra.

O valor de μ_0 pode ser calculado como o somatório dos produtos do coeficiente de absorção de massa pela fração em massa de todos os elementos presentes na amostra.

- b) A probabilidade P_2 (linha): é a probabilidade da radiação de excitação produzir uma vacância nos átomos de um elemento de interesse contidos na camada dx , resultando na produção de raios X característicos:

$$P_2 = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx \quad (3.7)$$

onde: τ é o coeficiente de absorção de massa para efeito fotoelétrico do elemento de interesse ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$) na energia de excitação, w é o rendimento de fluorescência da camada K, j é a razão de salto $K \rightarrow L$, f é a fração de fótons K emitidos como raios $K\alpha$ característicos e ρ é a densidade ($\text{g}.\text{cm}^{-3}$).

O coeficiente de absorção para o efeito fotoelétrico exatamente na energia do corte de absorção tem dois valores: um superior, que representa a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas K, L, M, etc., e um inferior, que representa a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas, com exceção da camada K. Assim defini-se razão de salto (*jump ratio*) como a razão entre os valores superior e inferior. Portanto podemos definir essa razão como a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas em relação à probabilidade das camadas L, M, etc.

O segundo termo da equação, $(1-1/j)$, indica a probabilidade de ionização da camada K em relação a todas as camadas K, L, M, etc., e então o termo $\tau.(1-1/j)$ representa o número de ionizações ocorridas na camada K.

Os parâmetros fundamentais τ , w , j e f para um determinado elemento dependem apenas da energia de excitação e podem ser agrupados em um único termo, denominado constante dos **parâmetros fundamentais (K)** e então, a equação pode ser reescrita como:

$$P_2 = K.\rho.dx, \quad (3.8)$$

onde:

$$K = \tau.w.\left(1 - \frac{1}{j}\right).f$$

- c) Probabilidade P3 (fluorescência): é a probabilidade do raio X $K\alpha$ produzido na camada dx não ser absorvido na espessura x e, conseqüentemente atingir o detector, produzindo um pulso eletrônico:

$$P_3 = e^{-\mu.\rho_0.x/\text{sen}\theta} .\mathcal{E} \quad (3.9)$$

onde: μ é o coeficiente de absorção de massa da matriz ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), ε é a eficiência do detector na energia dos fótons característicos e θ é o ângulo de emergência (entre a superfície da amostra e a direção do feixe emergente).

A eficiência do detector pode ser calculada teoricamente mediante as dimensões dos componentes do detector (camadas ativa e morta de Si, camada de ouro, janela de Be, etc.) especificados pelo fabricante, distância entre a amostra e o detector, e condições de excitação (sob ar, vácuo ou hélio).

A intensidade da radiação fluorescente dI produzida pelo elemento i contido na camada dx é o produto das três probabilidades P1, P2 e P3 e do fator de geometria G. Ela pode ser escrita como:

$$dI = \underbrace{G \cdot e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta_0}}_{\text{P1}} \cdot \underbrace{\tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx}_{\text{P2}} \cdot \underbrace{e^{-\mu \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta} \cdot \varepsilon}_{\text{P3}} \quad (3.10)$$

onde: $G = I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2$,

A variável G, denominada fator de geometria, é uma constante de proporcionalidade e depende apenas da geometria do sistema de excitação-deteção, da intensidade da fonte de excitação, e não da concentração elementar.

A equação 3.10 pode ser rescrita como:

$$dI = G \cdot e^{-(\mu_0 / \text{sen}\theta_0 + \mu / \text{sen}\theta) \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho_0 \cdot \varepsilon \cdot dx \quad (3.11)$$

Os coeficientes de absorção de massa para as energias dos feixes incidente (E_0) e emergente (E_i) podem ser agrupados da seguinte forma:

$$\chi_i(E_0, E_i) = \frac{\mu_M(E_0)}{\text{sen}\theta_1} + \frac{\mu_M(E_i)}{\text{sen}\theta_2} \quad (3.12)$$

$\chi_i(E_0, E_i)$ pode ser interpretado como um coeficiente de absorção de massa total.

Podemos reescrever a equação 3.12, fazendo as devidas substituições em seus termos, através daqueles definidos pelas equações 3.9, 3.10 e 3.11, obtendo:

$$dI = G.\varepsilon.K.e^{-\chi.\rho_0.x}.\rho.dx \quad (3.13)$$

A equação 3.13 ao ser integrada em toda a espessura da amostra, fornece a intensidade da radiação fluorescente I (fótons.s⁻¹) emitida por um elemento i , com concentração W_i , na amostra.

$$I_i = G.K_i.\varepsilon_i(E_i).\rho_i.\frac{1 - e^{-\chi_i.\rho_0.D}}{\chi_i.\rho_0} \quad (3.14)$$

onde: $\rho_0.D$ é a densidade superficial de massa da amostra, medida em g /cm²;

$\frac{\rho_i}{\rho_0} = W_i$ é a concentração do elemento i na amostra, medida em µg/g ou em g/kg,

ou seja, a concentração fracional do elemento em base de massa. Sendo assim:

$$I = G.\varepsilon.K.W.\frac{1 - e^{-\chi.\rho_0.D}}{\chi} \quad (3.15)$$

O produto que envolve os parâmetros fundamentais K_i , a geometria do arranjo experimental G e a eficiência da detecção $\varepsilon_i(E_i)$ representam a **sensibilidade do espectrômetro de raios X** para o elemento i na amostra, sendo representado por S_i .

$$S_i = G.K_i.\varepsilon_i(E_i) \quad (3.16)$$

A partir desse novo termo, apresentado na equação 3.16, podemos reescrever a equação 3.15:

$$I_i = S_i.W_i.\frac{1 - e^{-\chi_i.\rho_0.D}}{\chi_i} \quad (3.17)$$

A razão apresentada na equação é denominada **fator de absorção A** para o elemento i na amostra:

$$A = \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i} \quad (3.18)$$

Então podemos reescrever a equação de uma maneira simplificada:

$$I_i = S_i * W_i * A(E_0, E_i) \quad (3.19)$$

Fica claro, a partir da equação 3.19, que a determinação da concentração de um dado elemento i em uma amostra, pode ser efetuada através da medida da intensidade da radiação fluorescente, do conhecimento da curva de sensibilidade do sistema e da absorção da radiação na amostra.

Devemos ainda considerar, quando observamos a equação 3.19, duas possibilidades, em relação à absorção da amostra. Podemos ter amostras com absorção total muito grande ou, pelo contrário, amostras com pequena absorção total. Passemos a análise desses dois casos.

3.12.1. Amostras com absorção total muito grande

Quando a absorção da radiação é muito grande, o termo $\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D$ tende para valores muito altos, com isso,

$$\lim_{\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D \rightarrow \infty} A(E_0, E_i) = \frac{1}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (3.20)$$

Nesse caso, I_i assumiria a seguinte forma:

$$I_i = \frac{S_i \cdot W_i}{\chi_i(E_0, E_i)} \quad (3.21)$$

A equação 3.21 foi utilizada no cálculo da concentração elementar nas amostras de cérebro.

3.12.2. Amostras com absorção total muito pequena

Sendo a absorção total na amostra muito pequena, o termo $\text{EXP} [-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D]$, da equação 3.15 pode ser expandido por uma série de potências. Chamando de u o expoente da base e ($u = -\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D$), fazamos o desenvolvimento citado:

$$\text{EXP}(u) = 1 - u + \frac{u^2}{2!} + \frac{u^3}{3!} + \dots + \frac{u^n}{n!} \quad (3.22)$$

Substituindo o resultado obtido na equação 3.22, obteremos:

$$A(E_0, E_i) = (\rho_M \cdot D) \left[1 + \frac{(\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)}{2!} - \frac{(\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)^2}{3!} + \dots + \frac{(\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)^{n-1}}{n!} \right] \quad (3.23)$$

Para pequenos valores de absorção na amostra, o termo $\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D$ tende ao seguinte valor:

$$\lim_{\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D \rightarrow 0} A(E_0, E_i) = \rho_M \cdot D \quad (3.24)$$

De tal modo que a expressão para o cálculo de I_i , para esse caso, assume a seguinte forma:

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot \rho_M \cdot D \quad (3.25)$$

A equação 3.25 nos mostra que em “amostras finas”, onde a absorção da radiação é muito pequena, a intensidade da radiação fluorescente depende apenas da concentração elementar e da densidade superficial de massa da amostra.

O produto $\underline{W_i \cdot \rho_M \cdot D}$ representa a densidade superficial de massa elementar.

3.13. Métodos de correção dos efeitos da absorção nas amostras

As correções dos efeitos de absorção da radiação nas amostras não podem ser realizadas através de métodos analíticos, uma vez que não conhecemos, a princípio, suas concentrações elementares. Devido a isso, métodos semi-empíricos, tais como o método da transmissão-emissão, o método da razão entre os espalhamentos coerente e incoerente e o método da transmissão da radiação vêm sendo desenvolvido por vários pesquisadores [185], com a finalidade de avaliar e corrigir tais efeitos.

3.13.1. Método de transmissão da radiação

O método da transmissão da radiação foi desenvolvido por ANJOS [186], consistindo em uma variação do método da emissão-transmissão. Foi o método adotado neste trabalho para efetuar as correções de absorção nas amostras de cérebro.

Este método assume que a absorção da radiação na amostra pode ser representada por uma função potência, dada por [187]:

$$\mu_M(E) = A.E^B \quad (3.26)$$

Vale ressaltar que esta suposição é válida apenas para amostras cujas concentrações elementares estão em níveis de traços ou não apresentam acentuada descontinuidade na curva de absorção da radiação.

Reescrevendo a equação 3.26 usando logaritmo, obtemos:

$$\ln |\mu_M(E)| = \ln |A| + B.\ln |E| \quad (3.27)$$

A equação 3.27 é uma função do tipo $y = f(E)$, do primeiro grau, cuja representação cartesiana é uma reta. Assim sendo, seu coeficiente angular é o termo B e seu coeficiente linear é igual a $\ln(A)$. A energia E da radiação incidente representa a variável dessa função. Estimados os valores das constantes A e B, determinamos a curva de absorção da radiação da amostra.

A determinação dos valores de A e B se realiza, experimentalmente, através de medidas de transmissão para algumas energias, sendo os valores de $\mu_M(E)$ obtidos pela relação:

$$\mu_{i,M}(E) = \frac{1}{\rho \cdot D} \cdot \left(\ln \left| \frac{I_0}{I_i} \right| \right) \quad (3.28)$$

onde: I_0 é a intensidade da radiação sem a amostra e I_i é a intensidade da radiação transmitida na amostra, emitida por um elemento i de um alvo multi-elementar.

As medidas de transmissão se realizam usando-se os raios X característicos emitidos pelos elementos de um alvo multi-elementar. A Figura 3.19 ilustra um esquema do arranjo experimental utilizado no método (de transmissão) para a correção dos efeitos de absorção na amostra.

Os valores de $\mu_M(E)$, obtidos experimentalmente, são ajustados a uma reta por meio do método dos mínimos quadrados, ficando assim determinados os valores de A e B, apresentados na equação 3.26. Em consequência disso, a curva de absorção da amostra fica caracterizada.

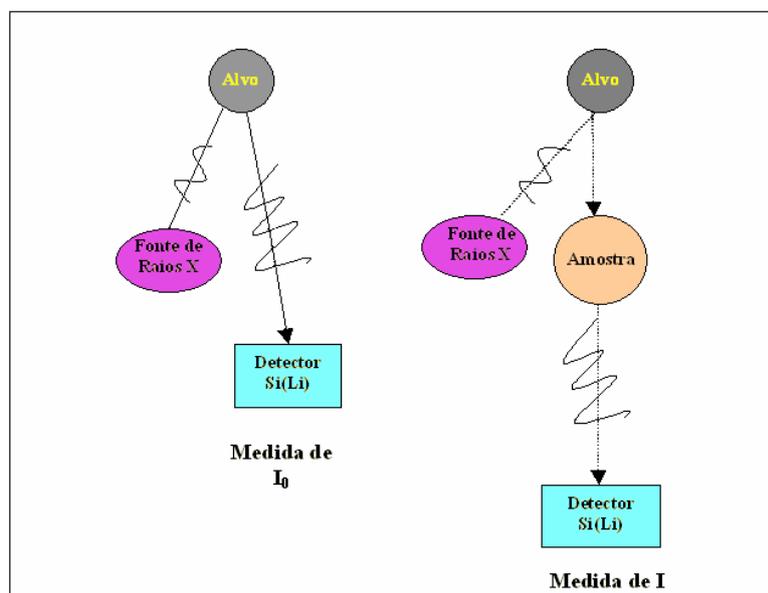


Figura 3.19. Geometria usada no método de transmissão: (a) Medidas de I_0 ; (b) Medidas de I .

3.14. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

Em 1971, Yoneda e Horiuchi reportaram o potencial dessa técnica para análise química, porém ela foi desenvolvida por Aiginger e Wobrauscheck. O primeiro espectrômetro de TXRF foi construído em 1977. Devido a contínuos aperfeiçoamentos na instrumentação e metodologia da TXRF, diversificadas aplicações vêm sendo encontradas na literatura científica: análise de superfícies de semicondutores, estudos ambientais, investigações mineralógicas, oceanografia, medicina, dentre outras [168].

A radiação síncrotron combinada com a técnica de TXRF proporcionou um aumento de 8-12 vezes no brilho do feixe de elétrons comparando-se com tubos de raios X convencionais, além de reduzir o limite de detecção da TXRF [147].

A TXRF como o próprio nome sugere é baseada no fenômeno físico da reflexão total. É uma técnica de energia dispersiva, sendo a excitação da amostra efetuada pela incidência de um feixe sob um ângulo de aproximadamente 1 mrad, para o caso do refletor ser o lucite. Esse ângulo é denominado por ângulo crítico do material refletor. Portanto, podemos dizer que a TXRF é uma variante da EDXRF com excitação sob as condições da reflexão total [188].

O efeito da reflexão total é aplicado para minimizar a intensidade da radiação de fundo e intensificar o sinal de fluorescência. A radiação de fundo baixa resulta, principalmente, da menor profundidade de penetração com ângulos inferiores ao ângulo crítico de reflexão total [188].

Além disso, outra característica marcante da TXRF é a distância pequena entre a amostra e o detector, de apenas alguns milímetros, resultando em um ângulo grande, obtendo dessa forma, a detecção eficiente do sinal de fluorescência proveniente da amostra.

Podemos destacar então, que a principal diferença entre a EDXRF e a TXRF consiste na geometria de excitação utilizada. Na EDXRF a radiação é espalhada na amostra, resultando em um aumento do contínuo no espectro da radiação característica detectada. Na TXRF, por utilizar-se um feixe rasante, não há espalhamento na amostra, reduzindo assim a radiação de fundo, e, conseqüentemente melhorando os limites de detecção [168]. Esta técnica foi desenvolvida principalmente para amostras líquidas, sendo possível também analisar amostras sólidas, desde que estas sejam precedidas por digestão química em meio ácido. Outra característica importante na TXRF é a espessura da amostra. Ela é considerada como um fino filme, o que permite desprezar os efeitos

da absorção e reforço da radiação (presentes na fluorescência de Raios X convencional), simplificando, dessa forma, o cálculo da concentração elementar. Sendo este obtido através de uma relação linear entre a intensidade dos raios X característicos emitidos pelo elemento i e a sensibilidade.

3.14.1. Aplicações

A TXRF vem sendo utilizada em múltiplas áreas científicas, principalmente devido a três vantagens: capacidade multielementar, baixo limite de detecção, e pequeno volume de amostragem [168]. A seguir seguem-se algumas áreas de aplicação:

Aplicações industriais: controle de qualidade, ciências forenses e arqueologia, análise de materiais inorgânicos, pigmentos, fibras têxteis, etc.

Aplicações ambientais: análise de águas - de chuva, de rio, do mar, plantas e amostras geológicas.

Aplicações médicas: sangue como um todo, soro, tecidos, cabelos, dentes, etc. [168].

Utilizamos esta técnica, nesse estudo, para calcularmos as concentrações elementares em regiões cerebrais do rato.

3.15. Análise Quantitativa por TXRF

As amostras devem ser convertidas em soluções, suspensões, finos padrões ou finos filmes para a análise. Os vários passos envolvidos na análise são: preparação das amostras, registro e interpretação do espectro ou identificação dos picos, cálculo da intensidade e finalmente a quantificação da concentração elementar [168]. Uma das principais vantagens da TXRF é a pequena quantidade de amostra necessária, microlitros para amostras líquidas e microgramas para amostras sólidas após digestão química. Por este motivo, a amostra pode ser considerada um filme fino e os efeitos de absorção podem ser desprezados. Nesse caso, a concentração elementar é determinada através de uma relação entre a intensidade da radiação fluorescente de um determinado elemento i , a sensibilidade do sistema de espectrometria para este elemento, o

coeficiente de reflexão do refletor e a transmissão da radiação no ar é dado através da equação 3.29.

$$I_i(\alpha) = K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i \cdot [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar} \quad (3.29)$$

onde: K é uma constante que depende apenas de fatores geométricos; I_o é a intensidade da radiação incidente; S_i é a sensibilidade para o elemento i na amostra; W_i é a concentração do elemento i; T_{ar} é a absorção da radiação no ar para o feixe incidente e o feixe de radiação fluorescente, $R(\alpha)$ é o coeficiente de reflexão do material utilizado como refletor para a energia da radiação incidente e α o ângulo de incidência da radiação.

Na TXRF, em geral, a quantificação é realizada através do método da adição do padrão interno [170]. Este método é baseado na adição de um elemento que a amostra não apresenta, como por exemplo, o gálio. Isto é utilizado porque o fino filme formado no suporte refletor não possui uma geometria regular e as intensidades dos raios X dependem da posição do filme fino. Este efeito de geometria pode ser corrigido normalizando-se cada linha elementar de raios-X pelo padrão interno [188] adicionado em todas as amostras e padrões. Desta forma, a equação 3.29, pode ser escrita da seguinte forma em relação a um padrão com intensidade I_S .

$$\frac{I_i}{I_S} = \frac{K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}{K \cdot I_o \cdot S_S \cdot W_S [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}} \quad (3.30)$$

onde: I_i e W_i são a intensidade da radiação fluorescente e a concentração do elemento i na amostra; I_S e W_S a intensidade da radiação fluorescente e a concentração do padrão interno na amostra; S_i e S_S são as sensibilidades para o elemento i e para o padrão interno, logo:

$$\frac{I_i}{I_S} \cdot W_S = \frac{S_i}{S_S} \cdot W_i \quad (3.31)$$

A equação 3.30 pode ainda ser escrita como:

$$I_{r,i} = S_{r,i} \cdot W_i \quad (3.32)$$

onde: $I_{r,i}$ é chamado de intensidade relativa $\left(\frac{I_i}{I_S} \cdot W_S \right)$ e $S_{r,i}$ sua sensibilidade relativa $\left(\frac{S_i}{S_S} \right)$.

A relação 3.32 é a equação básica da TXRF quando se utiliza um padrão interno. Ela mostra uma relação linear bastante simples entre a intensidade relativa e a concentração de um elemento i . Na prática, o parâmetro que se deseja determinar é a concentração elementar W_i . A intensidade relativa é obtida experimentalmente e a sensibilidade relativa é obtida através de padrões multielementares, com concentrações conhecidas.

3.16. O Limite de Detecção em TXRF

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida. A figura. 3.20 mostra, esquematicamente, um espectro em energia com um único pico de fluorescência de raios X, onde, N_L é a contagem líquida e N_B é a contagem relativa ao *background*.

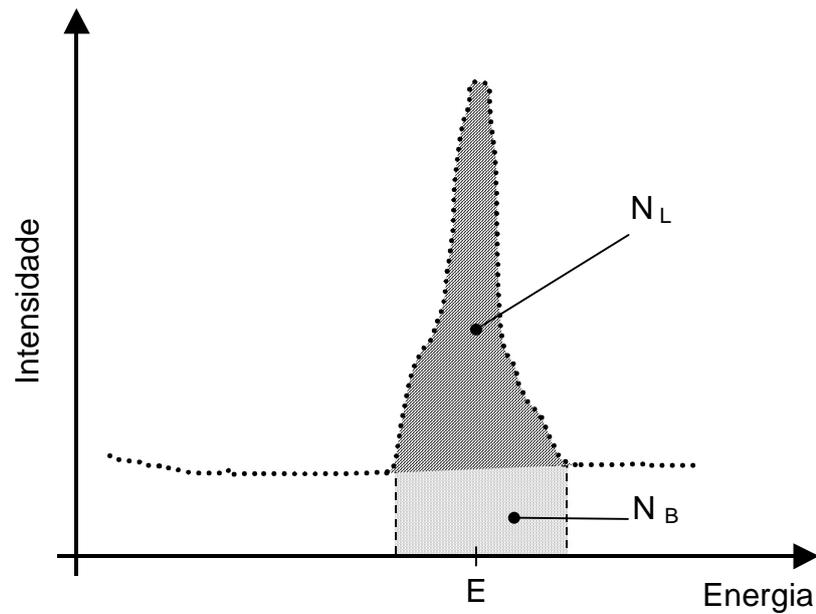


Figura 3.20. Representação Esquemática de um espectro em energia para um pico de fluorescência de raios X.

O limite de detecção (LD) é obtido a partir da equação 3.33 [194], sendo ele extrapolado em um tempo de medida de 1000 s.

$$LD = 3 \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \frac{C_{Ga}}{I_{Ga} S_i} \quad (3.33)$$

onde: $I_i(BG)$ é a intensidade do *background* por unidade de tempo (fótons/s); I_{Ga} é a intensidade da radiação fluorescente relativa ao padrão interno (fótons/s), gálio (Ga); C_{Ga} a concentração do padrão interno; S_i a sensibilidade relativa (adimensional) para o elemento i e t o tempo de medida. Normalmente, o limite de detecção é determinado para alguns elementos e depois por extrapolação (curva do limite de detecção) determina-se o limite de detecção para os elementos de interesse. O limite de detecção em TXRF é da ordem de $ng.g^{-1}$.

Neste capítulo descreveremos todo o processo de preparação das amostras tanto para a análise por microfluorescência de Raios X como por Reflexão Total, assim como as características da instrumentação do sistema para ambas as técnicas. Além disso, também será detalhado o teste comportamental realizado nos ratos idosos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Microfluorescência de Raios X

4.1.1. Preparação das amostras

O primeiro e o passo mais importante para qualquer análise biomédica é preservar a integridade da amostra [189]. A maioria dos tecidos dos mamíferos são macios, logo, na maioria das vezes necessitam de fixação antes do seccionamento. Contudo, qualquer fixador, como por exemplo, glutaraldeído ou álcool, eventualmente irá alterar a distribuição dos elementos traço no tecido através da retirada, inclusão ou até mesmo a modificação regional dos elementos traço. A criofixação, onde os tecidos e as células são rapidamente congelados, mantendo dessa maneira sua integridade, é considerada a melhor forma de preparação das amostras tanto para estudos morfológicos de alta resolução quanto para estudos analíticos no qual a medida das concentrações elementares é o objeto de estudo [189].

Na criofixação, para evitar a formação de cristais de gelo, muitos autores empregam o congelamento em algum criolíquido, como por exemplo, o isopentano [23], que também foi utilizado neste trabalho.

4.1.2. Amostragem

Todos os animais utilizados nesse estudo foram sacrificados por decapitação. A manipulação e o sacrifício dos animais seguiram as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e aprovadas pela comissão de uso de animais experimentais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Os tecidos moles, os ossos e os músculos da caixa craniana foram retirados com o auxílio de um alicate, removendo rapidamente e com cautela o cérebro. Em seguida, o cérebro foi imerso em isopentano sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

4.1.2.1. Ratos Wistar

Foram utilizados ratos albinos de linhagem Wistar de ambos os sexos, provenientes do biotério de roedores do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, alimentados com dieta normal e água *ad libitum*, em condições normais de temperatura e pressão.

4.1.2.2. Camundongos Transgênicos

Os camundongos com a doença de Huntington foram obtidos no laboratório de histologia animal do departamento de Histologia e Embriologia - UFRJ.

A doença de Huntington é causada pela expansão de um trinucleotídeo (CAG), acima de 37 unidades, no pequeno braço do cromossomo 4. O modelo utilizado neste trabalho foi o R6/2, o qual desenvolve um progressivo fenótipo neurológico [190]. O R6/2 em camundongos é transgênico para o exon 1 de gen humano com Huntington com mais do que 150 CAG repetidos nas condições de desenvolvimento da doença [190-191]. O camundongo desenvolve um movimento de desordem similar ao de HD aos 2 meses de idade, aproximadamente. A partir de então, a doença progride rapidamente [191].

Após todo esse período, os animais foram sacrificados de maneira análoga aos ratos Wistar.

4.1.3. Cortes Coronais

As secções coronais (ratos wistar e camundongos transgênicos), com 2 mm de espessura, foram obtidas posicionando o cérebro em um micrótomo manual, colocado no interior do criostato, a uma temperatura de -25°C . A seguir estes cortes foram colocados sobre uma placa de vidro revestida, na parte inferior, com um filme de PVC, e liofilizadas a baixa temperatura durante aproximadamente dois dias. As principais regiões do cérebro analisadas nesta secção foram o hipocampo, o córtex, tálamo e hipotálamo. A figura 4.1 ilustra o plano de corte realizado neste estudo.

A figura 4.2 ilustra a liofilização das amostras, e os componentes do liofilizador: bomba de vácuo e nitrogênio líquido. Ao final deste processo as amostras foram fixadas em resina para efetuar as medidas por microfluorescência de raios X.

O micrótomo manual encontra-se ilustrado na figura 4.3 e subseqüentemente na figura 4.3b é mostrado um corte coronal do encéfalo do rato wistar.

Todavia, a região estudada nos camundongos transgênicos difere da anterior, uma vez que para o estudo da doença de Huntigton, a região primariamente lesionada é o corpo estriado.

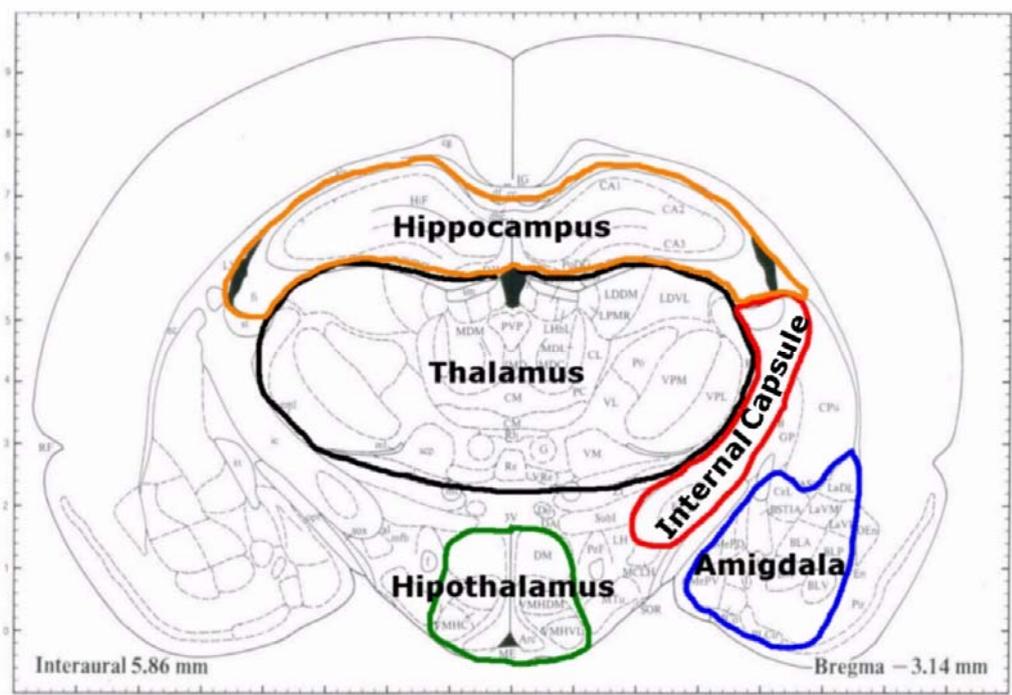


Figura 4.1. Mapa de orientação de corte da secção cerebral obtida nos ratos Wistar.



Figura 4.2. Equipamento para liofilização - LIN/UFRJ.

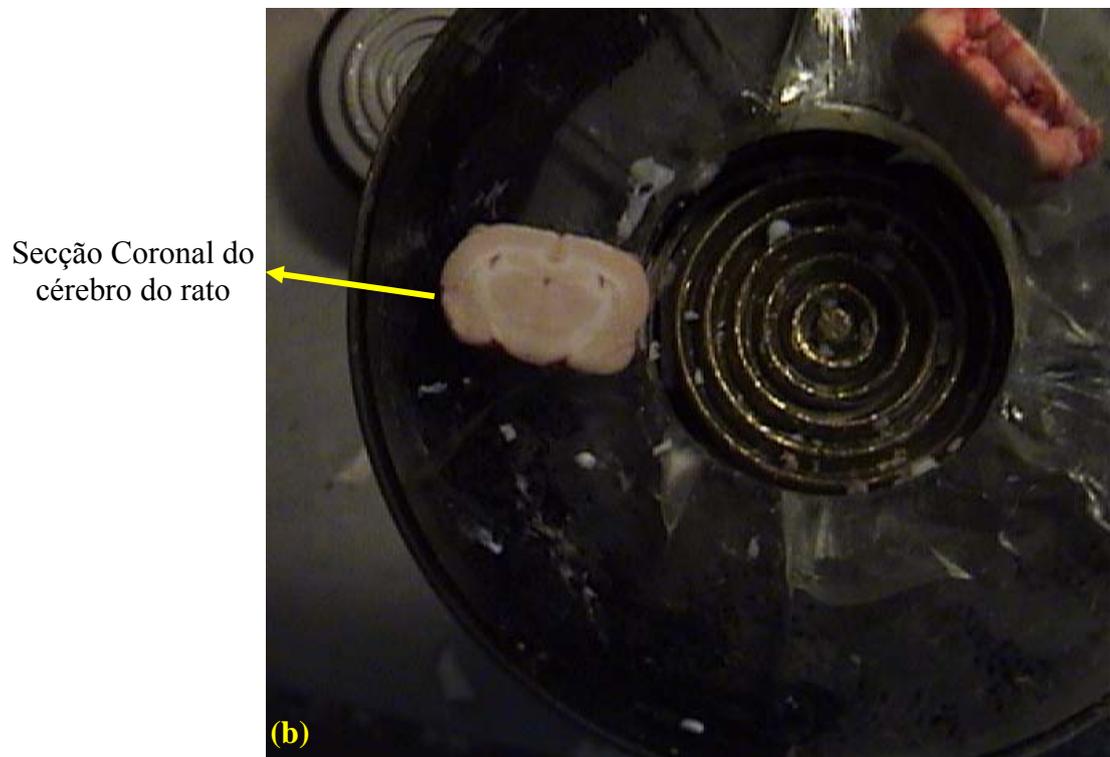
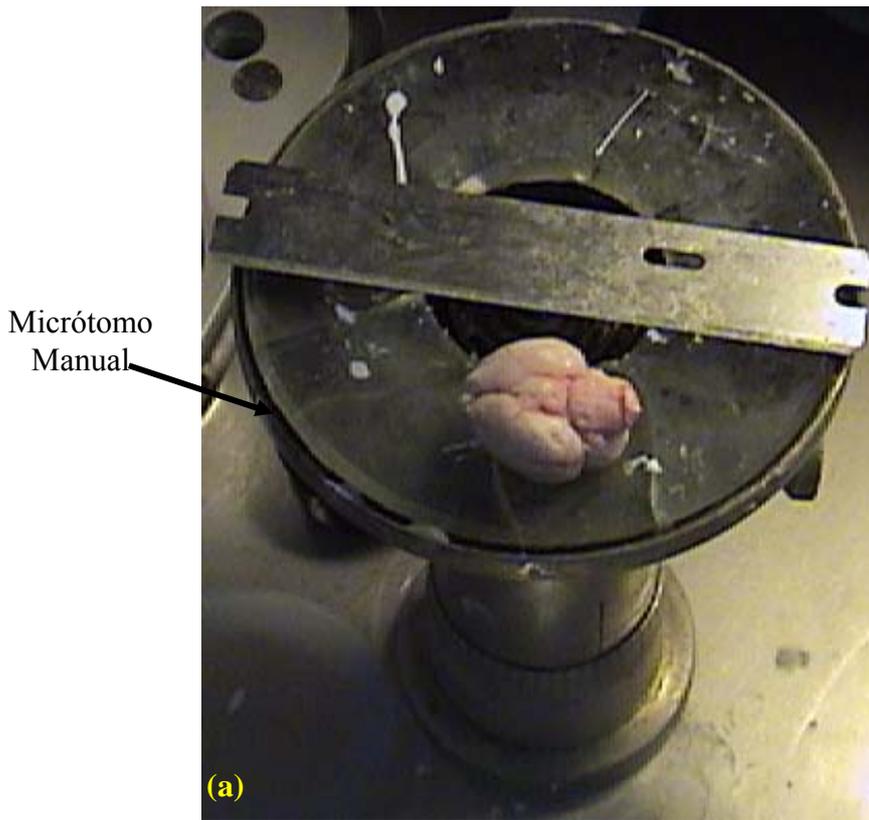


Figura 4.3. (a) Micrótomo manual. (b) Secção coronal do encéfalo do rato Wistar.

4.1.4. Instrumentação

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de Raios X (D09-XRF) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, Brasil). As amostras foram posicionadas no plano de imagem com uma acurácia de 0,5 μm com os três eixos (X, Y, Z) controlados por motor de passo. O suporte é posicionado a 45° em relação ao detector e ao feixe incidente, em um posicionamento também conhecido como geometria 45°/45°.

Utilizou-se um feixe branco de radiação para excitar as amostras, com dimensões de 300 μm tanto na horizontal quanto na vertical, obtido através de um sistema convencional de colimação com fendas. As amostras foram mapeadas, então, com passos de 300 μm (H) por 300 μm (V), ou seja, a cada 0,3 mm tanto na horizontal quanto na vertical correspondendo a um pixel. O tempo de contagem para cada pixel foi de 10 s.

Os raios X característicos produzidos em cada pixel foram detectados por um detector de Si (Li) com resolução de 165 eV em 5,9 keV posicionado a 90° em relação ao feixe incidente, no plano orbital dos elétrons, com o intuito de minimizar o background espectral, uma vez que o número de raios X espalhados no detector é minimizado nessa posição [19].

Os espectros, gravados por um sistema Multicanal-Camberra, foram analisados através do programa Axil [192], com o propósito de corrigir o background espectral e ajustar as linhas dos raios X característicos. Os mapas bidimensionais foram obtidos após a normalização das intensidades dos raios X característicos pelo valor da câmara de ionização, que mede a intensidade da corrente do anel. A figura 4.4 ilustra o arranjo experimental da Microfluorescência de Raios X

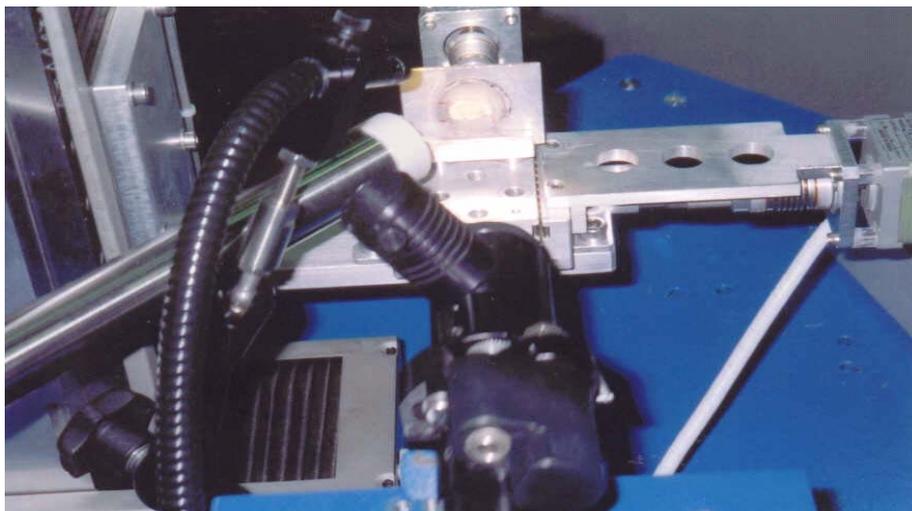


Figura 4.4. Arranjo Experimental da microfluorescência de raios X.

4.1.5. Concentração Elementar

Consideremos uma amostra de tamanho igual a 15 x 9 mm, e o tamanho do feixe tanto na vertical como na horizontal de aproximadamente 300 μm , então teremos uma matriz de 50 x 30, obtendo um total de 1500 espectros. Devido ao excessivo número de espectros para cada amostra analisada, utilizou-se um programa, desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN), no cálculo da concentração. Este programa utiliza os seguintes parâmetros: dados do espectro da radiação incidente na amostra, os valores das sensibilidades para as linhas K e L, valores da absorção, os dados de geometria do sistema – o valor dos ângulos de incidência e de emergência, fator de diluição e a densidade da amostra. Posteriormente, utilizamos um outro programa, também desenvolvido no LIN, para converter os valores de concentração em mapas bidimensionais.

4.2. Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

4.2.1. Preparação das amostras

4.2.1.1. Ratos Wistar

O condicionamento dos animais assim como o sacrifício dos mesmos foram feitos de maneira análoga aos utilizados para as medidas de microfluorescência.

Nesta etapa do trabalho, dividimos os ratos Wistar em dois grupos: fêmeas (n = 15) de 2, 8 e 48 semanas de idade, enfocando no envelhecimento, e um outro grupo (n = 12) de fêmeas idosas (104 semanas de idade – 2 anos de idade) submetidas à testes de avaliação da memória e do aprendizado.

A grande vantagem no preparo dessas amostras é a não obrigatoriedade de manter uma secção plana intacta, ou seja, sem rachaduras, uma vez que as regiões serão submetidas à digestão química em meio ácido.

O cérebro foi separado em cinco regiões: hipocampo, córtex temporal, córtex entorrinal, córtex visual e hipotálamo. A separação dessas regiões foi feita com o auxílio de um bisturi, placa de Petri e um microscópio óptico. As secções foram digeridas em meio ácido: ácido nítrico – 65% (HNO₃-65%) e aquecidas a uma temperatura de 60°C durante duas horas. Após a digestão química, o volume foi ajustado com água deionizada (18 mΩ). Uma alíquota de 500 µL foi colocada em *eppendorf* adicionando-se 50 µL de gálio (102,5 ppm) utilizado como padrão interno.

As amostras foram preparadas em triplicatas. Em seguida 8 µL foram pipetados no centro de um suporte refletor, lucite, secando-as sob luz infravermelha.

4.2.1.2. Branco

Com o intuito de corrigir efeitos referentes a possíveis contaminações, amostras foram preparadas de maneira análoga às amostras de análise, contendo apenas água e demais reagentes. Permitindo verificar, dessa maneira, a qualidade dos materiais utilizados na dissolução das amostras.

4.2.1.3. Amostras Certificadas

A acurácia das medidas foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de fígado bovino (NIST1577b), preparada por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras de cérebro.

4.2.1.4. Camundongos

O condicionamento dos animais assim como o sacrifício dos mesmos foram feitos de maneira análoga aos utilizados para as medidas de microfluorescência.

Separou-se apenas uma única região, o corpo estriado, visto que essa é a região lesionada em cérebros com a doença de Huntington. O processo de digestão química e preparo das amostras foram análogos aos realizados para os ratos Wistar.

A figura 4.5 sintetiza, no geral, o processo de preparo das amostras tanto para os ratos Wistar quanto para os camundongos transgênicos.

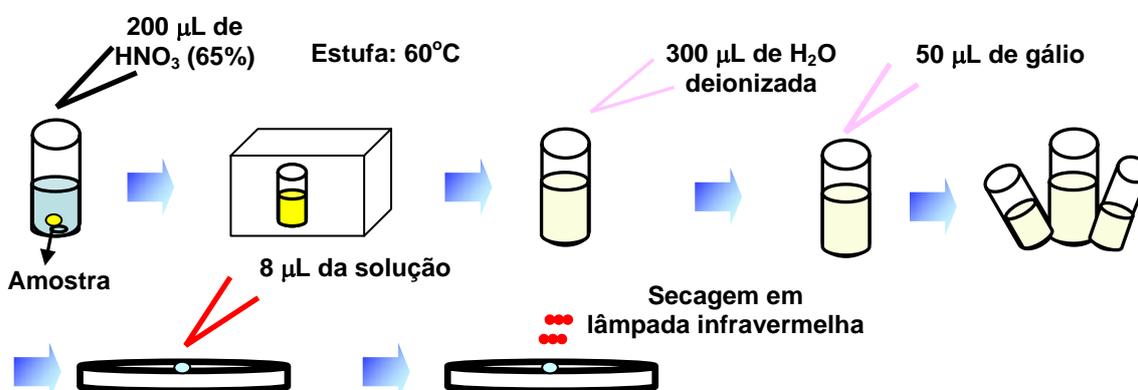


Figura 4.5. Esquema de preparação das amostras.

4.2.2. Instrumentação

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo. A amostra foi posicionada horizontalmente ao detector de germânio hiperpuro (HPGe) – resolução de

140 eV em 5,9 keV e excitada através de um feixe branco de irradiação de energia máxima igual a 20 keV, filtrado por 0,5 mm de alumínio com um ângulo de incidência de 1,0 mrad. O tempo de medida das amostras e dos padrões foi igual a 100s e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL) [192], distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento, associado a uma incerteza. A figura 4.6 ilustra o arranjo experimental utilizado nas medidas de TXRF.

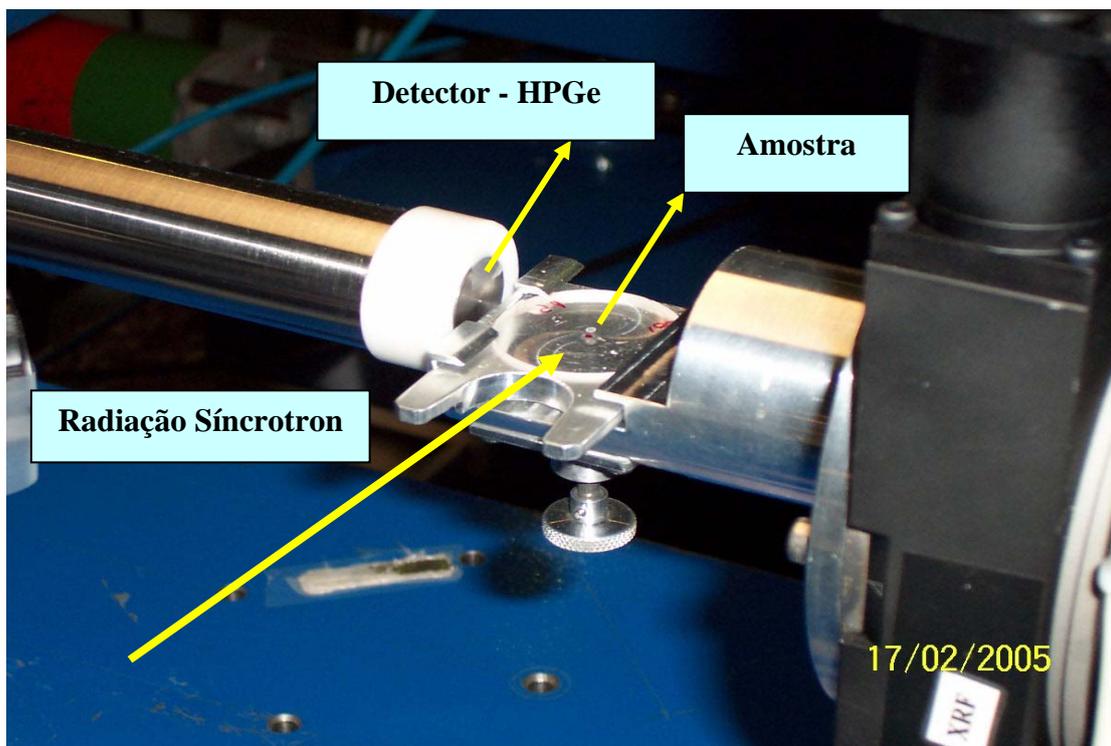


Figura 4.6. Arranjo experimental para as medidas de TXRF.

4.3. Avaliação Cognitiva

Além da análise elementar realizada no cérebro de ratos Wistar, foi feita também uma avaliação comportamental nos ratos Wistar idosos. Decidiu-se realizar este teste, uma vez que, sabe-se que os animais idosos possuem um comportamento diferenciado quanto à aprendizagem: alguns animais aprendem mais rápido, os denominados *fast learner*, em detrimento de outros, os quais aprendem mais devagar, também chamados de *slow learner*. Mediante este fato, já reportado na literatura, o intuito é avaliar se

existem diferenças na distribuição e na concentração elementar no cérebro desses animais em relação ao déficit cognitivo.

O teste de memória espacial foi baseado em uma adaptação do Water Maze de Morris [193], realizado na mesma sala onde os animais foram aclimatados nas condições de temperatura, iluminação e umidade descritas anteriormente.

Uma piscina circular (figura 4.7a) (180 cm de diâmetro, 50 cm de altura) foi preenchida por uma camada de 30 cm de água opaca a uma temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e dividida em quatro quadrantes de áreas iguais. Colocou-se uma plataforma de 8 cm de diâmetro a 1 cm abaixo da superfície da água equidistante do centro e da borda da piscina em um dos quadrantes. O animal foi colocado dentro da piscina faceando a borda, e sua latência escape, tempo levado pelo animal para encontrar a plataforma, foi medido por um observador (figura 4.7a).

Caso o animal leve mais de 120 s para encontrar a plataforma, ele é colocado na plataforma durante 10 s e somente então é retirado da piscina. Foram realizadas cinco tentativas por dia (figura 4.7b) durante quatro dias consecutivos com um intervalo entre as tentativas de 40 minutos. A plataforma é fixa, porém o ponto de largada dos animais é diferente em cada tentativa.

Após 10 dias, os animais foram retestados, com o intuito de avaliar sua memória de longa duração (retenção do teste). O animal foi considerado cognitivamente saudável quando ele demorou aproximadamente 20 s para encontrar a plataforma.

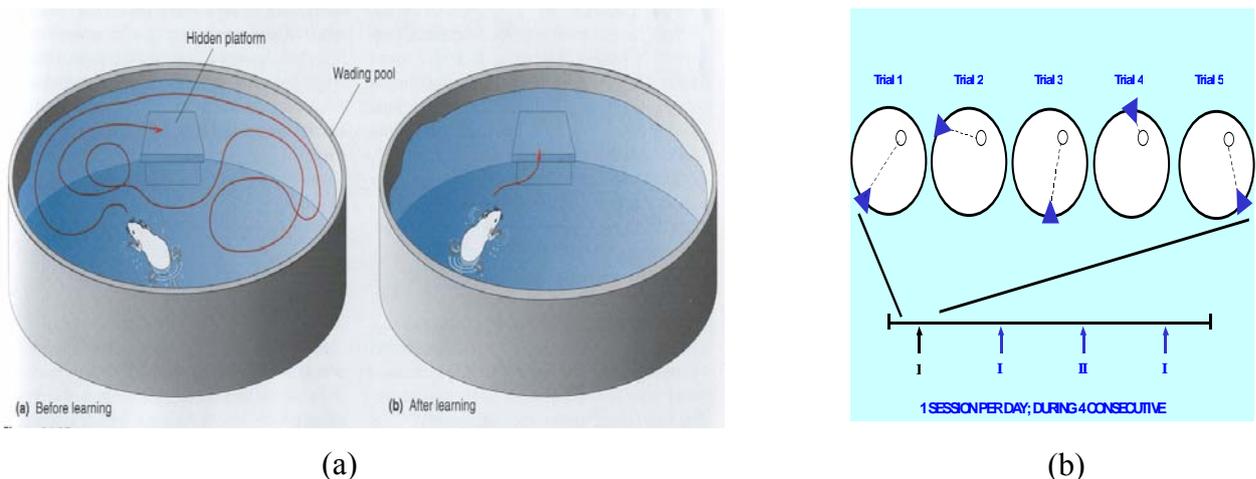


Figura 4.7. (a) Labirinto Aquático; (b) Diagrama das diferentes posições de largada do animal.

Neste capítulo os resultados da Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e da Microfluorescência de Raios X serão apresentados e discutidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise Quantitativa por TXRF

Os fundamentos da análise quantitativa por TXRF estão descritos no capítulo 3. A concentração elementar, de acordo com a equação 3.32, é obtida a partir da medida da intensidade da radiação fluorescente emitida por um elemento *i* em função da sensibilidade do sistema.

As figuras 5.1 e 5.2 ilustram os espectros característicos, para as amostras de cérebro de camundongo e de rato, respectivamente, utilizando a TXRF.

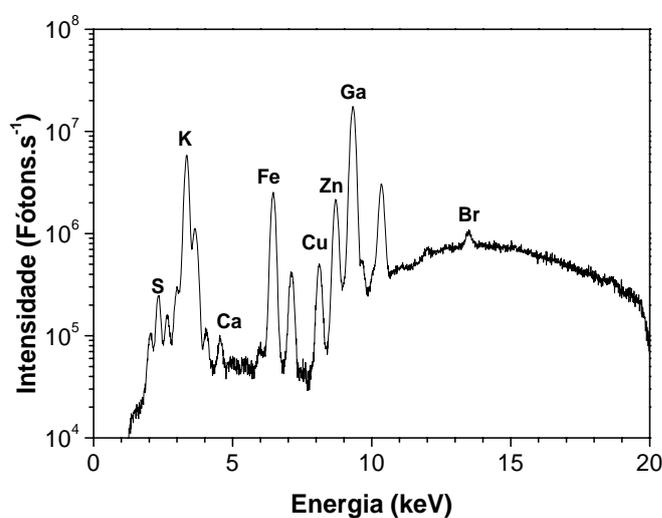


Figura 5.1. Espectro característico do corpo estriado de camundongo através da TXRF.

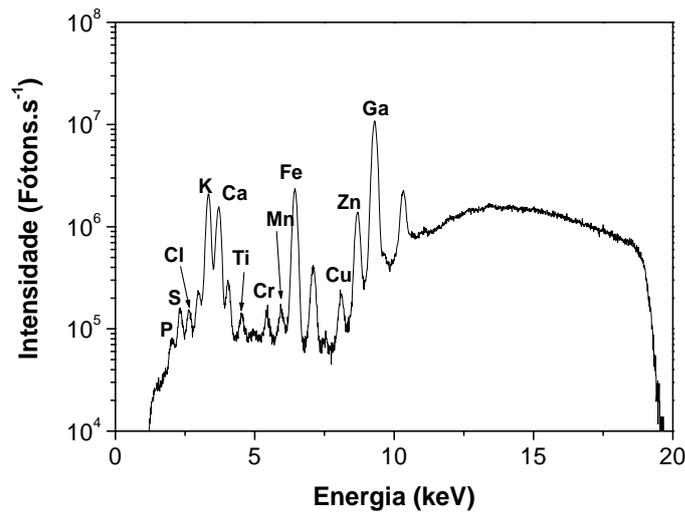


Figura 5.2. Espectro característico do hipocampo de ratos Wistar através da TXRF.

5.1.1. Sensibilidade do Sistema

A curva de calibração é determinada através da medida de cinco soluções padrões multielementares com concentrações diferentes e conhecidas. A tabela 5.1 mostra os elementos e suas respectivas concentrações utilizados na determinação da curva de calibração para a série K. A figura 5.3 mostra a sensibilidade para a série K.

Tabela 5.1. Concentração final (mg mL^{-1}) os elementos utilizados na solução padrão para a determinação da curva de sensibilidade para os elementos da série K.

Elementos	Padrão 1K	Padrão 2K	Padrão 3K	Padrão 4K	Padrão 5K
Al	3,50	6,12	12,25	18,38	24,51
Si	3,54	6,20	12,40	18,60	24,80
K	0,59	1,03	2,07	3,11	4,14
Ca	0,59	1,04	2,08	3,12	4,15
Ti	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Cr	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Fe	0,59	1,03	2,05	3,08	4,10
Ni	0,59	1,03	2,06	3,08	4,11
Zn	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Se	0,58	1,01	2,01	3,02	4,03
Sr	0,59	1,03	2,07	3,10	4,13
Ga	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88

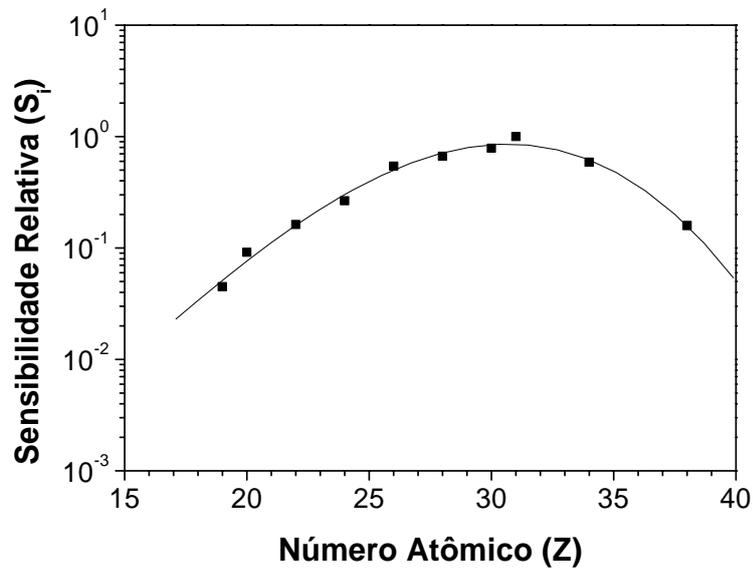


Figura 5.3. Curva de calibração para os elementos da série K utilizando TXRF.

Utilizando a equação 5.1, obtêm-se quaisquer valores de sensibilidade para a série K, em função do número atômico (Z).

$$S_i(Z) = \log(4,22 + 0,04 * Z + 0,01 * Z^2 - 2,41E-4 * Z^3) \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0,99$$

5.2. Limite de Detecção (LD)

A tabela 5.2 mostra os limites de detecção calculados utilizando a equação 3.33 para os elementos da série K nas amostras de cérebro de ratos e de camundongos.

Tabela 5.2. Limite de detecção para os elementos da série K, nas amostras de cérebro de rato e de camundongo, utilizando SR-TXRF.

Elementos	LD para a série K (ng.g ⁻¹)	
	Cérebros de ratos	Cérebros de camundongos
Al	181	137
P	49	38
S	26	20
Cl	14	11
K	5	4
Ca	3	2
Ti	1	1
Cr	0,5	0,4
Fe	0,3	0,2
Ni	0,2	0,2
Cu	0,2	0,2
Zn	0,2	0,2
Br	1	1
Rb	2	2

Com os dados apresentados na tabela 5.2, obtêm-se as figuras 5.4 e 5.5, respectivamente.

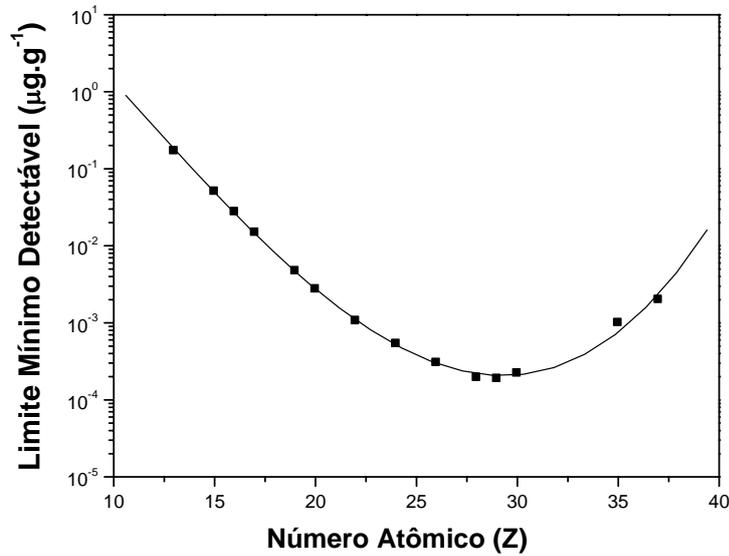


Figura 5.4. Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de cérebro de rato, utilizando TXRF.

Utilizando a equação 5.4, obtêm-se quaisquer valores para o LD em função de Z.

$$LD(Z) = \log_{10} (2,71484 - 0,19752 * Z - 0,00890 * Z^2 + 2,79444E-4 * Z^3) \quad (5.4)$$

$$R^2 = 0,998$$

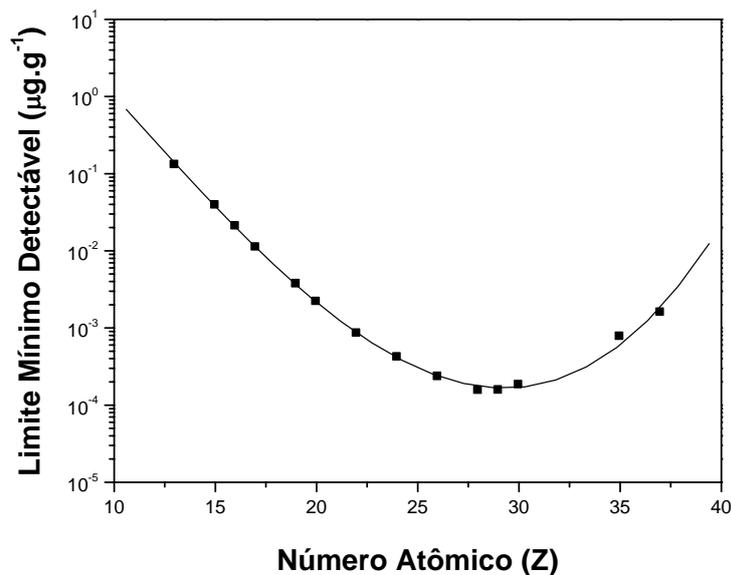


Figura 5.5. Limite de detecção dos elementos da série K para as amostras de cérebro de camundongo, utilizando TXRF.

Utilizando a equação 5.5, obtêm-se quaisquer valores para o LD em função de Z.

$$LD(Z) = 0,99068 - 0,11529 * Z - 0,00432 * Z^2 - 5,21640E-5 * Z^3 \quad (5.5)$$

$$R^2 = 0,998.$$

5.3. Análise Estatística

Os resultados da TXRF estão dispostos como média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos para cada um dos enfoques (em função da idade e em relação as estruturas, tabelas A1, A2 e A3 no apêndice I) foram comparados utilizando uma análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5%. As médias entre os valores foram comparadas utilizando o teste Bonferroni. Todas essas análises estatísticas foram realizadas através do programa de Bioestatística Primer. Os resultados da TXRF em relação ao desempenho cognitivo (tabela A4, no apêndice I) e em relação à doença de Huntington (tabela A5, no apêndice I) foram comparados utilizando o teste t, com um nível de significância de 5%.

5.4. Concentração elementar nas regiões cerebrais do cérebro de rato Wistar - TXRF

É bem estabelecido que os elementos traço encontram-se distribuídos heterogeneamente ao longo do cérebro. Para os elementos essenciais, o padrão na sua distribuição pode estar associado a funções biológicas de áreas específicas cerebrais. É também de extrema relevância determinar e avaliar os níveis dos elementos traço no cérebro, desde que, alterações nos seus níveis (excesso ou deficiência) vêm sendo correlacionadas a doenças neurodegenerativas [14].

5.4.1. Determinação dos níveis dos elementos em função da idade

Três fatores estão envolvidos no processo de envelhecimento e degeneração do sistema nervoso central dos mamíferos: estresse oxidativo, irregularidades no acúmulo dos metais de transição, em especial o ferro, e insuficiência mitocondrial oxidativa [56].

Além disso, inúmeras alterações relacionadas à anatomia e a histologia são observadas nos cérebros de indivíduos idosos [69]. Com o envelhecimento, aumenta-se também a produção dos radicais livres e o estresse oxidativo nos neurônios e células glia [69].

A possibilidade de que os elementos traço participam dos mecanismos de

envelhecimento foi originalmente sugerida, devido a mudanças nos hábitos alimentares decorrente da idade [75]. Devido essas alterações nos hábitos alimentares e a correlação de certos elementos traço com determinadas doenças neurodegenerativas, acrescido do fato de que a idade é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de certas patologias neurodegenerativas [195], torna bastante relevante estudar os níveis dos elementos em função da idade.

Para tal estudo, analisamos a concentração local no córtex entorrinal, córtex visual, córtex temporal e hipocampo de ratos Wistar fêmeas ($n = 15$) de diferentes idades: 02 semanas, 08 semanas e 48 semanas de idade. Esse estudo encontra-se publicado na *Spectrochimica Acta B*, v.61, (2006), pp.1205-1209, intitulado por: Elemental Concentration Analysis in Brain Structures from Young, Adult and Old Wistar Rats by Total Reflection X-ray Fluorescence with Synchrotron Radiation (anexo A), e os resultados são mostrados através das figuras 5.6 a 5.15, e também pode ser visualizado através das tabelas A1 e A2 no apêndice I.

As figuras 5.6 a 5.15 ilustram as concentrações médias associadas ao desvio padrão de cada elemento, nas diferentes regiões e idades estudadas.

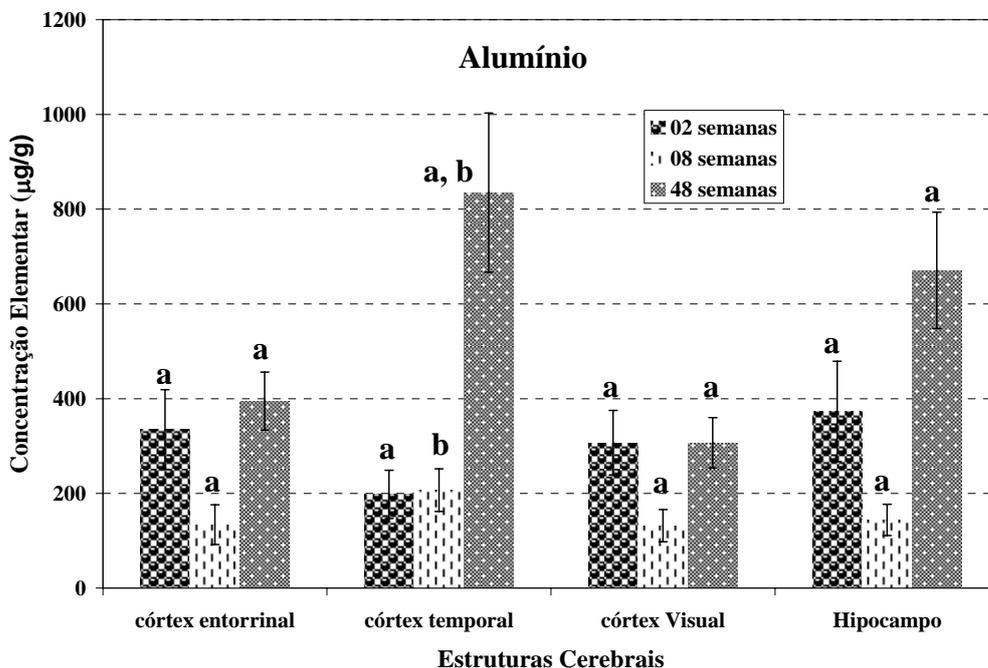


Figura 5.6. Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

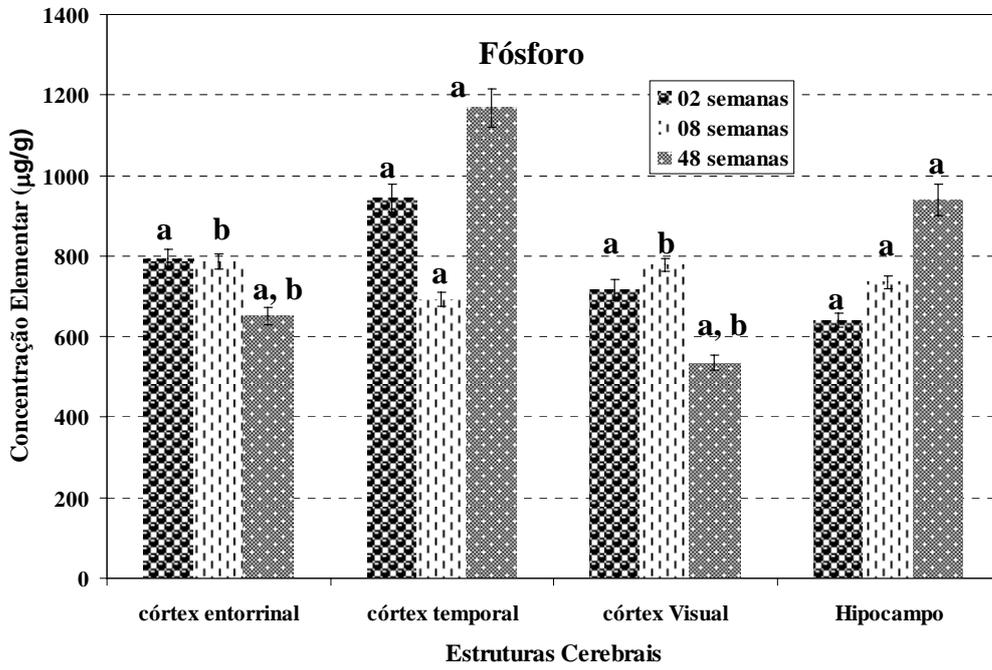


Figura 5.7. Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

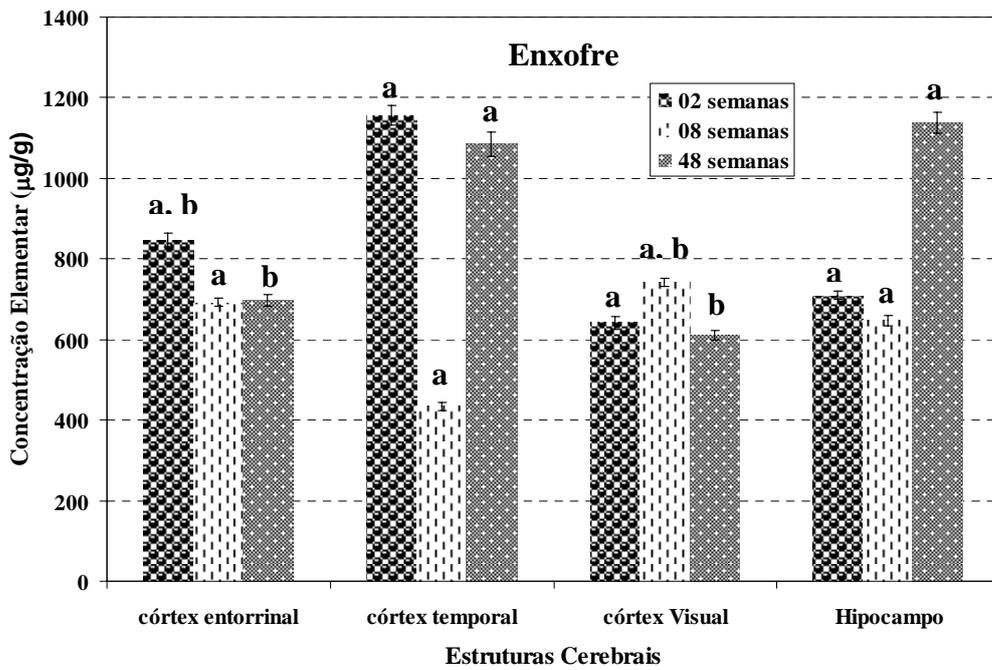


Figura 5.8. Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

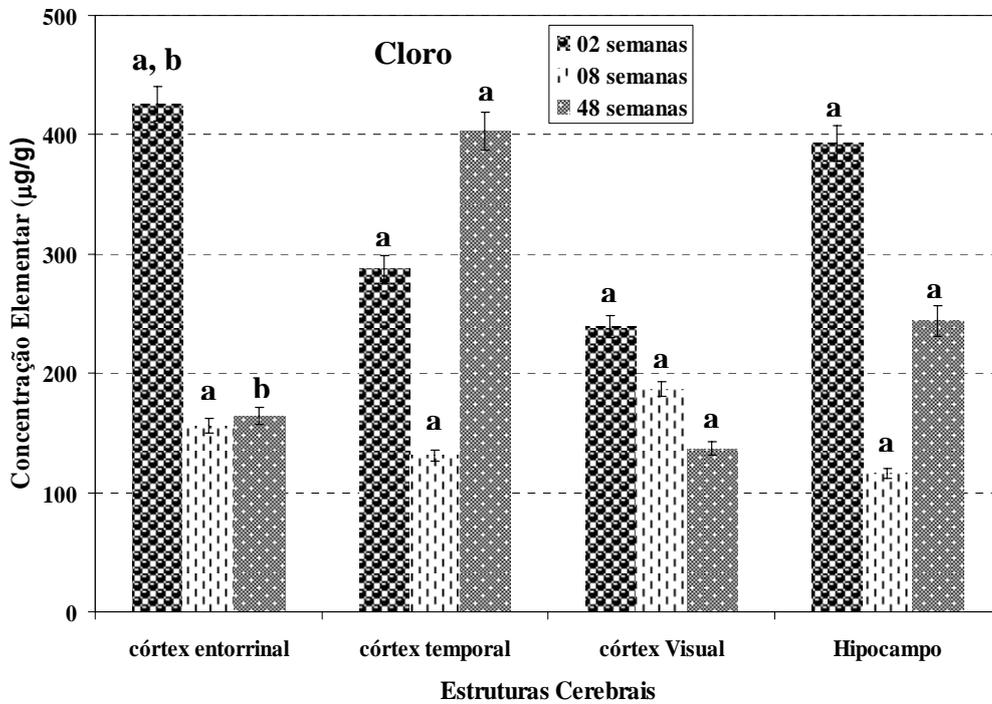


Figura 5.9. Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

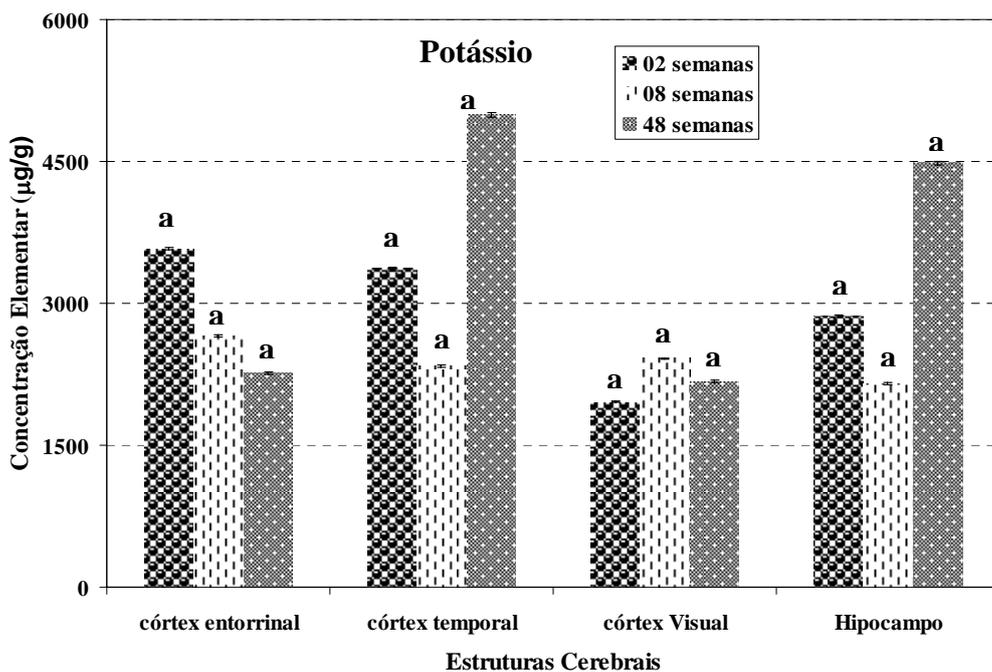


Figura 5.10. Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

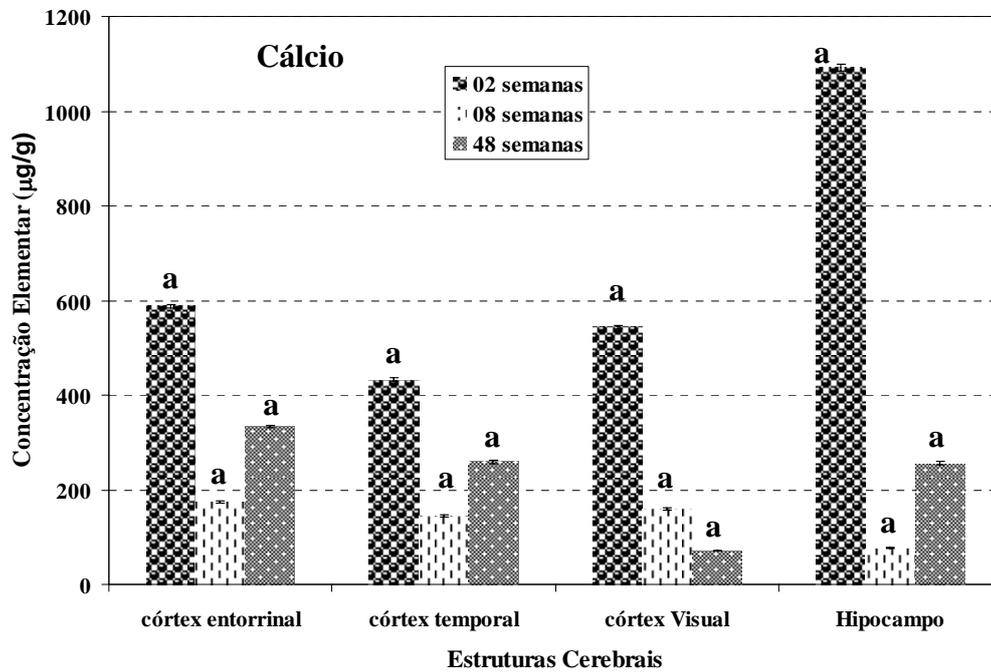


Figura 5.11. Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

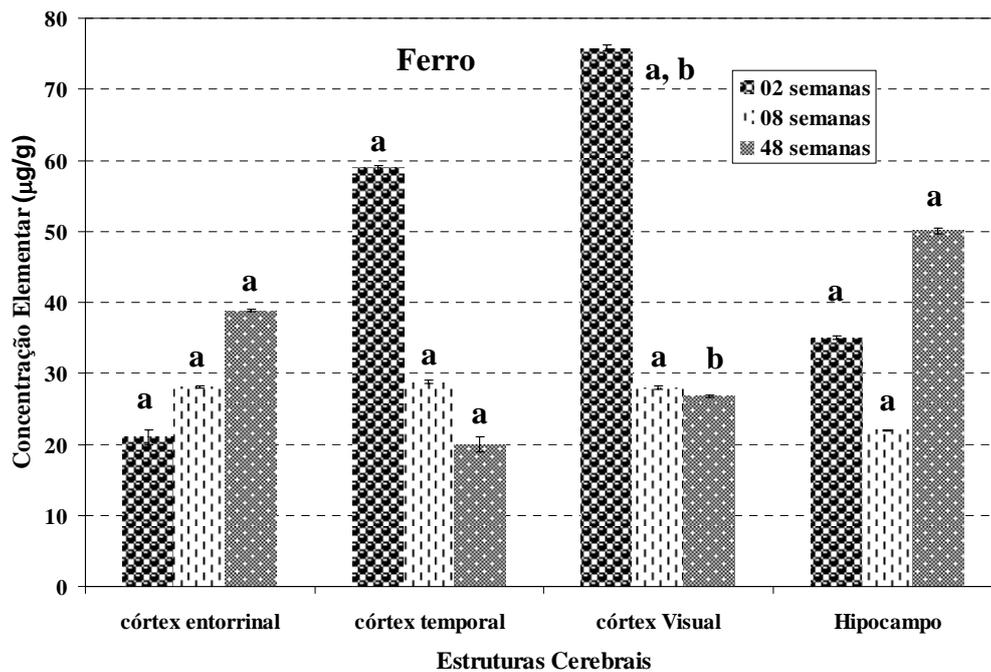


Figura 5.12. Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

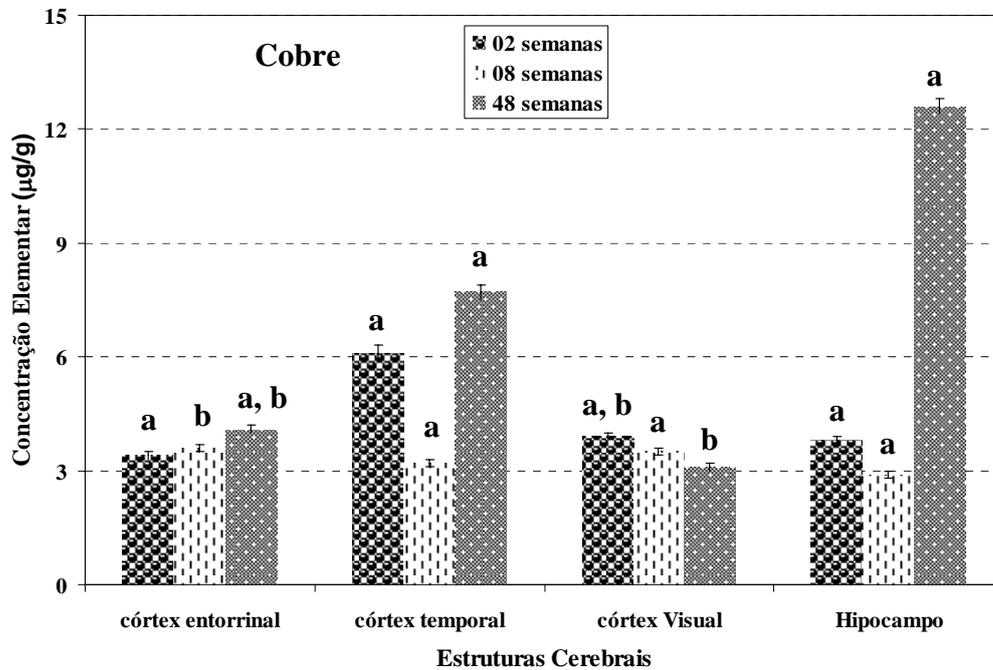


Figura 5.13. Concentração de cobre nas regiões cerebrais estudadas de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

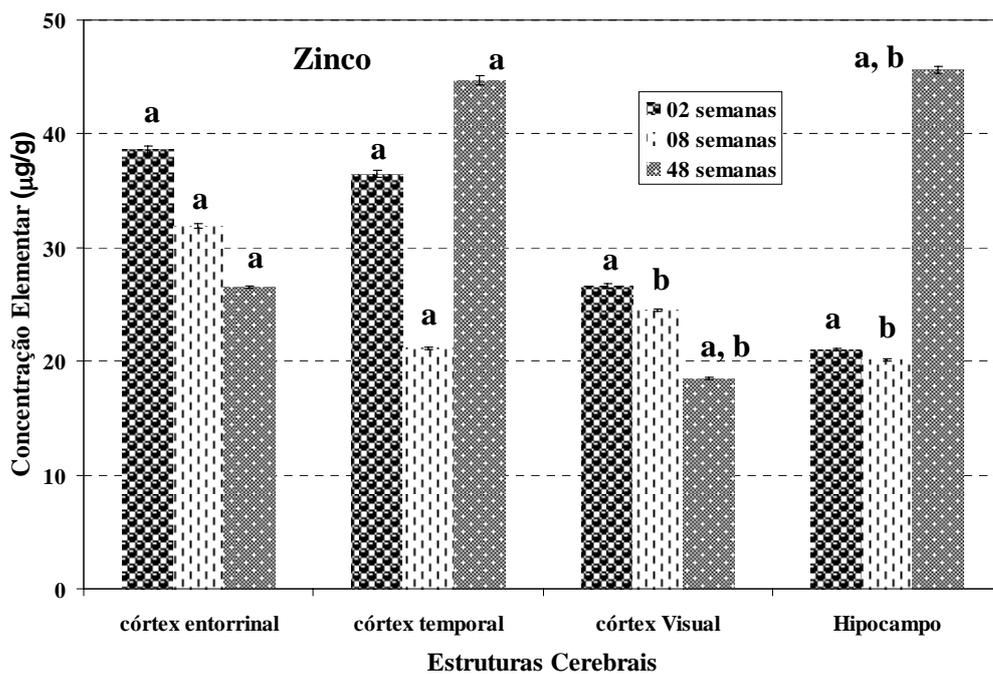


Figura 5.14. Concentração de zinco nas regiões cerebrais estudadas de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

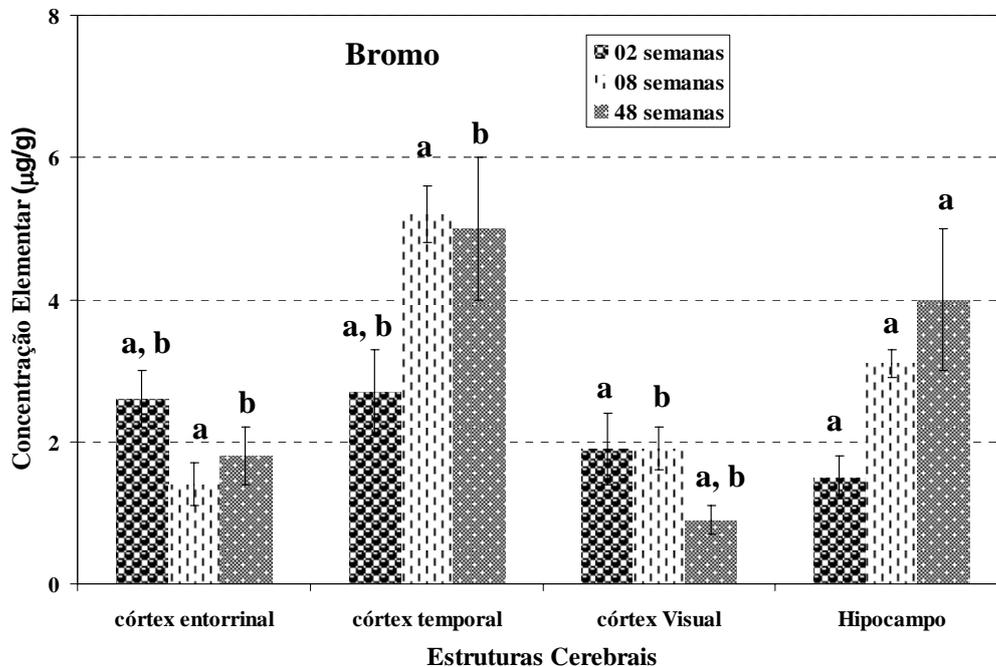


Figura 5.15. Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

Analisando as figuras 5.6 a 5.15, e a tabela A1 observamos que em certas regiões determinados elementos (Al no córtex entorrinal, visual e hipocampo, P no córtex temporal, Cl e Ca no córtex entorrinal, temporal e hipocampo, K no córtex temporal e no hipocampo, Fe no hipocampo, Cu e Zn no córtex temporal) encontram-se bastante elevados nos animais de 02 semanas em relação aos adultos de 08 semanas, e depois voltam aumentar de 08 para 48 semanas. Nessa fase de 02 semanas, o animal ainda está em desenvolvimento, muitos eventos biológicos ainda estão ocorrendo, possivelmente por isso, alguns elementos encontram-se bastante elevados.

Os animais de meia idade (48 semanas) apresentaram níveis superiores de Al em todas as regiões cerebrais analisadas. O córtex temporal e o hipocampo desses animais apresentaram os mais altos índices de Al.

Os níveis de P e Cl diminuíram em função da idade nos córtices entorrinal e visual. Os níveis de K também diminuíram em função da idade no córtex entorrinal. Os níveis de Ca também decresceram no córtex visual à medida que a idade avança. Por outro lado, somente os níveis de P aumentaram em função da idade no hipocampo.

Nossos resultados para os níveis de K estão em concordância com os reportados por Hebbrecht et al. [13]. O declínio nos níveis de K, o principal íon intracelular, pode estar relacionado ao declínio nos neurônios ou ainda no volume intracelular do cérebro envelhecido. Uma outra justificativa para esse fato é uma possível alteração na permeabilidade da membrana e um declínio na atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ com o avanço da idade, podendo induzir mudanças no equilíbrio iônico [10].

O P é primariamente encontrado nos fosfolipídios e está presente em concentrações relativamente altas no cérebro. O declínio nos níveis de P pode refletir uma perda dos fosfolipídios da mielina ao longo do tempo [10].

Os teores de Fe e Cu aumentaram no córtex entorrinal em função da idade, os níveis de Br foram superiores no hipocampo em relação à idade e por outro lado, as concentrações de Zn diminuíram em função da idade nos córtices entorrinal e visual.

Em relação às regiões cerebrais analisadas (tabela A2 apresentada no apêndice I) observou-se que o hipocampo e o córtex temporal das ratas idosas foram as estruturas mais sensíveis aos efeitos da idade, apresentando as maiores concentrações para a maioria dos elementos identificados, como por exemplo, Al, P, Cl no hipocampo, Fe somente no córtex temporal, K, Ca, Zn, Br e Rb nas duas estruturas e Cu apenas no hipocampo. Contudo, os animais adultos apresentaram uma distribuição praticamente homogênea ao longo das regiões analisadas. Por outro lado, o córtex entorrinal dos animais jovens apresentou maiores níveis de K, Cl, Fe e Zn.

O estudo do envelhecimento também foi realizado em ratos Wistar machos. Nesse caso, analisamos o córtex entorrinal, o córtex visual, o córtex temporal, o hipocampo e o hipotálamo de ratos Wistar machos jovens, adultos e de meia idade (n = 20): 02 semanas, 09 semanas, 22 semanas e 108 semanas de idade. No apêndice I, a tabela A3, apresenta os valores das concentrações dos elementos nos ratos Wistar machos. As figuras 5.16 a 5.25 ilustram as concentrações médias associadas ao desvio padrão para cada um dos elementos identificados em função da idade e das regiões cerebrais.

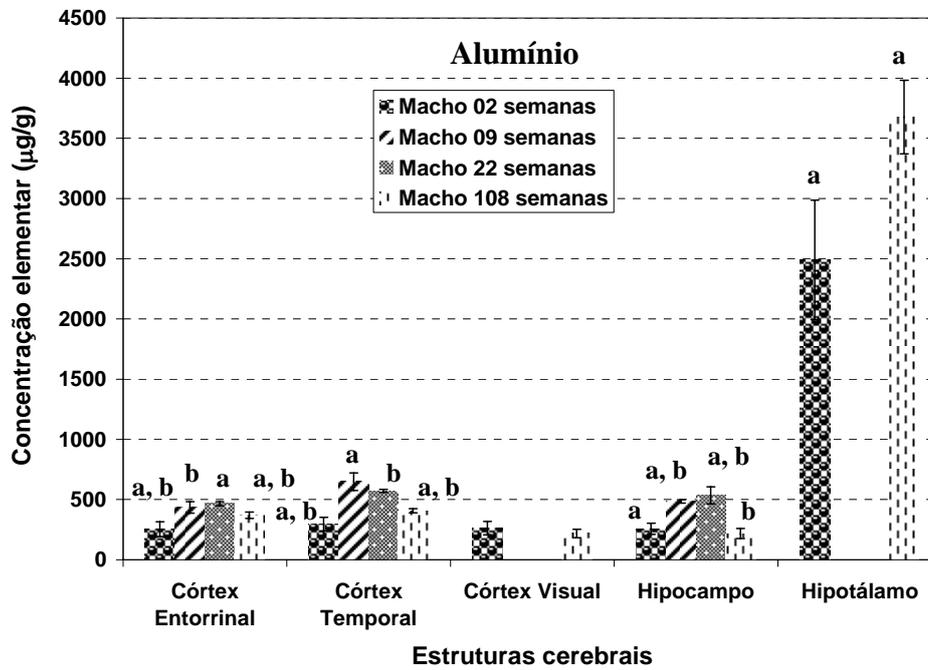


Figura 5.16. Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

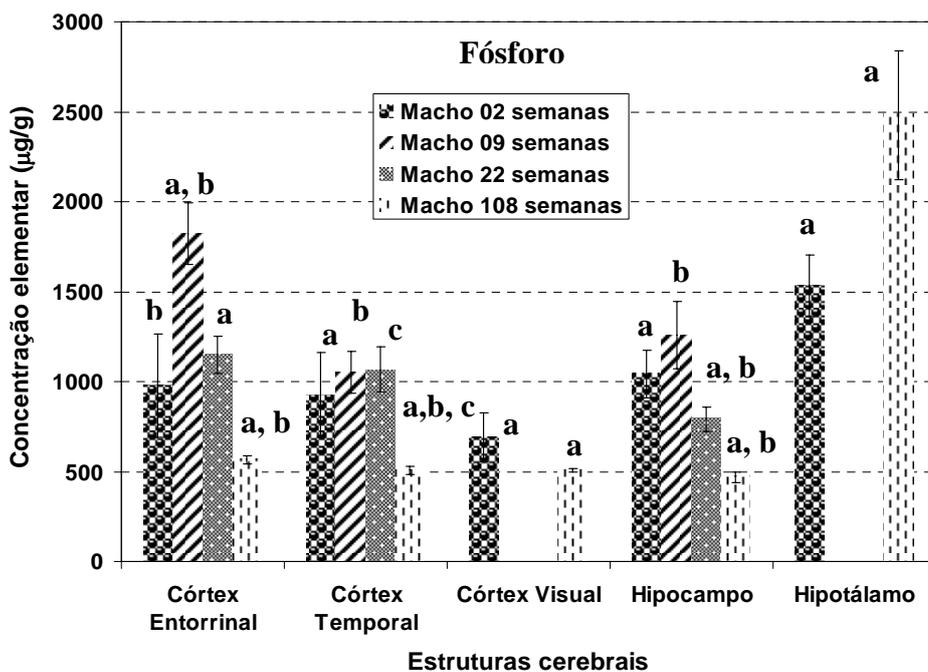


Figura 5.17. Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

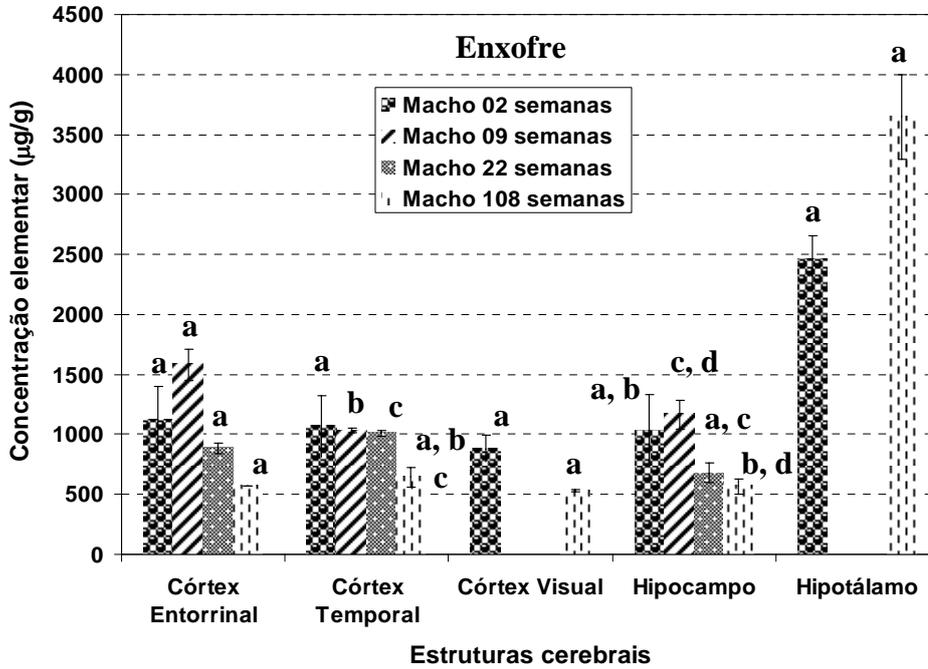


Figura 5.18. Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

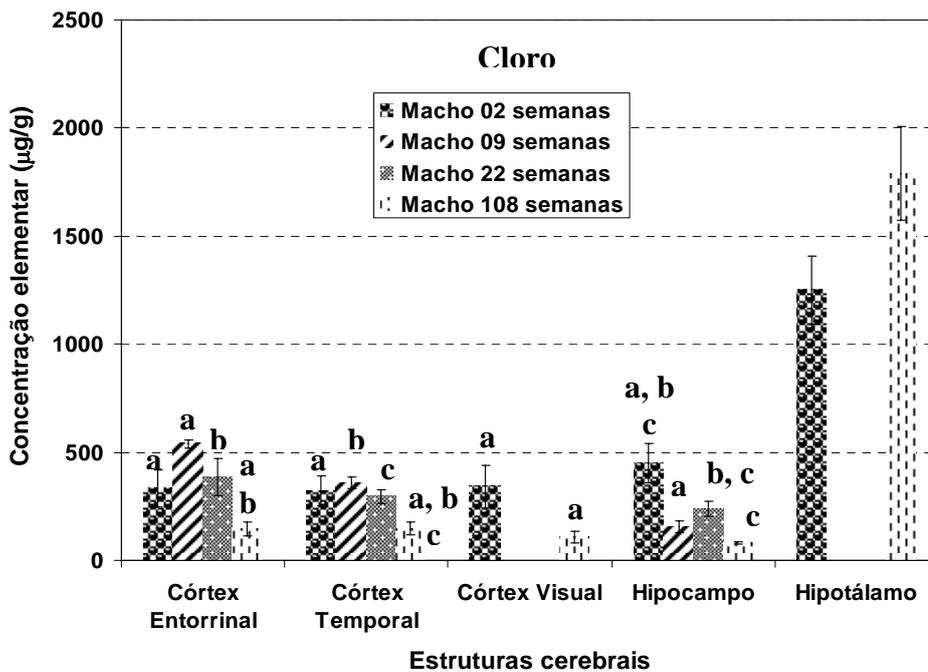


Figura 5.19. Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

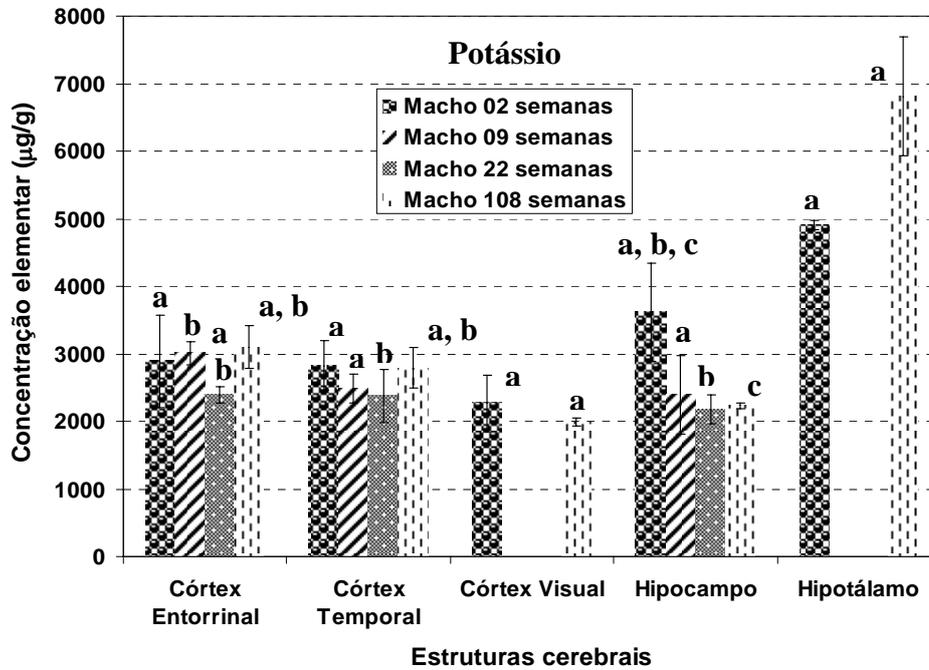


Figura 5.20. Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

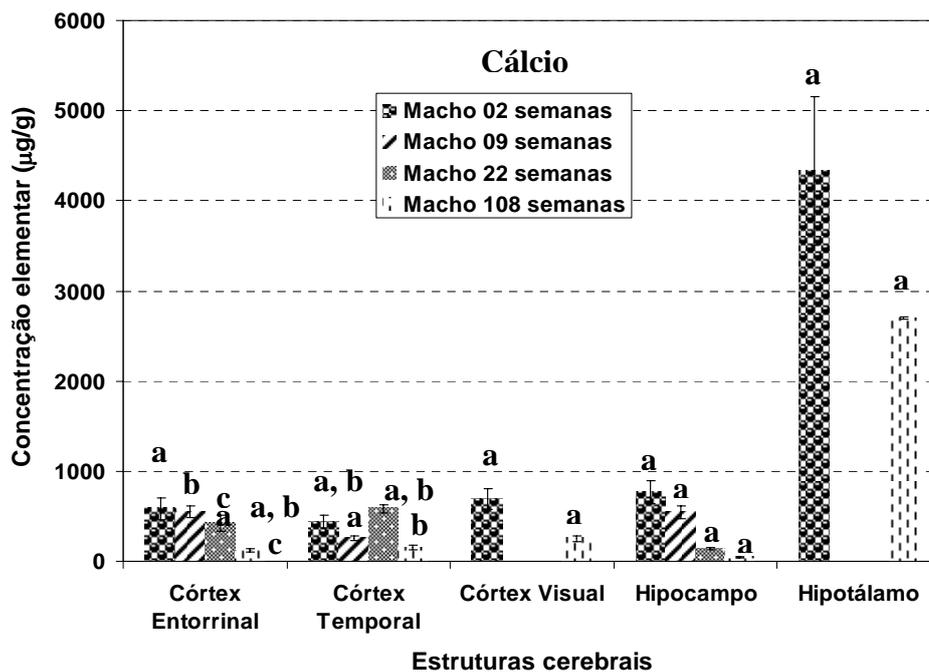


Figura 5.21. Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

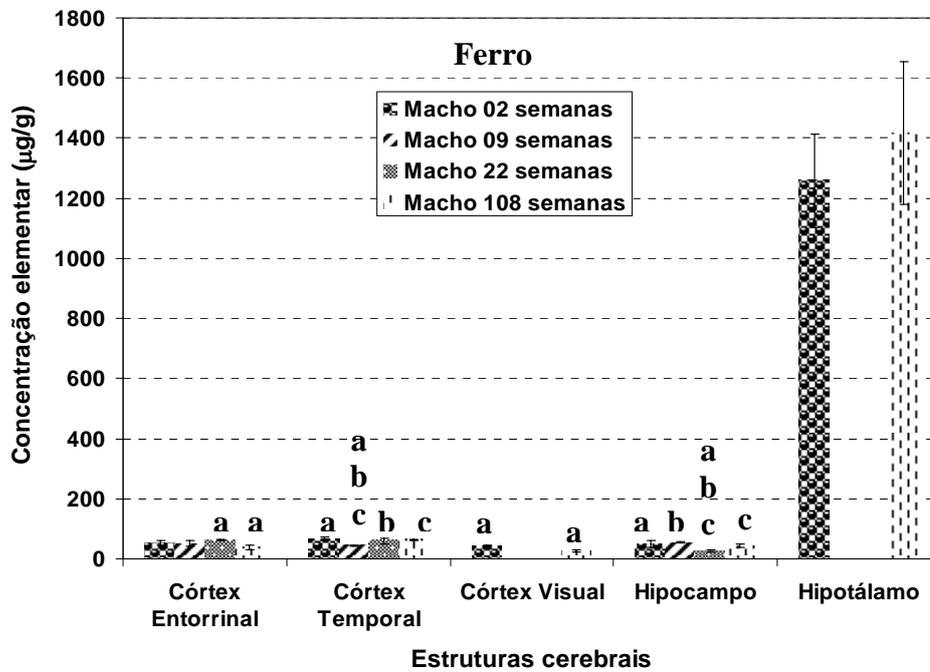


Figura 5.22. Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

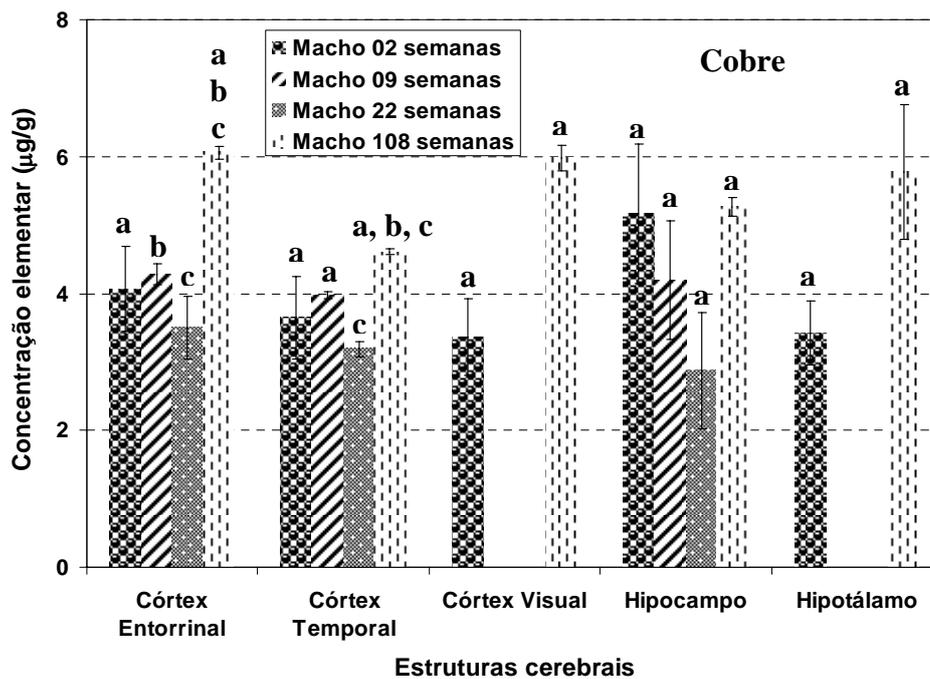


Figura 5.23. Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

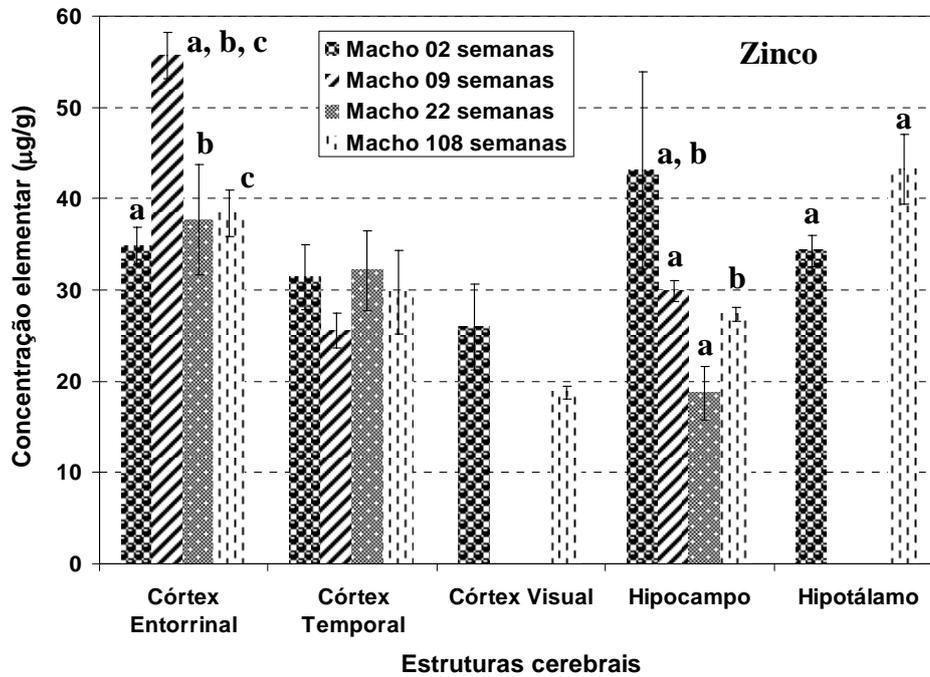


Figura 5.24. Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

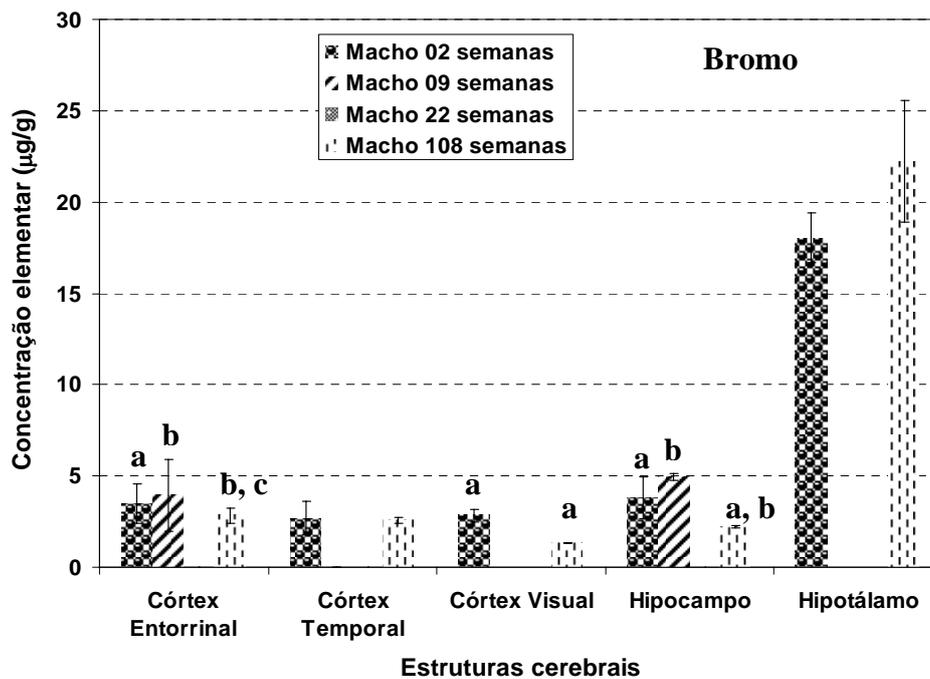


Figura 5.25. Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos em relação ao envelhecimento. Índices iguais indicam diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$.

Analisando as figuras 5.16-5.25, observamos que o hipotálamo dos animais idosos apresentou os maiores níveis para a maioria dos elementos identificados: Al, S, K, Cu e Zn. Além disso, os teores de Cu também foram superiores nos córtices entorrinal, temporal e visual dos animais idosos. Por outro lado, as concentrações de Zn foram superiores no hipocampo dos animais jovens (02 semanas).

Os níveis de P e S, foram inferiores nos córtices entorrinal, temporal e visual e hipocampo dos animais idosos; os níveis de Ca diminuíram em função da idade no córtex entorrinal, no córtex visual e no hipocampo; os níveis de Cl também decresceram em função da idade no córtex entorrinal, no córtex temporal, no córtex visual e no hipocampo, enquanto que as concentrações de K diminuíram apenas no córtex visual em relação à idade.

5.4.2. Determinação dos níveis dos elementos em função do desempenho cognitivo

É bem estabelecido que a idade está associada a deficiências neurocomportamentais [7]. O processo de envelhecimento do cérebro humano é caracterizado pela progressiva perda neuronal [13].

Um dos aspectos críticos do envelhecimento é a habilidade em se adaptar às mudanças do meio externo, e, além disso, o dano cognitivo é um dos fatores mais severos que pode ocorrer com o avanço da idade [77].

O hipocampo é uma área cerebral associada aos mecanismos de memória e aprendizagem [192, 196]. Estudos mostraram que danos na região hipocampal produz deficiências na memória espacial, sendo estas as mesmas observadas em indivíduos idosos. Além disso, o envelhecimento dessa estrutura, normalmente envolve decréscimo no número, na densidade e no tamanho dos neurônios e sinapses [197].

Há um consenso de que o envelhecimento do hipocampo é caracterizado por alterações neuroquímicas e neurofisiológicas que podem contribuir para o dano cognitivo [198]. Existe também uma correlação entre o desempenho cognitivo dos animais idosos no Morris Water Maze e os níveis de synaptofisina, uma proteína associada à sinapse [199]. Contudo, ainda não se sabe se as distribuições dos elementos essenciais poderiam caracterizar deficiências na memória espacial em ratos idosos.

Portanto, esse estudo pode vir a contribuir para o entendimento de como os níveis dos elementos que constituem o cérebro variam em função do desempenho cognitivo.

Nesse estudo, analisamos o córtex entorrinal, o córtex visual, o córtex temporal, o hipocampo e o hipotálamo de ratos Wistar fêmeas com 108 semanas de idade (n=12). A avaliação do desempenho cognitivo dos animais foi realizada através do emprego do teste Morris Water Maze, descrito no capítulo 4, e pode ser visualizado através das figuras 5.26 a 5.27. Esse estudo encontra-se publicado na *Spectrochimica Acta B*, v.61, (2006), pp.1205-1209, intitulado por: Elemental Concentration Analysis in Brain Structures from Young, Adult and Old Wistar Rats by Total Reflection X-ray Fluorescence with Synchrotron Radiation (anexo B), e os resultados (valor médio \pm desvio padrão) são mostrados através das figuras 5.6 a 5.19, e também pode ser visualizado através da tabela A4, no apêndice I.

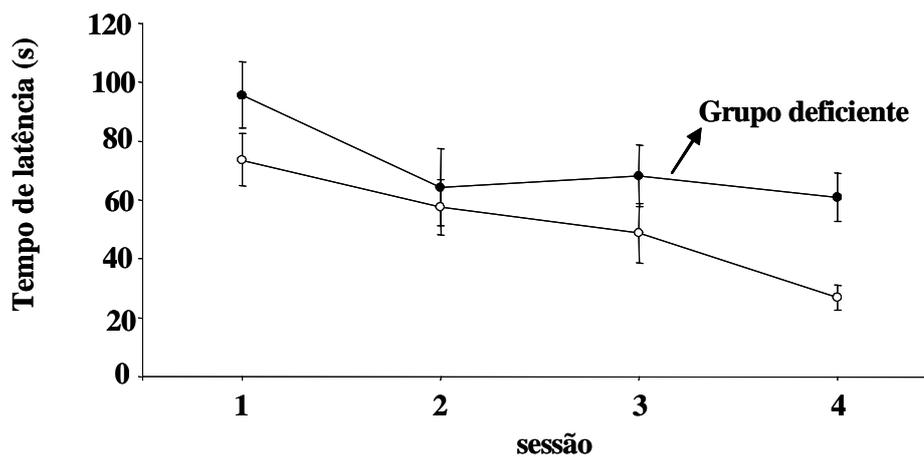


Figura 5.26. Média das tentativas entre os dois grupos analisados: grupo cognitivamente saudável (n=6) e com deficiência (n=6).

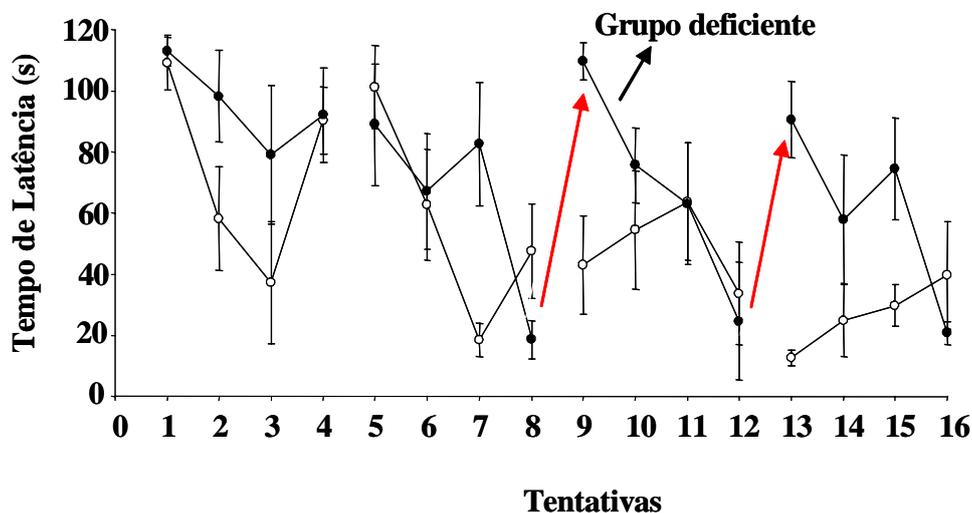


Figura 5.27. Desempenho cognitivo apresentado pelos dois grupos analisados.

De acordo com o teste Morris Water Maze, utilizado para avaliar o desempenho cognitivo, os animais foram classificados em dois grupos: um grupo considerado saudável do ponto de vista cognitivo, que denominaremos de grupo normal e um outro grupo que apresentou deficiência cognitiva, que o chamaremos de grupo deficiente.

Através da figura 5.26 podemos perceber que o grupo que apresentou deficiência cognitiva executou a tarefa num tempo máximo de 80 s, ao passo que, o grupo denominado por normal, executou essa mesma tarefa em um tempo bem inferior, 20 s. Outra característica marcante entre esses dois grupos, que pode ser vista através da figura 5.27, é que os animais com deficiência cognitiva apreenderam a tarefa no 2º dia do teste na 5ª tentativa, porém no dia seguinte (3º dia) eles esquecem completamente o local da plataforma, o que nos leva a concluir que estes animais possuem apenas a memória de trabalho, não possuindo, portanto, a memória de longa duração.

As figuras 5.28 a 5.37 ilustram as concentrações médias associadas ao desvio padrão dos elementos estudados nas diferentes estruturas cerebrais, dos dois grupos de animais: cognitivamente saudável e com deficiência.

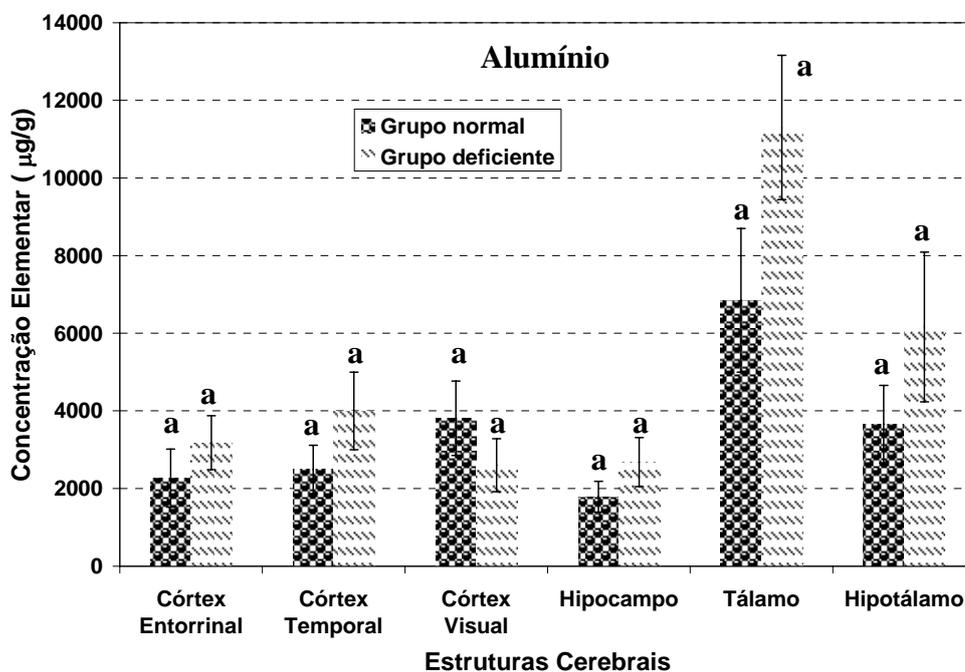


Figura 5.28. Concentração de alumínio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

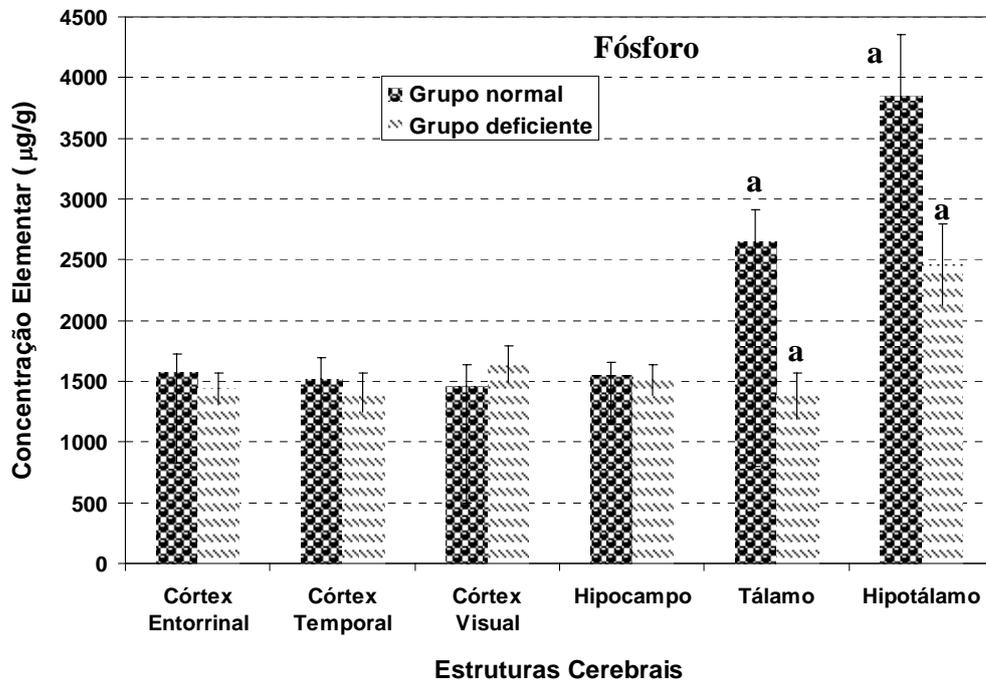


Figura 5.29. Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

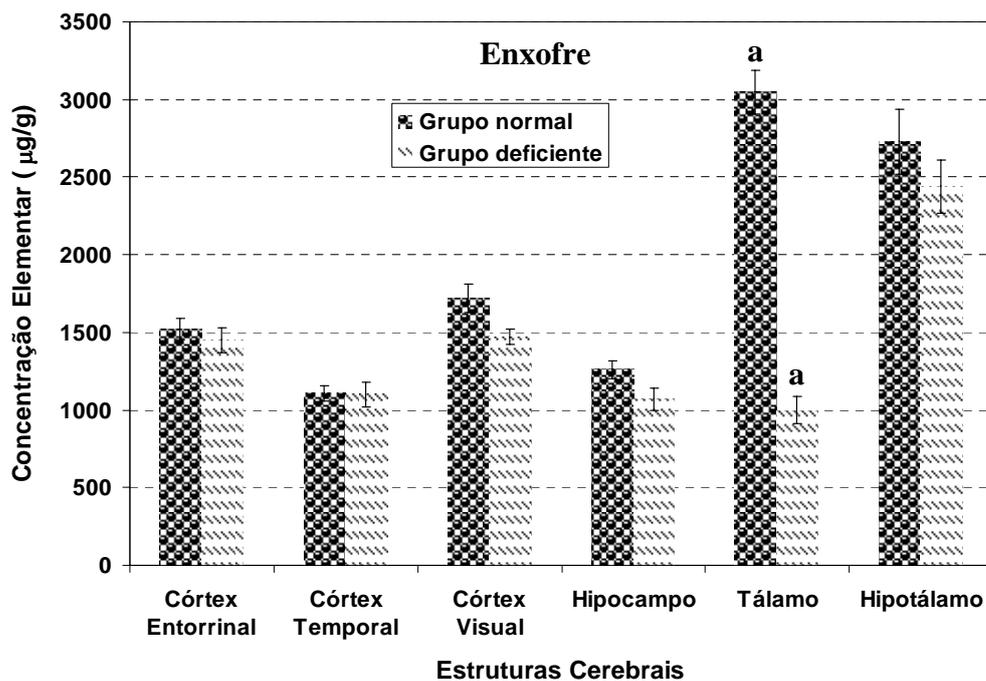


Figura 5.30. Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

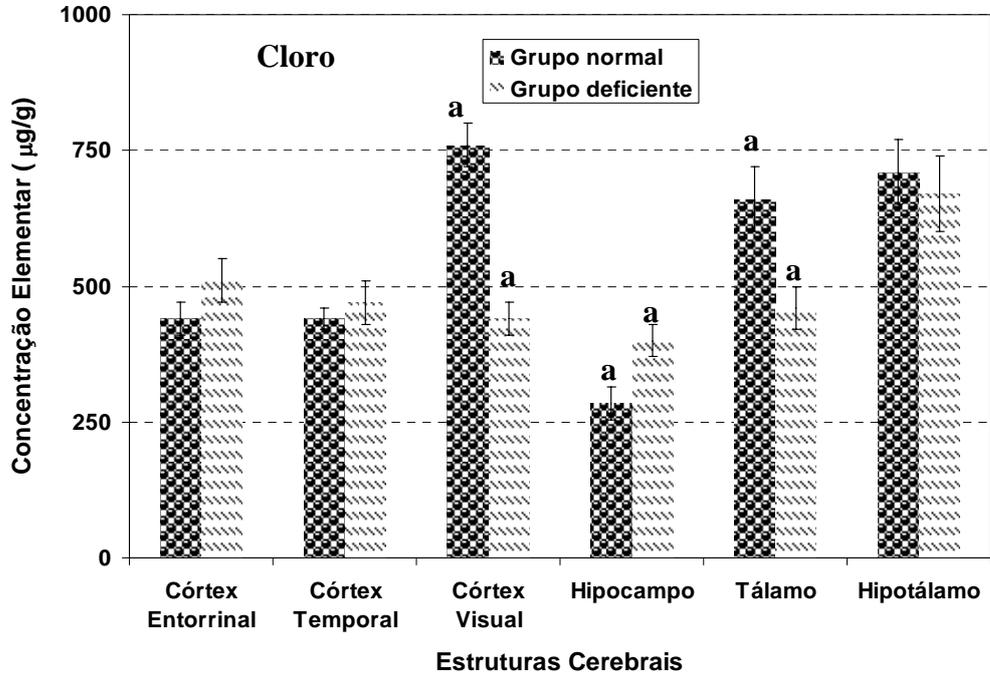


Figura 5.31. Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

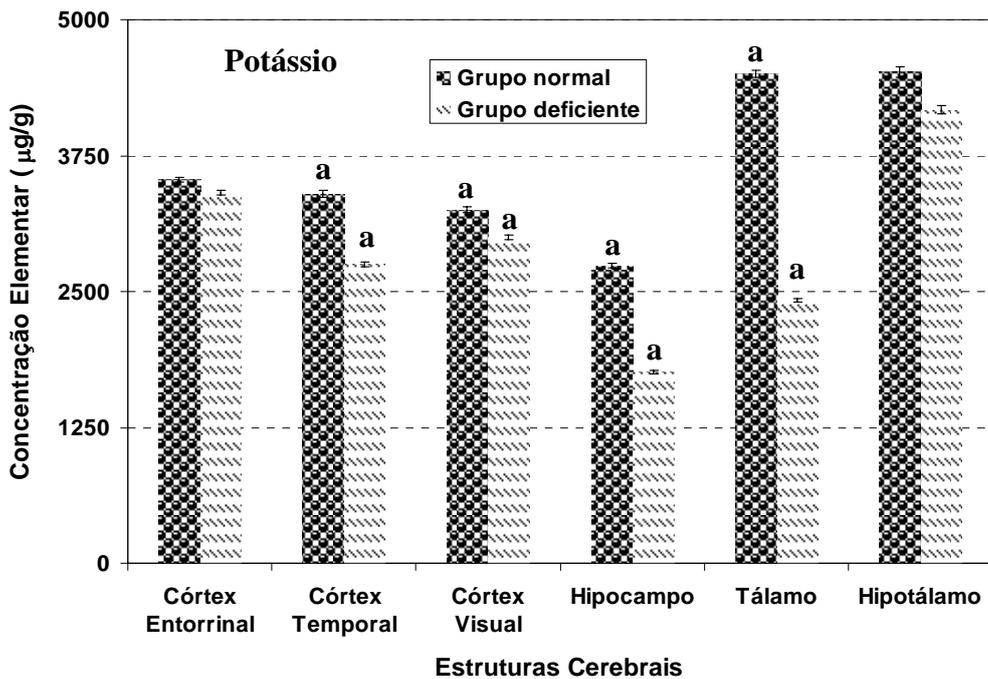


Figura 5.32. Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

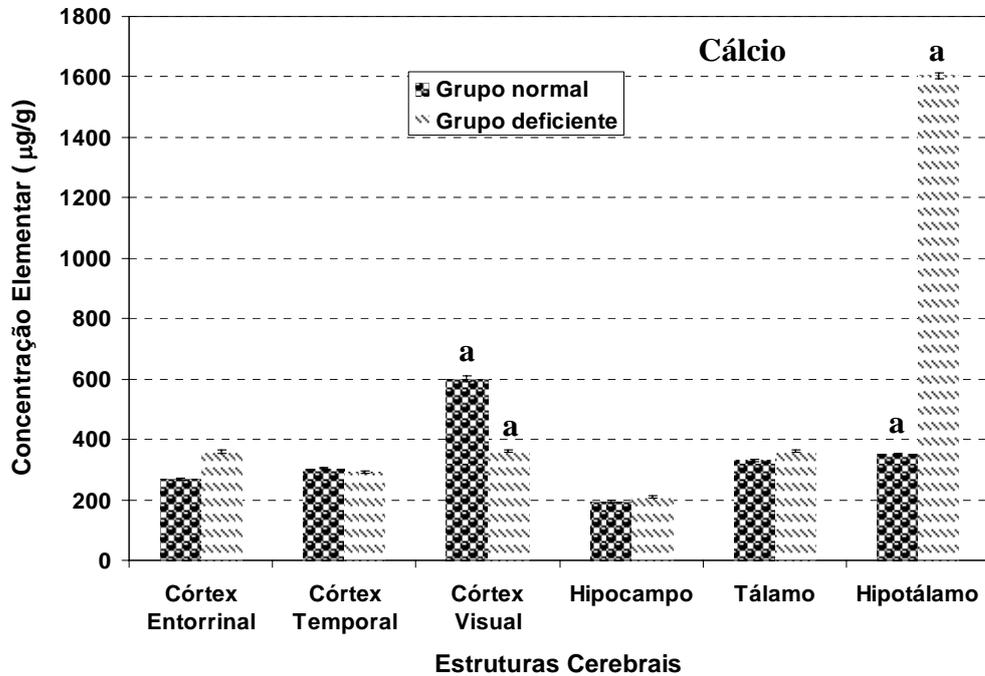


Figura 5.33. Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

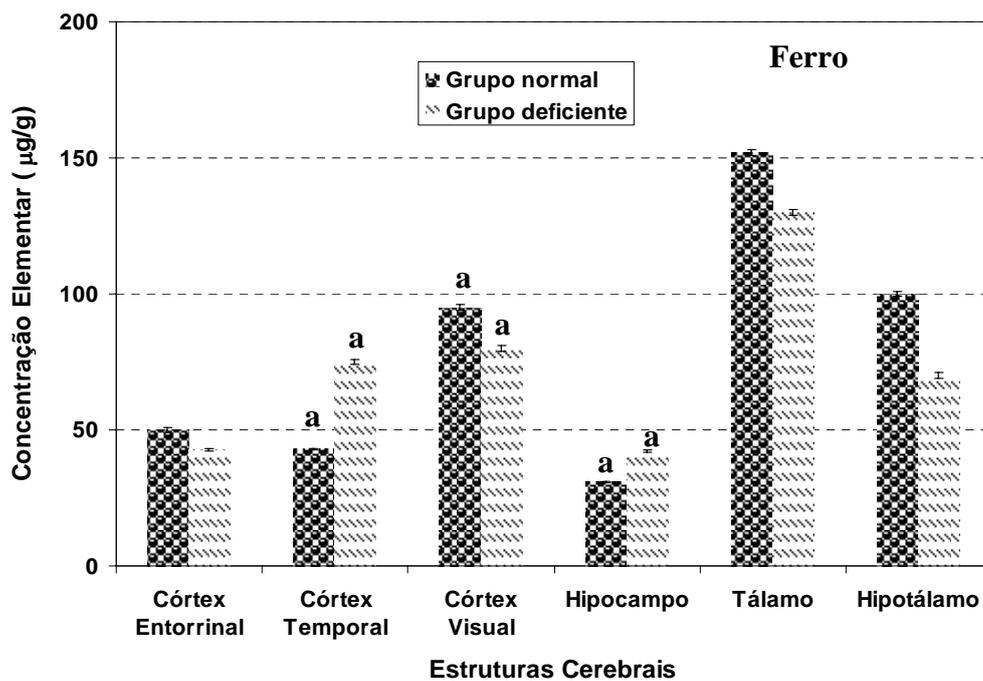


Figura 5.34. Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

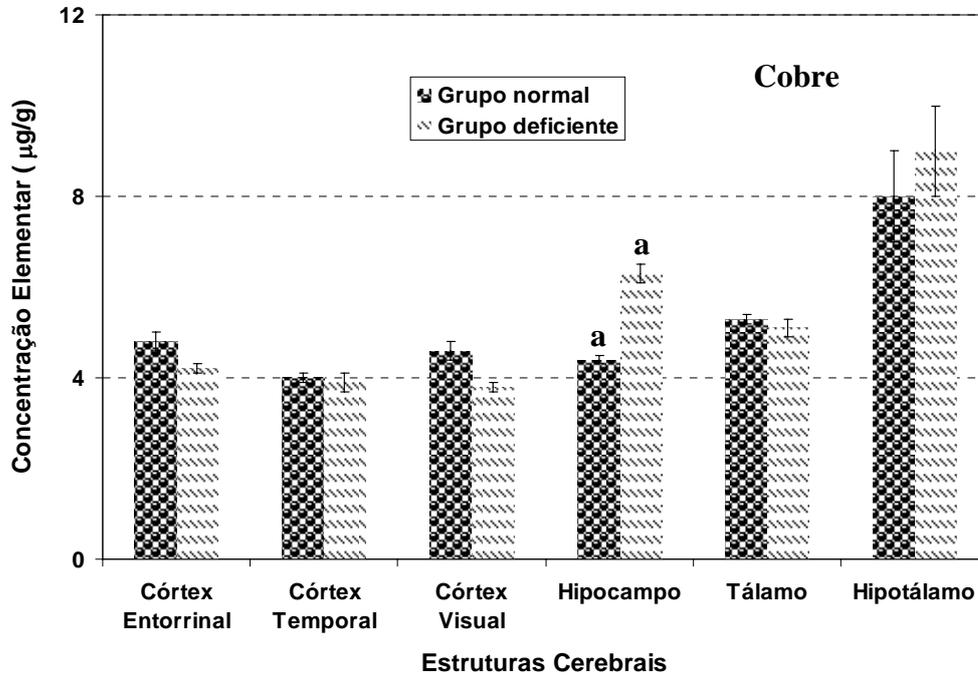


Figura 5.35. Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

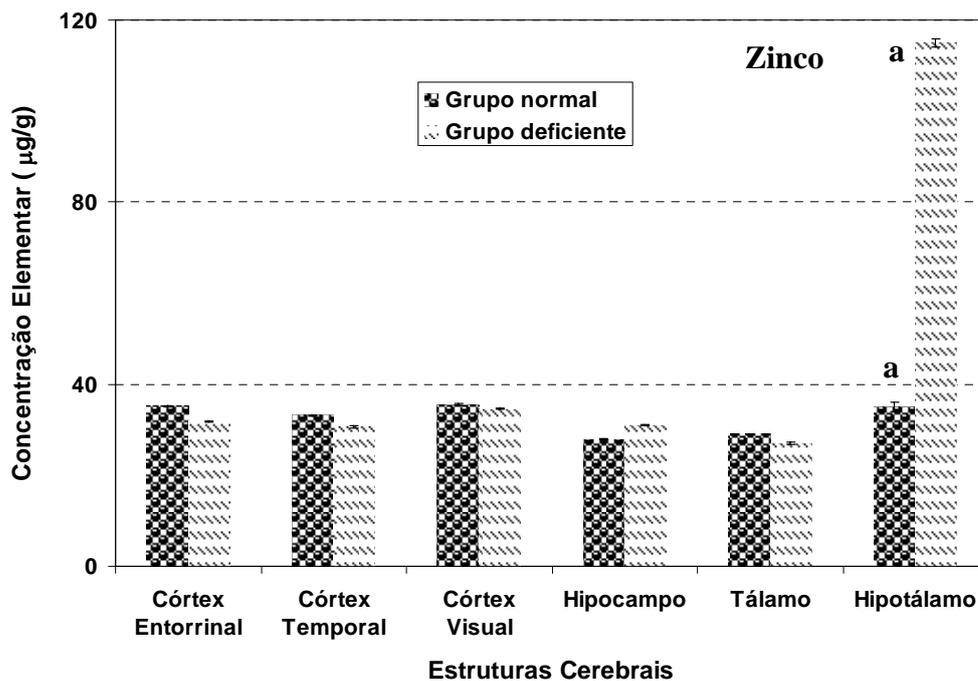


Figura 5.36. Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

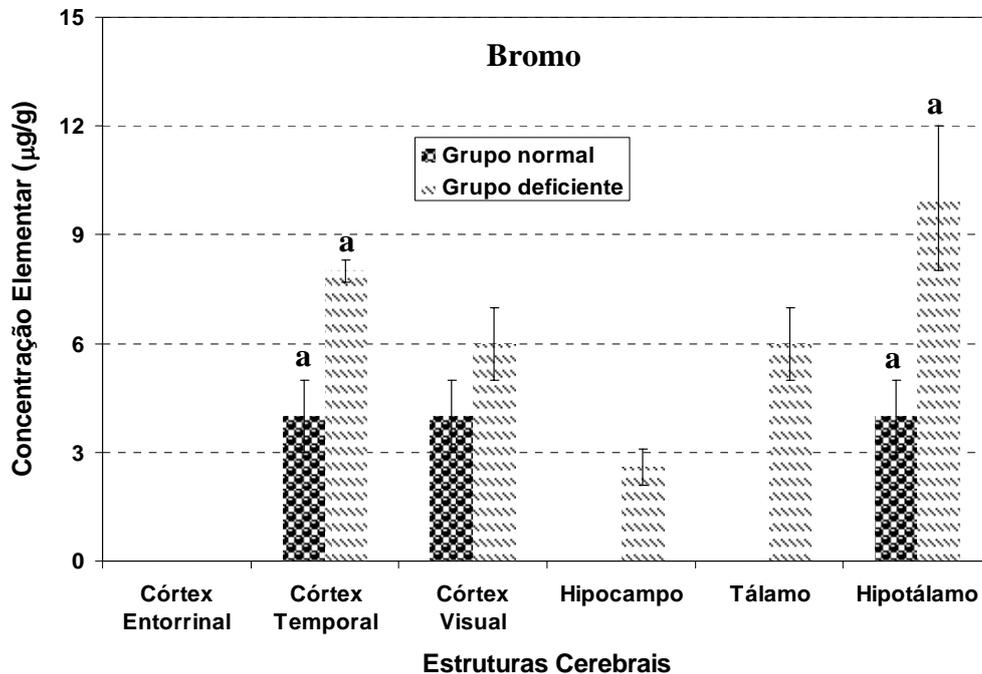


Figura 5.37. Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar idosos avaliados cognitivamente. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

O córtex pré-frontal basal e as áreas polar temporal, partes do tálamo e projeções corticais participam das diferentes funções da memória. É bem provável que o córtex pré-frontal seja um centro de controle para a metamemória, sendo o local onde inicia-se a recordação, e a seqüência temporária e a organização de informação [136].

É bem estabelecido que o córtex pré-frontal é dentre as regiões cerebrais, a mais sensível aos efeitos negativos da idade, mas ainda não está claro se os efeitos causados pelo envelhecimento nas estruturas cerebrais são uniformes ao longo de todas as regiões pré-frontais. Estudos sugerem alterações nas seguintes tarefas: memória de trabalho, resolução de problemas complexos, formação da concepção e inibição da resposta [52].

Analisando as tabelas apresentadas no anexo I, observamos que existem diferenças estatisticamente significativas na concentração elemental entre os dois grupos. Os níveis de Br e de Al foram superiores em todas as regiões analisadas dos animais com deficiência cognitiva. Isto pode ser explicado, uma vez que estudos

mostraram um aumento na concentração de bromo no córtex e no hipocampo de indivíduos com a DA [41].

Além disso, os teores de Cl, Fe e Cu também foram superiores no hipocampo dos animais com deficiência cognitiva. O hipocampo é uma das regiões consideradas importantes no processo de aprendizagem, o que sugere que o acúmulo desses elementos, Al, Fe, Cu, Zn (embora não foi estatisticamente significativo) e Br, interferem negativamente no processo de retenção da informação, uma vez que os animais com deficiência cognitiva apresentaram problemas em reter informações. Presume-se que o Zn^{2+} está envolvido na modulação da excitabilidade neuronal e na plasticidade sináptica do desenvolvimento e aprendizado [105].

Além disso, os níveis de Ca, Cu e Zn e também foram superiores no hipotálamo, e os níveis de Fe também foram maiores no córtex temporal dos animais com deficiência cognitiva. A acumulação de Fe pode resultar no dano oxidativo e neurodegeneração [86].

Por outro lado, houve um acúmulo de P, S, Cl, K, Ca e Fe em determinadas regiões cerebrais dos animais saudáveis em relação aos deficientes. Os níveis de P foram inferiores no tálamo e no hipotálamo dos animais com deficiência cognitiva em relação aos saudáveis; as concentrações de S foram inferiores apenas no tálamo dos animais com deficiência cognitiva em relação aos saudáveis; os teores de Cl foram inferiores no córtex visual e tálamo dos animais com deficiência cognitiva em relação aos saudáveis; os níveis de K foram menores no córtex temporal, no córtex visual, no hipocampo e no tálamo dos animais com deficiência cognitiva em relação aos saudáveis, enquanto que os teores de Ca e Fe foram menores apenas no córtex visual dos animais com deficiência cognitiva em relação aos saudáveis.

5.4.3. Determinação dos níveis dos elementos em função da doença de Huntington

Como já mencionado anteriormente, distúrbios nos níveis dos elementos podem causar doenças neurodegenerativas. A doença de Huntington é pouco explorada em relação aos níveis dos elementos traço e majoritários. Portanto, esse estudo tem como objetivo verificar se existe alteração nas concentrações elementares no corpo estriado de camundongos saudáveis e com a doença de Huntington. Os resultados das concentrações elementares encontram-se dispostos nas figuras 5.38 a 5.41 e também podem ser vistos através da tabela A5.

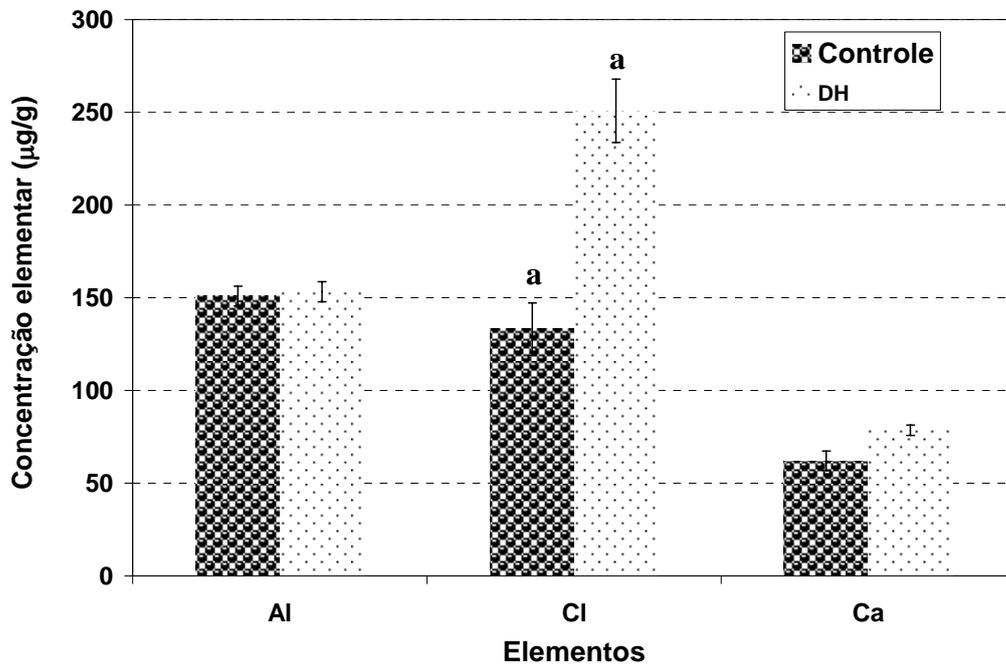


Figura 5.38. Concentração de Al, Cl e Ca no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

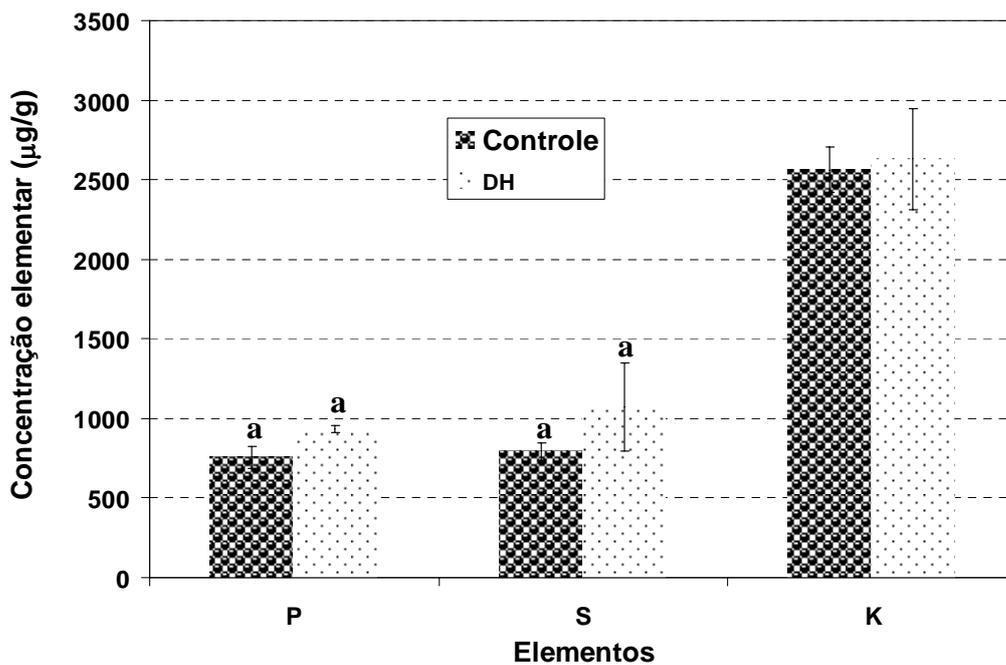


Figura 5.39. Concentração de P, S e K no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

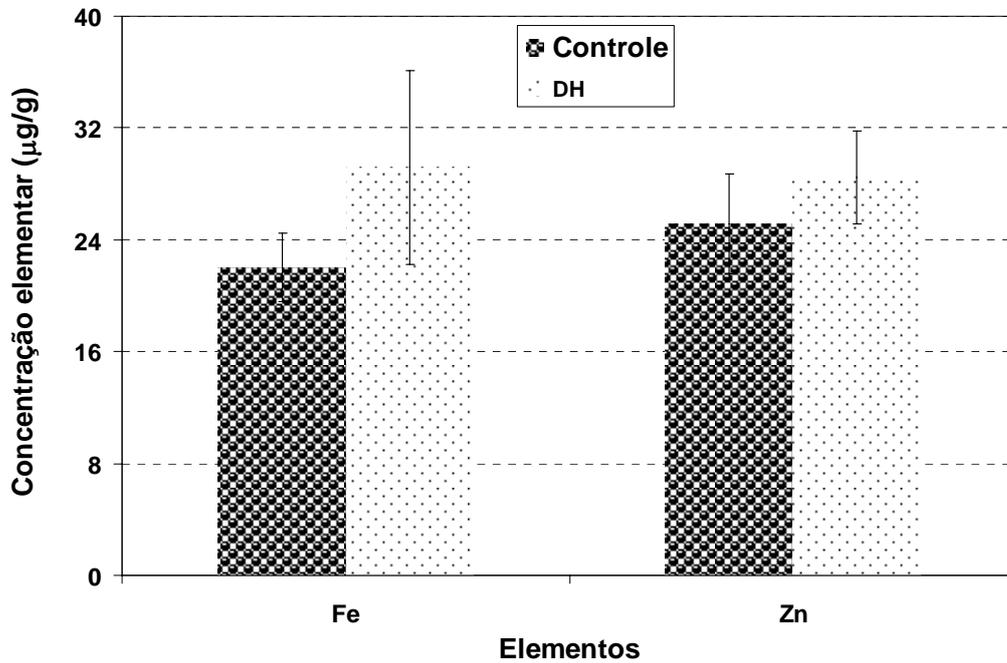


Figura 5.40. Concentração de Fe e Zn no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos níveis de Fe e Zn, com $p \leq 0,05$.

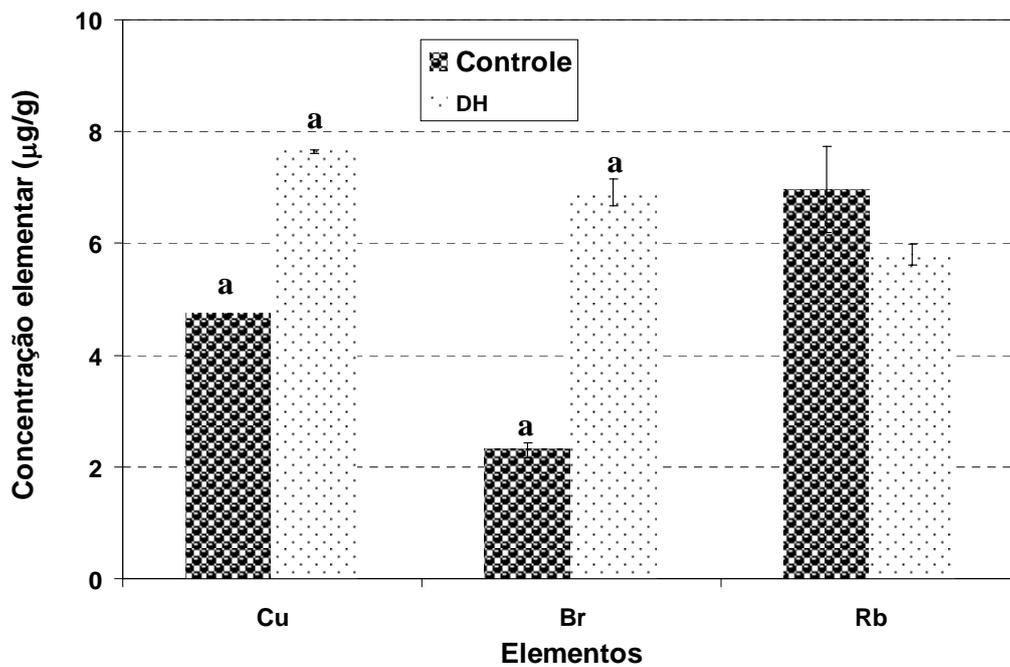


Figura 5.41. Concentração de Cu, Br e Rb no corpo estriado de camundongos com a doença de Huntington. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$.

Através das figuras 5.38, 5.39 e 5.41, verificamos que o corpo estriado dos camundongos com a doença de Huntington apresentou maiores concentrações de Cl, P, S, Cu e Br.

5.5. Mapeamento Bidimensional da concentração elementar em cérebros de animais - μ XRF

A figura 5.42 ilustra o espectro característico para amostra de cérebro utilizando μ XRF.

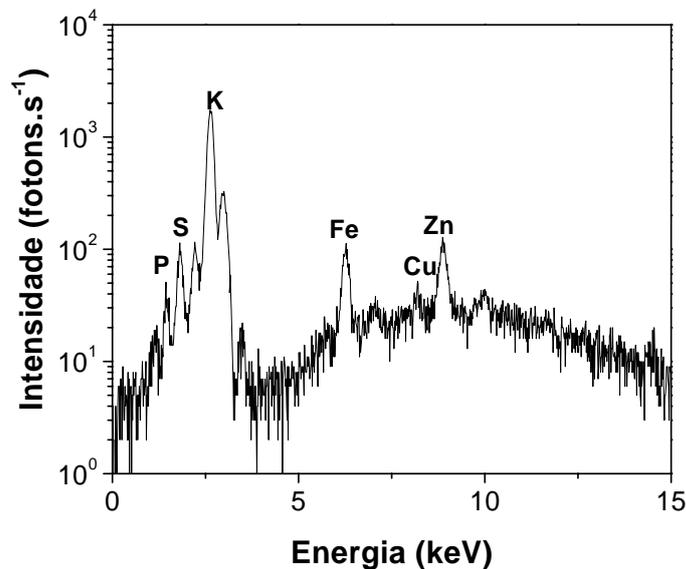


Figura 5.42. Espectro característico de uma amostra de cérebro de rato através da microXRF.

5.5.1. Sensibilidade do sistema

É determinada através da medida de padrões monoelementares da micromatter. A figura 5.43 mostra a sensibilidade do sistema para os elementos da série K.

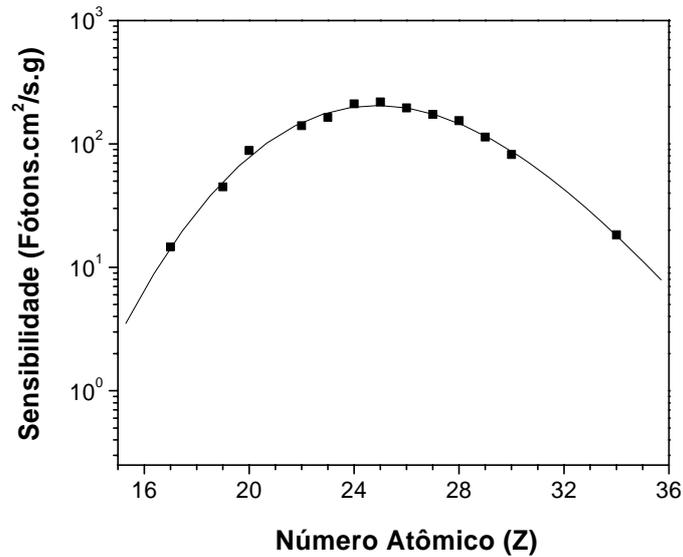


Figura 5.43. Sensibilidade dos elementos para a série K utilizando padrões monoelementares através da microXRF.

Utilizando a equação 5.6 obtêm-se quaisquer valores para a sensibilidade em função de Z:

$$S_i = \log_{10}(-31,20 + 3,51 * Z - 0,10 * Z^2 + 9,29E-04 * Z^3) \quad (5.6)$$

$$R^2 = 0,99$$

5.5.2. Absorção

A absorção é determinada através do método da transmissão da radiação desenvolvido por Anjos [186], descrito no capítulo 3. A curva de absorção é apresentada na figura 5.44.

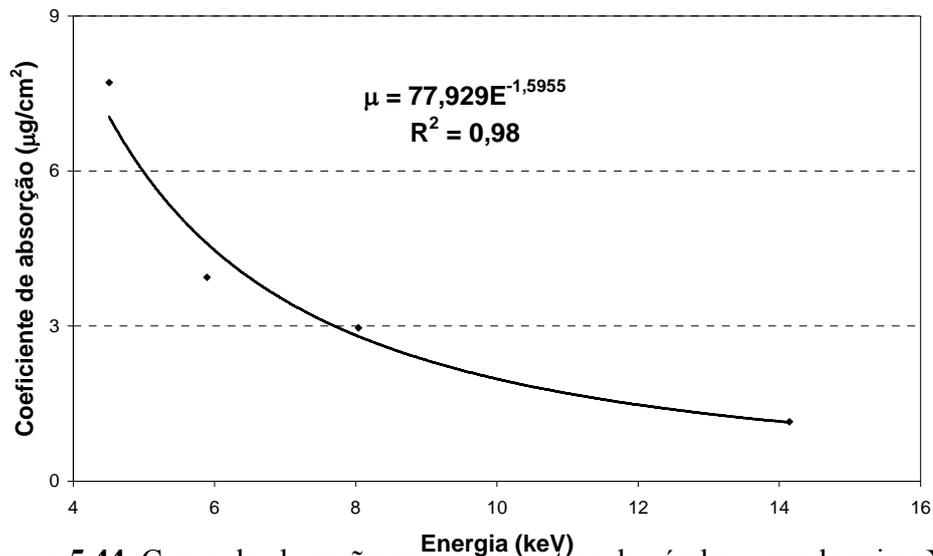


Figura 5.44. Curva de absorção para as amostras de cérebro usando microXRF.

5.5.3. Concentração elementar

A concentração elementar é determinada utilizando os parâmetros físicos descritos acima, e os cálculos são obtidos através de um programa desenvolvido por Oliveira, descrito passo a passo no capítulo 4.

As figuras 5.45 a 5.49 apresentam os mapas bidimensionais da concentração elementar em cérebros de ratos Wistar fêmeas, sendo que cada idade representa uma única amostra. No total, temos um $n = 3$ para cada idade analisada, sendo que todas as amostras apresentaram o mesmo comportamento para a mesma idade e para o mesmo elemento.

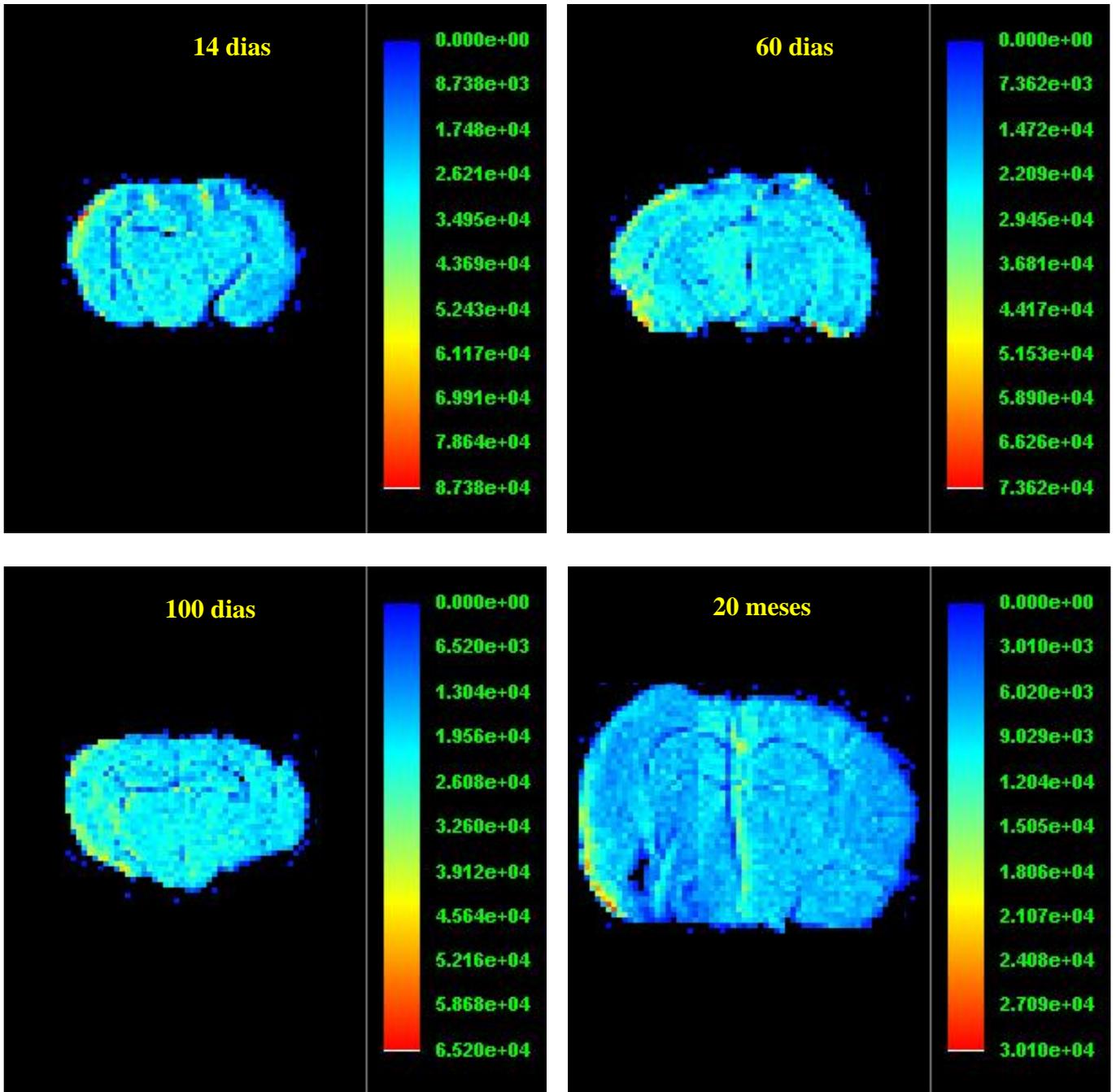


Figura 5.45. Mapeamento bidimensional da concentração de fósforo em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

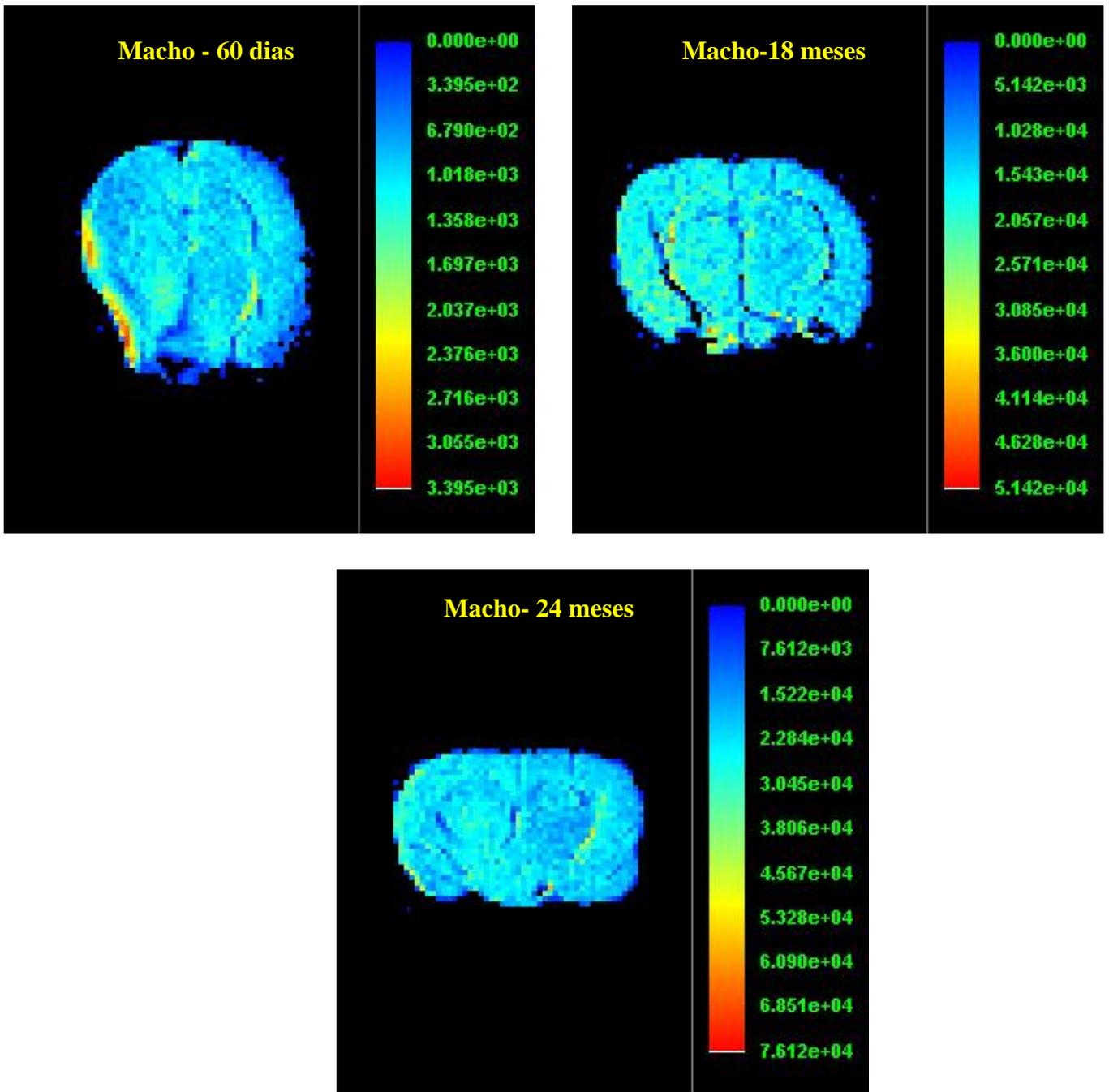


Figura 5.46. Mapeamento bidimensional da concentração de fósforo em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Através das figuras 5.45 e 5.46 observamos que a concentração de P diminuiu em função da idade nas fêmeas, mas em contrapartida, aumentou com o avanço da idade nos machos. Quanto à sua distribuição verificamos que foi homogênea ao longo do cérebro, independentemente da idade e do sexo.

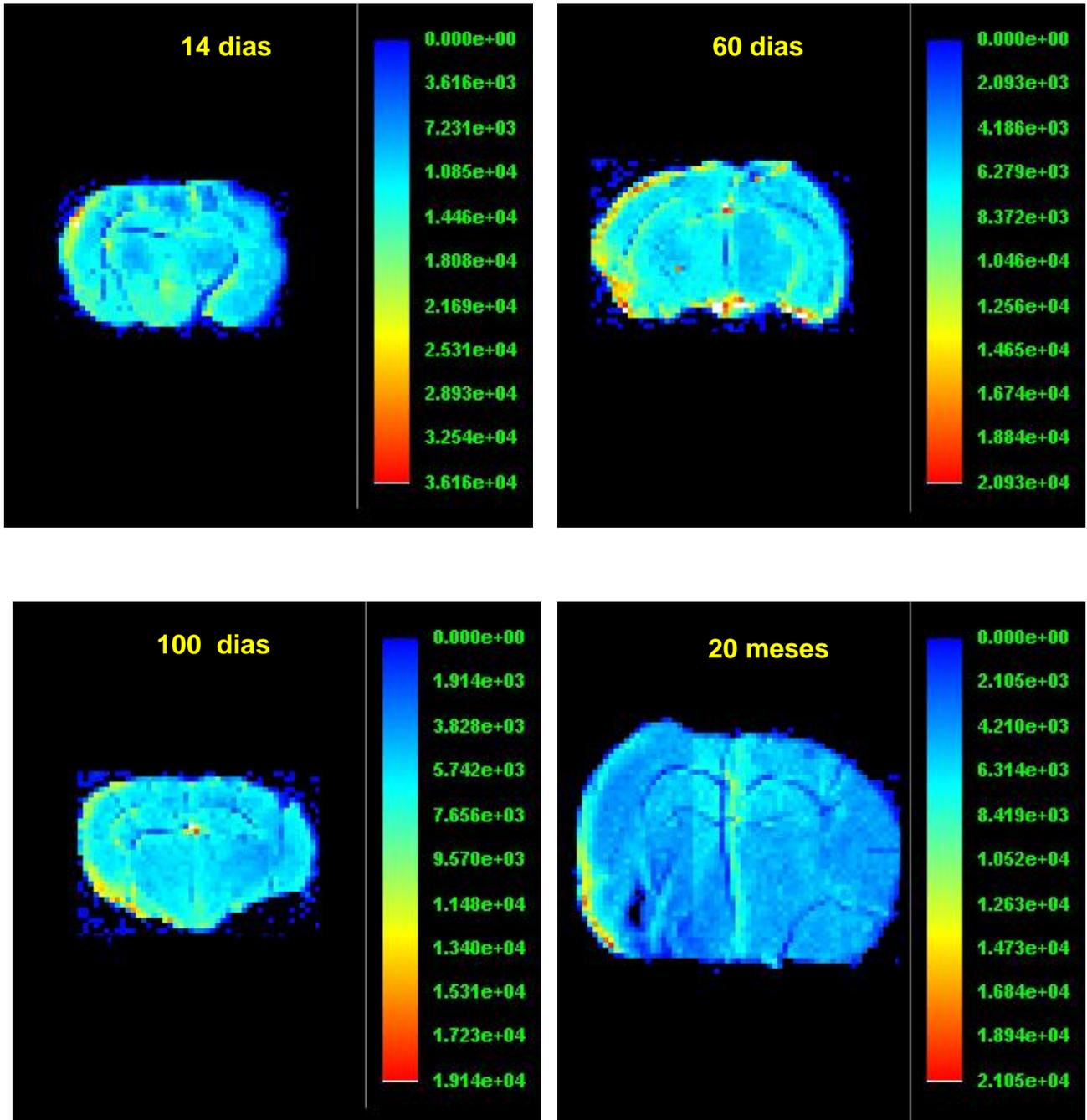


Figura 5.47. Mapeamento bidimensional da concentração de cloro em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

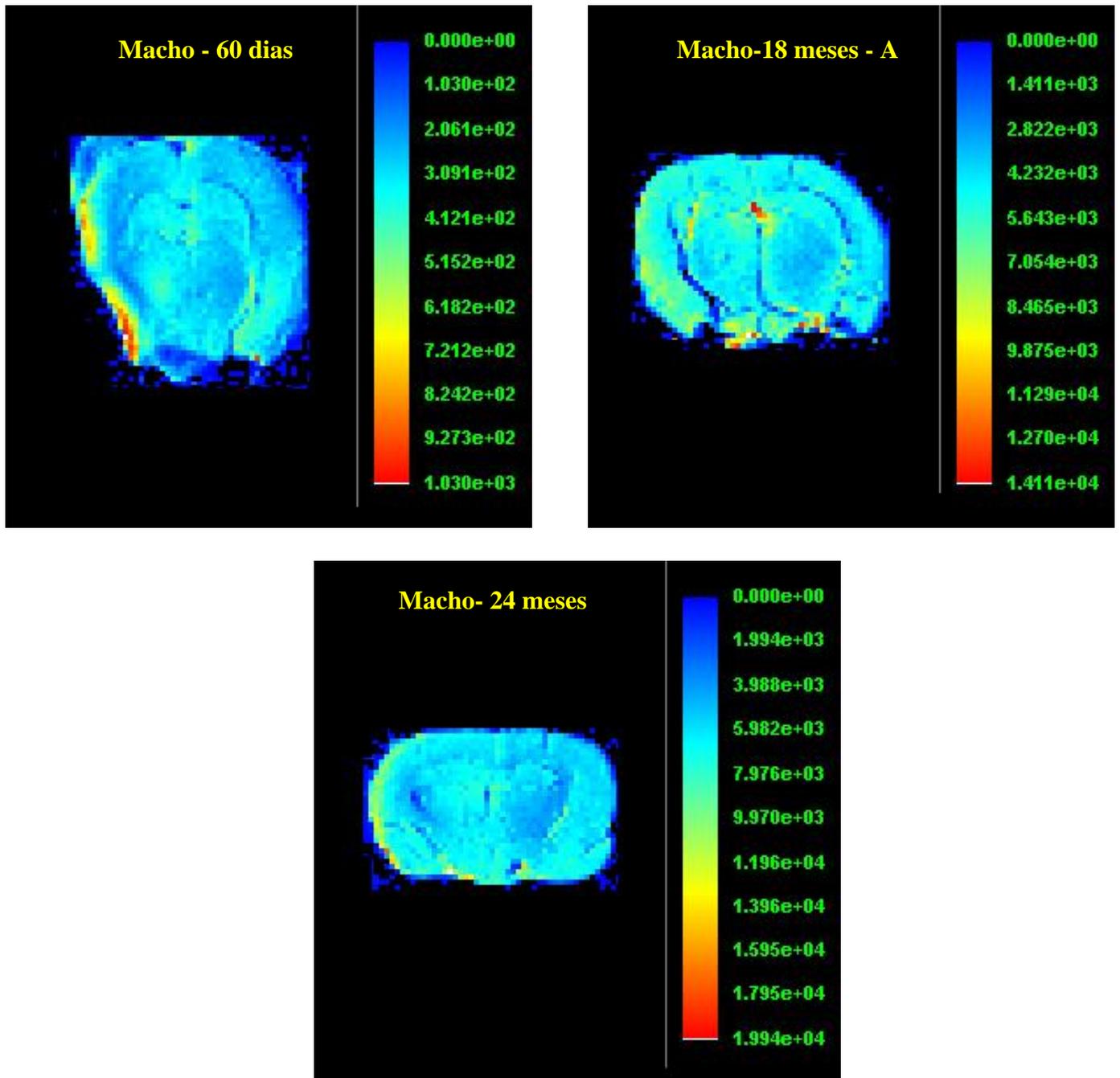


Figura 5.48. Mapeamento bidimensional da concentração de cloro em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Através das figuras 5.47 e 5.48 verificamos que o nível de Cl diminuiu em função da idade nas fêmeas, porém, nos machos sua concentração aumentou em relação à idade. Analisando sua distribuição ao longo do cérebro, verificamos que o Cl foi mais intenso nas regiões cortical, hipocampal e talâmica, para todos os animais estudados, exceto na fêmea de 20 meses.

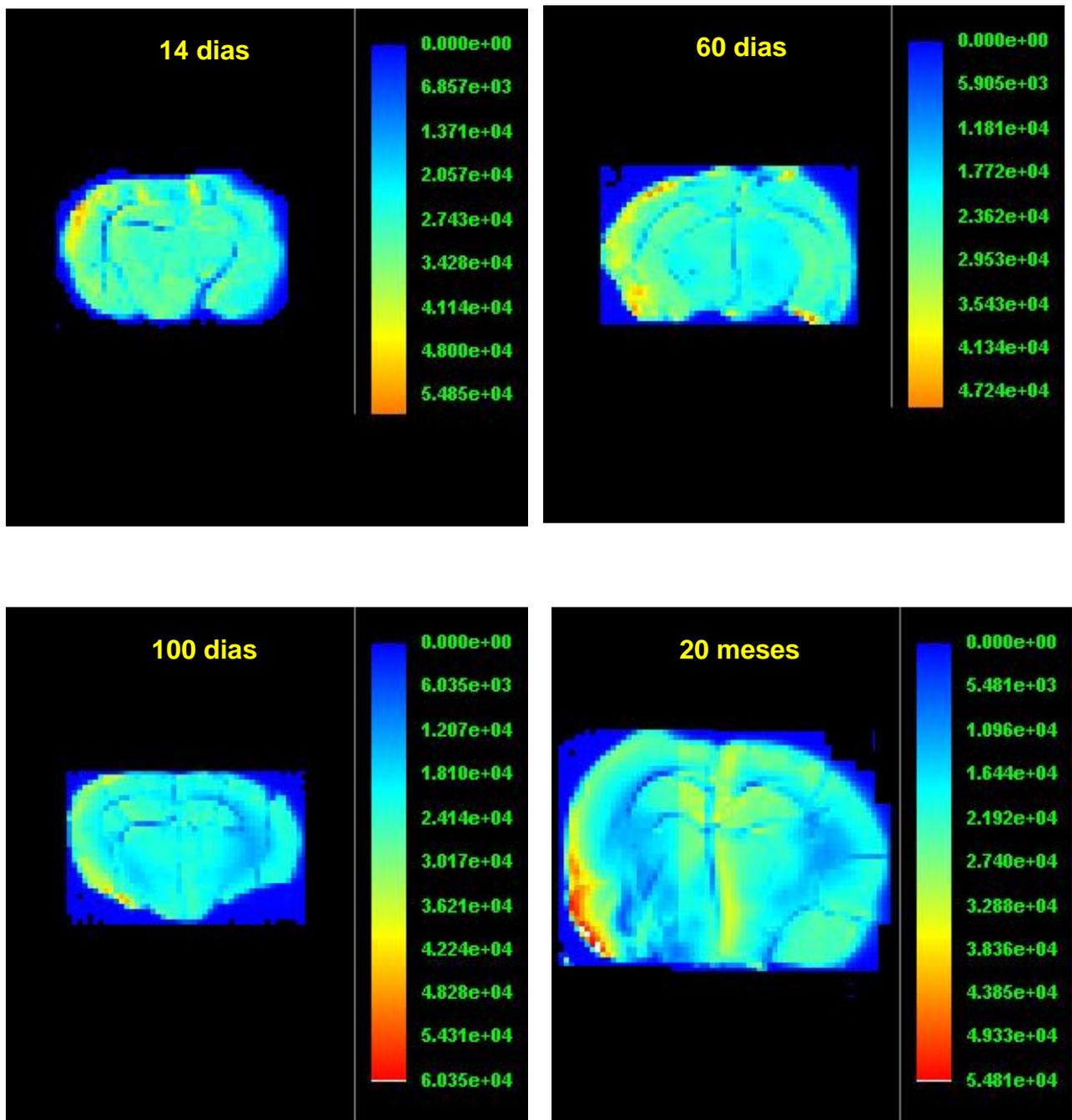


Figura 5.49. Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

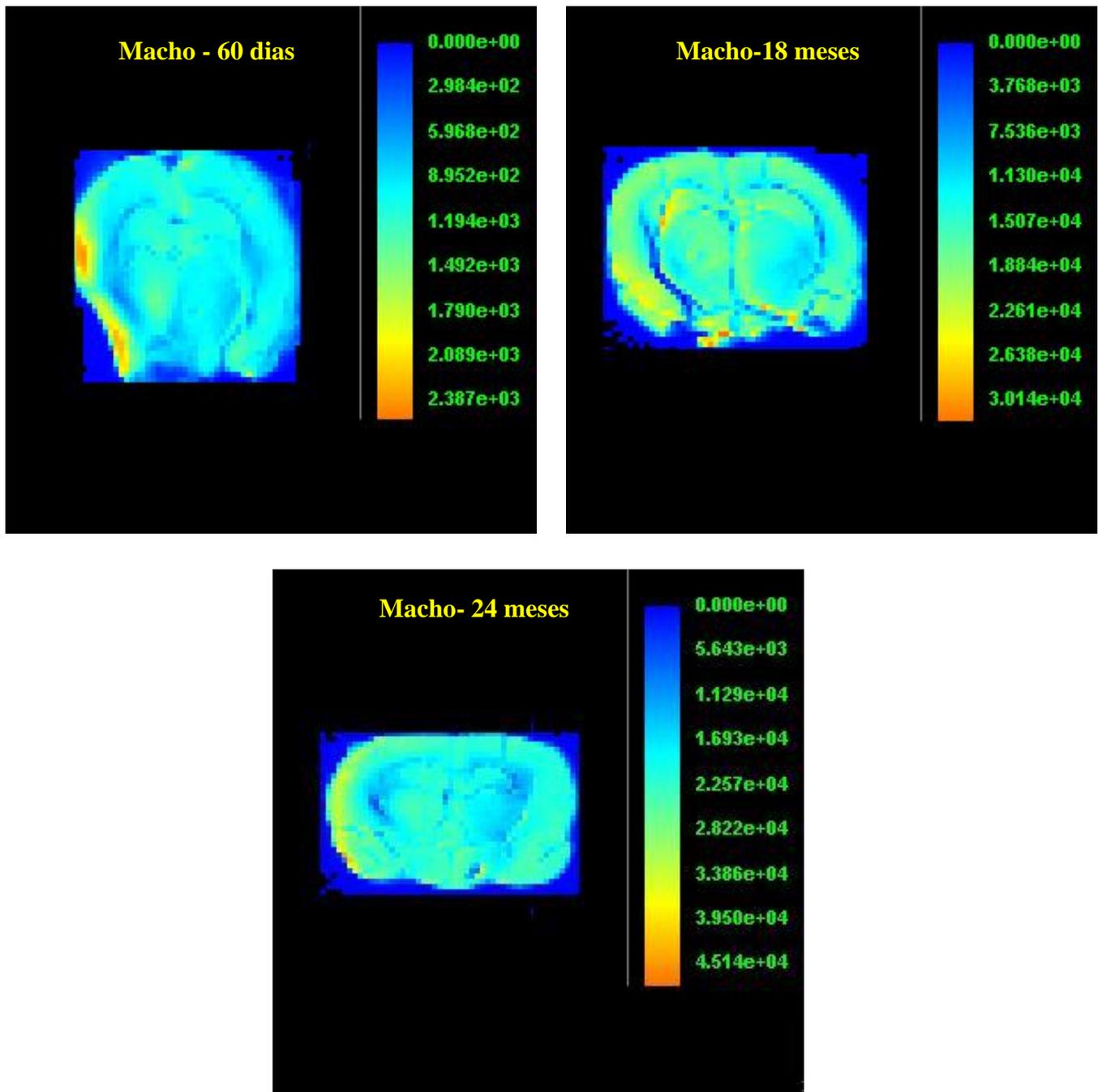


Figura 5.50. Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Através das figuras 5.49 e 5.50 observamos que o nível de K aumentou nos machos em função da idade do mesmo modo que os níveis de P e Cl. Todavia, nas fêmeas a concentração de K diminuiu entre 14 e 60 dias de idade, e depois aumentou, entre 60-100 dias, permanecendo constante, entre 100 dias e 20 meses de idade. Quanto à sua distribuição, verificamos que independentemente da idade e do sexo, foi homogênea ao longo do cérebro.

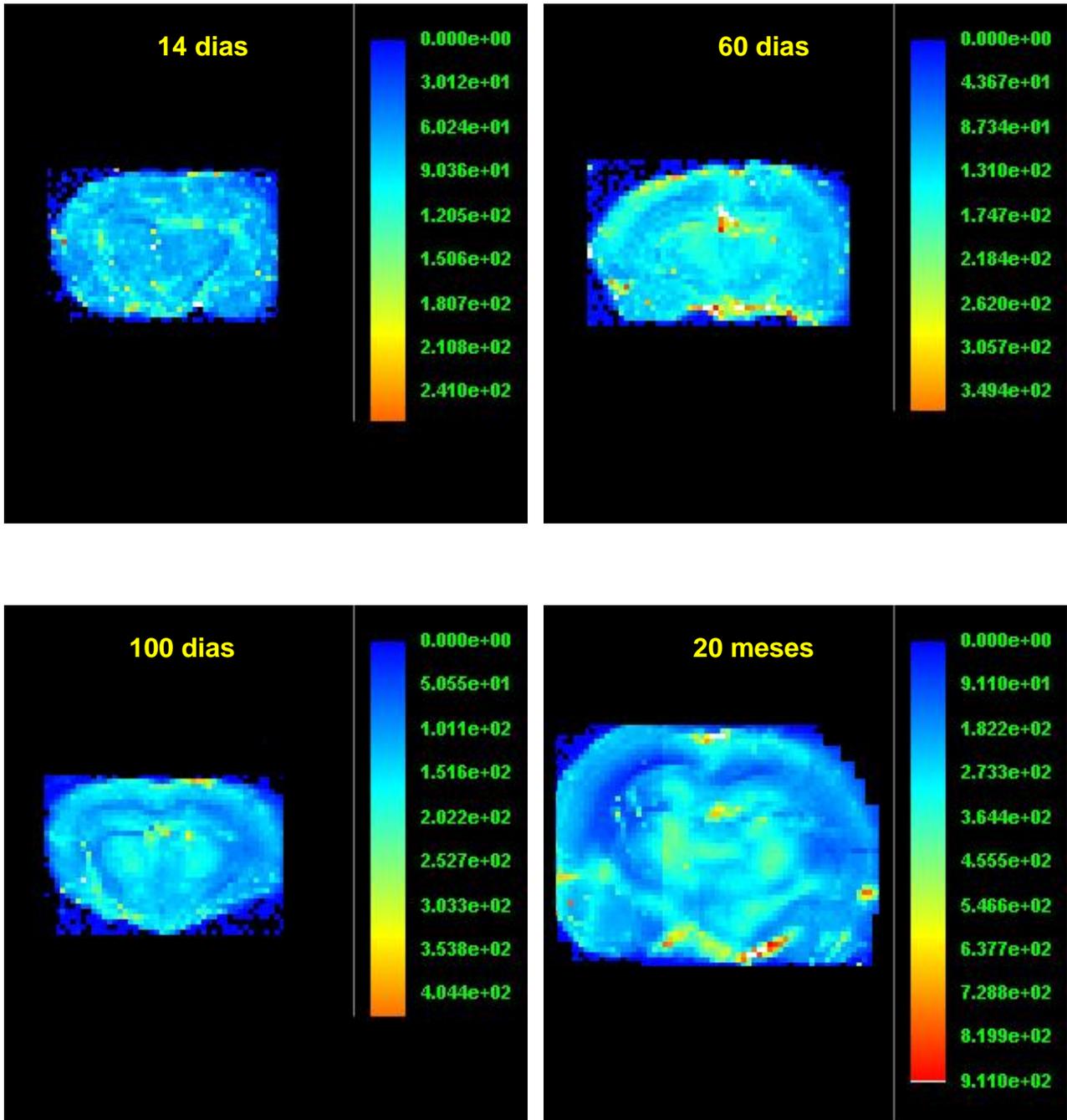


Figura 5.51. Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

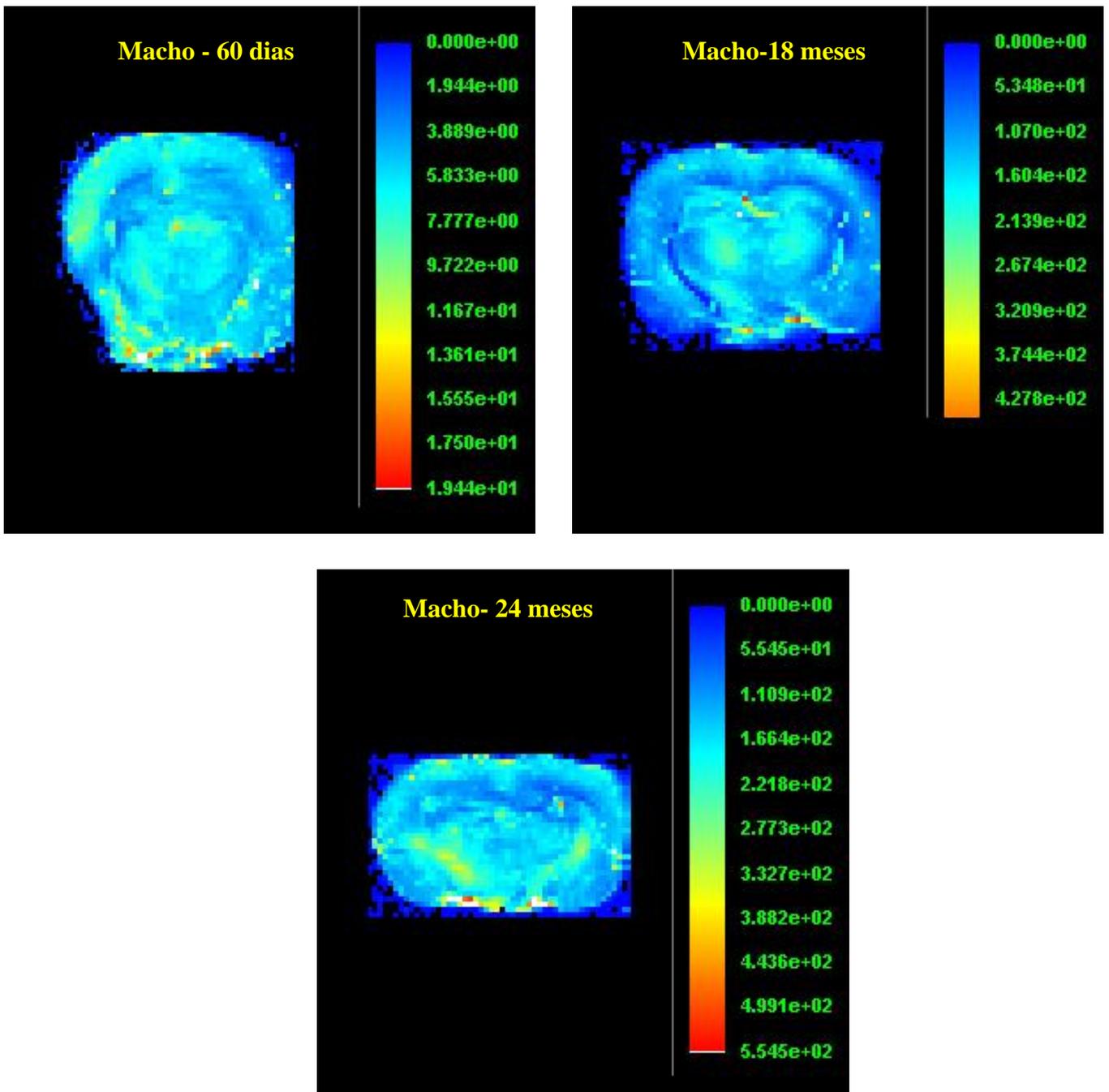


Figura 5.52. Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Nas figuras 5.51 e 5.52, observamos que os níveis de Fe aumentaram à medida que a idade avança e que, além disso, as fêmeas apresentaram níveis superiores de ferro em relação aos machos.

Em relação à sua distribuição, verificamos que o Fe foi mais intenso na região cortical, talâmica e hipotalâmica. Estes resultados sugerem que de fato o Fe afeta negativamente os mecanismos químicos cerebrais, desde que, há também um aumento

nos níveis desse elemento em diversas desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a DP [6,113]. Watt et al. mostrou um aumento de 26% nos teores de Fe na substância negra lesionada com 6-OHDA em relação ao lado intacto [91].

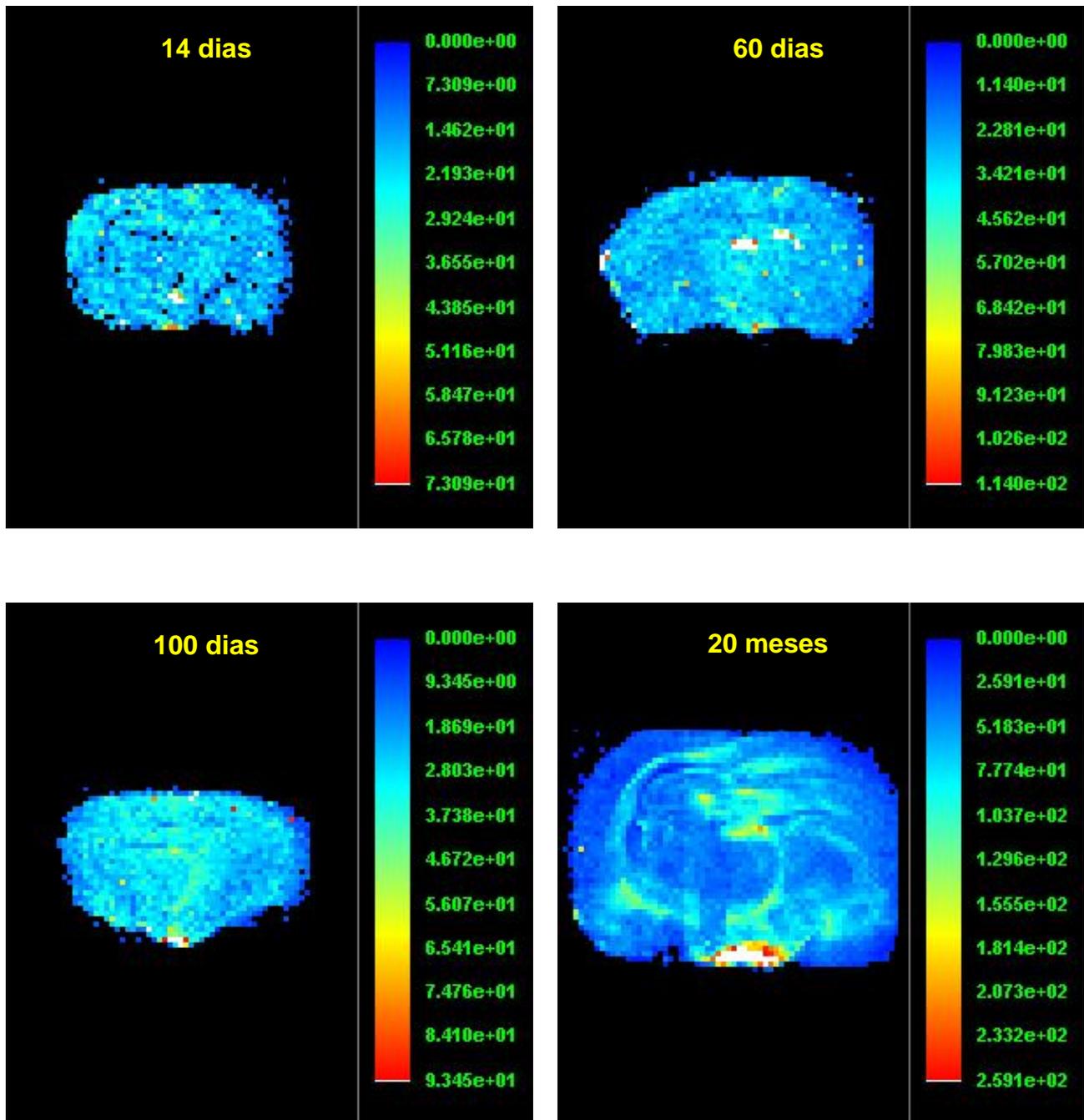


Figura 5.53. Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

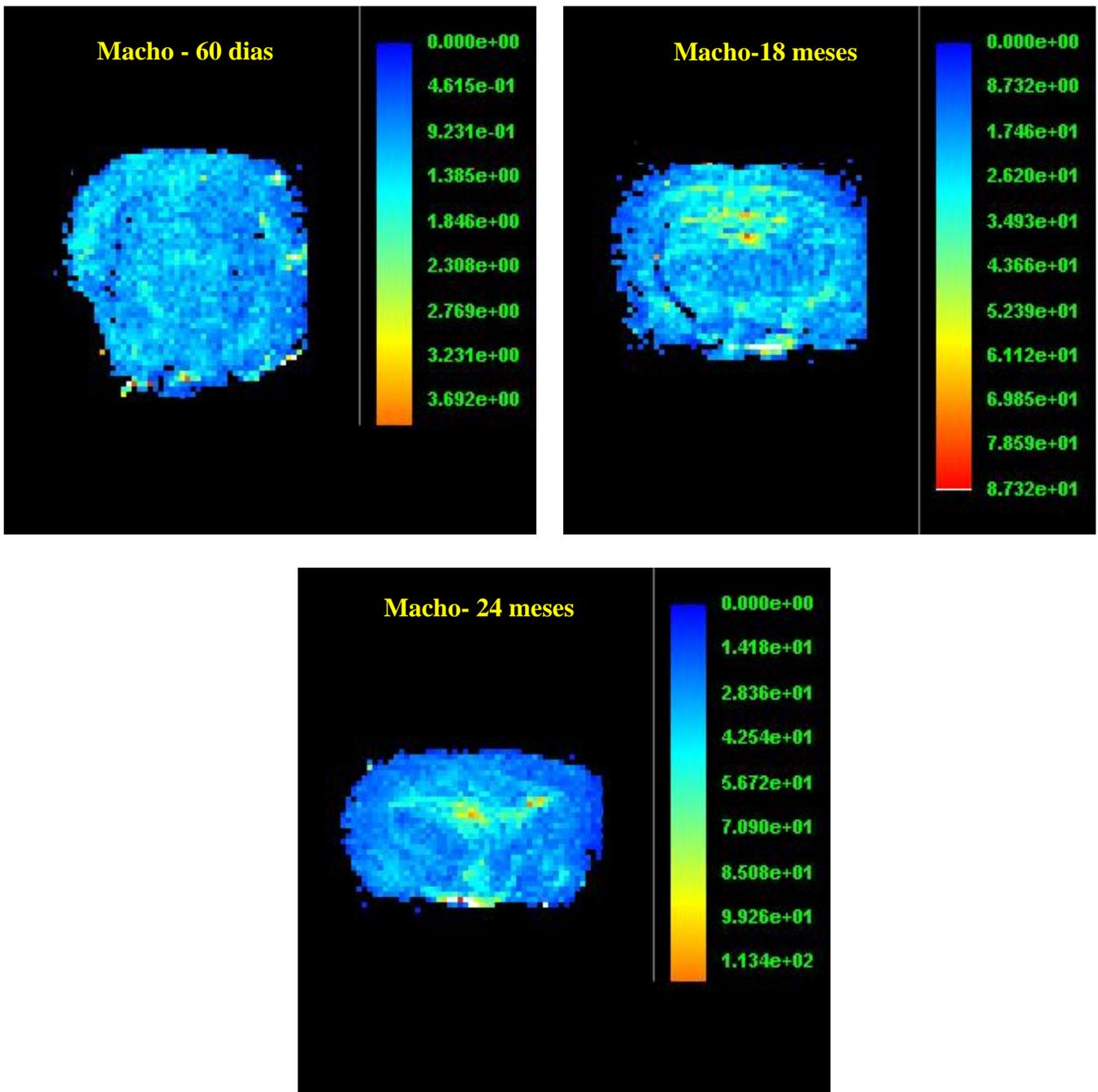


Figura 5.54. Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Através das figuras 5.53 e 5.54 do mesmo modo que os níveis de Fe, houve também um acúmulo nos níveis de Cu em função da idade. Este resultado está de acordo com os reportados por outros autores, que também reportaram um aumento nos teores de Cu em algumas áreas cerebrais, como por exemplo, o hipocampo e o córtex temporal [8, 10, 12]. A doença de Wilson também é caracterizada pelo acúmulo deste

elemento [15]. Sua distribuição ocorreu de maneira irregular e similar em todos os animais estudados.

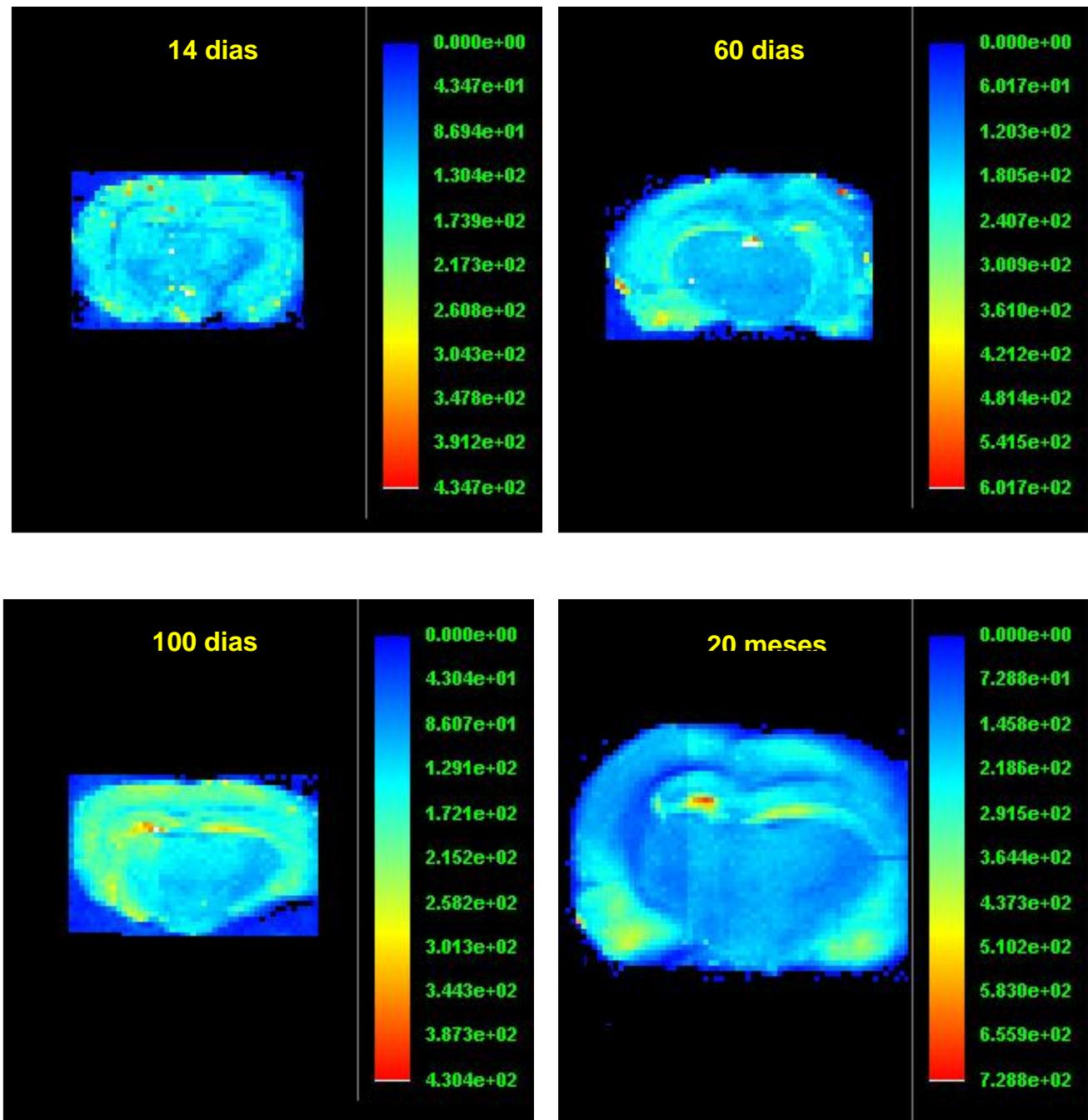


Figura 5.55. Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em ratos Wistar fêmeas jovens, adultas e idosas.

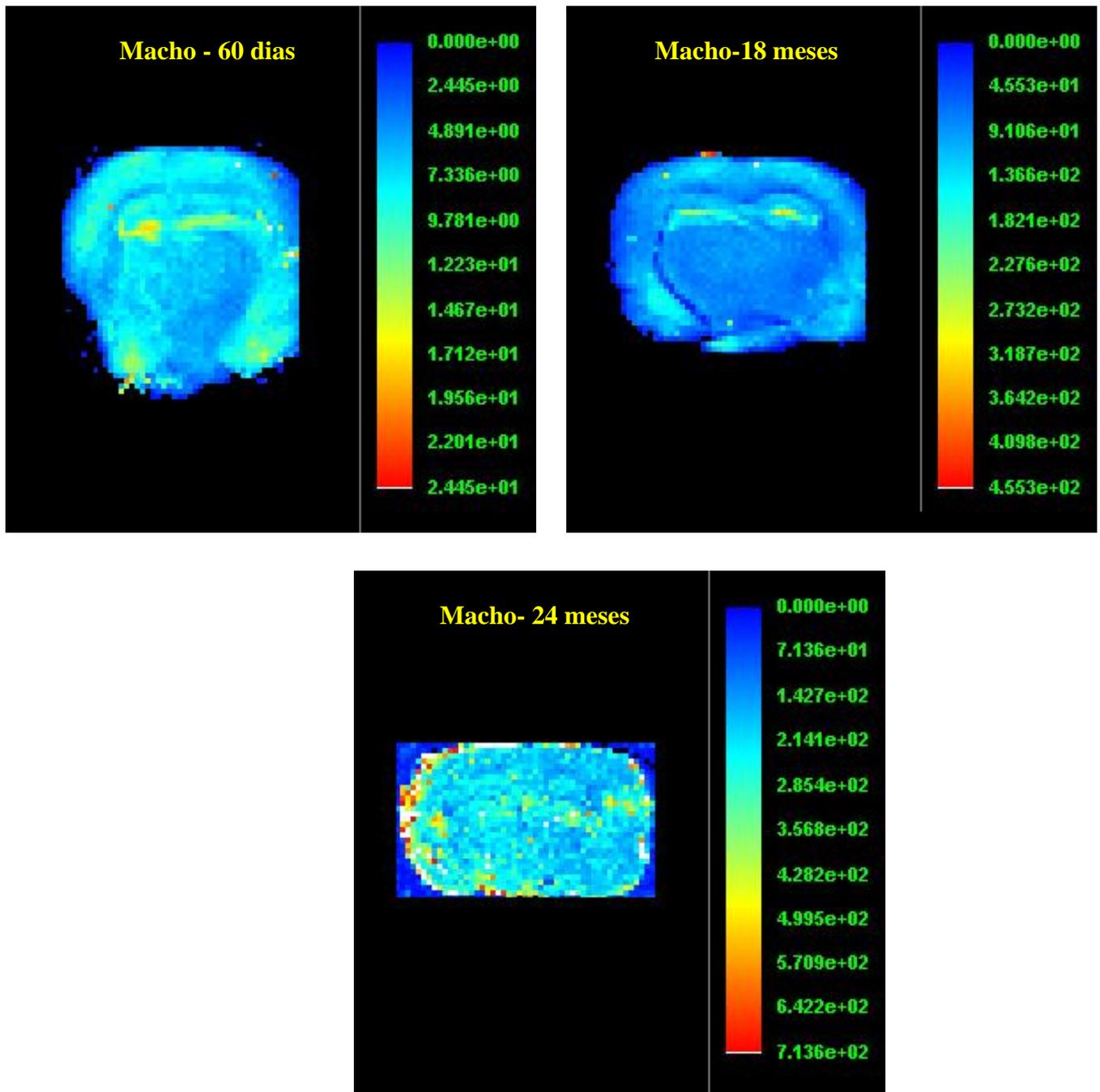


Figura 5.56. Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em ratos Wistar machos jovens e idosos.

Analisando as figura 5.55 e 5.56, podemos verificar que os teores de Zn foram superiores no hipocampo em relação às outras estruturas. Estes resultados estão em concordância com os descritos por Frederickson et al. [132]. Eles mostraram que o Zn é mais intenso no hipocampo do que na coluna vertebral; contudo resultados preliminares em tecidos do SNC de humanos indicam que a concentração de Zn no hipocampo é

apenas ligeiramente maior do que nas demais regiões [132]. Nossos resultados também concordam com os reportados por Takeda et al. [37], que também determinaram um acúmulo de Zn na formação hipocampal.

As figuras 5.57 a 5.60 mostram o mapeamento do potássio, ferro, cobre e zinco, respectivamente, através da μ XRF, em tecidos cerebrais de uma amostra de camundongo transgênico com a doença de Huntington e controle. No total, temos um $n = 3$, para o animal transgênico e um $n = 3$ para o controle, sendo que todas as amostras do grupo transgênico apresentaram o mesmo comportamento da amostra transgênica apresentada nas figuras 5.57 a 5.60 e todas as amostras do grupo controle também apresentaram o mesmo comportamento da amostra controle apresentada nas figuras 5.57 a 5.60.

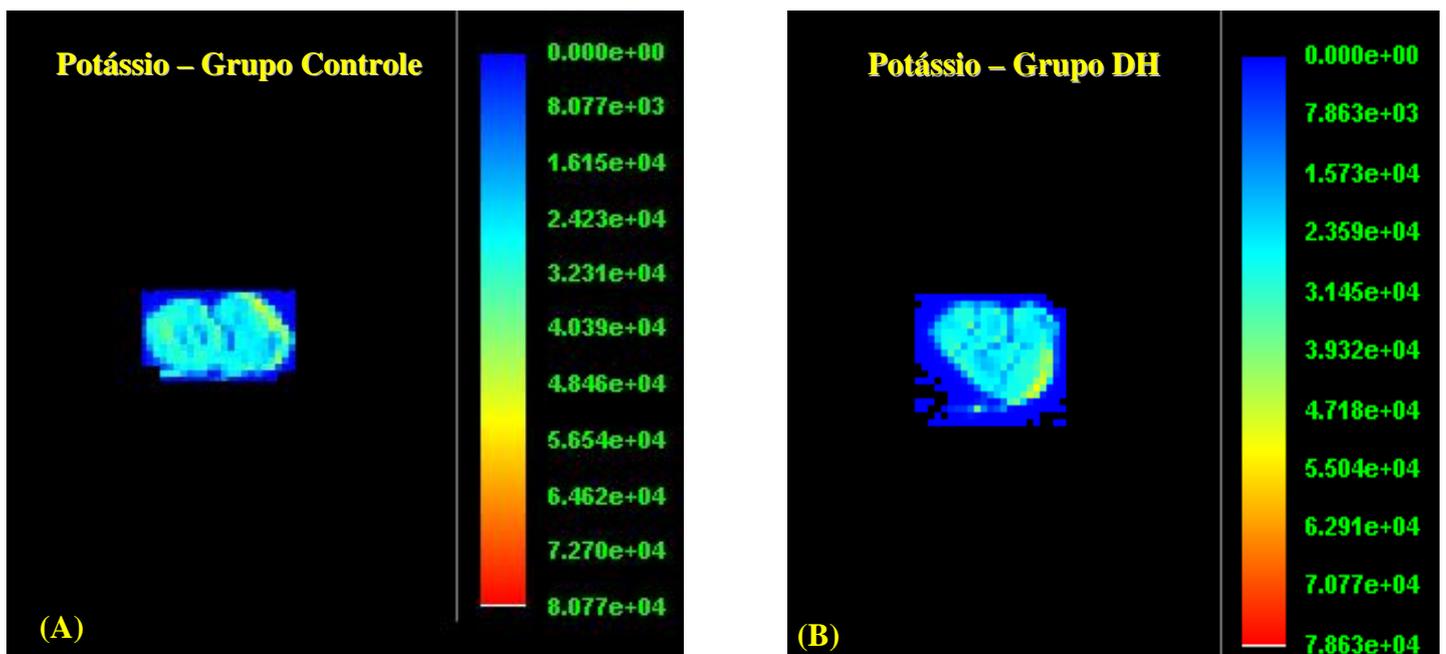


Figura 5.57. Mapeamento bidimensional da concentração de potássio em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.

Através da figura 5.56, observamos que os níveis de K, tal e qual, na TXRF, não variam em função da doença.

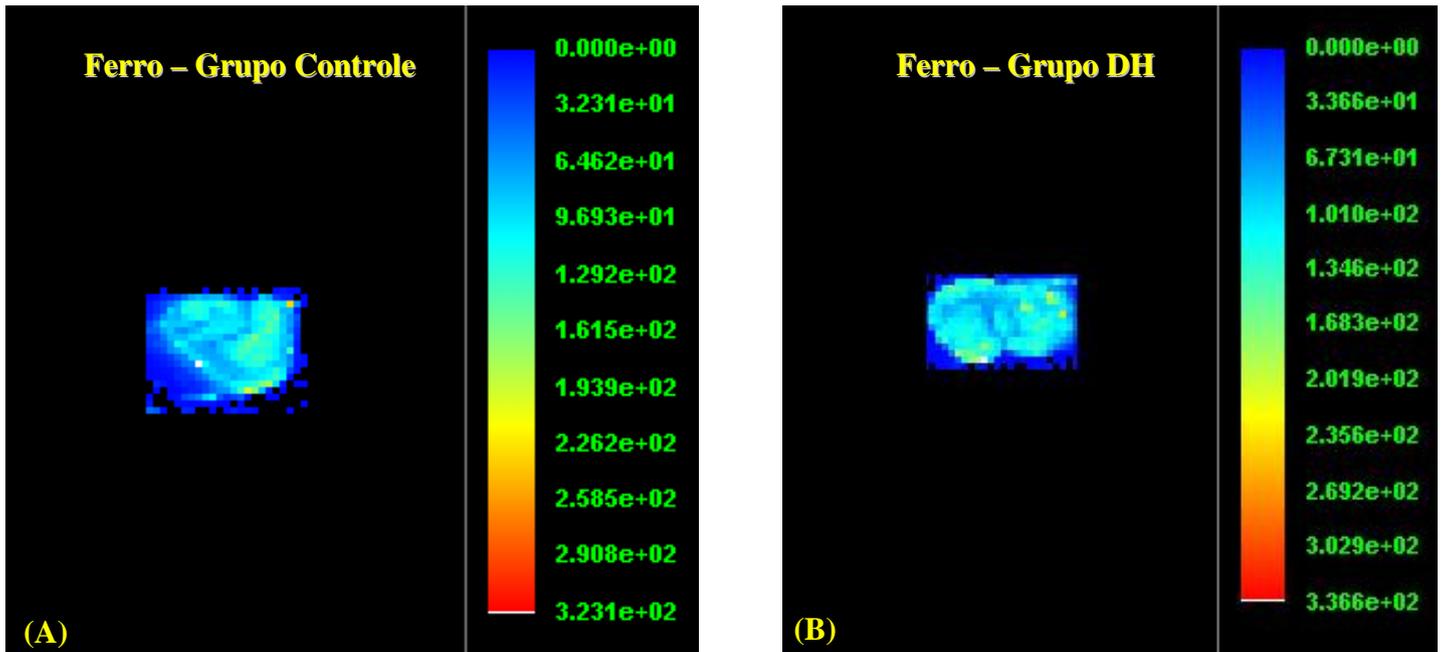


Figura 5.58. Mapeamento bidimensional da concentração de ferro em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle

Através da Figura 5.58, observamos que os teores de Fe são ligeiramente maiores, nos cérebros dos animais com a DH, em relação aos controles.

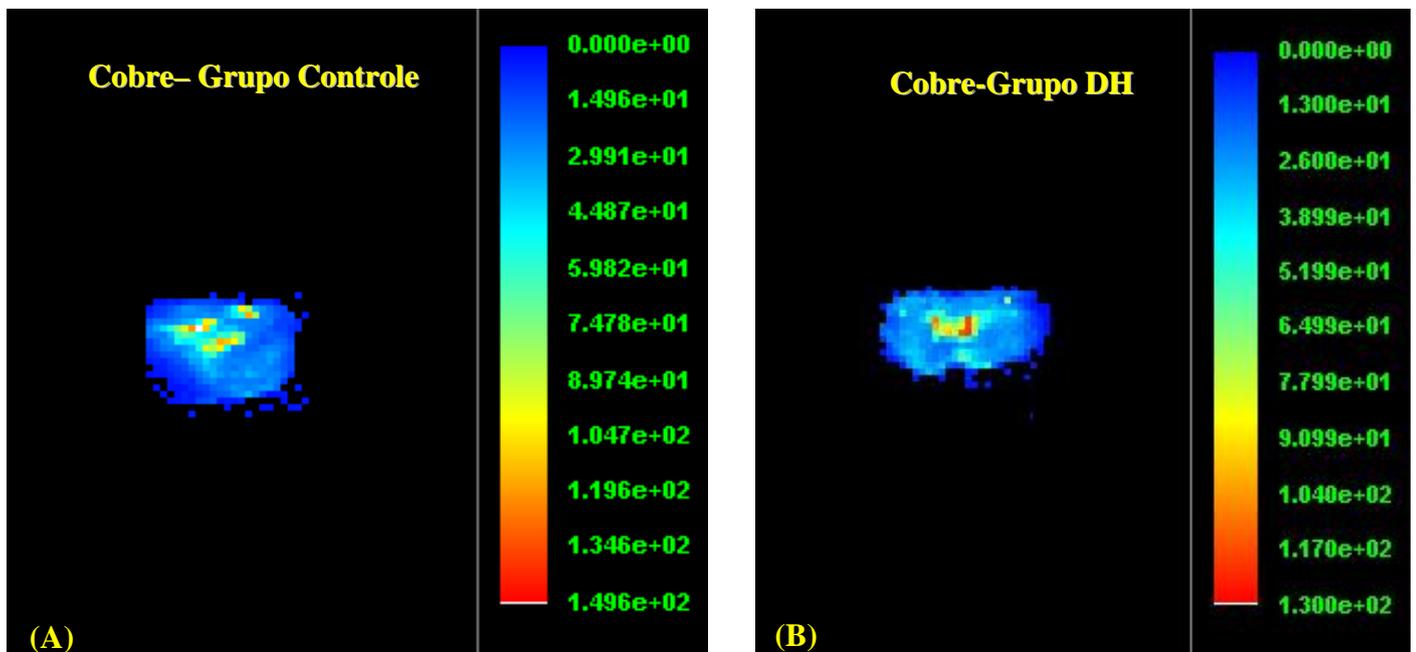


Figura 5.59. Mapeamento bidimensional da concentração de cobre em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.

Em contrapartida, através da figura 5.59, verificamos que os níveis de Cu, são ligeiramente inferiores nos cérebros dos animais com a DH, em relação aos controles.

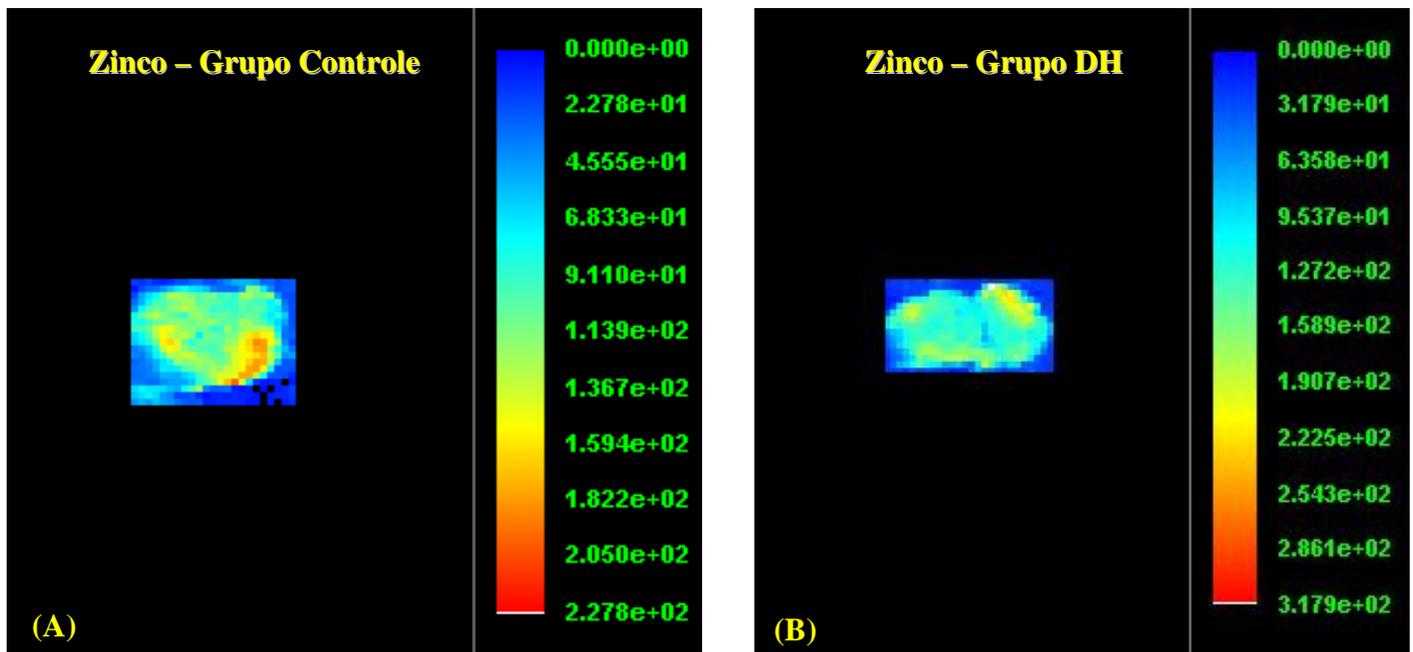


Figura 5.60. Mapeamento bidimensional da concentração de zinco em camundongos transgênicos com a doença de Huntington e controle.

Através da figura 5.60, observamos que o zinco é superior no cérebro dos animais com a DH, em relação aos do grupo controle.

5.6. Amostras Certificadas

Como já mencionado no capítulo 4, a acurácia dos resultados foi determinada a partir da medida de amostras certificadas, fígado bovino, tanto para a TXRF quanto para a μ XRF. Esses resultados estão apresentados na tabela A6 no apêndice A.

5.7. Discussão geral dos resultados dos principais elementos envolvidos nos processos de neurodegeneração

Estudos mostraram um acúmulo de Al, Cu, Zn e Fe, [10, 53, 87] e Br [53] em cérebros de pacientes com Alzheimer em relação aos pacientes saudáveis.

Além desses acúmulos, também tem sido descrito que Cu, Zn e Fe estão concentrados na e ao redor das placas amilóides no cérebro com a DA [25] e altos teores

de Zn [89] e Fe [90] também têm sido descritos nas placas amilóides de camundongos transgênicos Tg2576 para o modelo de Alzheimer.

Tendo em vista o envolvimento desses elementos nas doenças neurodegenerativas, os itens abaixo apresentam uma discussão dos níveis desses elementos determinados no presente estudo, em função do envelhecimento, do desempenho cognitivo e da doença de Huntington.

5.7.1. Alumínio

O acúmulo de Al em todas as áreas cerebrais dos ratos Wistar fêmeas em função da idade, está de acordo com os dados descritos por Markesbery et al. [10]. O aumento de Al nos cérebros idosos pode ser resultado de uma acumulação gradual desse elemento proveniente do meio ambiente em função do tempo [10].

O alumínio é um elemento altamente neurotóxico e pode causar degeneração nos nervos celulares no cérebro de humanos e de animais de laboratório [137]. Um estudo, realizado em 1995, mostrou o acúmulo desse elemento em certas regiões cerebrais, como por exemplo, os córtices parasagital e basal, tálamo e núcleos da base de pacientes com a DA em relação aos saudáveis [24].

Na análise do Al em função do desempenho cognitivo, também observamos um acúmulo nos seus níveis em praticamente todas as áreas analisadas dos animais com deficiência cognitiva em relação aos normais. Esses dados são coerentes na medida que esse elemento também tem sido apontado como um agente causador da demência [7, 137], e como sendo responsável pelo decréscimo das habilidades neurocognitivas seguidas de exposição ocupacional de Al [7].

Além disso, o Al também está envolvido na esclerose lateral amiotrófica, na doença de Alzheimer [7, 137] e na doença de Parkinson [7].

Nosso estudo mostra, principalmente nas fêmeas, a neurotoxicidade desse elemento em função da idade e do desempenho cognitivo.

5.7.2. Ferro

Na análise de Fe, por TXRF, observamos um acúmulo nos seus níveis no córtex entorrinal, no córtex temporal e no hipocampo das fêmeas idosas. Através da μ XRF, também foi observado um aumento nos níveis de Fe, tanto nas fêmeas quanto nos

machos, em função da idade. Nossos resultados concordam com os reportados por Keen e Hurley [8], Kishi et al. [9], Markesbery et al. [10], Hill e Switer [11], Hebbrecht et al. [13], Takahashi et al. [14] e Tarohda et al. [15].

Tal aumento pode ser devido a uma alteração na vascularização que ocorre tanto durante envelhecimento, como também nas doenças neurodegenerativas [114, 115]. Além disso, o progressivo acúmulo de Fe no cérebro com o avanço da idade produz danos via radicais livres, podendo induzir a neurodegeneração através da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo [113, 116].

O Fe no cérebro tem sido associado aos mecanismos oxidativos de danos neuronais e morte celular, uma vez que, o ferro livre Fe (Fe^{2+}) promove o dano oxidativo catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radical hidroxila (OH).

Sabe-se, ainda, que as enzimas de Fe, embora ocorram em pequenas quantidades, são importantes para a química do cérebro devido à sua função nas reações oxidativas e seu envolvimento no metabolismo neurotransmissor [7].

O acúmulo de Fe, em função da idade, no hipocampo é um fato importante, uma vez que ele induz o estresse oxidativo que pode causar a neurodegeneração. O Fe está envolvido no transporte de oxigênio, armazenamento e ativação, transporte de elétrons e diversos processos metabólicos importantes [200].

Tal acúmulo é um processo específico e envolve o aumento nos níveis de Fe nas moléculas de determinadas células, particularmente as das regiões cerebrais que são alvos preferenciais nas doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson [116].

Além da DA e da DP, distúrbios na homeostase de ferro, estresse oxidativo e lesões mitocondriais têm sido descritos em outras lesões neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Huntington [73]. DP e DH estariam associadas com anormalidades no ferro, através do acúmulo desse elemento, e alterações locais resultando em dano oxidativo e neurodegeneração [104]. Nossos resultados, através da TXRF e da μ XRF, também mostraram que há uma tendência de um aumento nos níveis de Fe no corpo estriado dos camundongos transgênicos com a DH.

Na análise dos teores de Fe, em função do desempenho cognitivo, através da TXRF, verificou-se um acúmulo nos níveis de Fe no hipocampo das fêmeas idosas com deficiência cognitiva. Tendo em vista, que uma das características da DA é a deficiência cognitiva, nosso estudo reforça a idéia de que esse elemento é tóxico, em altas

concentrações, podendo ocasionar danos cognitivos. Esse elemento também está associado com a DA; estudos mostram um aumento nos teores de Fe, em determinadas estruturas cerebrais tanto de humanos quanto de animais com a DA em relação ao grupo controle [24-26, 53].

A literatura também reporta um acúmulo nos níveis de Fe no lobo frontal, putâmen e vermis cerebelar de pacientes com aterosclerose [61].

As concentrações de Fe também foram superiores na substância negra de ratos Sprague-Dawley parkinsonianos em detrimento ao controle [32] e de pacientes com a DP em relação ao grupo sadio [33].

Um estudo recente realizado em macacos, também mostrou um aumento nos teores de Fe na substância negra em função da idade e em função de uma lesão produzida através de uma injeção intracarótida arterial de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) [92].

5.7.3. Cobre

Na análise por TXRF, observamos um acúmulo nos níveis de Cu, no hipocampo, hipotálamo (somente machos) e córtex entorrinal dos ratos Wistar idosos fêmeas e machos com 48 semanas de idade e 108 semanas de idade, respectivamente. Tal acúmulo também foi observado no hipocampo dos ratos Wistar idosos em função do desempenho cognitivo.

Na análise por MicroXRF, também foi observado em aumento nos teores de Cu em função da idade.

Estes resultados estão de acordo com os reportados por outros autores, que também verificaram um aumento nos teores de Cu em algumas áreas cerebrais, como por exemplo, o hipocampo e o córtex temporal [8, 10, 12]. Além disso, Keen et al. [8] também reportaram um aumento nos níveis de Cu com a idade em camundongos híbridos.

Em relação a doenças neurodegenerativas, estudos mostraram um acúmulo nos níveis desse elemento em cérebros com a doença de Wilson [19, 23] e com a DA [25].

No nosso estudo por TXRF, em relação à doença de Huntington, observamos um aumento nos teores de Cu no corpo estriado de camundongos transgênicos com a DH em relação aos controles. Contudo, nos cortes cerebrais, analisados por μ XRF, os níveis de Cu foram constantes em relação à doença.

5.7.4. Zinco

Através da TXRF, observamos um acúmulo nos teores de Zn no córtex temporal e no hipocampo das fêmeas idosas, no hipotálamo dos machos idosos e dos animais com deficiência cognitiva. Por outro lado, em relação à DH, verificamos um decréscimo nos níveis de Zn no corpo estriado dos camundongos transgênicos.

Houve também um acúmulo nos teores de Zn em função da idade, nas secções cerebrais analisadas por μ XRF, nos ratos Wistar machos e fêmeas, concordando com os resultados reportados por Keen e Hurley [8] e Makesbery et al. [10].

O acúmulo de Zn observado no hipocampo dos ratos Wistar fêmeas idosas (48 semanas), através da TXRF, concordam com os apresentados por Palm et al. [12] e Kishi et al. [9]. Hebbrecht et al. [13] também reportaram um aumento com o avanço da idade nos níveis de Zn na substância cinzenta e nos núcleos da base.

Estudos também mostraram um acúmulo de Zn em certas estruturas cerebrais de pacientes com a DA, como por exemplo, na amígdala, hipocampo, cerebelo[28] e no neuropilo [25]. Makjanic et al. [26], também observaram um acúmulo nos níveis de Zn ($108 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no grupo controle versus $123 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no grupo com DA) em tecidos cerebrais de pacientes com a DA em relação ao grupo controle.

Em relação à DH, observamos através da TXRF, que houve um acúmulo, embora não seja estatisticamente significativo, nos teores de Zn no camundongo transgênico com a patologia.

Observamos que tanto em ratos saudáveis (fêmeas de 48 semanas) quanto com problemas cognitivos, há um acúmulo desse elemento no hipocampo em função da idade. O hipocampo é uma das estruturas mais afetadas na DA, mostrando que de fato esse elemento apesar de ser essencial, pode ser nocivo, em altas concentrações.

Portanto, os nossos resultados mostram que, mesmo em animais sadios, há um acúmulo, em função da idade, desses elementos, tal e qual na doença de Alzheimer, o que nos leva a afirmar que possivelmente esses elementos são tóxicos, em altas concentrações, nos indivíduos, podendo desencadear o surgimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a DA.

Neste capítulo, mediante os resultados apresentados no capítulo V, descreveremos as conclusões para cada enfoque abordado nesse estudo.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

A microfluorescência de Raios X foi eficaz na análise dos mapas bidimensionais das secções coronais dos cérebros de ratos Wistar e camundongos transgênicos, sendo os cortes realizados sem nenhum tipo de fixador, mantendo inalterada a distribuição elementar ao longo do tecido.

O uso do isopentano foi ideal para a realização dos cortes coronais, uma vez que este impediu a formação de cristais de gelo durante o congelamento dos tecidos cerebrais, permitindo assim a realização de um corte com uma superfície mais plana, além de melhorar a resistência mecânica do tecido.

Através da TXRF e da μ XRF observamos que os níveis dos elementos identificados diferiram bastante em relação à idade, às regiões cerebrais, ao desempenho cognitivo e à doença de Huntington. Essa variação nos níveis dos elementos quanto à idade pode ser atribuída num primeiro instante, ao fato de que com o avanço da idade, os hábitos alimentares dos indivíduos se alteram, bem como a absorção dos elementos.

Na análise por TXRF em função do envelhecimento nos ratos Wistar fêmeas verificamos que em certas regiões determinados elementos (Al no córtex entorrinal, visual e hipocampo, P no córtex temporal, Cl e Ca no córtex entorrinal, temporal e hipocampo, K no córtex temporal e no hipocampo, Fe no hipocampo, Cu e Zn no córtex temporal) encontram-se bastante elevados nos animais de 02 semanas em relação aos adultos de 08 semanas.

Os animais de meia idade (48 semanas) apresentaram níveis superiores de Al em todas as regiões cerebrais analisadas. O córtex temporal e o hipocampo desses animais apresentaram os mais altos índices de Al. Os níveis de P e Cl diminuíram em função da idade nos córtices entorrinal e visual. Os níveis de K também diminuíram em função da idade no córtex entorrinal. Os níveis de Ca também decresceram no córtex visual à

medida que a idade avança. Por outro lado, somente os níveis de P aumentaram em função da idade no hipocampo.

Os teores de Fe e Cu aumentaram no córtex entorrinal em função da idade, os níveis de Br foram superiores no hipocampo em relação à idade e por outro lado, as concentrações de Zn diminuíram em função da idade nos córtices entorrinal e visual.

O hipocampo e o córtex temporal das ratas idosas foram as estruturas mais sensíveis aos efeitos da idade, apresentando as maiores concentrações para a maioria dos elementos identificados, como por exemplo, Al, P, Cl no hipocampo, Fe somente no córtex temporal, K, Ca, Zn, Br e Rb nas duas estruturas e Cu apenas no hipocampo.

Nos ratos Wistar machos, por TXRF, observamos que o hipotálamo dos animais idosos apresentou os maiores níveis para a maioria dos elementos identificados: Al, S, Cl, K, Fe e Br.

Os níveis de P, S, Cl e Ca foram inferiores nos córtices entorrinal, temporal e visual e hipocampo dos animais idosos.

Os teores de Cu também foram superiores nos córtices entorrinal, temporal e visual dos animais machos idosos. Por outro lado, as concentrações de Zn foram superiores no hipocampo dos animais jovens (02 semanas).

Em relação ao desempenho cognitivo, observamos que os níveis de Br e de Al foram superiores em todas as regiões analisadas dos animais com deficiência cognitiva. Os animais saudáveis apresentaram um acúmulo de K em todas as regiões cerebrais estudadas e níveis superiores de S e P no hipotálamo.

No estudo por TXRF com os camundongos transgênicos com a doença de Huntington, verificamos que o corpo estriado dos camundongos com a doença apresentou maiores concentrações de Cl, Ca, P, S, Fe, Zn, Cu e Br.

Na análise, por μ XRF, em relação à idade, verificamos tanto nas fêmeas quanto nos machos que as concentrações de Fe e Cu aumentaram em função da idade. Em relação à distribuição de Fe, observamos que ele foi mais intenso na região cortical, talâmica e hipotalâmica. Enquanto que a distribuição de Cu ocorreu de maneira irregular em todos os animais estudados e o Zn encontra-se distribuído principalmente no hipocampo.

As concentrações de P e Cl diminuíram em função da idade nas fêmeas, enquanto que os níveis de P, Cl e K aumentaram com o avanço da idade nos machos. Quanto sua distribuição, verificamos que o P foi homogêneo ao longo do cérebro, independentemente da idade e do sexo. O Cl foi mais intenso nas regiões cortical,

hipocampal e talâmica, para todos os animais estudados, exceto nas fêmeas de 20 meses.

Essas diferenças regionais entre os elementos provavelmente podem ser atribuídas às diferenças funcionais apresentadas por cada estrutura cerebral.

Na análise por μ XRF nos cortes coronais dos camundongos transgênicos com a doença de Huntington, observamos que o Zn foi superior no cérebro dos animais com a DH, em relação ao grupo controle.

Dentre as estruturas cerebrais analisadas nos ratos Wistar, o hipocampo das fêmeas idosas (48 semanas) e dos animais com deficiência cognitiva foi a estrutura que mais se destacou quanto ao acúmulo nos níveis de Al, Fe, Cu, Zn e Br.

As concentrações de Fe, Cu, Zn e Br também foram superiores, embora alguns não foram estatisticamente significativos, no corpo estriado dos camundongos transgênicos com a DH.

Dessa maneira, esse estudo reforçou a idéia de que de algum modo, seja através do estresse oxidativo, da lipídio peroxidação, ou de outros mecanismos químicos, o excesso destes elementos no cérebro é tóxico para seu funcionamento.

Todavia, nos machos esse acúmulo não foi observado. O hipocampo é uma região cerebral relacionada aos mecanismos da aprendizagem e memória, e a literatura científica também descreve um acúmulo nos níveis desses elementos em relação a diversas doenças neurodegenerativas.

Nossos resultados indicam, portanto, que o acúmulo nos níveis de Fe, Cu, Zn e Br podem estar relacionados com o envelhecimento, com a deficiência cognitiva e com a DH. Sendo assim, esses elementos, apesar de serem essenciais, são tóxicos, em altas concentrações, nos indivíduos podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer, a doença de Huntington, a doença de Parkinson, dentre outras, e problemas de cognição.

Com o propósito de dar prosseguimento a esse estudo, seguem abaixo algumas sugestões para trabalhos futuros.

- a) Administração de três dietas: controle, deficiente em Fe, Cu e Zn e rica nesses elementos para verificar se o acúmulo desses elementos seria uma consequência ou uma das causas do aparecimento das doenças neurodegenerativas e de problemas de cognição.

- b) Utilização da espectroscopia de absorção de Raios X próximo a borda de absorção (MicroXanes), com a finalidade de obter mapas bidimensionais em função do estado de oxidação dos elementos.
- c) Aprimorar a técnica do corte coronal, ou seja, produzir cortes com espessuras mais finas e planas.
- d) Aplicar as técnicas de μ XRF e de TXRF no estudo da doença de Alzheimer em cérebros humanos (estudo em andamento).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KRISTIAN, T., SIESJO, B.K., 1997, “Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia, *International Review of Neurobiology*, v.40, pp.27-45.
- [2] YOUNG, W., FLAMM, E.S., 1982, “Effect of high dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potential and extracellular calcium in experimental spinal injury”, *Journal of Neurosurgery*, v.57, pp.667-673.
- [3] TAKAHASHI, H., TANAKA, S., SANO, K., 1981, “Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of experimental closed head injury”, *Journal of Neurosurgery*, v.57, pp.667-673.
- [4] MARCÓ, L.M.P., CARABALLO, E.A.H., PASCUSO, C., et al., 2003, “Determination of manganese in brain samples by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry”, *Talanta*, v.59(5), pp.897-904.
- [5] BECKER, J.S., ZORIY, M.V., PICKHARDT, C., et al., 2005, “Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry”, *Analytical Chemistry*, v.77, pp.3208-3216.
- [6] SINGH, B., DHAWAN, D., CHAND, B., et al., 1995, “Trace element distribution in rat brain following lead and lithium supplementation – A study using an EDXRF spectrometer”, *Applied Radiation and Isotopes*, v.46, (JUL), pp. 59-64.
- [7] GÓMEZ, M., SÁNCHEZ, D.J., LLOBET, J.M., et al., 1997, “Concentrations of some essential elements in the brain of aluminum-exposed rats in relation to the age of exposure”, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v.24, (OCT), pp.287-294.

- [8] KEEN, C.L., HURLEY, L.S., et al., 1980, “Developmental changes in concentrations of iron, copper, and zinc in mouse tissues”, *Mechanisms of Ageing and Development*, v.13, (MAR), pp.161-176.
- [9] KISHI, R., IKEDA, T., MIYAKE, H., et al., 1982, “Regional distribution of lead, zinc, iron and copper in suckling and adult rat brains”, *Brain Research*, v.251, (JUL), pp. 180-182.
- [10] MAKESBERY, W.R., EHMANN, W.D., ALAUDDIN, M., et al., 1984, “Brain trace element concentrations in aging”, *Neurobiology of Aging*, v.5, (SEP), pp.19-28.
- [11] HILL, J.M., SWITZER, R.C., 1984, “The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain”, *Neuroscience*, v.11, no.3, pp.595-603.
- [12] PALM, R., WAHLSTRÖM, G., HALLMANS, G., 1990, “Age related changes in weight and the concentrations of zinc and copper in the brain of the adult rat”, *Laboratory animals*, pp.240-245.
- [13] HEBBRECHT, G., MAENHAUT, W., DE REUCK, J., 1999, “Brain trace elements and aging”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 150, pp.208-213.
- [14] TAKAHASHI, S., TAKAHASHI, I., SATO, H., et al., 2001, “Age-related changes in the concentrations of major and trace elements in the brain of rats and mice”, *Biological Trace Element Research*, v.80(2), (MAY), pp.145-158.
- [15] TAROHDA, T., YAMAMOTO, M., AMANO, R., 2004, “Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.380, (AUG), pp.240-246.
- [16] HÖCK, A., DEMMEL, U., SCHICHA, H., et al., 1975, “Trace element concentration in human brain”, *Brain*, v.98, pp.49-64.

- [17] BORUCHOWSKA, M., LANKOSZ, M., ADAMEK, D., et al., 2001, "Pixel analysis of human brain tissue", X-Ray spectrometry, v.30, (JAN), pp.174-179.
- [18] NAKAGAWA, N., SAITO, T., SAITO, K., "Changes in trace element concentrations in eight brain regions of the senescence accelerated mouse (SAM) by aging", Journal of Inorganic Biochemistry, pp.147.
- [19] HANSON, A.L., JONES, K.W., GORDON, B.M., et al., 1987, "Trace element measurements using white synchrotron radiation", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, v.24/25, pp.400-404.
- [20] CHEVALLIER, P., DHEZ, P., ERKO, A., et al., 1996, "X-Ray microprobes", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, v.113, pp.122-127.
- [21] LINDH, U., 1991, "Nuclear microscopy. Its role and future in medicine and trace-element biology", Nuclear instruments and methods in Physics Research B, v.54, pp.160-170.
- [22] LINDH, U., 1990, "Micron and submicron nuclear probes in biomedicine", Nuclear instruments and methods in Physics Research B, v.49, pp.451-464.
- [23] LINDH, U., 1995, "Cell biology, trace elements and nuclear microscopy", Nuclear instruments and methods in Physics Research B, v.104, pp.285-291.
- [24] ANDRÁSI, E., FARKAS, E., SCHEIBLER, H., et al., 1995, "Al, Zn, Cu, Mn and Fe levels in brain in Alzheimer's disease", Archives of Gerontology and Geriatrics, v. 21, pp. 89-97.
- [25] LOVELL, M.A., ROBERTSON, J.D., TEESDALE, W.J., et al. 1998, "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques", Journal of the Neurological Sciences, v. 158, pp. 47-52.

- [26] MAKJANIC, J., WATT, F., 1999, “Nuclear microscopy in Alzheimer, disease”, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, v. 150, pp.167-172.
- [27] BÉLAVÁRI, CS., ANDRÁSI, E., MOLNÁR, ZS., et al., 2005, “Determination of alkali metals in control and AD brain samples by different techniques”, Microchemical Journal, v.79, pp.367-373.
- [28] DANSCHER, G., JENSEN, K.B., FREDERICKSON, C.J., et al., 1997, “Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer’s disease brains: A proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material”, Journal of Neuroscience Methods, v. 76, pp. 53-69.
- [29] ZHANG, Z.Y., LIU, N.Q., LI, F.L. et al. 2006, “Characterization of Fe, Cu and Zn in organs of PDAPP transgenic mice by XRF spectrometry”, X-Ray Spectrometry, v.35, pp. 253-256.
- [30] PELTZ-CSÁSZMA, I., ANDRÁSI, E., LÁSZTITY, A., et al., 2005, “Determination of strontium and its relation to other alkaline earth elements in human brain samples”, Microchemical Journal, v.79, pp. 375-381.
- [31] DEXTER, D.T., CARAYON, A., JAVOY-AGID, F., et al., 1991, “Alterations in the level of iron, ferritin and other trace metal in Parkinson’s and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia”, Brain, v.114, pp.1953-1975.
- [32] HE, Y., THONG, P.S.P., LEE, T., et al., 1996, “Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study”, Brain Research, v.735, (MAR), pp. 149-153.

- [33] MORAWSKI, M., MEINECKE, Ch., REINERT, T., et al. 2005, "Determination of trace elements in the human substantia nigra", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v.231, pp. 224-228.
- [34] SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., LANKOSZ, M., OSTACHOWISZ, J. et al. 2004, "Topographic and quantitative microanalysis of human central nervous system tissue using synchrotron radiation", *X-Ray Spectrometry*, v.33, pp. 3-11.
- [35] LOEFFLER, D.A., LEWITT, P.A., JUNEAU, P.L., et al., 1996, "Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders", *Brain Research*, v.738, (JUN) pp.265-274.
- [36] SERPA, R. F.B., De JESUS, E.F.O., ANJOS, M.J., et al., 2006, "Elemental concentration in the cortex and hippocampus of Wistar rats by X-ray total reflection fluorescence with synchrotron radiation", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.269, pp.647 - 652.
- [37] TAKEDA, A., SAWASHITA, J., OKADA, S., 1995, "Biological half-lives of zinc and manganese in rat brain", *Brain Research*, v.695, (JUL), pp.53-58.
- [38] VAYENAS, D. A., REPANTI, M., VASSILOPOULOS, A., 1998, "Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain", *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, v.28 (3), pp. 183-186.
- [39] LIU, N.Q., XU, Q., HOU, X.L., et al., 2001, "The distribution patterns of trace elements in the brain and erythrocytes in a rat experimental model of iodine deficiency", *Brain Research Bulletin*, v. 55, no 2, pp.309-312.
- [40] CEMPEL, M., JANICKA, K., 2002, "Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration", *Biological Trace Element Research*, v. 90(1-3), pp.215-226.

- [41] TAKEDA, A., TAMANO, H., TOCHIGI, M., et al., 2005, “Zinc Homeostasis in the hippocampus of zinc-deficient young adult rats”, *Neurochemistry International*, v.46, (DEC), pp.221-225.
- [42] YABUSHITA, Y., KANAYAMA, Y., TAROHDA, T., et al. 2003, “Brain regional distribution of the minor and trace elements, Na, K, Sc, Cr, Mn, Co, Zn and Se, in mice bred under Zn-deficient, -adequate and –excessive diets”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.257, no. 2, pp.399-403.
- [43] KAMEO, S., NAKAI, K., KUROKAWA, N., et al., 2005, “Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.216, pp.3157-3159.
- [44] GÉLINAS, Y., YOULA, M., BÉLIVEAU, R., et al., 1992, “Multi-element analysis of biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry: healthy Sprague Dawley rats”, *Analytica Chimica Acta*, v.269, (MAY), pp. 115-122.
- [45] RAJAN, M.T., JAGANNATHA RAO, K.S., MAMATHA, B.M., et al., 1997, “Quantification of trace elements in normal human brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, *Journal of the Neurological Sciences*, v.146, (AUG), pp.156-166.
- [46] ANDRÁSI, E., SUHAJDA, M., SÁRAY, I., et al., 1993, “Concentration of elements in human brain: glioblastoma multiforme”, *The Science of the Total Environment*, v.139/140, pp.399-402.
- [47] RAJAN, M.T., JAGANNATHA RAO, K.S., MAMATHA, B.M., et al., 1997, “Quantification of trace elements in normal human brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, *Journal of the Neurological Sciences*, v. 146, pp. 153-166.

- [48] ANDRÁSI, E., SAROLTA I., SZOBOSZLAI, N. et al. 1999, “Several methods to determine heavy metals in the human brain”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 54, pp. 819-825.
- [49] MAYNARD, C.J., CAPPAL, R., VOLITAKIS, I., et al. 2002, “Overexpression of Alzheimer’s disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, no. 47, pp. 44670-44676.
- [50] CHAN, A.W.K., MINSKI, M.J., LAI, J.C.K., 1983, “An application of neutron activation analysis to small biological samples: simultaneous determination of thirty elements in rat brain regions”, *Journal of Neuroscience Methods*, v.7, (OCT), pp. 317-328.
- [51] DEMMEL, U., A. HÖCK, E. FEINENDEGEN, 1984, “Trace elements in brain of patients with alcohol abuse, endogenous psychosis and schizophrenia”, *The Science of the Total Environment*, v.38, (DEC), pp.69-77.
- [52] CHAN, A.W.K., MINSKI, M.J., LAI, J.C.K., 1983, “An application of neutron activation analysis to small biological samples: simultaneous determination of thirty elements in rat brain regions”, *Journal of Neuroscience Methods*, v.7, (OCT), pp.317-328.
- [53] WENSTRUP, D., EHMANN, W.D., MARKESBERY, W.R., 1990, “Trace element imbalances in isolated subcellular fractions of Alzheimer’s disease brains”, *Brain research*, v.533, (MAY), pp.125-131.
- [54] ZECCA, L., SHIMA, T., STROPPOLO, A., et al. 1996, “Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain”, *Neuroscience*, v.73, No. 2, pp. 407-415.

- [55] KWIAATEK, W.M., LONG, G.J., POUNDS, J.G., et al., 1990, “Trace element distribution in the rat cerebellum”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v.49, pp.561-565.
- [56] IDE-EKTESSABI, A., KAWAKAMI T., ISHIHARA, R., et al., 2004, “Investigation on metal elements in the brain tissues from DNTC patients”, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v.50, pp.160-164.
- [57] TAKAHASHI, S., HATASHITA, S., TABA, Y., et al., 2000, “Determination of the spatial distribution of major elements in the rat brain with X-ray fluorescence analysis”, *Journal of Neuroscience Methods*, v.100, (APR), pp.53-62.
- [58] VAN LIERDE, S., MAENHAUT, W., DE REUCK, J., et al., 1997, “Nuclear microprobe analysis of brain tissue: Quantitative aspects and concentration variability of minor and trace elements”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 130, pp.444-448.
- [59] MAENHAUT, W., HEBBRECHT, G., DE REUCK, J., 1993, “Examination of the regional distribution of minor and trace elements in normal human brain by PIXE and chemometric techniques”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 75, pp.180-187.
- [60] TAPPER, U.A.S., MALMQVIST, K.G., BRUN, A., et al., 1987, “Elemental regional distribution in human brain tumours-Pixe analysis of biopsy and autopsy samples”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 22, pp.176-178.
- [61] PINHEIRO, T., HALPERN, J.M., FERNANDES, R., et al., 1990, “Brain trace element alterations in atherosclerosis”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 49, pp.191-194.
- [62] KWIAATEK, W.M., KUBICA, B., PALUSZKIEWICZ, et al., 1982, “Trace element analysis by means of synchrotron radiation, XRF, and PIXE: selection of

sample preparation procedure”, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 328, (DEC), pp.283-288.

- [63] CHWIEJ, J., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., WOJCIK, S., et al. 2005, “Implementation of X-ray fluorescence microscopy for investigation of elemental abnormalities in central nervous system tissue”, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 401, pp. 184-188.
- [64] BECKER, J.S., ZORIY, M.V., PICKHARDT, C., et al. 2005, “Imaging of copper, zinc, and others elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”, *Analytical Chemistry*, v. 77, pp. 3208-3216.
- [65] BOHIC, S., SIMIONOVICI, A., ORTEGA, R., et al., 2001, “Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on single cells”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.*, v. 181, pp.728-733.
- [66] CAMPBELL, A., SMITH, M.A., SAYRE, L.M., et al., 2001, “Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases”, *Brain Research Bulletin*, v. 55, no. 2, pp. 125-132.
- [67] EMERIT, J., EDEAS, M., BRICAIRE, F., 2004, “Neurodegenerative diseases and oxidative stress”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, pp. 39-46.
- [68] MARK, R.E., RUGG, M.D., 1998, “Age effects on brain activity associated with episodic memory retrieval. An electrophysiological study”, *Brain*, v. 121, pp. 861-873.
- [69] MARK, R.E., GRIFFIN, S.T., GRAHAM, D.I., 1997, “Aging-associated changes in human brains”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 56, no.2, pp.1269-1275.

Referências Bibliográficas

- [70] HOLF, P.R., MORRISON, J.H., 2004, “The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits”, *Trends in Neuroscience*, v.27, no.10, pp.607-613.
- [71] LAMAR, M., RESNICK, S.M., 2004, “Aging and prefrontal functions: dissociating orbitofrontal and dorsolateral abilities”, *Neurobiology of Aging*, v.25, (JUN), pp.553-558.
- [72] MCENTEE, W.J., CROOK, T.H., 1990, “Age-associated memory impairment: a role for catecholamines”, *Neurology*, v. 40, pp.526-530.
- [73] SCHIPPER, H.M., 2004, “Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing”, *Ageing Research Reviews*, v.3, pp.265-301.
- [74] TEMPEL, K.H., IGNATIUS, A., 1993, “Toxicological studies with primary cultures of chick embryo cells: DNA fragmentation under the influence of Dnase I-inhibitors”, *Archives of Toxicology*, v.67, pp.318- 324.
- [75] MOCCHEGIANI, E., MUZZIOLI, M., CIPRIANO, C., et al., 1998, “Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins”, *Mechanisms of Ageing and Development*, v.106, (SEPT), pp.183-204.
- [76] MORITA, A., KIMURA, M., ITOKAWA, Y., 1994, “The effect of aging on the mineral status of female mice”, *Biological Trace Element Research*, v. 42, pp.165-177.
- [77] ARBEL, I., KADAR, T., SILBERMANN, M., et al., 1994, “The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats”, *Brain Research*, v.657, (JUN), pp.227-235.
- [78] SCHIPPER, H.M., VININSKY, R.V., BRULL, R., et al., 1998, “Astrocyte mitochondria: A substrate for iron deposition in the aging rat substantia nigra”, *Experimental Neurology*, v.152, (MAY), pp. 188-196.

- [79] DOBSON, J., 2004, “Magnetic iron compounds in neurological disorders”, *Annals New York Academy of Sciences*, v. 1012, pp. 183-192.
- [80] LIU, N.Q., ZHANG, F., WANG, X.F., et al., 2004, “Element distribution in the brain sections of rats measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence”, *Spectrochimica Acta Part B*, v.59, pp. 255-260.
- [81] SERGEANT, C., VESVRES, M.H., DEVÈS, G., et al., 2005, “Calcium, potassium, iron, copper and zinc concentrations in the white and gray matter of the cerebellum and corpus callosum in brain of four genetic mouse strains”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 231, pp. 234-238.
- [82] BUSH, A.I., 2000, “Metals and neuroscience”, *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 4, pp. 184-191.
- [83] FRANCOIS, C., NGUYEN-LEGROS, J., PERCHERON, G., 1981, “Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains”, *Brain Research*, v. 215, (FEB), pp.317-322.
- [84] THONG, P.S.P., HE, Y., LEE, T., et al., 1997, “Nuclear microscopic investigations into the elemental changes in the substantia nigra of unilaterally MPTP-lesioned Parkinsonian monkeys”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 130, pp.460-465.
- [85] GUPTA, V.B., ANITHA, S., HEDGE, M.L., et al., 2005, “Aluminium in Alzheimer’s disease: are we still at a crossroad”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, pp.143-158.
- [86] HATTORI, N., KITAGAWA, K., HIGASHIDA, T., et al., 1998 “Cl⁻-ATPase and Na⁺/K⁺ -ATPase activities in Alzheimer’s disease brains”, *Neuroscience letters*, v. 254, pp.141-144.

- [87] FREDERICKSON, C.J., KOSH, J.Y., BUSH, A.I., 2005, “The neurobiology of zinc in health and disease”, *Nature Reviews-Neuroscience*, v. 6, pp.449-462.
- [88] PANAYI, A.E., PART, P., SPRYROU, N.M., 2001, “Intercomparison of INAA and ICP-MS in the analysis of ‘normal’ and Alzheimer’s brain samples”, 7th International Conference on Applications of Nuclear Techniques – Nuclear and Atomic Industrial & Analytical Applications, Crete, Greece, (JUN), pp. 17-23.
- [89] LEE, J.Y., MOOK-JUNG, I., KOH, J.Y. et al. 1999, “Histochemically reactive zinc in plaques of the Swedish mutant beta-amyloid precursor protein transgenic mice”, *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, v. 19, pp. RC10.
- [90] SMITH, M.A., HIRAI, K., HSIAO, K. et al. 1998, “Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress”, *Journal of Neurochemistry*, v. 70, pp. 2212-2215.
- [91] WATT, F., LANDSBERG, J.P., 1993, “Nuclear microscopy: biomedical applications”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 77, pp. 249-260.
- [92] REN, M.Q., XIE, J.P., WANG, X.S., et al., 2001, “Iron concentrations and distributions in the parkinsonian substantia nigra of aged and young primate models”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 181, pp.522-528.
- [93] XUE-KUN, L., AN-CHEN, G., PING-PING, Z., 2003, “Survival and differentiation of transplanted neural stem cells in mice brain with MPTP-induced Parkinson disease”, *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 24 (12), (DEC), pp.1192-1198.
- [94] SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., CHWIEJ, J., LANKOSZ, M., et al. 2005, “Intraneuronal investigations of organic components and trace

elements with the use of synchrotron radiation”, *X-Ray Spectrometry*, v. 34, pp. 514-520.

[95] FLINT BEAL, M., FERRANTE, R.J., 2004, “Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington’s disease”, *Nature Reviews*, v. 5, pp. 373-384.

[96] Associação Brasil Huntington’s, 2005, disponível on line: <http://www.abh.org.br/direita.htm> , pesquisa realizada em 20/05/2005.

[97] LANDLES, C., BATES, G., 2004, “Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington’s disease”, *EMBO reports*, v. 5, no.10, pp.958-963.

[98] ARIANO, M.A., CEPEDA, C., CALVERT, C.R., et al., 2005, “Striatal potassium channel dysfunction in Huntington’s disease transgenic mice”, *Journal of Neurophysiology*, v. 93, (DEC), pp.2565-2574.

[99] DAVIES, S.W., TURMAINE, M., COZENS, B., et al., 1997, “Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation”, *Cell*, v. 90, pp. 537-548.

[100] COPPER, J.K., SCHILLING, G., PETERS, M.F., et al., 1998, “Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats from nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture”, *Human Molecular Genetics*, v. 7, pp. 783-790.

[101] SATO, T., OYAKE, M., NAKAMURA, K., et al., 1999, “Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients”, *Human Molecular Genetics*, v. 8, pp. 99-106.

[102] ORTH, M., COPPER, J.M., BATES, G.P., et al., 2003, “Inclusion formation in Huntington’s disease R6/2 mouse muscle cultures”, *Journal of Neurochemistry*, v. 87, pp. 1-6.

- [103] HAACKE, E.M., CHENG, N.Y.C., HOUSE, M.J., et al., 2005, “Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging”, *Magnetic Resonance Imaging*, v. 23, (OCT) pp.1-25.
- [104] MADHAVI, T., JOSEPH, J., 2004, “Neurodegenerative disease and iron storage in the brain”, *Current Opinion in Neurology*, v. 17(4), pp.437-442.
- [105] GELMAN, BB., 1995, “Iron in CNS disease”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 54, pp.477-486.
- [106] DRAYER, B.P., OLANOW, W., BURGER, P., et al., 1986, “Parkinson’s plus syndrome: diagnosis using high field MR imaging of brain iron”, *Radiology*, v. 159, pp.493-498.
- [107] CONNOR, J.R., SNYDER, B.S., BEARD, J.L., 1992, “Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and disease”, *Journal of Neuroscience Research*, v. 31, pp.327-335.
- [108] OESTREICHER, E., SENGSTOCK, G.J., RIEDERER, P., et al., 1994, “Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study”, *Brain Research*, v. 660, (JUN), pp.8-18.
- [109] HALLGREN, B., SOURANDER, P., 1958, “The effect of aging on the non-haemin iron in the human brain”, *Journal of Neurochemistry*, v. 3, pp.41-51.
- [110] CONNOR, J.R., SYNDER, B.S., AROSIO, P., et al., 1995, “Quantitative analysis of isoferitins in select regions of aged, parkinsonian and Alzheimer Disease brains”, *Journal of Neurochemistry*, v. 65, pp.717-724.
- [111] ZECCA, L., et al., 2001, “Iron, neuromelanin and ferritin in substantia nigra of normal subjects at different ages. Consequences for iron storage and

- neurodegenerative disorders”, *Journal of Neurochemistry*, v. 76, pp.1766-1773.
- [112] HIROSE, W., IKEMATSU, K., TSUDA, R., 2003, “Age-associated increase in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain”, *Legal Medicine*, v. 5 (1), pp.S360-S366.
- [113] GRAHAM, J.M., PALEY, M.N.J., GRÜNEWALD, R.A., et al., 2000, “Brain iron deposition in Parkinson’s disease imaged using the PRIME magnetic resonance sequence”, *Brain*, v. 123, pp.2423-2431.
- [114] BRUN, A., ENGLUND, E., 1986, “A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type: a pathoanatomical study”, *Annals of Neurology*, v. 19, pp.253-262.
- [115] SNOWDON, D.A., 2003, “Nun Study. Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study”, *Annals of Internal Medicine*, v. 139, pp.450-454.
- [116] JELLINGER, K., PAULUS, W., GRUNDKE-IQBAL, I., RIEDERER, P., et al., 1990, “Brain iron and ferritin in Parkinson’s and Alzheimer’s disease”, *Journal of Neural Transmission Parkinson Disease and Dementia Secion.*, v. 2, pp.327-340.
- [117] FRANCOIS, C., NGUYEN-LEGROS, J., PERCHERON, G., 1981, “Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains”, *Brain Research*, v. 215, (FEB), pp.317-322.
- [118] BEARD, J.L., CONNOR, J.R., 1993, “Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain”, *Nutrition Reviews*, v. 51, pp.157-170.
- [119] HINZMANN, R.D., 1992, “Ferritin and transferrin in iron deficiency and overload”, *Immunodiagn Today*, v. 12, pp.1-4.

Referências Bibliográficas

- [120] CONNOR, J.R., BOESHORE, S.A., BENKOVIC, S.A., et al., 1994, “Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain”, *Journal of Neuroscience Research*, v. 37, pp.461-465.
- [121] GERLACH, M., BEM-SHACHAR, D., RIEDERER, P., et al., 1994, “Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?”, *Journal of Neurochemistry*, v. 63, pp.793-807.
- [122] SMITH, M.A., HARRIS, P.L.R., SAYRE, L.M., et al., 1997, “Iron accumulation in Alzheimer’s disease is a source of redox-generated free radicals”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 94, pp. 9866-9868.
- [123] FINEFROCK, A.E., BUSH, A.I., DORAISWAMY, M.P., 2003, “Current status of metals as therapeutic targets in Alzheimer’s disease”, *Geriatric Bioscience*, v. 51, pp. 1143-1148.
- [124] TAKEDA, A., 2000, “Movement of zinc and its functional significance in the brain”, *Brain Research Reviews*, v. 34, pp. 137-148.
- [125] CUAJUNGCO, M.P., LEES, G.J., 1997, “Zinc and Alzheimer’s disease: is there a direct link? *Brain Research Reviews*, (DEC), v. 23, pp.219-236.
- [126] CHOI, D.W. 1988, “Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage”, *Trends in Neurosciences*, v. 11, pp. 465-469.
- [127] YOKOYAMA, M., KOH, J., CHOI, D.W., 1986, “Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons”, *Neuroscience Letters*, v. 71, pp.351-355.
- [128] FREDERICKSON, C.J., SUH, S.W., SILVA, D., et al., 2000, “Importance of zinc in the central nervous system: the zinc containing neuro”, *Journal of Nutrition*, v. 130, pp.1471S-1483S.

- [129] TAKEDA, A., 2001, “Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain”, *Biometals*, v. 14, pp. 343-351.
- [130] TAKEDA, A., SUZUKI, M., OKU, N., 2002, “Possible involvement of plasma histidine in differential brain permeability to zinc and cadmium”, *Biometals*, v. 15, pp.371-375.
- [131] LEHMANN, H.M., BROTHWELL, B.B., VOLAK, L.P., et al., 2002, “ Zinc status influences zinc transport by porcine brain capillary endothelial cell”, *Journal of Nutrition*, v. 132, pp.2763-2768.
- [132] FREDERICKSON, C.J., 1989, “Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons”, *International Review of Neurobiology*, v. 31, pp. 145-238.
- [133] HAMED, S.A., ABDELLAH, M.M., 2004, “Trace elements and eletrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patientes”, *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 96, (SEPT), pp.349-359.
- [134] CHANG, C.J., NOLAN, E.M., JAWORSKI, J., et al., 2004, “ZP8, a neuronal zinc sensor with improved dynamic range; imaging zinc in hippocampal slices with two-photon microscopy”, *Inorganic Chemistry*, v. 43, (MAY), pp.6774-6779.
- [135] DENG, Q.S., TURK, G.C., BRADY, D.R., et al., 1994, “Evaluation of brain element composition in Alzheimer’s disease using inductively coupled plasma mass spectrometry”, *Neurobiolology of Aging*, v. 15 (1), pp.113.
- [136] BACKSTROM, J.R., MILLER, C.A., TÖKÉS, Z.A., 1992, “Characterization of neural proteinases from Alzheimer-affected and control brain specimesns: Identification of calcium-dependent metalloproteinases from the hippocampus”, *Journal of Neurochemistry*, v. 58, pp.983-992.

- [137] YUMOTO, S., NAGAI, H., MATSUZAKI, H., et al., 2001, “Aluminium incorporation into the brain of rat fetuses and sucklings”, *Brain research Bulletin*, v. 55 no2, pp. 229-234.
- [138] ATWOOD, C.S., MOIR, R.D., HUANG, X., et al., 1998, “Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, pp. 12817-12826.
- [139] HUANG, X., ATWOOD, C.S., HARTSHORN, M.A., et al., 1999, “The A β peptide of Alzheimer’s disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction”, *Biochemistry*, v. 38, pp. 7609-7616.
- [140] ATWOOD, C.S., SCARPA, R.C., HUANG, X., et al., 2000, “Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides”, *Journal of Neurochemistry*, v. 75, pp. 1219-1233.
- [141] ERIKSON, K.M., ASCHNER, M., 2003, “Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction”, *Neurochemistry International*, v. 43, (SEPT), pp. 475-480.
- [142] PRINS, M., KUIPER, J.M., VIEGERS, M.P.A., 1984, “The design of an X-ray microprobe at the SRS Daresbury (UK)”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 3, pp.246-249.
- [143] AUSTRUP, J., REHNCRONA, S., SIESJO, B.K., et al., 1980, “The increase inextracellular potassium concentration in the ischemic brain in relation to the preischemic functional activity and cerebral metabolic rate”, *Brain Research*, v. 199, pp.161-174.
- [144] DEXTER, D.T., WELLS, F.R., LEES, A.J., et al., 1989, “Increased nigral ironcontent and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson’s disease”, *Journal of Neurochemistry*, v. 52 issue 6, (JUN), pp.1830-1836.

- [145] HAVRILLA, G.J., 1997, “Applications of X-ray microfluorescence to materials analysis”, *X-Ray Spectrometry*, v. 26, pp.364-373.
- [146] KANNIGIEßER, B., 2003, “Quantification procedures in micro X-ray fluorescence analysis”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 58, (JUN), pp.609-614.
- [147] INJUK, J., GRIEKEN, R.V., 2003, “Literature trends in X-ray emissionspectrometry in the period 1990-2000 – a review”, *X-Ray Spectrometry*, v. 32, pp. 35-39.
- [148] THOMPSON, A.C., UNDERWOOD, J.H., WU, Y., 1988, “Elemental measurements with an X-ray micropobe of biological and geological samples with femtogram sensitivity”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 266, pp.318-323.
- [149] GORDON, B.M., JONES, K.W., 1985, “Design criteria and sensitivity calculations for multielemental trace analysis at the NSLS X-ray microprobe”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 10/11, pp. 293-298.
- [150] BARYSHEV, V.B., KULIPANOV, G.N., SKRINSKY, A.N., 1986, “Review of X-ray fluorescent analysis using synchrotron radiation”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 246, pp. 739-750.
- [151] LANGEVELDE, F.V., BOWEN, D.K., TROS, G.H.J., et al., 1990, “Ellipsoid X-ray focussing for synchrotron-radiation microprobe analysis at the SRS, Daresbury, UK”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 292, pp. 719-727.
- [152] PRINS, M., KUIPER, J.M., VIEGERS, M.P.A., 1984, “The design of an X-ray microprobe at the SRS Daresbury (UK)”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 3, pp.246-249.

Referências Bibliográficas

- [153] LANGEVELDE, F.V., TROS, G.H.J., BOWEN, D.K., et al., 1990, “The synchrtron radiation microprobe at the SRS, daresbury (UK) and its applications”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 49, pp. 544-550.
- [154] BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A., “Neurociências – Desvendando o sistema nervoso”, Capítulo 1 – 2ª edição, editora Artmed, 2002, pp.3-21.
- [155] BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A., “Neurociências – Desvendando o sistema nervoso”, Capítulo 7 – 2ª edição, editora Artmed, 2002, pp.164-201.
- [156] Anatomia Comparada do Sistema Nervoso Central Humano e de Ratus Norvegicus, disponível on line: <http://members.fortunecity.com/biologia666/snc.htm>, pesquisa realizada em 15/10/2004.
- [157] LENT, R., “Cem Bilhões de Neurônios - Conceitos Fundamentais da Neurociência”, Capítulo 4 - editora Atheneu, 2001, São Paulo, pp.99-132.
- [158] Aventuras em neuroanatomia. As divisões do sistema nervoso, disponível on line: http://br.geocities.com/neurokidsbr/Divisoes_do_SN.html, pesquisa realizada em 23/06/2006.
- [159] Sistema Límbico, disponível on line: http://www.guia.heu.nom.br/sistema_limbico.htm, pesquisa realizada em 03/11/2006.
- [160] AMARAL, J.R., OLIVEIRA, J.M., Sistema Límbico: O centro das emoções - Estruturas Cerebrais na formação das emoções, <http://www.cerebromente.org.br/n05/mente/struct.htm>, pesquisa realizada em 16/10/2006.

Referências Bibliográficas

- [161] ANDERSEN, R., Neurofisiologia, disponível on line: www.iupe.org.br/ass/psicanalise/psi-neurofisiologia.htm, pesquisa realizada em 23/06/2006
- [162] BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A., “Neurociências – Desvendando o sistema nervoso”, Capítulo 8 – 2ª edição, editora Artmed, 2002, pp.164-201.
- [163] LENT, R., “Cem Bilhões de Neurônios - Conceitos Fundamentais da Neurociência”, Capítulo 18 - editora Atheneu, 2001, São Paulo, pp.99-132.
- [164] MELO, C.F., RUBIN, M.A., “Mecanismos bioquímicos de memória, disponível on line: <http://www.comciencia.br/reportagens/memoria/17.shtml>, pesquisa realizada em 17/10/2006.
- [165] KANDEL, E. R. “Introdução ao curso - Cérebro e comportamento - Este texto é uma tradução feita pela Profa. Maria Carolina Doretto do capítulo "Brain and Behavior", do livro Principles of Neural Sciences, Second Edition, Eric R. Kandel e James H. Schwartz, Elsevier”, disponível on line: <http://www.icb.ufmg.br/~agora/CB/introduc.htm>, 1985.
- [166] NASCIMENTO FILHO, V.F., 1999, “Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)”, disponível on line: www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/CEN-5723/EDXRF_TXRF.doc, pesquisa realizada em 10/11/2005.
- [167] KATSANOS, A. A. - X-Ray Methods. In: IAEA, ed. - Elemental Analysis of Biological Materials. Viena, IAEA, Technical Reports series no. 197, 1980 p. 231.
- [168] MISTRA, N.L., SINGH MUDHER, K.D., 2002, “Total reflection X-ray fluorescence: a technique for trace element analysis in materials”, *Progress in Crystal Growth and Characterizations of Materials*, pp.65-74.

- [169] SIMABUCO, S. M., NASCIMENTO FILHO, V. F., 1994, “Quantitative analysis by energy dispersive X-ray fluorescence by transmission method applied geological samples”, *Scientia Agricola*, v. **51**(2), pp.197-206.
- [170] KLOCKENKÄMPER, R., Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis, **140**, A Wiley-Interscience Publication, United States of America-1996, 123.
- [171] KNOLL, G.F., 1989, Radiation detection and measurement, 2a ed., John Wiley & Sons, chapter 2, New York.
- [172] EISBERG, R.M., traduzido por Coutinho, F.A.B., Malta, C.P., Perez, J.F., Fundamentos da Física Moderna, 1979, editora Guanabara, Rio de Janeiro, cap.14.
- [173] GORDON, B.M., HANSON, A.L., JONES, K.W., et al., 1990, “The application of synchrotron radiation to microprobe trace-element analysis of biological samples”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 45, pp. 527-531.
- [174] SERPA, R. F. B. *Medida de Metais Pesados no Fumo, Cinza e Fumaça em Cigarros Nacionais usando TXRF*, Tese de M.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- [175] GORDON, B.M., 1982, “Sensitivity calculations for multielemental trace analysis by synchrotron radiation induced x-ray fluorescence”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. 204, pp. 223-229.
- [176] BOS, A.J.J., VIS, R.D., VERHEIJ, H. et al., 1984, “Experimental comparison of synchrotron radiation with other modes of excitation of X rays for trace element analysis”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 3, pp. 232-240.
- [177] DICKHOFF, T.G.M.H., PRINS, M., HOFFMAN, L.J.B. 1982, *Nucl. Instr. Meth. in Phys. Res.*, v. 197, pp. 129-135.

- [178] BERNASCONI, G., HASELBERGER, N., MARKOWICZ, A., 1994, "Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 86, pp. 333-338
- [179] PRINS, M., 1984, "Trace elements analysis and element mapping by scanning X-ray fluorescence at Daresbury SRS", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 222, pp. 324-328
- [180] EKTESSABI, A., YOSHIDA, S., TAKADA, K., 1999, *X-Ray Spectrometry*, v.28, pp.456-461.
- [181] JANSSENS, K., VINCZE, L., ADAMNS, F., 1993, "Synchrotron radiation induced x-ray microanalysis", *Analytica Chimica Acta*, v. 283, (OCT), pp.98-119.
- [182] LANGEVELDE, F.V., LENGLET, W.J.M., OVERWATER, R.M.W., et al., 1987, "X-ray focussing for synchrotron radiation microprobe analysis at the SRS, Daresbury (UK)", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 257, pp. 436-442.
- [183] SIMABUCO, S. M. e NASCIMENTO FILHO, V. F. "Study on Vinasse Dynamics in Soil Using Energy Dispersive X-Ray Fluorescence with Radioisotope Excitation", *Sci. Agriv.*, v. 51, n.2, pp. 207-215, 1994.
- [184] ORLIC, I., TOMIC, S., MAKJANIC, J. et al "A Method Approach to the Quantitative XRF Analysis to Thick Targets", *X-Ray Spectrometry*, v. 16, pp. 125-230, 1987.
- [185] KUMAR, S., SINGH, S., MEHTA, D. et al. "Matrix Corrections for Quantitative Determination of Trace Elements in Biological Samples Using Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry", *X-Ray Spectrometry*, v. 18, pp. 207-210, 1989.

- [186] ANJOS, M. J. *Análise de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000.
- [187] MARROWICZ, A., HASELBERGER, N., 1992, “A Modification of the Emission-Transmission Method for the Determination of Trace and Minor Elements by XRF”, *Appl. Radiat. Isto.*, v. 43, n. 6, pp.777-779.
- [188] KLOCKEMKÄMPER, R., VON BOHLEN, A., 1996, “Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection Fluorescent: A Review”, *X-Ray Spectrometry*, v. 25, pp.156-162.
- [189] WATT, F., LANDSBERG, J.P., 1993, “Nuclear microscopy: biomedical applications”, *Nuclear Instruments in Physics Research B*, v. 3, pp. 232-240.
- [190] TURMAINE, M., RAZA, A., MAHAL, A., et al., 2000, “Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington’s disease”, *Neurobiology*, v. 97, pp. 8093-8097.
- [191] ORTH, M., COOPER, J.M., BATES, G.P., et al., 2003, “Inclusion formation in Huntington’s disease R6/2 mouse muscle cultures”, *Journal of Neurochemistry*, v. 87, pp. 1-6.
- [192] Quantitative X ray analysis system (QXAS) software package, IAEA, Vienna.
- [193] MORRIS, R.G., GARRUD, P., RAWLINS, J.N., O’KEEFE, J., 1982, “Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions”, *Nature*, v. 297, pp. 681-683.
- [194] LADISICH, W., RIEDER, R., WOBRAUSCHEK, P., 1993, “Total reflection X-ray fluorescence analysis with monoenergetic excitation and full spectrum excitation using rotating anode X-ray tubes”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 330, pp. 501-506.

- [195] FLOYD, R.A., HENSELY, K., 2002, “Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutic of neurodegenerative diseases”, *Neurobiol. Aging*, v. 23(5), pp. 795-807.
- [196] WAN, H., AGGLETON, J.P., BROWN, M.W., 1999, “Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory”, *The Journal of Neuroscience*, v. 19(3), pp. 1142-1148.
- [197] MILLER, D.B., O’CALLAGHAN, J.P., 2003, “Effects of Aging and Stress on Hippocampal Structure and Function”, *Metabolism*, v. 52(10), pp.17-21.
- [198] HASAN, M., GLEES, P., 1973, “Ultrastructural age changes in hippocampal neurons, synapses and neuroglia”, *Experimental Gerontology*, v. 8(2), pp. 75-83.
- [199] SMITH, TD; ADAMS, MM; GALLAGHER et al., 2000, “Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats”, *J. Neuroscience*, v. 20, pp. 6587-6593.
- [200] ZECCA, L., YODIM, M.B.H., RIEDERER, et al., 2004, “Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders”, *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 5, pp. 863-873.

APÊNDICE A

Tabela A1. Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas, em função da idade, através da SR-TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Córtex Entorrinal</i>			<i>Córtex Temporal</i>			<i>Córtex Visual</i>			<i>Hipocampo</i>		
	02 semanas	08 semanas	48 semanas	02 semanas	08 semanas	48 semanas	02 semanas	08 semanas	48 semanas	02 semanas	08 semanas	48 semanas
Al	335 ^a (84)	134 ^{a,b} (42)	395 ^b (61)	198 ^a (51)	207 ^b (45)	835 ^{a,b} (168)	307 ^a (68)	132 ^{a,b} (34)	307 ^b (53)	373 ^a (106)	144 ^a (33)	671 ^a (123)
P	793 ^a (25)	786 ^b (19)	652 ^{a,b} (22)	944 ^a (36)	693 ^a (18)	1168 ^a (47)	716 ^a (25)	778 ^b (17)	535 ^{a,b} (18)	640 ^a (17)	735 ^a (16)	941 ^a (39)
S	847 ^{a,b} (17)	692 ^a (12)	698 ^b (14)	1156 ^a (24)	434 ^a (9.5)	1085 ^a (30)	641 ^a (15)	742 ^{a,b} (11)	611 ^b (12)	710 ^a (11)	647 ^a (10)	1137 ^a (26)
Cl	426 ^{a,b} (14)	156 ^a (6)	164 ^b (7)	287 ^a (12)	131 ^a (5.4)	403 ^a (16)	239 ^a (9)	187 ^a (6)	137 ^a (6)	393 ^a (15)	116 ^a (4)	244 ^a (13)
K	3578 ^a (16)	2657 ^a (11)	2261 ^a (10)	3364 ^a (14)	2335 ^a (9)	4995 ^a (22)	1960 ^a (9)	2417 ^a (10)	2173 ^a (10)	2867 ^a (11)	2150 ^a (8)	4483 ^a (20)
Ca	588 ^a (4)	175 ^a (2)	334 ^a (3)	433 ^a (3.5)	145 ^a (2)	259 ^a (4)	544 ^a (4)	159 ^a (2)	71 ^a (1)	1092 ^a (7)	77 ^a (1)	256 ^a (3)
Ti	7.7 ^a (0.3)	2.3 ^a (0.2)	0.7 ^a (0.3)	5.9 ^a (0.3)	2.7 ^a (0.3)	4 ^a (1)	8.5 ^a (0.3)	1.5 ^a (0.2)	0.7 ^a (0.2)	3 ^{a,b} (0.2)	1 ^a (0.1)	1.4 ^b (0.4)
Fe	210 ^a (1)	28.1 ^a (0.2)	38.9 ^a (0.2)	58.9 ^a (0.4)	28.8 ^a (0.2)	186 ^a (1)	75.8 ^{a,b} (0.4)	28 ^a (0.2)	26.8 ^b (0.2)	35 ^a (0.2)	22 ^a (0.1)	50.1 ^a (0.4)
Cu	3.4 ^a (0.1)	3.6 ^b (0.1)	4.1 ^{a,b} (0.1)	6.1 ^a (0.2)	3.2 ^a (0.1)	7.7 ^a (0.2)	3.9 ^{a,b} (0.1)	3.5 ^a (0.1)	3.1 ^b (0.1)	3.8 ^a (0.1)	2.9 ^a (0.1)	12.6 ^a (0.2)
Zn	38.6 ^a (0.3)	31.9 ^a (0.2)	26.5 ^a (0.1)	36.5 ^a (0.3)	21.1 ^a (0.1)	44.7 ^a (0.4)	26.6 ^a (0.2)	24.5 ^b (0.1)	18.5 ^{a,b} (0.1)	21 ^a (0.1)	20.1 ^b (0.1)	45.6 ^{a,b} (0.3)
Br	2.6 ^{a,b} (0.4)	1.4 ^a (0.3)	1.8 ^b (0.4)	2.7 ^{a,b} (0.6)	5.2 ^a (0.4)	5 ^b (1)	1.9 ^a (0.5)	1.9 ^b (0.3)	0.9 ^{a,b} (0.2)	1.5 ^a (0.3)	3.1 ^a (0.2)	4 ^a (1)
Rb	5 (1)	5.2 (0.7)	5 (1)	7.6 ^a (1.2)	6.2 ^a (0.6)	14 ^a (2)	3.6 ^a (0.8)	6.9 ^a (0.6)	6 ^a (1)	8 ^a (1)	6.6 ^a (0.5)	12 ^a (2)

Valores: média \pm desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa em função da idade, em cada região para $p \leq 0.05$.

Tabela A2. Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar fêmeas, em função da região, utilizando SR-TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>02 semanas</i>				<i>08 semanas</i>				<i>48 semanas</i>			
	EC	TC	VC	H	EC	TC	VC	H	EC	TC	VC	H
Al	335 ^a (84)	198 ^{a,b,c} (51)	307 ^b (68)	373 ^c (106)	134 ^a (42)	207 ^a (45)	132 ^a (34)	144 ^a (33)	395 ^a (61)	835 ^b (168)	307 ^a (53)	671 ^b (123)
P	793 ^a (25)	944 ^a (36)	716 ^a (25)	640 ^a (17)	786 ^a (19)	693 ^b (18)	778 ^a (17)	735 ^c (16)	652 ^a (22)	1168 ^b (47)	535 ^c (18)	941 ^d (39)
S	847 ^a (17)	1156 ^a (24)	641 ^a (15)	710 ^a (11)	692 ^a (12)	434 ^b (9.5)	742 ^c (11)	647 ^d (10)	698 ^a (14)	1085 ^b (30)	611 ^a (12)	1137 ^b (26)
Cl	426 ^{a,b} (14)	287 ^{a,c} (12)	239 ^b (9)	393 ^{b,c} (15)	156 ^a (6)	131 ^b (5.4)	187 ^c (6)	116 ^d (4)	164 ^a (7)	403 ^b (16)	137 ^c (6)	244 ^d (13)
K	3578 ^a (16)	3364 ^a (14)	1960 ^a (9)	2867 ^c (11)	2657 ^a (11)	2335 ^b (9)	2417 ^c (10)	2150 ^d (8)	2261 ^a (10)	4995 ^b (22)	2173 ^c (10)	4483 ^d (20)
Ca	588 ^a (4)	433 ^b (3.5)	544 ^a (4)	1092 ^c (7)	175 ^a (2)	145 ^b (2)	159 ^c (2)	77 ^d (1)	334 ^a (3)	259 ^b (4)	71 ^c (1)	256 ^b (3)
Ti	7.7 ^a (0.3)	5.9 ^b (0.3)	8.5 ^c (0.3)	3 ^d (0.2)	2.3 ^a (0.2)	2.7 ^a (0.3)	1.5 ^b (0.2)	1 ^c (0.1)	0.7 ^a (0.2)	4 ^b (1)	0.7 ^a (0.2)	1.4 ^c (0.4)
Fe	210 ^a (1)	58.9 ^b (0.4)	75.8 ^c (0.4)	35 ^d (0.2)	28.1 ^a (0.2)	28.8 ^b (0.2)	28 ^a (0.2)	22 ^c (0.1)	38.9 ^a (0.2)	186 ^b (1)	26.8 ^c (0.2)	50.1 ^d (0.4)
Cu	3.4 ^a (0.1)	6.1 ^b (0.2)	3.9 ^c (0.1)	3.8 ^c (0.1)	3.6 ^a (0.1)	3.2 ^b (0.1)	3.5 ^a (0.1)	2.9 ^c (0.1)	4.1 ^a (0.1)	7.7 ^b (0.2)	3.1 ^c (0.1)	12.6 ^d (0.2)
Zn	38.6 ^a (0.3)	36.5 ^a (0.3)	26.6 ^a (0.2)	21 ^a (0.1)	31.9 ^a (0.2)	21.1 ^b (0.1)	24.5 ^c (0.1)	20.1 ^d (0.1)	26.5 ^a (0.1)	44.7 ^b (0.4)	18.5 ^c (0.1)	45.6 ^d (0.3)
Br	2.6 ^a (0.4)	2.7 ^a (0.6)	1.9 ^{ab} (0.5)	1.5 ^b (0.3)	1.4 ^a (0.3)	5.2 ^b (0.4)	1.9 ^a (0.3)	3.1 ^c (0.2)	1.8 ^a (0.4)	5 ^b (1)	0.9 ^a (0.2)	4 ^b (1)
Rb	5 ^a (1)	7.6 ^b (1.2)	3.6 ^a (0.8)	8 ^b (1)	5.2 ^a (0.7)	6.2 ^{ab} (0.6)	6.9 ^b (0.6)	6.6 ^b (0.5)	5 ^a (1)	14 ^b (2)	6 ^a (1)	12 ^b (2)

Valores: média \pm desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa em função da idade, em cada região para $p \leq 0.05$.

Tabela A3. Concentração elementar ($\mu\text{g.g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar machos, em função da idade, utilizando SR-TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Córtex Entorrinal</i>				<i>Córtex Temporal</i>				<i>Córtex Visual</i>			
	02 semanas	09 semanas	22 semanas	108 semanas	02 semanas	09 semanas	22 semanas	108 semanas	02 semanas	09 semanas	22 semanas	108 semanas
Al	254 ± 61 ^{a,b}	435 ± 48 ^b	466 ± 16 ^a	371 ± 26 ^{a,b}	296 ± 57 ^{a,b}	648 ± 73 ^a	571 ± 12 ^b	406 ± 17 ^{a,b}	263 ± 54	-	-	218 ± 35
P	978 ± 288 ^b	1821 ± 171 ^{a,b}	1146 ± 103 ^a	566 ± 23 ^{a,b}	923 ± 235 ^a	1050 ± 115 ^b	1066 ± 126 ^c	507 ± 21 ^{a,b,c}	690 ± 136 ^a	-	-	508 ± 9 ^a
S	1122 ± 275	1579 ± 134	885 ± 46	569 ± 4	1067 ± 253 ^a	1036 ± 20 ^b	1012 ± 24 ^c	644 ± 83 ^{a,b,c}	883 ± 116 ^a	-	-	534 ± 9 ^a
Cl	332 ± 84 ^b	539 ± 19 ^{a,b}	384 ± 86 ^a	146 ± 33 ^{a,b}	321 ± 72 ^a	359 ± 29 ^b	293 ± 33 ^c	146 ± 29 ^{a,b,c}	340 ± 97 ^a	-	-	108 ± 26 ^a
K	2882 ± 685	3006 ± 169	2393 ± 117	3099 ± 319	2827 ± 365	2482 ± 210	2371 ± 393	2794 ± 298	2269 ± 417	-	-	1991 ± 66
Ca	583 ± 122 ^a	552 ± 67 ^b	425 ± 88 ^c	117 ± 20 ^{a,b,c}	438 ± 7 ^{a,b}	258 ± 27 ^a	583 ± 41 ^{a,b}	150 ± 28 ^b	694 ± 118 ^a	-	-	251 ± 28 ^a
Fe	53 ± 8	51 ± 9	63 ± 2 ^a	38 ± 7 ^a	66 ± 5 ^a	46 ± 2 ^{a,b,c}	60 ± 10 ^b	64 ± 2 ^c	41 ± 6 ^a	-	-	27 ± 5 ^a
Cu	4 ± 1 ^a	4,3 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,5 ^c	6,1 ± 0,1 ^{a,b,c}	4 ± 1	3,9 ± 0,1	3,2 ± 0,1	5,1 ± 0,1	3,4 ± 0,6 ^a	-	-	5,9 ± 0,2 ^a
Zn	35 ± 2 ^a	56 ± 2 ^{a,b,c}	38 ± 6 ^b	38 ± 3 ^c	31 ± 4	26 ± 2	32 ± 4	30 ± 0,2	26 ± 5	-	-	19 ± 1
Br	4 ± 1 ^a	4 ± 2 ^b	<LD	2,8 ± 0,4 ^{b,c}	3 ± 1	<LD	<LD	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,3 ^a	-	-	1,3 ± 0,1 ^a
Rb	7 ± 2 ^a	<LD	4,1 ± 0,2 ^{a,b}	8 ± 1 ^b	7 ± 2	<LD	<LD	6,3 ± 0,4	5 ± 1	-	-	6 ± 1

Valores: média ± desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa em função da idade, em cada região para $p \leq 0.05$.

Tabela A3 (CONT.). Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em diferentes estruturas cerebrais de ratos Wistar machos, em função da idade, utilizando SR-TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Hipocampo</i>				<i>Hipotálamo</i>			
	02 semanas	09 semanas	22 semanas	108 semanas	02 semanas	09 seman as	22 seman as	108 semanas
Al	256 ± 46 ^a	485 ± 14 ^{a,b}	536 ± 72 ^{a,b}	217 ± 42 ^b	2491 ± 498 ^a	-	-	3679 ± 306 ^a
P	1043 ± 134 ^a	1256 ± 188 ^b	791 ± 70 ^{a,b}	470 ± 30 ^{a,b}	1534 ± 170 ^a	-	-	2482 ± 359 ^a
S	1036 ± 298 ^{a,b}	1164 ± 119 ^{c,d}	677 ± 82 ^{a,c}	566 ± 64 ^{b,d}	2465 ± 191 ^a	-	-	3648 ± 351 ^a
Cl	450 ± 90 ^{a,b,c}	155 ± 27 ^a	238 ± 36 ^{b,c}	79 ± 4 ^c	1250 ± 157	-	-	1790 ± 218
K	3623 ± 726 ^{a,b,c}	2392 ± 583 ^a	2179 ± 220 ^b	2235 ± 40 ^c	4903 ± 68 ^a	-	-	6808 ± 880 ^a
Ca	767 ± 128 ^a	548 ± 71 ^a	144 ± 11 ^a	48 ± 5 ^a	4333 ± 827 ^a	-	-	2700 ± 16 ^a
Fe	49 ± 11 ^a	55 ± 2 ^b	26 ± 5 ^{a,b,c}	43 ± 4 ^c	1259 ± 155	-	-	1416 ± 237
Cu	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	5,3 ± 0,1	4 ± 1 ^a	-	-	6 ± 1 ^a
Zn	43 ± 11 ^{a,b}	30 ± 1 ^a	19 ± 3 ^a	27 ± 1 ^b	34 ± 2 ^a	-	-	43 ± 4 ^a
Br	4 ± 1 ^a	5,2 ± 0,2 ^b	<LD	2,1 ± 0,1 ^{a,b}	18 ± 1	-	-	22 ± 3
Rb	8 ± 2 ^a	3,3 ± 0,6 ^{a,b}	<LD	7 ± 1 ^b	17 ± 2	-	-	<LD

Valores: media ± desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa em função da idade, em cada região para $p \leq 0.05$.

Tabela A4. Concentração Elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas em função do desempenho cognitivo, utilizando TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Córtex Entorrinal</i>		<i>Córtex temporal</i>		<i>Córtex Visual</i>	
	Grupo Normal	Grupo Deficiente	Grupo Normal	Grupo Deficiente	Grupo Normal	Grupo Deficiente
Al	2270 ± 750 ^a	3180 ± 695 ^a	2490 ± 625 ^a	4000 ± 1000 ^a	3810 ± 960 ^a	2600 ± 680 ^a
P	1580 ± 140	1440 ± 130	1520 ± 170	1410 ± 160	1460 ± 180	1640 ± 150
S	1520 ± 70	1450 ± 80	1110 ± 50	1100 ± 80	1720 ± 90	1470 ± 50
Cl	440 ± 30	510 ± 40	440 ± 20	470 ± 40	760 ± 40 ^a	440 ± 30 ^a
K	3530 ± 20	3410 ± 25	3400 ± 30 ^a	2750 ± 20 ^a	3250 ± 25 ^a	3000 ± 20 ^a
Ca	270 ± 4	360 ± 5	305 ± 3	290 ± 4	600 ± 10 ^a	360 ± 4 ^a
Fe	50 ± 1	42,7 ± 0,3	43 ± 0,3 ^a	75 ± 1 ^a	95 ± 1 ^a	80 ± 1 ^a
Cu	4,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2	3,8 ± 0,1
Zn	35,2 ± 0,3	31,9 ± 0,3	33,1 ± 0,2	30,6 ± 0,2	35,5 ± 0,3	34,6 ± 0,3
Br	<LMD	<LMD	4 ± 1 ^a	8,0 ± 0,3 ^a	4 ± 1	6 ± 1
Rb	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	<LMD	5 ± 1
<i>Elementos</i>	<i>Hipocampo</i>		<i>Tálamo</i>		<i>Hipotálamo</i>	
	Grupo Normal	Grupo Deficiente	Grupo Normal	Grupo Deficiente	Grupo Normal	Grupo Deficiente
Al	1790 ± 400 ^a	2680 ± 630 ^a	6850 ± 1850 ^a	11300 ± 1860 ^a	3660 ± 1000 ^a	6160 ± 1930 ^a
P	1550 ± 110	1510 ± 130	2650 ± 260 ^a	1380 ± 190 ^a	3850 ± 500 ^a	2460 ± 340 ^a
S	1260 ± 60	1070 ± 70	3050 ± 140 ^a	1000 ± 90 ^a	2730 ± 210	2440 ± 170
Cl	284 ± 30 ^a	400 ± 30 ^a	660 ± 60 ^a	460 ± 40 ^a	710 ± 60	670 ± 70
K	2740 ± 20 ^a	1760 ± 20 ^a	4500 ± 30 ^a	2420 ± 20 ^a	4520 ± 50	4170 ± 40
Ca	195 ± 4	210 ± 4	330 ± 4	360 ± 4	350 ± 5 ^a	1605 ± 10 ^a
Fe	30,9 ± 0,2 ^a	42,4 ± 0,4 ^a	152 ± 1	130 ± 1	100 ± 1	70 ± 1
Cu	4,4 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,2 ^a	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,2	8 ± 1	9 ± 1
Zn	27,9 ± 0,2	31,0 ± 0,3	29,1 ± 0,2	27,2 ± 0,2	35 ± 1 ^a	115 ± 1 ^a
Br	<LMD	2,6 ± 0,5	<LMD	6 ± 1	4 ± 1 ^a	10 ± 2 ^a
Rb	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 1	<LMD	<LMD	5 ± 1

Valores média ± desvio padrão. O índice a indica diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados, em cada região, para $P \leq 0,05$.

Tabela A5. Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no corpo estriado de camundongos transgênicos com a doença de Huntington e saudáveis, utilizando TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Controle</i>	<i>DH</i>
Al	151 ± 5	153 ± 5
P	757 ± 69 ^a	936 ± 21 ^a
S	794 ± 55 ^a	1070 ± 277 ^a
Cl	133 ± 14 ^a	251 ± 17 ^a
K	2560 ± 142	2630 ± 318
Ca	62 ± 5	78 ± 3
Fe	22 ± 2	29 ± 7
Cu	4,73 ± 0,01 ^a	7,64 ± 0,03 ^a
Zn	25 ± 4	28 ± 3
Br	2,3 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,2 ^a
Rb	7 ± 1	5,8 ± 0,2

Valores: média ± desvio padrão. O índice a indica diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados para $P \leq 0,05$.

Tabela A6. Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no material certificado – fígado bovino, NIST1577b.

<i>Elementos</i>	<i>Concentração certificada</i>	<i>Concentração medida porTXRF</i>	<i>Concentração medida por μXRF</i>
P	11000 \pm 300	9130 \pm 40	7000 \pm 400
S	7850 \pm 60	6235 \pm 25	6100 \pm 90
K	9940 \pm 20	8620 \pm 20	10210 \pm 80
Ca	116 \pm 4	115 \pm 6	80 \pm 6
Mn	10,5 \pm 1,7	7.7 \pm 0.2	6,4 \pm 0,2
Fe	184 \pm 15	170 \pm 1	140 \pm 4
Cu	160 \pm 8	134.7 \pm 0.4	120 \pm 4
Zn	127 \pm 16	112.7 \pm 0.4	120 \pm 4
Rb	13,7 \pm 1.1	15 \pm 1	18 \pm 6

Anexo A

TRABALHOS PUBLICADOS

1. Serpa, R. F.B., De Jesus, E.F.O., Anjos, M.J., Do Carmo, M.G.T., Rocha, M., RODRIGUES, L.C., Lopes, R.T., Moreira, S., Martinez, A.M.B. Cognitive impairment related changes in the elemental concentration in the brain of old rat. *Spectrochimica Acta. Part B*, v. 61, pp. 1219-1223, 2006.
2. Serpa, R. F.B., De Jesus, E.F.O., Anjos, M.J., Do Carmo, M.G.T., Rocha, M., Martinez, A.M.B., Moreira, S., Lopes, R.T. Elemental Concentration Analysis in Brain Structures from Young, Adult and Old Wistar Rats by SR-TXRF. *Spectrochimica Acta. Part B*, v.61, pp. 1205-1209, 2006.

