



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS À
EXPOSIÇÃO AO N-HEXANO**

Trabalho submetido por
André Miguel Souto Reis
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS À
EXPOSIÇÃO AO N-HEXANO**

Trabalho submetido por
André Miguel Souto Reis
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Maria Edite da Silva Oliveira Torres

novembro de 2016

“If you want to live a happy life, tie it to a goal, not to people or objects”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Durante os vários meses de elaboração desta monografia, foram várias as pessoas que tornaram possível conclusão da mesma. Como tal compete-me agradecer ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz por me ter dado todas as bases necessárias, para que no exercício da profissão farmacêutica, consiga atingir um nível de excelência.

Um especial agradecimento à Professora Edite por me ter orientado, animado e ajudado em todos os momentos que precisei, pois sem as suas palavras não conseguiria ter levado a realização desta monografia a um fim.

A ti Mãe, por me teres suportado em todos os momentos da minha vida, por teres acreditado em mim quando eu não correspondi, por teres conseguido fazer de mim um farmacêutico.

O meu lado sonhador e por vezes ingénuo, deve-se a ti Pai. Obrigado por me fazeres sonhar alto, por me teres dito desde que me conheço que sou um cidadão do mundo.

Aos meus velhinhos preferidos Avô Souto, Avó Sofia, Avô Reis e Avó Flora, vocês são o exemplo que tento seguir todos os dias. Todos os momentos que passámos juntos foram muito importantes para eu ser o que sou hoje. Uma palavra em especial a ti Avó Sofia, sabes bem o que significa o fim deste ciclo para mim, há uns anos disse-te que ia ser farmacêutico. Consegui, Avó!

Ao resto da família, mas não menos importante, um enorme agradecimento por toda a educação que me deram ao longos destes anos todos, invejo-vos a paciência!

Para além de formação, o ISCSEM deu-me a minha Margarida, minha colega, amiga e namorada. És um marco na minha vida e vais continuar a ser por muitos anos, não tenho como te agradecer tudo o que fizeste por mim. Agarraste-me sempre que parecia cair e ergueste-me. Sem ti nada disto seria possível. Foram os primeiros de muitos anos que ainda temos pela frente, sendo que os que aí vêm serão sempre melhores. Obrigado por me amares à tua maneira, é essa que eu gosto.

Resta-me agradecer aos meus amigos, que sempre me apoiaram independentemente dos momentos serem bons ou maus, Afonso, João, Nuno, Diogo, Gaspar, Inês Guerreiro, Pedro, Mariana, Inês Santos, Lúcia e Vanessa. Obrigado por todo o apoio.

RESUMO

Sendo o controlo e prevenção da exposição humana a produtos químicos neurotóxicos uma área importante de pesquisa que certamente contribui para a promoção da saúde pública, pretende-se com esta dissertação estudar a neurotoxicidade induzida pelo n-hexano.

Deste modo, nesta revisão científica bibliográfica pretende-se apresentar as consequências da exposição crónica a este solvente, a qual induz neuropatias periféricas classificadas como atrofia axonal no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periféricos (SNP) tanto em seres humanos como em animais.

O principal composto responsável por esta neurotoxicidade é o seu metabolito, a 2,5-hexanodiona (2,5-HD) que a nível do organismo forma compostos pirrólicos através da ligação seletiva desta γ -dicetona a grupos amina do aminoácido lisina existentes nas proteínas de determinados neurofilamentos axonais. Após a formação destes compostos podem ocorrer alterações a nível da estrutura dos axónios e consequentemente da sua função.

Estas alterações bioquímicas podem ser detetadas recorrendo a biomarcadores de exposição e de efeito, 2,5-HD e 2,5-dimetilpirrol (2,5-DMP) respetivamente.

A presença destes aductos pirrólicos pode ser associada a certas patologias neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, através, por exemplo, da promoção da peroxidação lipídica. Além destas patologias, podem ainda surgir efeitos tóxicos tanto a nível reprodutivo como ocular.

Assim, os efeitos neurotóxicos observados após a exposição ambiental/ocupacional ao n-hexano refletem alterações neurocomportamentais que podem ser avaliadas de modo a rastrear o desenvolvimento progressivo da neurotoxicidade deste solvente durante a exposição a longo prazo. Para tal é utilizada uma bateria de testes de observação funcional, os quais são bastante sensíveis e permitem detetar alterações progressivas a nível das disfunções motoras em função do tempo de exposição.

Palavras-Chave: n-Hexano; Toxicologia Ocupacional; Neurotoxicidade; 2,5-Hexanodiona.

ABSTRACT

The control and prevention of the human exposure to neurotoxic chemical products is an important field of research that certainly contributes to the promotion of public health, therefore it is intended to study with this dissertation the neurotoxicity induced by n-hexane.

In this scientific bibliographical review, the aim is to present the consequences to chronic exposure to this solvent, which induces peripheral neuropathies classified as axonal atrophy in the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS), both in humans and animals.

The main compound responsible for this neurotoxicity is its metabolite, at 2,5-hexanedione, that in the body shapes pyrrolic compounds through the selective connection of this γ -diketone with amine groups of the amino acid lysine existent in the proteins of certain axonal neurofilaments. After the formation of these compounds, alterations arise in the axons structure, and consequently, on its function.

This biochemical changes may be detected using exposure and effect biomarkers, 2,5-hexanedione and 2,5-dimethylpyrrole, respectively.

The presence of these pyrrolic adducts may be associated with certain neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, for instance, through lipid peroxidation promotion. Beyond these pathologies, toxic effects may occur on the reproductive and ocular systems.

Thus, the neurotoxic effects observed after the environmental/occupational exposure to n-hexane reflect the neurobehavioral alterations that may be assessed in order to trace the progressive development of the neurotoxicity of this solvent during long term exposure. To this end, a battery of functional observation tests is used, that due to its sensitivity can detect progressive alterations at the level of motor disabilities according to the time of exposure.

Keywords: n-Hexane; Occupational Toxicology; Neurotoxicity; 2,5-Hexanedione.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
OBJETIVOS	13
1. n-hexano	15
1.1. Toxicocinética.....	16
1.1.1. Absorção.....	16
1.1.2. Metabolização.....	17
1.1.3. Eliminação	18
2. Toxicidade da 2,5-Hexanodiona	19
2.1. Neurotoxicidade.....	19
2.1.1. Efeitos neurológicos	19
2.1.2. Efeitos neuropatológicos	20
2.1.3. Efeitos fisiológicos e bioquímicos.....	22
2.1.4. Efeitos citotóxicos	23
2.1.5. Mecanismo de ação da 2,5-Hexanodiona	23
2.2. Efeitos reprodutivos tóxicos	25
2.3. Efeitos tóxicos na retina e visão.....	26
3. Controlo e prevenção da exposição ocupacional a solventes.....	29
3.1. Limites para a exposição ocupacional	29
3.1.1. Biomarcadores como ferramenta de biomonitorização à exposição química	30

3.1.2.	Biomarcadores de exposição	31
3.1.3.	Biomarcadores de suscetibilidade	32
3.1.4.	Biomarcadores de efeitos.....	33
3.1.5.	Métodos analíticos para determinar biomarcadores de exposição	34
4.	Mecanismo da toxicidade dos compostos pirrólicos.....	35
4.1.	Aductos pirrólicos.....	35
4.2.	Compostos pirrólicos e radicais livres	36
4.3.	Produção endógena de compostos pirrólicos.....	37
5.	Compostos pirrólicos e doenças neurodegenerativas.....	39
5.1.	Doença de Alzheimer.....	40
5.2.	Doença de Parkinson	41
6.	Métodos para avaliação da neurotoxicidade	43
6.1.	Testes neurocomportamentais em animais	44
6.1.1.	Monitorização neurocomportamental em roedores	45
6.2.	Avaliação clínica.....	47
7.	Conclusão	49
8.	Bibliografia	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Biotransformação e reações de ligação macromolecular de n-hexano e 2,5-HD	17
Figura 2: Neurofilamentos distais apresentam maior densidade de aductos pirrólicos como consequência da lenta migração de neurofilamentos pelo axónio. Local onde é iniciada a degeneração do axónio evoluindo para locais mais proximais	21
Figura 3: Processo de neurodegeneração após exposição crónica ao n-hexano.....	22
Figura 4: Mecanismo molecular da formação de compostos pirrólicos a partir da 2,5-HD e consequentes reações de oxidação com diversos nucleófilos	25
Figura 5: Fluxograma com as classes de biomarcadores. Progressão desde a exposição até à doença	30
Figura 6: Mecanismo de formação de 2,5-Dimetilpirrol.....	35
Figura 7: Mecanismo de inibição/promoção da oxidação de pirróis com consequente formação de aductos de tiol conjugados ou de dímeros pirrólicos.....	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas e neuropatologia das doenças neurodegenerativas: Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP)	40
Tabela 2: Testes da bateria de monitorização neurocomportamental.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

2,5-DMP	2,5-Dimetilpirrol
2,5-HD	2,5-Hexanodiona
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
DA	Doença de Alzheimer
DCL	Demência com Corpos de <i>Lewy</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
ECETOC	<i>European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre</i>
FOB	Bateria de Observação Funcional (<i>Functional Observational Battery</i>)
GLPH	Glicogénio-Fosforilase
GSH	Glutathiona Reduzida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSAB	Ácidos e Bases Duros ou Macios (<i>Hard and Soft Acid and Bases</i>)
HTA	Hipertensão Arterial
LEO	Limites de Exposição Ocupacional
NAC	N-acetilcisteína
NFS	Neurofilamentos
NRC	<i>National Research Council</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLS	Substâncias Pirrol-Tipo (<i>Pyrrole-Like Substances</i>)
RM	Ressonância Magnética

ROS	Espécies de Oxigénio Reativo (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TC	Tomografia Computorizada
VAP	<i>Average Path Velocity</i>
VCL	<i>Curvilinear Velocity</i>
VLB	Valores-Limite Biológicos
VSL	<i>Straight Line Velocity</i>

OBJETIVOS

A presente monografia tem como principal objetivo o estudo da associação entre o n-hexano e doenças neurodegenerativas: doença de Parkinson e doença de Alzheimer.

Neste contexto, pretende-se, através de uma revisão da literatura científica:

- i) abordar os efeitos tóxicos do n-hexano e dos seus metabolitos no organismo, nomeadamente da 2,5-hexanodiona;
- ii) descrever as classes de biomarcadores desde o início da exposição até à doença e respetivas amostras biológicas;
- iii) verificar a existência de métodos para a avaliação da neurotoxicidade;
- iv) relacionar o aparecimento das doenças neurodegenerativas e a exposição a este solvente.

1. n-hexano

O n-hexano é um solvente alifático de baixo peso molecular, incolor, volátil, pouco solúvel em água e com um odor muito característico.

A importância do estudo deste solvente prende-se com o facto do mesmo causar danos neurológicos e, conseqüentemente ter impacto considerável a nível saúde pública (DeCaprio, 2000).

Este composto é largamente utilizado, pela indústria química, no seu estado puro e comercial (US EPA 635/R-03/012), como pode ser encontrado em vários produtos, nomeadamente colas, tintas, adesivos, lacas, produtos de revestimento, cimentos e agentes de limpeza (Fedtke & Bolt, 1987). Pode também ser utilizado e/ou encontrado noutra tipo de indústria, como a indústria do calçado e petrolífera. A utilização do n-hexano na indústria do calçado deve-se ao facto de este ser um constituinte de alguns materiais como a cola, a tinta e produtos de limpeza.

Em termos de indústria petrolífera o n-hexano faz parte da composição do petróleo bruto e do gás natural em proporções diferentes. Após o processamento destas matérias primas e obtenção do produto final, estima-se que o n-hexano esteja presente em gasóleo/gasolina sem chumbo (11,6%) e no combustível destinado à aviação (2%). Uma vez que este tipo de produtos são utilizados diariamente e em larga escala, a população em geral encontra-se sujeita à exposição a este composto por via inalatória devido à poluição ambiental (Brugnone et al., 1991).

Após terem sido efetuados e estudados testes toxicológicos em animais e estudos epidemiológicos em humanos, chegou-se à conclusão de que a inalação de n-hexano afeta diversos órgãos como o baço, fígado, rins, nervos periféricos e cérebro. Apresenta também um grande distribuição em tecidos ricos em lípidos (Huang, 2008).

A exposição ocupacional ao n-hexano tem sido associada à falta de condições de segurança em vários locais de trabalho onde este solvente é utilizado com bastante frequência. Neste caso, estamos perante uma exposição crónica conhecida como causa de problemas ao nível do sistema nervoso, também conhecida por polineuropatia (Oñeale, Handra, & Raşcu, 2015). Estudos revelam que os primeiros casos de polineuropatias associadas à exposição crónica ao n-hexano foram identificados numa fábrica de

laminação de polietileno no Japão (Chang et al., 1993; Iwata, Takeuchi, Hisanaga, & Ono, 1983; Takeuchi, 2006).

O n-hexano provoca estados de euforia ao ser inalado, e por estar presente em produtos de fácil acesso, como as colas, é utilizado pelos jovens levando-os à sua dependência (Damstra, 1978; Smith & Albers, 1997).

A dependência por inalação dos vapores de n-hexano presente em colas provoca neuropatias, também conhecida por neuropatia de *Huffer* (Fedtke & Bolt, 1986; Spencer & Schaumburg, 1975).

1.1. Toxicocinética

1.1.1. Absorção

A absorção do n-hexano pode ocorrer através das vias inalatória, oral e dérmica, sendo que para uma exposição ocupacional, a principal via de absorção é a inalatória. Por ser a principal via de absorção do n-hexano, verificou-se que cerca de 25% do composto inalado é retido a nível alveolar, sendo que este valor corresponde a 17% da absorção pulmonar. A pele por sua vez é a menor porta de entrada do composto neste tipo de exposição (Mutti et al., 1984).

Esta molécula, para além de apresentar uma elevada taxa de retenção alveolar, também se caracteriza pela facilidade de ultrapassar a membrana alvéolo-capilar, entrando na corrente sanguínea (Brugnone, Perbellini, Grigolini, & Apostoli, 1978; Veulemans, Vlem, Janssens, Masschelein, & Leplat, 1982).

Apesar da via inalatória ser a mais rápida, esta depende de vários fatores que influenciam a captação de n-hexano. Esta via de absorção encontra-se aumentada em indivíduos obesos e durante a prática de exercício físico uma vez que a taxa de ventilação pulmonar é superior (OMS, 1991).

Devido à grande facilidade de absorção do n-hexano por via inalatória foi realizado um estudo, em que se demonstrou a existência de uma relação entre a concentração do composto inalado e a sua concentração a nível sanguíneo (Brugnone et al., 1978; Mutti et al., 1984; Perbellini, Mozzo, Brugnone, & Zedde, 1986).

1.1.2. Metabolização

O n-hexano segue um caminho complexo a nível metabólico, no qual sofre inúmeras reações de hidroxilação e desidrogenação. A Figura 1 apresenta esquematicamente todo o processo de biotransformação do n-hexano em aductos pirrólicos.

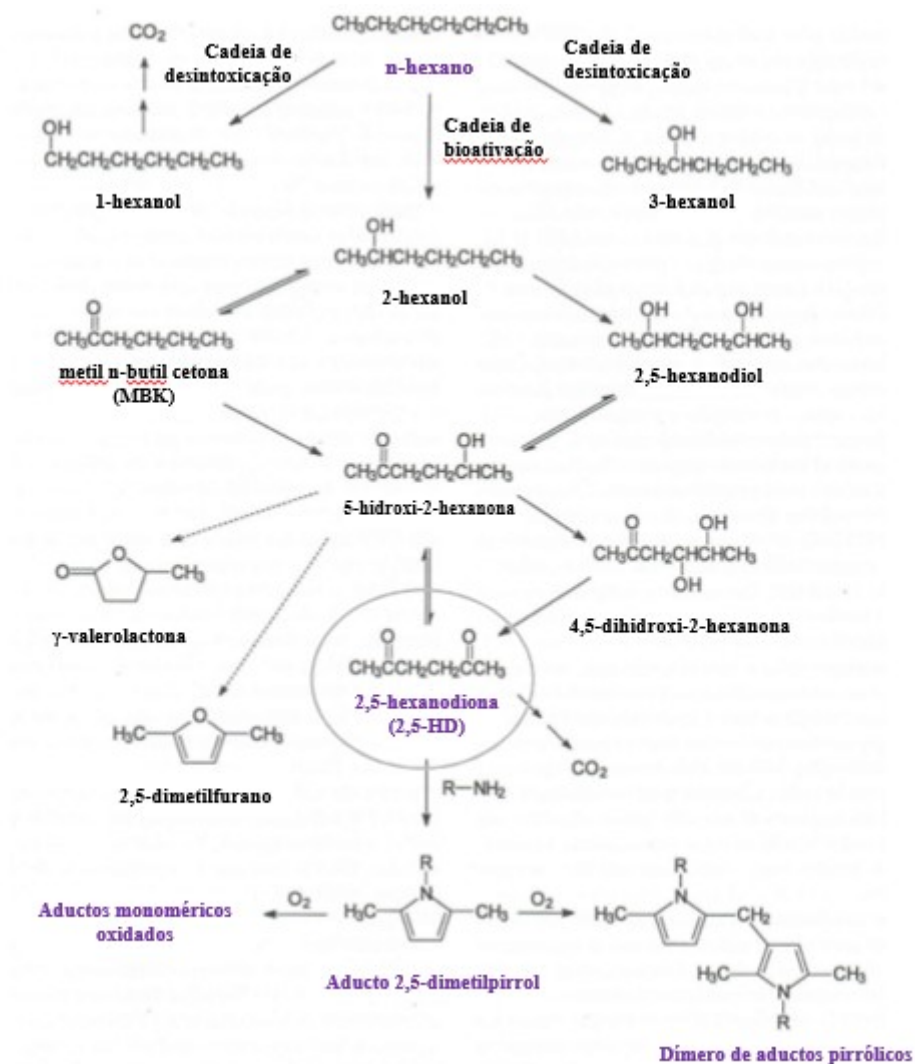


Figura 1: Biotransformação e reações de ligação macromolecular de n-hexano e 2,5-HD

(Adaptado de Torres, 2014)

Após o n-hexano entrar em circulação, sofre uma hidroxilação mediada pelo citocromo P450, originando diversos metabolitos. Dos vários metabolitos podem ser destacados o **2-hexanol**, **metil n-butilcetona**, **4,5-dihidroxi-2-hexanona** e o **2,5-hexanodiona (2,5-HD)** (Andreoli, Manini, Mutti, Bergamaschi, & Niessen, 1998; Graham, 1999; Manini, Andreoli, Mutti, Bergamaschi, & Franchini, 1999).

Por outro lado, se o n-hexano seguir por uma via de desintoxicação, origina **1-hexanol** e **3-hexanol** que são metabolitos muito menos tóxicos. Estes são oxidados formando o ácido hexanóico que será metabolizado pela via lipídica.

O **2-hexanol** por ser um dos principais metabolitos do n-hexano e por se encontrar num ponto intermédio de todo o processo metabólico origina todos os outros metabolitos que se apresentam em maior quantidade. O **2-hexanol** é convertido por uma segunda hidroxilação em **2,5-hexanodiol** e 2-hexanona que são metabolizados em **5-hidroxi-2-hexanona** e **4,5-dihidroxi-2-hexanona**, que ao sofrerem oxidação originam a **2,5-HD**. De todos os metabolitos do **n-hexano**, a **2,5-HD** é o que produz maiores efeitos tóxicos em humanos (Andreoli et al., 1998; Manini et al., 1999; Perbellini, Brugnone, & Faggionato, 1981).

1.1.3. Eliminação

A eliminação do n-hexano ocorre ao nível da expiração do composto que não foi absorvido e metabolizado por bioativação, e ao nível urinário são eliminados os metabolitos que decorrem da absorção do n-hexano (Perbellini, Amantini, Brugnone, & Frontali, 1982).

Cinco voluntários foram expostos ao n-hexano com o objetivo de obter uma relação entre a quantidade de composto inalado e a quantidade eliminada por expiração. Obtiveram-se valores de eliminação e absorção de 73% e 27%, respetivamente (Hamelin, Truchon, & Tardif, 2004).

Brugnone e a sua equipa realizaram estudos onde se demonstra que a taxa de absorção de n-hexano por via inalatória se encontra entre 15% a 25% do composto inalado, sendo que os valores obtidos por Tardif e seus colaboradores apresentam um ligeiro aumento de 2% em relação ao limite máximo do intervalo mencionado anteriormente (Brugnone et al., 1978; Hamelin et al., 2004; Veulemans et al., 1982).

Os níveis de 2,5-HD na urina são utilizados como biomarcadores de rotina da exposição ocupacional ao n-hexano (Andreoli et al., 1998; OMS, 1991; Perbellini et al., 1981).

2. Toxicidade da 2,5-Hexanodiona

O metabolito 2,5-HD apresenta efeitos tóxicos a nível neurológico, ocular e reprodutivo sendo, como tal, abordado para uma melhor compreensão dos seus efeitos.

2.1. Neurotoxicidade

Os efeitos tóxicos provocados pelo n-hexano são, em grande medida, provenientes de uma exposição ocupacional por utilização deste solvente nas várias indústrias. Hoje sabe-se que não é este composto que provoca efeitos tóxicos diretamente, mas sim o seu principal metabolito (2,5-HD) (Torres, 2014).

2.1.1. Efeitos neurológicos

A 2,5-HD é responsável pela indução de uma axonopatia distal a nível central e periférico, caracterizada pela atrofia causada em grandes nervos motores e sensoriais (DeCaprio, Kinney, & LoPachin, 2009; Lehning et al., 2000; Lehning, Dyer, Jortner, & LoPachin, 1995).

Quanto mais longos forem os axónios no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), mais vulneráveis são relativamente aos efeitos tóxicos do n-hexano e seus metabolitos. Devido aos efeitos tóxicos da 2,5-HD, os indivíduos expostos apresentam ataxia e fraqueza muscular caracterizada por uma neuropatia distal sensitivo-motora (axonopatia distal) (Costa, 1996; Spencer, Schaumburg, Sabri, & Veronesi, 1980).

Os efeitos tóxicos que afetam o SNP manifestam-se clinicamente como uma axonopatia distal ou neuropatia “*dying-back*”, cujos sintomas são variados. Os primeiros sintomas após uma exposição aguda, são a dormência e a sensação de queimadura nos dedos seguida de fraqueza muscular (Schaumburg & Spencer, 1976).

Quando ocorre uma exposição contínua e já numa neuropatia mais avançada (polineuropatia) os sintomas apresentam-se de forma simétrica (Sanagi, Seki, Sugimoto, & Hirata, 1980). A diminuição da sensação de temperatura, toque e vibração, perda de massa muscular e consequente fraqueza são também sintomas característicos deste tipo de exposição ao nível do SNP (Chang, 1990; Schaumburg & Spencer, 1976).

A dependência associada à inalação de aerossóis de colas está diretamente relacionada com sintomas como a dor abdominal, náuseas, vômitos, impotência, sudorese, visão turva, alteração da visão a cores, alterações na retina, dormência facial e diminuição dos reflexos da córnea (Dick, Semple, Chen, & Seaton, 2000).

Relativamente aos efeitos neurotóxicos da 2,5-HD no SNC, distinguem-se as dores de cabeça, distúrbios no sono, irritabilidade, deficiências mentais e diminuição de movimentos (DeCaprio, 2000).

Quando estamos perante uma exposição aguda a concentrações elevadas de n-hexano e consequentemente da 2,5-HD verificam-se sintomas como a necrose, euforia, tonturas, vertigens e alucinações. O sintoma que motiva a dependência por inalação de aerossóis de colas são as alucinações (Chang, 1987; DeCaprio, 2000).

As pessoas expostas ao solvente podem ainda desenvolver, em casos mais graves, depressão respiratória, convulsões, coma e morte (Chang, 1987; DeCaprio, 2000).

2.1.2. Efeitos neuropatológicos

As principais lesões neuropatológicas causadas pela exposição ao n-hexano são a atrofia axonal, o inchaço internodal, a degeneração axonal distal do tipo *Wallerian* e a retração da mielina nos nós de *Ranvier* (DeCaprio, Kinney, & Fowke, 1997; Graham, Amarnath, Valentine, Pyle, & Anthony, 1995; Jortner, 2000; Lehning et al., 2000; Lopachin, 2000)

O indicador patológico da degeneração axonal do nervo periférico é o inchaço axonal distal não terminal. Estes inchaços têm início nos nódulos de *Ranvier* que por divisão e encolhimento da mielina ascendem até à porção terminal do nervo com o avançar da exposição (Figura 2) (Schaumburg & Spencer, 1976).

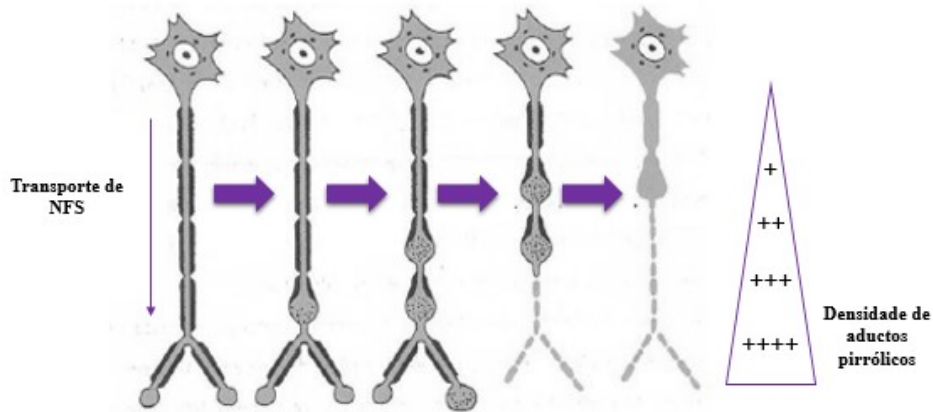


Figura 2: Neurofilamentos distais apresentam maior densidade de aductos pirrólicos como consequência da lenta migração de neurofilamentos pelo axônio. Local onde é iniciada a degeneração do axônio evoluindo para locais mais proximais

(Adaptado de Torres, 2014)

Os inchaços axonais caracterizam-se por serem preenchidos por massas de neurofilamentos (NFS) desorganizados, que inicialmente ocorrem junto dos nódulos de *Ranvier* da porção distal do axônio. Durante a exposição crônica ao n-hexano e após a sua metabolização em 2,5-HD, formam-se, por derivatização química com grupos lisil-amino dos neurofilamentos, os aductos pirrólicos (Graham et al., 1995).

A constrição do diâmetro axonal nos nódulos de *Ranvier* é um fator importante para a formação de edemas, dificultando o transporte de massas de NFS. Desta forma as massas de NFS não concluem o seu processo de atingir a sinapse (Griffin et al., 1984).

A Figura 3 representa esquematicamente o processo de neurodegeneração após a exposição crónica ao n-hexano.

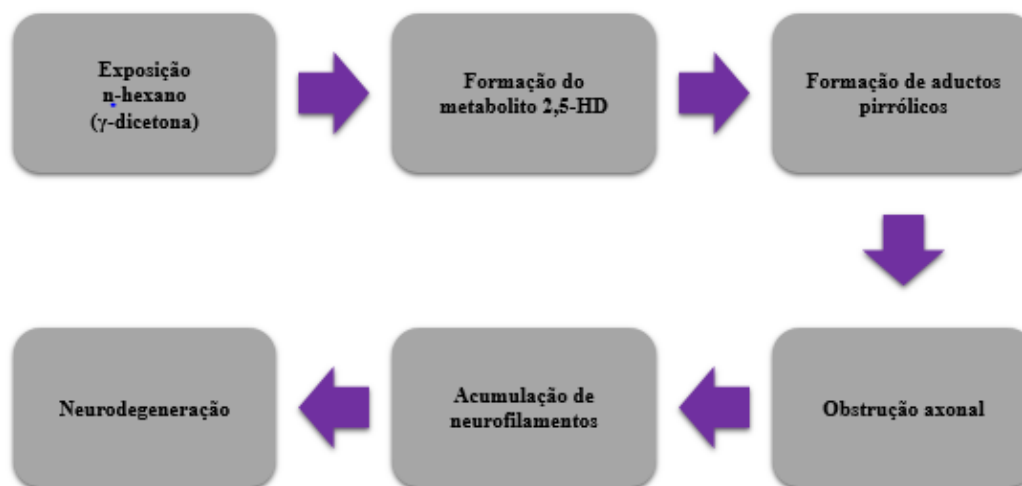


Figura 3: Processo de neurodegeneração após exposição crónica ao n-hexano
(Adaptado de Lopachin & Decaprio, 2005)

Com efeito, o principal local onde a γ -dicetona (2,5-HD) promove a génese de patologias é o axónio. No entanto, o mecanismo de alteração na estrutura proteica, que contribui para a formação de axonopatias e degeneração de fibras nervosas, permanece em fase de estudo (Tshala-katumbay et al., 2008, 2009).

2.1.3. Efeitos fisiológicos e bioquímicos

A ligação química da 2,5-HD às proteínas é hoje objeto de estudo, uma vez que estas ligações estão na origem dos efeitos tóxicos ao nível da formação de novas proteínas, assim como danificação das já existentes (DeCaprio, Olajos, & Weber, 1982).

A γ -dicetona é responsável por alterações na síntese de novas proteínas e pela degradação das já existentes (DeCaprio, 1985; Lopachin & Decaprio, 2005; Spencer, Kim, & Sabri, 2002)

Com exceção da glicogénio-fosforilase (GLPH), o aumento do número de enzimas envolvidas no metabolismo energético é considerado como uma resposta ao stress

provocado pelas alterações na síntese/estrutura de proteínas pela 2,5-HD (Genova et al., 2004; Tshala-katumbay et al., 2009).

Assim, níveis baixos na expressão da GLPH indicam que a degradação do metabolismo da glucose está associado à neurotoxicidade devido à γ -dicetona (Yuan et al., 2009).

Os efeitos tóxicos a nível bioquímico e fisiológico estão principalmente associados a alterações a nível axonal com consequências eletrofisiológicas que levam a uma perda na velocidade de condução do sinal (Yuan et al., 2009). A 2,5-HD é responsável pela redução dos níveis de expressão proteica que garante a manutenção axonal e como consequência, uma boa passagem do sinal elétrico.

2.1.4. Efeitos citotóxicos

Segundo ensaios *in vitro*, há perda de neurónios por exposição tanto ao n-hexano como à 2,5-HD (Cui et al., 2007; Kim et al., 2009; Selkoe, Luckenbill-Edds, & Shelanski, 1978). Verifica-se que a apoptose celular pode estar associada à toxicidade de elevadas doses de 2,5-HD (400mg/kg) por alterações ao nível das proteínas anti-apoptose e pro-apoptose (Cui et al., 2007). Para doses baixas (50mg/kg), a 2,5-HD provoca a diminuição da neurogénese, levando ao aumento da formação de espécies de oxigénio reativas em 60% (Kim et al., 2009).

A 2,5-HD induz diretamente alterações no corpo celular dos neurónios (Moretto, Passarin, Benedetti, Rizzuto, & Monaco, 1991), onde são sintetizadas a maioria das proteínas necessárias para a manutenção e reparação do axónio (Cui et al., 2007). Este metabolito provoca efeitos cognitivos e prejudica a memória espacial uma vez que afeta o SNC, onde estão localizados 99% dos neurónios (Carney et al., 2002).

2.1.5. Mecanismo de ação da 2,5-Hexanodiona

Teoria *Hard and Soft Acid and Base* (HSAB)

Na área da toxicologia, a interação covalente irreversível entre um eletrófilo tóxico e o seu nucleófilo conjugado é reconhecida como uma reação mediadora de lesões celulares induzidas por químicos. A reação eletrófilo/nucleófilo apresenta um elevado grau de seletividade, na medida em que, um determinado eletrófilo reage com um nucleófilo

específico. Desta forma, a seletividade eletrofílica baseia-se em características eletrónicas e estruturais que contribuem para a classificação: ácidos e bases duros ou macias (HSAB) (Pearson, 1968, 1987).

O grau de seletividade das interações eletrófilo/nucleófilo é previsto pela teoria HSAB, na medida em que, classifica as espécies reativas como duras (*hard*) e macias (*soft*) com base na sua polarizabilidade: polarizadas (*soft*) e não polarizadas (*hard*) (Lopachin, Gavin, Decaprio, & Barber, 2012). Assim sendo, em termos toxicológicos, os eletrófilos tóxicos reagem preferencialmente com alvos biológicos que apresentam polarizabilidade semelhante (Lopachin & Decaprio, 2005).

A polarizabilidade é definida como a facilidade que a nuvem eletrónica apresenta em formar novas ligações consoante o tipo de reação (*hard* ou *soft*). As interações que podem originar compostos tóxicos entre o eletrófilo e o nucleófilo conjugado podem ser irreversíveis, caso a ligação seja covalente, ou reversíveis se a ligação for iónica (Lopachin & Barber, 2006).

Formação de compostos pirrólicos

Diversos estudos demonstraram que a 2,5-HD pode reagir diretamente com a proteína axonal, formando-se assim aductos 2,5-Dimetilpirrol (2,5-DMP). Esta ligação dá-se devido à presença de resíduos de lisina nos neurofilamentos (DeCaprio et al., 1997; Graham et al., 1995; Lopachin & Decaprio, 2005; Pyle, Amarnath, Graham, & Anthony, 1992).

No entanto, apenas as cetonas classificadas como γ -dicetonas têm a capacidade de provocar danos através do seu efeito neurotóxico. A razão pela qual apenas a 2,5-HD provoca efeitos tóxicos, prende-se com o facto de haver limitação espacial a nível molecular para a formação de outro tipo de composto que provoque efeitos tóxicos (DeCaprio, 2000; Llorens, 2013; Zhang, Gavin, Decaprio, & Lopachin, 2010).

Uma vez formado o aducto pirrólico, este pode sofrer uma oxidação secundária por eletrófilos macios (Graham, Anthony, & Boekelheide, 1982; Zhu, Spink, Yan, Bank, & Decaprio, 1995).

Na Figura 4 estão demonstradas três possíveis oxidações secundárias mediadas pelo grupo -SH (A, tiol), por outro aducto pirrólico (B) e pelo grupo -NH₂ (C, amina).

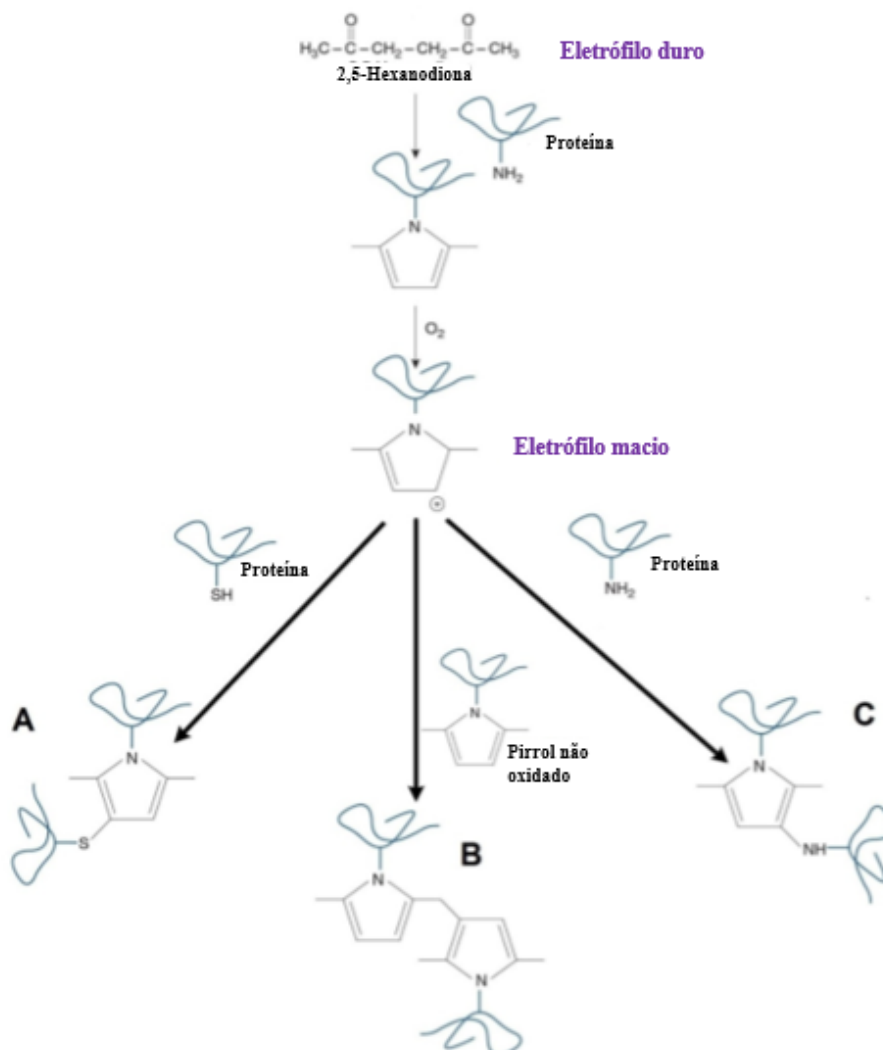


Figura 4: Mecanismo molecular da formação de compostos pirrólicos a partir da 2,5-HD e consequentes reações de oxidação com diversos nucleófilos

(Adaptado de Moser, Aschner, Richardson, & Philbert, 2013)

2.2. Efeitos reprodutivos tóxicos

A exposição ao n-hexano, para além de causar polineuropatias periféricas, pode também originar uma perda de células germinativas ao nível do testículo devido ao efeito tóxico do seu metabolito que provoca atrofia testicular irreversível (Allard, Hall, & Boekelheide, 1995; Hall & Boekelheide, 1991; Krasavage, O'Donoghue, DiVincenzo, & Terhaar, 1980).

Uma vez formada a 2,5-HD após exposição ao n-hexano, são formados pirróis que se vão acumular, induzindo lesões tanto ao nível do sistema nervoso como dos testículos (Clair et al., 1988; DeCaprio et al., 1982; Sayre, Shearson, Wongmongkolrit, Medori, & Gambetti, 1986). As lesões testiculares derivadas da presença dos compostos pirrólicos, são detetadas numa primeira fase devido ao aumento da polimerização da tubulina testicular que afeta em primeiro lugar as células de *Sertoli*. Estas células são responsáveis pelo suporte do epitélio dos túbulos seminíferos (Hall & Boekelheide, 1991; Horimoto, Isobe, Isogai, & Tachibana, 2000). Uma vez afetadas estas estruturas, após a exposição, existe diminuição da secreção de fluídos seminíferos e, por consequência, a perda de células germinativas (Boekelheide et al., 2003).

Outros efeitos tóxicos foram observados em animais onde se verificou a alteração de dois parâmetros usados para detetar efeitos tóxicos a nível reprodutivo. Estes parâmetros são a percentagem de espermatozoides móveis e a contagem destes no sémen. A 2,5-HD afeta indiretamente os espermatozoides, uma vez que as células de *Sertoli* são as primeiras a serem afetadas as quais repercutem diversos efeitos noutras estruturas como a diminuição de espermatozoides contados em sémen, a perda de peso dos testículos e epidídimo, bem como, os diferentes parâmetros avaliados através da velocidade dos espermatozoides. Os parâmetros de velocidade são: *average path velocity* (VAP), *straight line velocity* (VSL), *and curvilinear velocity* (VCL). Estes parâmetros são utilizados na avaliação do efeito tóxico da 2,5-HD na velocidade dos espermatozoides (Horimoto et al., 2000).

Os testículos, a próstata e o epidídimo são os órgãos alvo dos efeitos tóxicos da 2,5-HD no sistema reprodutivo e como tal, quando realizados testes de avaliação de efeitos tóxicos, devem ser testados os vários órgãos. Este tipo de toxicidade quando afeta o sistema reprodutor não danifica apenas um dos órgãos (Moffit, Bryant, Hall, & Boekelheide, 2007). No entanto, existe a possibilidade de reverter a atrofia induzida pela 2,5-HD com a administração da hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH), como por exemplo, a leuprorrelina (RCM - Leuprorrelina, 2015).

2.3. Efeitos tóxicos na retina e visão

Estudos em animais expostos ao n-hexano indicam que a 2,5-HD provoca uma deterioração acelerada e prematura da visão (Bäckström, 1999; Carelli et al., 2007; Spencer & Schaumburg, 1978). Trabalhadores expostos ao n-hexano apenas apresentam

efeitos adversos quando são expostos a concentrações acima do limite de exposição ocupacional, podendo apresentar perda da visão para cores e para o contraste (Mergler & Blain, 1987; Mergler, Bowler, & Cone, 1991; Moser, 2011).

Como foi referido anteriormente, existem indústrias onde o n-hexano é usado com frequência, e como tal, os seus trabalhadores estão mais suscetíveis a apresentar sintomas de intoxicação por exposição ao solvente. Trabalhadores das indústrias de óleos vegetais, tintas e adesivos apresentaram sintomas de perda de visão a cores uma vez que foram expostos a níveis de n-hexano acima do limite ocupacional (Bull, 2007; Eguchi et al., 1995). Numa fase inicial da exposição com concentrações acima dos limites legislados os trabalhadores apresentam perda da visão de cores como o azul e o amarelo, com a progressão da exposição ficam incapacitados no que toca à cor verde e vermelha por consequência da desmielinização do nervo ótico (Bäckström, 1999; Issever, Malat, Sabuncu, & Yuksel, 2002; Mergler & Blain, 1987; Moser, 2011).

3. Controlo e prevenção da exposição ocupacional a solventes

O crescente aumento de horas de trabalho, sobretudo nos países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento e a explosão industrial, observada nas últimas décadas tem-se feito notar na saúde dos trabalhadores. Cada vez mais são utilizados diferentes tipos de químicos que por exposição prolongada acabam por afetar a saúde dos profissionais, tornando o local de trabalho um fator muito importante para a saúde (Grandjean & Landrigan, 2006).

Apesar do contínuo melhoramento verificado relativamente às condições de trabalho a nível industrial, onde são utilizados mais solventes orgânicos, ainda muitos trabalhadores estão expostos a este tipo de químicos que por má ventilação e espaços muito reduzidos, acabam por sofrer de intoxicações severas (Anand, Bruckner, & Warren, 2013).

A toxicologia é uma área de estudo muito ampla, pelo que houve necessidade de se subdividir esta área noutras subáreas como é o caso da toxicologia ocupacional. Esta área por ser mais específica, tem como principais objetivos o controlo e a prevenção de doenças induzidas pela exposição a agentes químicos em trabalhadores que contactem no seu local de trabalho com solventes nocivos para a saúde. A definição de valores limite para cada substância química utilizada é uma das grandes prioridades desta área da toxicologia, uma vez que o que se pretende é apresentar um valor que abaixo dele não seja induzida qualquer doença devido a exposição ocupacional (Grandjean & Landrigan, 2006).

Atualmente, já existem normas que estabelecem valores de exposição de forma a promover a saúde e segurança do profissional no local de trabalho.

3.1. Limites para a exposição ocupacional

A comissão europeia estabeleceu não só valores-limite biológicos (VLB), mas também valores-limite de exposição ocupacional que, para uma maior segurança no trabalho permitem a padronização dos limites de exposição ocupacional (LEO). Aos químicos utilizados nas diversas áreas, é-lhes atribuído um LEO, que tem de ser cumprido por todos os estados membro (Directive 98/24/EC, 1998; Huang, 2008).

Estes limites de exposição ocupacional são determinados pelas agências reguladoras e utilizados como padrões nas empresas (Akubowski & Trzcinka-Ochocka, 2005; Bolt & Thier, 2006; Topping, 2001).

3.1.1. Biomarcadores como ferramenta de biomonitorização à exposição química

A biomonitorização é definida como uma medição de produtos tóxicos, dos seus metabolitos ou de uma molécula em amostras biológicas recolhidas de seres humanos e/ou animais. Podem ser analisadas amostras de urina, fezes, sangue, cabelo, unhas dos pés e mãos, leite materno, ar expirado, tecido adiposo e de lavagem brônquica (Prasad, Tyagi, & Aggarwal, 2016; Thorne, 2013).

Os biomarcadores são indicadores biológicos que são definidos como qualquer substância estrutura ou processo passíveis de serem medidos no organismo, em biofluidos ou em tecidos dele derivados (OMS, 2001).

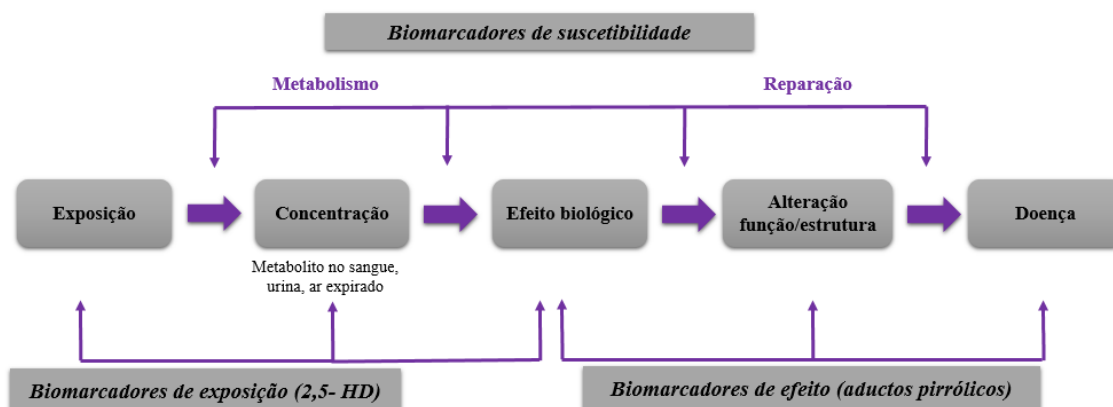


Figura 5: Fluxograma com as classes de biomarcadores. Progressão desde a exposição até à doença (Adaptado de Manini, Andreoli, & Mutti, 2006; NRC, 1987)

Os biomarcadores de exposição, de suscetibilidade e de efeito representam os diferentes tipos de biomarcadores que são utilizados para a obtenção de resultados diferentes consoante o uso de um biomarcador relativamente à exposição ou de outros, relativamente à suscetibilidade e ao efeito, tal como é demonstrado na Figura 5. Os resultados retirados são utilizados para a realização de estudos estatísticos de forma a relacionar uma exposição curta com uma exposição de longa duração ou crónica (NRC, 1987).

Para que se verifique a fiabilidade de um biomarcador de exposição é necessário que este tenha a capacidade de ser detetável a níveis diminutos, ser mensurável através de técnicas não invasivas, ser específico para a substância pretendida, ser barato e que permita estabelecer um valor preditivo de um estado de saúde específico. Para a toxicologia ocupacional o principal foco prende-se com a necessidade dos biomarcadores permitirem medições fiáveis de doses internas, para que assim se consiga estabelecer uma relação dose-efeito relativamente à substância tóxica (Manini, Andreoli, & Niessen, 2004).

Uma vez conhecida a relação dose-efeito, o biomarcador mais adequado é suficiente para que após a obtenção dos resultados se consiga avaliar o risco de efeitos adversos para aquela exposição. De todas as amostras biológicas acima referidas, o sangue e a urina são as mais utilizadas por serem pouco ou nada invasivas. A urina pelo facto de não ser invasiva é a mais utilizada (Manini et al., 2006).

3.1.2. Biomarcadores de exposição

A determinação do metabolito do n-hexano (2,5-HD) em trabalhadores expostos ao solvente faz-se através de amostras de urina. Esta determinação tem apenas a limitação de apenas detetar os casos de exposição recente, uma vez que a eliminação do metabolito dá-se em horas ou em alguns dias (Kawai et al., 1991; Saito et al., 1991).

O biomarcador de exposição utilizado em análises de rotina é o nível de 2,5-HD total na urina, isto é, 2,5-HD livre, 4,5-dihidroxi-2-hexanona e 5-hidroxi-2-hexanona (Bavazzano et al., 1998). Este tipo de análise realizada faz-se após um pré-tratamento da amostra por hidrólise ácida que, segundo a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, não será o procedimento mais correto uma vez que ao sofrer hidrólise ácida os metabolitos do n-hexano vão ser convertidos em 2,5-HD. Por este motivo, foi proposto um procedimento onde não existe o pré-tratamento da amostra de urina por hidrólise ácida.

Os metabolitos acima referidos não apresentam risco de neurotoxicidade e vão ser eliminados pela urina por ligação com o ácido glucorónico, não sendo desta forma necessários para a medição da 2,5-HD (Fedtke & Bolt, 1987; Manini et al., 1999).

Devido ao facto de os metabolitos do n-hexano serem excretados pela urina na forma conjugada com o ácido glucorónico, a medição analítica da 2,5-HD livre é o biomarcador de eleição para uma avaliação preditiva do risco tóxico (Manini et al., 2006).

Ainda assim, este método apresenta limitações que se prendem com o facto de o n-hexano estar presente nos mais variados produtos aos quais qualquer pessoa está exposta e que pode originar falsos negativos. Uma pessoa cujo local de trabalho não apresente focos de exposição ao n-hexano, ao realizar a análise de medição da exposição ao n-hexano pode ter como resultado um falso positivo, muitas vezes devido à poluição ambiental (Cardona et al., 1993; Kessler et al., 1990; Manini, Andreoli, Mutti, Bergamaschi, & Niessen, 1998).

Outros biomarcadores podem ser utilizados em biomonitorização do n-hexano, podendo assim ser utilizada uma amostra de sangue ou a determinação do n-hexano através do ar expirado. A utilização da medição do n-hexano numa amostra sanguínea tem duas limitações: para além de ser uma técnica invasiva, o n-hexano é um composto volátil que torna os resultados imprecisos. A medição do n-hexano por ar expirado é utilizada como teste de confirmação de exposição, uma vez que, se trata de uma medição rápida e muito específica (Brugnone et al., 1991; Cardona et al., 1996; Filser, Peter, Bolt, & Fedtke, 1987; Hamelin et al., 2004; Periago et al., 1993).

3.1.3. Biomarcadores de suscetibilidade

Um dos marcadores de suscetibilidade é a variação genética (CYP2E1) que está envolvida na metabolização do n-hexano com consequente suscetibilidade de lesão em nervos periféricos (Chang et al., 1993; Jenner, 1998).

A enzima CYP2E1 é a grande responsável pela metabolização de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, solventes e monómeros utilizados industrialmente, como é o caso do n-hexano e da acetona. Esta metabolização tem como produto final o metabolito neurotóxico do n-hexano, a 2,5-HD (Jenner, 1998).

Devem ser tidas em conta variações não só inter-individuais tais como a absorção, biodisponibilidade, excreção e reparações de DNA, mas também intra-individuais, isto é, alterações fisiopatológicas que ocorrem num determinado período de tempo.

Adicionalmente, deve-se ter em consideração fatores biológicos como a idade, o género, a massa gorda e as doenças (Gil & Pla, 2001; OMS, 2001).

3.1.4. Biomarcadores de efeitos

Não existe nenhum biomarcador de efeito validado da neurotoxicidade da 2,5-HD, ainda assim, vários estudos selecionaram pontos de toxicidade da 2,5-HD para escolher biomarcadores de efeito capazes de medir o seu grau de toxicidade. Em alguns estudos científicos, os ratos expostos a γ -dicetonas demonstraram que existe formação de aductos 2,5-HD-hemoglobina proporcional ao tempo e à dose (Costa, 1996; Zhang et al., 2010).

Uma vez que a formação de aductos está relacionada com o desenvolvimento de neuropatias, a hemoglobina utilizada é vista como a substituta dos NFS. Assim, as medições realizadas para quantificação de aductos hemoglobina-pirrol no caso do n-hexano são também consideradas biomarcadores de efeito para além de biomarcadores de exposição. Os NFS formam aductos com os compostos pirrólicos, estando na origem das axonopatias devido ao inchaço axonal por aglomeração de NFS, e como tal, são considerados biomarcadores de efeito nos casos de exposição ao n-hexano (Graham et al., 1995).

Baseados no mecanismo de ação da 2,5-HD, alguns autores propuseram que a determinação dos aductos formados entre a 2,5-HD e proteínas endógenas, fossem considerados como biomarcadores de exposição crónica ao n-hexano, os quais refletem a quantidade de 2,5-HD livre com capacidade para se ligar às proteínas alvo. Assim, os compostos pirrólicos presentes em amostras biológicas podem prever possíveis efeitos neurotóxicos, podendo ser utilizados como biomarcadores de efeito (Mateus, Santos, & Batoréu, 2002; Yin et al., 2014).

No entanto, estes compostos pirrólicos podem estar presentes no organismo devido à exposição a xenobióticos ou como resultado de fatores genéticos que promovem alterações fisiológicas, induzindo certas doenças (Landrigan et al., 2005; Sonnen et al., 2007).

A formação de aductos pirrólicos foi observada em várias doenças, nomeadamente, a diabetes, a Doença de Parkinson (DP), a Doença de Alzheimer (DA), a Aterosclerose e a

doença renal (Davies, Amarnath, & Roberts, 2004; Gu et al., 2003; Hidalgo, Alaiz, & Zamora, 1998, 2001; Manini et al., 1998).

3.1.5. Métodos analíticos para determinar biomarcadores de exposição

Os métodos analíticos mais utilizados para a análise de biomarcadores de exposição são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (CL). Para a determinação de solventes orgânicos inalterados no ar expirado, sangue e urina, o método recomendado é a CG.

Sendo a excreção urinária da 2,5-HD considerada um biomarcador de exposição e um indicador de efeitos neurotóxicos, a exposição ocupacional de trabalhadores expostos ao n-hexano é avaliada através da análise à urina para determinação dos níveis tóxicos do metabolito 2,5-HD (Kawai et al., 1991; Mutti et al., 1984; OMS, 1991; Saito et al., 1991).

Antes da excreção dos metabolitos do n-hexano, estes necessitam de se conjugar com o ácido glucorónico para posteriormente serem excretados. Deste modo, a análise à urina por CG ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) requer um tratamento da amostra através de hidrólise seguido de extração líquido-líquido para que desta forma apenas se quantifiquem os níveis da 2,5-HD (Fedtke & Bolt, 1987; Kawai et al., 1991; Kawai, Mizunuma, Yasugi, Uchida, & Ikeda, 1990; Perbellini et al., 1981).

4. Mecanismo da toxicidade dos compostos pirrólicos

4.1. Aductos pirrólicos

Diversos estudos demonstraram que a 2,5-HD pode reagir diretamente com a proteína axonal, formando-se assim aductos 2,5-dimetilpirrol (2,5-DMP) (Figura 6). Esta ligação dá-se devido à presença de resíduos de lisina nos neurofilamentos (DeCaprio, 1997; Graham et al., 1995; Lopachin & Decaprio, 2005; Pyle et al., 1992).

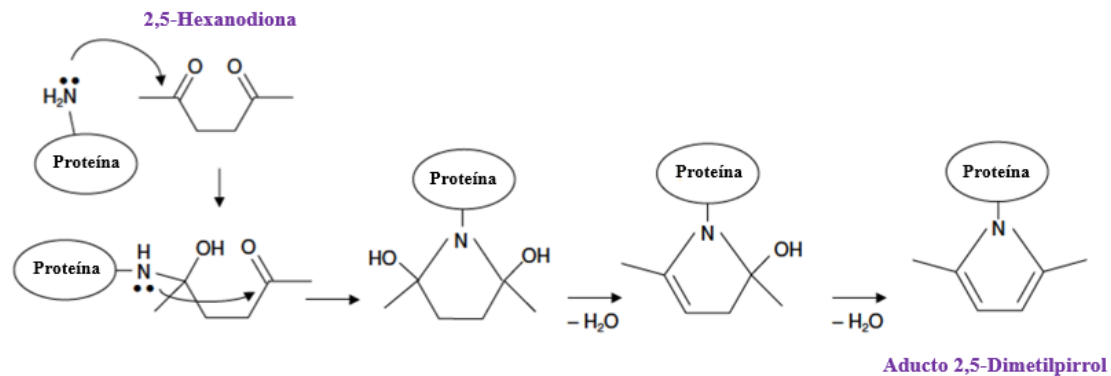


Figura 6: Mecanismo de formação de 2,5-Dimetilpirrol
(Adaptado de Boelsterli, 2003)

Segundo Lopachin & Decaprio, (2004), a formação de aductos pirrólicos com proteínas neurofilamentosas pode provocar alterações físico-químicas nestas proteínas, levando-as à perda de mobilidade. Uma vez alterada a capacidade de movimentação destas proteínas, aumenta a probabilidade de ocorrer aglomeração nos NFS e consequente degeneração nervosa.

A auto-oxidação de aductos alquilpirrólicos *in vivo* e *in vitro* conduz ao *cross-linking* de proteínas, nomeadamente, as proteínas residuais dos NFS (DeCaprio, 1985, 1986). Este passo na cadeia de formação de aductos pirrólicos é, por diversos autores, descrito como obrigatório em todo o processo de toxicidade da γ -dicetona (Carden, Lee, & Schlaepfer, 1986; DeCaprio et al., 1982; Lapadula, Irwin, Suwita, & Abou-Donia, 1986; Zhu et al., 1995).

Estudos realizados por Zhu et al., (1995) demonstraram que os 2,5-dimetil-N-alkilpirróis apresentam reatividade em soluções aquosas e à temperatura fisiológica, onde sofrem auto-oxidação espontânea, resultando na formação rápida de dímeros e trímeros (Figura 4-B). Este tipo de compostos apresenta níveis de toxicidade mais elevados que os

monómeros, merecendo, por este facto, uma melhor compreensão de toda a sua cadeia de formação.

Assim, as ligações entre pirróis que são mediadas por reticulação de proteínas derivadas da 2,5-HD e a dimerização auto oxidativa entre pirróis, podem envolver a reação em cadeia de radicais livres (Yin et al., 2014; Yin, Guo, Zeng, Zhao, & Xie, 2013; Zhu et al., 1995). Para além da dimerização auto oxidativa entre pirróis, as reações de reticulação podem incluir anéis de pirróis oxidados e nucleófilos de proteínas, nomeadamente o tiol e a amina (Spencer, Tshala-Katumbay, Palmer, Kayton, & Sabri, 2005; Tshala-katumbay et al., 2008, 2009).

4.2. Compostos pirrólicos e radicais livres

Tal como referido anteriormente, a dimerização de pirróis pode envolver reações em cadeia entre os radicais livres e nucleófilos biológicos. Os nucleófilos biológicos que por norma afetam direta ou indiretamente a própria formação de dímeros, inibindo-a, são a N-acetilcisteína (NAC) e a glutathiona reduzida (GSH). Por outro lado, os radicais livres atuam na cadeia de formação de dímeros pirrólicos, promovendo a oxidação (Figura 7) (Amarnath, Amarnath, Valentine, Eng, & Graham, 1995; Zhu et al., 1995).

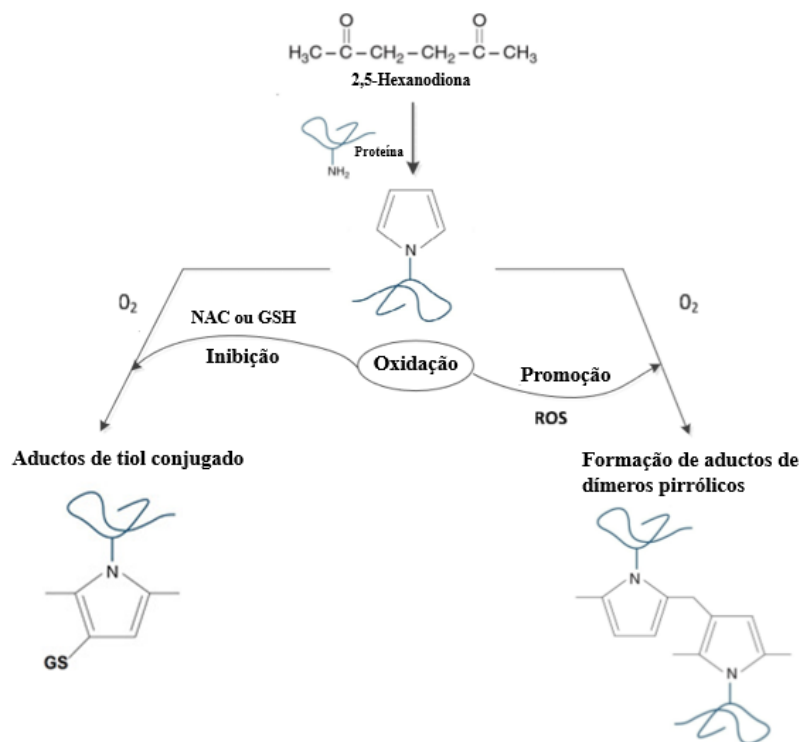


Figura 7: Mecanismo de inibição/promoção da oxidação de pirróis com consequente formação de aductos de tiol conjugados ou de dímeros pirrólicos

(Adaptado de Torres, 2014)

A população está constantemente exposta a radicais livres criados pela radiação eletromagnética do ambiente tanto de origem natural (radônio e radiação cósmica), como artificial ou ainda devido ao metabolismo celular. Os radicais livres mais comuns são os radicais de hidroxilo (OH•), os radicais de superóxido (O^{2-•}) e os radicais de óxido nítrico (NO•). Outras moléculas, não sendo radicais livres, podem ainda assim levar à sua formação através de diversas reações químicas, nomeadamente, o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o peroxinitrato (ONOO). Os radicais livres e moléculas relacionadas são classificadas com *reactive oxygen species* (ROS) que possuem a capacidade de promover mudanças oxidativas e alterações a nível do *stress* oxidativo intracelular (Gilgun-sherki, Melamed, & Offen, 2001).

Tal como está representado na Figura 7, a presença de radicais livres promove a formação de aductos (Amarnath et al., 1995; Zhu et al., 1995). Uma vez que a ligação covalente das proteínas dos NFS é um passo crítico no mecanismo de formação de pirróis, é aceite que os tióis biológicos exercem efeitos protetores contra as neuropatias promovidas pela γ -dicetona, interrompendo o processo de reticulação. Por outro lado, uma menor proteção da glutatona reduzida (GSH) sustenta a hipótese de que a própria formação de pirróis é suficiente para causar neuropatias (Gilgun-sherki et al., 2001).

4.3. Produção endógena de compostos pirrólicos

Casos de existência de 2,5-HD em pessoas que não estão expostas ao n-hexano têm sido referidos por vários autores que consideram ser importante perceber a origem da formação do composto no corpo humano (Bavazzano et al., 1998; Brugnone et al., 1991; Mutti, Bergamaschi, Ghittori, Imbriani, & Franchini, 1993).

Numa pessoa não exposta ao n-hexano foi descoberta a presença de $372 \pm \mu\text{g/mL}$ de 2,5-HD a qual por sua vez origina substâncias pirrólicas definidas como *pyrrole-like substances* (PLS) (Canesi et al., 2003; Kessler et al., 1990).

Neste grupo de pessoas não expostas, a 2,5-HD é principalmente um produto derivado do metabolismo intermédio do organismo, sendo que uma percentagem mínima se deve à poluição a que a população está sujeita (Andreoli et al., 1998; Perbellini, Pezzoli, Brugnone, & Canesi, 1993).

A possibilidade da existência de 2,5-HD na população não exposta a nível ocupacional deve-se cada vez mais ao aumento da poluição atmosférica, devido aos compostos químicos inalados presentes sobretudo nos combustíveis (Brugnone et al., 1991).

5. Compostos pirrólicos e doenças neurodegenerativas

Pesquisas a nível molecular assim como estudos epidemiológicos permitiram chegar à conclusão de que a exposição ocupacional e ambiental a substâncias químicas contribui para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Eisen, 1995; Landrigan et al., 2005; Lopachin, Gavin, & Barber, 2008).

As doenças neurodegenerativas são resultado de uma perda progressiva e gradual de células neurais que levam ao anormal funcionamento do sistema nervoso. A este tipo de doenças estão associados fatores de risco, nomeadamente: género, aumento da idade, stress oxidativo, acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão arterial (HTA), diabetes, tabagismo, traumatismo craniano, depressão, infeções, neoplasias, deficiência vitamínica e exposição a substâncias químicas (Brown, Lockwood, & Sonawane, 2005).

Pelo facto de ser desconhecida a patogénese de duas doenças neurodegenerativas cada vez mais comuns na sociedade (doença de Parkinson e doença de Alzheimer), foram feitos estudos que permitiram examinar a relação existente entre a exposição ambiental, onde estão presentes diversas substâncias químicas neurotóxicas, e os danos causados a nível das células nervosas do SNC e SNP (Brown et al., 2005; Lopachin & Decaprio, 2005).

Segundo Davies, Amarnath, Brame, Boutaud, & Roberts, (2007) e Davies et al., (2004) como resultado do *stress* oxidativo, formam-se compostos pirrólicos semelhantes aos que se formam devido à exposição ao n-hexano.

Na Tabela 1 estão representadas as características clínicas e neuropatológicas destas doenças neurodegenerativas.

Tabela 1: Características clínicas e neuropatologia das doenças neurodegenerativas: Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP)

(Adaptado de Singh, Sharad, & Kapur, 2004)

Doenças neurodegenerativas	Características clínicas	Neuropatologia
Alzheimer (DA)	Demência, perda progressiva do raciocínio e capacidade de julgamento, perda da fala, percepção visual e espacial diminuídas e perda de humor.	Atrofia cortical com encolhimento do hipocampo e amígdala. Disfunção e morte seletiva do neocortex, hipocampo, amígdala e tronco cerebral.
Parkinson (DP)	Lentidão de movimentos voluntários (bradicinesia), rigidez muscular, tremor e déficit cognitivo.	Degeneração neuronal devido à perda de neurónios na substância nigra.

O mecanismo fisiopatológico e molecular de muitos neurotóxicos permanece pouco definido apesar da constante pesquisa e trabalho que tem sido realizado pelos toxicologistas. Ainda assim, pensa-se que a toxicidade celular dá-se quando a formação de aductos danifica a estrutura e/ou a função das macromoléculas (Hinson & Roberts, 1992; Nelson & Pearson, 1990).

5.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência em idosos caracterizando-se pela perda progressiva da memória e diminuição acentuada das suas capacidades cognitivas, afetando gravemente as atividades de vida diárias e a sua qualidade de vida. A DA apresenta depósitos amiloides extracelulares e novos neurofibrilares intraneuronais de proteína tau hiperfosforilada (Migliore & Coppèdè, 2009).

A neurodegeneração associada à DA parece envolver *stress* oxidativo, nomeadamente oxidação proteica, aumento da expressão de enzimas antioxidantes e aumento da

peroxidação lipídica (Aksenov et al., 1995; Bozner et al., 1998; Lopachin & Decaprio, 2005; Sayre et al., 1997).

O fator genético associado ao avançar da idade e à exposição ambiental contribui para o *stress* oxidativo neuronal que dará início à cascata fisiopatológica da DA. A peroxidação lipídica é a principal consequência do *stress* oxidativo, que promove a modificação dos ácidos gordos pelos radicais livres (Lopachin et al., 2008).

A peroxidação lipídica produz vários α,β -aldeídos insaturados, tais como acroleína, malondialdeído e 4-hidroxinonenal (Lopachin & Decaprio, 2005; Picklo, Montine, Amarnath, & Neely, 2002). Aductos contendo acroleína foram detetados no cérebro de doentes com a DA, sendo por isso considerados um biomarcador do *stress* oxidativo (Calingasan, Uchida, & Gibson, 1999). Adicionalmente, sugere-se que a formação do aducto contendo acroleína com resíduos de lisina em proteínas tau pode desempenhar um papel preponderante no desenvolvimento deovelos neurofibrilares, que são uma característica patológica da DA (Calingasan et al., 1999; Picklo et al., 2002).

De referir que, a acroleína é um poluente ambiental ubíquo, deste modo a fisiopatologia desta doença neurodegenerativas pode envolver a formação de aductos de proteínas mediada por ambos os componentes neurotóxicos: exógenos e endógenos (Lopachin & Decaprio, 2005).

5.2. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson tem origem numa condição neurológica degenerativa e progressiva que ocorre devido à morte de células nervosas da substância nigra com consequente perda progressiva de movimentos (Moore, West, Dawson, & Dawson, 2005). A interação entre fatores ambientais e genéticos podem estar na origem da DP, ainda assim a sua etiologia pode diferir entre populações dependendo das suas características (Martin et al., 2001; Scott et al., 2001).

Tem sido referenciado que indivíduos com genótipos particulares podem ter dificuldade em metabolizar neurotóxicos ambientais tornando-os assim, suscetíveis a desenvolver DP após a exposição as neurotoxinas (Canesi et al., 2003; Pezzoli et al., 1995). A acumulação de neurotoxinas pode promover a neurodegeneração da substância nigra através de mecanismos que envolvem o *stress* oxidativo (Moore et al., 2005).

Os hidrocarbonetos presentes em solventes poluentes são toxinas ambientais que estão associadas com a patogênese desta doença, sendo que têm sido demonstradas evidências de que a exposição crônica a solventes contendo hidrocarbonetos, nomeadamente o n-hexano, contribui para o aparecimento precoce da DP, podendo agravar a sua severidade com o decorrer do tempo (Canesi et al., 2003; Pezzoli et al., 1995).

O avançar da idade e a DP estão associadas a uma redução dos níveis urinários e sanguíneos da 2,5-HD devido à diminuição da metabolização do n-hexano em 2,5-HD, levando assim à acumulação desta dicetona no organismo (Brown et al., 2005; Canesi et al., 2003).

Os corpos de *Lewy* são considerados a principal característica patológica da DP, sendo a sua formação resultado da incapacidade dos doentes não realizarem a reparação proteica. A proteína ubiquitina desempenha funções ao nível da reparação de proteínas. De referir, que em apenas 10% dos idosos com DP está presente a proteína ubiquitina, os restantes doentes apresentam uma capacidade de reparação proteica diminuída e consequente Demência com Corpos de *Lewy* (DCL) (Brown et al., 2005; Savica, Rocca, & Ahlskog, 2010).

6. Métodos para avaliação da neurotoxicidade

Para se poder avaliar a neurotoxicidade, são necessárias medições e/ou testes a diferentes níveis. Esta análise inclui alterações a nível bioquímico, fisiológico, morfológico e estudo comportamental (Kulig et al., 1996; Markel, Galaktionov, & Efimov, 1989; Moser, Becking, Macphail, & Kulig, 1997).

As avaliações realizadas a nível neurocomportamental e patológico do sistema nervoso são parâmetros adicionais à avaliação base e aos testes de toxicidade dos diferentes produtos neurotóxicos. Estes testes permitem obter resultados relacionados com os efeitos neurológicos e comportamentais de diferentes formas e também com diferentes especificidades devido à complexidade do sistema nervoso (Moser, 2011).

A escolha dos métodos mais adequados deve ter em consideração a finalidade do estudo que se pretende realizar, podendo deste modo utilizar-se métodos de análise química e métodos de análise comportamental.

As medições realizadas a nível químico têm a desvantagem de nunca fornecerem uma informação completa relativamente à ação de um agente neurotóxico numa exposição crónica. Os testes neurocomportamentais, por sua vez, apresentam algumas vantagens em relação aos métodos de análise química. Por serem testes neurocomportamentais não necessitam de técnicas invasivas, podendo ser utilizados a longo prazo, permitindo assim um estudo alargado no tempo que pode detetar alterações comportamentais com maior facilidade (Tilson, Macphail, & Crofton, 1996).

Para além da longevidade do estudo comportamental, estes permitem acompanhar mudanças de comportamento ao longo de uma exposição crónica a compostos neurotóxicos (Tilson, 2000; Tilson et al., 1996).

De referir que, atualmente, não existem orientações específicas e padronizadas para uma avaliação da neurotoxicidade, mas sim um conjunto de estudos que indicam diferentes protocolos de avaliação neurotóxica. Desta forma, devem ser utilizados os protocolos/orientações que mais se adequem ao estudo que se pretende realizar (Kulig et al., 1996; Moscardo, Maurin, Dorigatti, Champeroux, & Richard, 2007; Moser, 2011).

6.1. Testes neurocomportamentais em animais

Os estudos neurocomportamentais em animais consistem na observação direta das alterações a nível neurológico e comportamental em animais após exposição a uma substância química. Este tipo de estudos caracteriza-se por obter informação diretamente da observação, permitindo assim a dedução da existência, ou não, de alterações clínicas de maneira a investigar potenciais efeitos neurotóxicos de um composto químico. Relativamente aos testes neurocomportamentais em roedores (o animal mais estudado em laboratório) podem ser realizados tanto em gaiolas como em campo aberto, onde são avaliados vários parâmetros, nomeadamente, alteração de movimento, aparência física e a resposta do animal a diversos estímulos. A grande vantagem presente neste tipo de testes é a possibilidade de repetição dos testes no mesmo animal, analisando-se não só o início do efeito tóxico, mas também a sua progressão, a duração e a possível reversão das lesões neurotóxicas por procedimentos não invasivos (Moser, 2011).

Todos os testes supramencionados estão incluídos numa bateria de observação funcional ou *functional observational battery* (FOB) que, para além destes, apresentam também numerosos testes fisiológicos, neuromusculares (fraqueza, perda de coordenação, dificuldade na marcha e tremor), sensoriais (audição, visão e somatosensorial), resposta pupilar, salivação, funções de termorregulação e alterações na função do SNC (Cory-Slechta et al., 2001; Tilson et al., 1996).

Os testes de primeira linha são os mais utilizados, apresentando três vantagens, tais como: métodos rápidos, simples e baratos na deteção da neurotoxicidade. A estes dá-se o nome de testes de rastreio e consistem em ensaios simples de avaliação de alterações comportamentais que permitem identificar a ação do químico sobre o sistema nervoso assim como avaliar e determinar para que doses é que esta ação tem efeito. A maioria dos testes de rastreio simples permitem avaliar reflexos sensoriomotores, sinais neurológicos e a resposta a estímulos sensoriais (Moser, 2011; Tilson et al., 1996).

Os testes de segunda linha apresentam uma complexidade superior à dos testes de rastreio. No entanto, para determinados tipos de estudos podem ainda assim ser os mais adequados, uma vez que, fornecem uma descrição mais completa dos efeitos resultantes da relação dose-resposta. Estes exigem mais tempo despendido na sua realização, mais recursos, mais formação e rigor científico de quem os aplica e conseqüentemente maiores gastos financeiros (Tilson et al., 1996). No entanto, é um tipo de teste que apesar de ser mais

dispendioso, garante outro tipo de informação que os testes de rastreio não garantem, nomeadamente a possibilidade de se conseguir alterar as variáveis experimentais para a obtenção de uma maior especificidade, facilitando assim a interpretação dos dados retirados (Cory-Slechta et al., 2001; Moser, 2011).

Com o evoluir das estratégias de ensaio, foi criado o programa das três camadas que incluem: identificação do perigo, caracterização e suscetibilidade humana aos produtos químicos utilizando testes análogos aos usados em testes com animais. Este esquema de três camadas foi adotado pelo *National Research Council* (NRC) que, ao acrescentar estudos sobre mecanismos de ação de substâncias tóxicas, viu este esquema ser aprovado pela *European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre* (ECETOC) (ECETOC, 1992; Tilson, 2000).

6.1.1. Monitorização neurocomportamental em roedores

A avaliação neurocomportamental é um importante teste para a avaliação do potencial efeito neurotóxico de uma substância química. A observação de alterações comportamentais em estudos de neurotoxicidade pode fornecer informações de grande relevância para a identificação e/ou características de efeitos neurotóxicos.

Para tal, a FOB compreende uma variedade de pontos a avaliar para que sejam analisadas as diferentes alterações comportamentais promovidas pelo neurotóxico. Assim, os protocolos já estabelecidos podem ser divididos em avaliações observacionais e testes de manipulação, conforme apresentado na Tabela 2 (Moser, 1999).

Tabela 2: Testes da bateria de monitorização neurocomportamental
(Adaptado de Moser, 1999)

Avaliações observacionais	
Níveis de atividade: <ul style="list-style-type: none">▪ Observação em jaula▪ Observação em campo aberto	Movimentos motores involuntários/anormais: <ul style="list-style-type: none">▪ Tremores▪ Fasciculações▪ Tónus▪ Estereotipia▪ Comportamentos anormais
Reatividade/Excitabilidade: <ul style="list-style-type: none">▪ Reatividade▪ Excitabilidade	
Características da marcha e postura <ul style="list-style-type: none">▪ Descrição da marcha▪ Descrição da postura	Sinais Clínicos: <ul style="list-style-type: none">▪ Lacrimação▪ Salivação▪ Crescimento anormal de pelo▪ Fecho palpebral▪ Alterações oculares▪ Alterações do tónus muscular
Testes de manipulação	
Reflexos/Reações neurológicas: <ul style="list-style-type: none">▪ Resposta pupilar▪ Reflexo palpebral▪ Reflexo de <i>pinna</i>▪ Reflexo de impulso do extensor	Respostas Sensoriais: <ul style="list-style-type: none">▪ Testes visuais: Resposta de abordagem e colocação visual▪ Teste somatossensorial: Resposta ao toque▪ Teste auditivo: Resposta ao clique▪ Testes nociceptivos: Resposta ao belisque da cauda/pata e reflexo do flexor▪ Teste de posicionamento proprioceptivo▪ Teste olfatório
Testes neuromusculares e reações posturais: <ul style="list-style-type: none">▪ Resistência ao aperto▪ Apoio da pata▪ Reação de correção▪ Teste de <i>Hopping</i>	

Dos vários testes apresentados na Tabela 2, os investigadores podem e devem utilizar o maior número de testes possível, uma vez que ao realizarem uma bateria de testes para a avaliação de alterações neurocomportamentais, obtêm maior informação sobre as mesmas, otimizando o estudo dos efeitos provocados pela substância tóxica em estudo.

Relativamente à componente prática da execução da bateria de testes e prévia planificação dos mesmos, os investigadores necessitam de ter um conjunto de capacidades, nomeadamente: o conhecimento dos protocolos e consequente execução prática tendo em conta as boas práticas em laboratório, ter a capacidade de reconhecer um comportamento normal de um comportamento alterado, ter prática na manipulação de animais e saber realizar sempre testes controlo (Moser, 2011; Slikker et al., 2005).

6.2. Avaliação clínica

Nas sociedades desenvolvidas industrialmente os solventes orgânicos estão presentes em todo o lado, aumentando a necessidade da atividade dos clínicos que avaliam a condição dos pacientes tanto a nível da exposição ambiental como ocupacional. Assim, a avaliação neurotoxicológica é iniciada com a avaliação clínica dos pacientes através da recolha de dados necessários para a construção de uma história clínica e com um exame neurológico (Bull, 2007; White & Proctor, 1997).

Os sintomas regularmente associados à exposição a este tipo de solventes envolvem lesões a nível do SNC e do SNP. Na grande maioria dos casos, sintomas relacionados com o SNC e o SNP são revertidos pela própria cessação de exposição. No entanto, exposições agudas a elevadas doses e exposições crónicas de grande duração podem induzir efeitos mais duradouros que se caracterizam por alterações cognitivas e comportamentais. Para este tipo de exposição existem casos onde a reversão dos efeitos sobre o SNC e o SNP está comprometida, dando origem a danos permanentes (Chang et al., 1993).

Aquando de uma suspeita de distúrbio do sistema nervoso devido à exposição a um solvente orgânico, o médico pode pedir a realização de diversos exames clínicos que auxiliam na definição da condição clínica do paciente. Estes exames devem ser realizados por profissionais de saúde experientes de forma a elevar o contributo dos exames para a definição do distúrbio relacionado com a exposição ocupacional e ambiental (Torres, 2014).

A depressão do SNC e défices psicomotores/atenção são, por norma, resultantes da exposição a solventes orgânicos. Como tal, os pacientes recorrem ao médico, indicando

sintomas como a fadiga, irritabilidade, confusão, depressão e dificuldades de memória (Baker, White, & Murawski, 1985; White & Proctor, 1997).

Em casos onde é afetada a normal função do SNP, o paciente apresenta queixas a nível motor, nomeadamente, sensação de formigueiro e dormência intermitente. Estes sintomas podem evoluir até à perda da sensação e fraqueza muscular (Smith & Albers, 1997; Yokoyama, Feldman, Sax, Salzsider, & Kucera, 1990).

Com efeito, os exames neurológicos podem ser realizados com o objetivo de definir anomalias neurológicas provocadas pelo solvente ou para excluir outras causas que resultaram em sintomas/danos. Os testes laboratoriais utilizados para avaliar a função nervosa podem ser úteis na confirmação de alterações do normal funcionamento do SNC e do SNP. O exame à condução nervosa, a electromiografia, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) podem detetar alterações atroficas nos lobos frontais e no cerebelo, bem como lesões a nível da substância branca (Ridgway, Nixon, & Leach, 2003; Yamanouchi et al., 1995).

Para além dos testes laboratoriais acima referidos, podem ser realizados testes neuropsicológicos com a perspetiva de detetar défices intelectuais e afetivos com possível origem na exposição a solventes orgânicos (Chang, 1987).

O historial clínico e a monitorização biológica são, por norma, as abordagens mais viáveis para o profissional de saúde. Relativamente à monitorização biológica, sabe-se que os solventes e os seus metabolitos são detetáveis em diversas amostras biológicas, nomeadamente, no sangue, na urina, no cabelo, no tecido adiposo e no ar expirado (Thorne, 2013).

7. Conclusão

A presente monografia pretendeu apresentar os efeitos neurotóxicos decorrentes da exposição ao n-hexano. Dado que este composto tóxico pode estar presente tanto no meio ambiente como a nível ocupacional, é importante a prevenção da exposição crónica a este poluente.

Entre os vários efeitos neurotóxicos foram referidas as patologias neurodegenerativas de Alzheimer e de Parkinson, assim como outros danos que o n-hexano provoca a nível da saúde, nomeadamente a toxicidade a nível reprodutivo e na retina e visão. Está provado que o responsável por esta toxicidade é o metabolito do n-hexano, a γ -dicetona 2,5-hexanodiona.

Esta dicetona por ter o distanciamento espacial necessário, pode dar origem a aductos pirrólicos após a reação com os grupos amina do aminoácido lisina de alguns neurofilamentos axonais. A formação destes compostos pirrólicos dá origem a uma série de outras reações que levam ao aparecimento dos efeitos tóxicos tanto no ser humano como nos animais.

De modo a controlar esta exposição devem ser utilizados biomarcadores de exposição, mas principalmente de efeito que permitam a biomonitorização de modo a evitar o aparecimento das referidas patologias. O biomarcador de exposição mais utilizado é a 2,5-HD (analisado tanto na urina como no sangue) não havendo, no entanto, nenhum biomarcador de efeito recomendado pelas agências reguladoras.

Apesar da aplicação de análises de modo a avaliar a existência do biomarcador de exposição e da aplicação dos testes neurocomportamentais, não se consegue prever com a devida antecedência o aparecimento das doenças neurodegenerativas devido à exposição a este solvente, pois ainda não se aplica a análise de biomarcadores preditivos do aparecimento do efeito neurotóxico.

8. Bibliografia

- Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, P., Wu, J. F., Carney, T. M., Lovell, M., ... Harris, M. (1995). Brain Regional Correspondence Between Alzheimer 's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5).
- Akubowski, M. J., & Trzcinka-Ochocka, M. (2005). Biological Monitoring of Exposure : Trends and Key Developments. *Journal of Occupational Health*, 47, 22–48.
- Allard, E. K., Hall, S. J., & Boekelheide, K. (1995). Stem cell kinetics in rat testis after irreversible injury induced by 2,5-hexanedione. *Biology of Reproduction*, 53(1), 186–192. doi:10.1095/biolreprod53.1.186
- Amarnath, V., Amarnath, K., Valentine, W. M., Eng, M. A., & Graham, D. G. (1995). Intermediates in the Paal-Knorr Synthesis of Pyrroles. 4-Oxoaldehydes. *Chemical Research in Toxicology*, 8, 234–238. doi:10.1021/jo00024a040
- Anand, S. S., Bruckner, V., & Warren, D. A. (2013). Toxic Effects of Solvents and Vapors. Em McGraw-Hill (Ed.), *Toxicology: the Basic Science of Poisons* (8th ed., pp. 1031–1112). Nova Iorque.
- Andreoli, R., Manini, P., Mutti, A., Bergamaschi, E., & Niessen, W. M. A. (1998). Determination of n-hexane metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry 1. 2,5-hexanedione and other phase I metabolites in untreated and hydrolyzed urine samples by atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12, 1410–1416. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19981015)12:19<1410::AID-RCM339>3.0.CO;2-M
- Bäckström, B. (1999). *Structural and functional alterations in the rat retina after long term exposure to two n-hexane metabolites* (1st ed.). Estocolmo: National Institute for Working Life.
- Baker, E. L., White, R. F., & Murawski, B. J. (1985). Clinical evaluation of neurobehavioral effects of occupational exposure to organic solvents and lead. *International Journal of Mental Health*, 14, 135–158.

- Bavazzano, P., Apostoli, P., Balducci, C., Bartolucci, G. B., Buratti, M., Duca, P., ... Minoia, C. (1998). Determination of urinary 2,5-hexanedione in the general Italian population. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 71, 284–288. doi:10.1007/s004200050282
- Boekelheide, K., Fleming, S. L., Allio, T., Embree-Ku, M. E., Hall, S. J., Johnson, K. J., ... Thompson, S. (2003). 2,5-Hexanedione-Induced Testicular Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 125–147. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135930
- Boelsterli, U. A. (2003). *Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets* (1st ed.). Londres: Taylor & Francis.
- Bolt, H. M., & Thier, R. (2006). Biological monitoring and Biological Limit Values (BLV): The strategy of the European Union. *Toxicology Letters*, 162, 119–124. doi:10.1016/j.toxlet.2005.09.015
- Bozner, P., Pappolla, M. A., Chyan, Y.-J., Omar, R. A., Hsiao, K., Perry, G., & Smith, M. A. (1998). Evidence of Oxidative Stress and in Vivo Neurotoxicity of β -Amyloid in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer 's Disease. *American Journal of Patology*, 152(4), 871–877.
- Brown, R. C., Lockwood, A. H., & Sonawane, B. R. (2005). Neurodegenerative diseases: An overview of environmental risk factors. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1250–1256. doi:10.1289/ehp.7567
- Brugnone, F., Maranelli, G., Romeo, L., Giuliani, C., Gobbi, M., Malesani, F., ... Alexopoulos, C. (1991). Ubiquitous pollution by n-hexane and reference biological levels in the general population. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 63, 157–160. doi:10.1007/BF00381562
- Brugnone, F., Perbellini, L., Grigolini, L., & Apostoli, P. (1978). Solvent Exposure in a Shoe Upper Factory. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 42, 51–62.
- Bull, S. (2007). *Review of Environmental Chemicals and Neurotoxicity. Focus on Neurological Diseases*. Oxfordshire: Health Protection Agency.
- Calingasan, N. Y., Uchida, K., & Gibson, G. E. (1999). Protein-Bound Acrolein: A Novel Marker of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 72.

- Canesi, M., Perbellini, L., Maestri, L., Silvani, A., Zecca, L., Bet, L., & Pezzoli, G. (2003). Poor metabolization of n-hexane in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *250*, 556–560. doi:10.1007/s00415-003-1035-y
- Carden, M. J., Lee, V. M.-Y., & Schlaepfer, W. W. (1986). 2,5-Hexanedione neuropathy is associated with the covalent crosslinking of neurofilament proteins. *Neurochemical Pathology*, *5*, 25–35. doi:10.1007/BF03028034
- Cardona, A., Marhuenda, D., Martí, J., Brugnone, F., Roel, J., & Perbellini, L. (1993). Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by measurement of urinary 2,5-hexanedione. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *65*, 71–74. doi:10.1007/BF00586062
- Cardona, A., Marhuenda, D., Prieto, M. J., Martí, J., Periago, J. F., & Sánchez, J. M. (1996). Behaviour of urinary 2,5-hexanedione in occupational co-exposure to n-hexane and acetone. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *68*, 88–93. doi:10.1007/s004200050033
- Carelli, V., Franceschini, F., Venturi, S., Barboni, P., Savini, G., Barbieri, G., ... Mattioli, S. (2007). Grand rounds: Could occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitate visual failure in Leber hereditary optic neuropathy? *Environmental Health Perspectives*, *115*, 113–115. doi:10.1289/ehp.9245
- Carney, R., Dardis, C., Cullen, W. K., Felipo, V., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (2002). Early spatial memory deficit induced by 2,5-hexanedione in the rat. *Toxicology Letters*, *128*, 107–115. doi:10.1016/S0378-4274(01)00538-0
- Chang, C. M., Yu, C. W., Fong, K. Y., Leung, S. Y., Tsin, T. W., Yu, Y. L., ... Chan, S. Y. (1993). N-hexane neuropathy in offset printers. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *56*, 538–542. doi:10.1136/jnnp.56.5.538
- Chang, Y. C. (1987). Neurotoxic effects of n-hexane on the human central nervous system: evoked potential abnormalities in n-hexane polyneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *50*, 269–274. doi:10.1136/jnnp.50.3.269
- Chang, Y. C. (1990). Patients with n-hexane induced polyneuropathy: a clinical follow up. *British Journal of Industrial Medicine*, *47*, 485–489. doi:10.1136/oem.47.7.485

- Clair, M. B. G. S., Amarnath, V., Moody, M. A., Anthony, D. C., Anderson, C. W., & Graham, D. G. (1988). Pyrrole Oxidation and Protein Cross-Linking as Necessary Steps in the Development of γ -Diketone Neuropathy. *Chemical Research in Toxicology*, *1*, 179–185.
- Cory-Slechta, D. A., Crofton, K. M., Foran, J. A., Ross, J. F., Sheets, L. P., Weiss, B., & Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. I: Behavioral effects, *109*, 79–91.
- Costa, L. G. (1996). Biomarker research in neurotoxicology: The role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environmental Health Perspectives*, *104*, 55–67. doi:10.1289/ehp.96104s155
- Cui, N., Li, S., Zhao, X., Zhang, T., Zhang, C., Yu, L., ... Xie, K. (2007). Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in nerve tissues of rats chronically exposed to 2,5-hexanedione. *Neurochemical Research*, *32*, 1566–1572. doi:10.1007/s11064-007-9359-0
- Damstra, T. (1978). Environmental chemicals and nervous system dysfunction. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *51*, 457–468.
- Davies, S. S., Amarnath, V., Brame, C. J., Boutaud, O., & Roberts, L. J. (2007). Measurement of chronic oxidative and inflammatory stress by quantification of isoketal/levuglandin γ -ketoaldehyde protein adducts using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Nature Protocols*, *2*, 2079–2091. doi:10.1038/nprot.2007.298
- Davies, S. S., Amarnath, V., & Roberts, L. J. (2004). Isoketals: Highly reactive γ -ketoaldehydes formed from the H 2-isoprostane pathway. *Chemistry and Physics of Lipids*, *128*, 85–99. doi:10.1016/j.chemphyslip.2003.10.007
- DeCaprio, A. P. (1985). Molecular mechanisms of diketone neurotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *54*, 257–270.
- DeCaprio, A. P. (1986). Mechanisms of in vitro pyrrole adduct autoxidation in 2,5-hexanedione-treated protein. *Molecular Pharmacology*, *30*, 452–458.
- DeCaprio, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment. *Environ Science & Technology*, *31*, 1837–1848. doi:10.1021/es960920a

- DeCaprio, A. P. (2000). n-Hexane, Metabolites and Derivatives. Em S. H. H. Spencer P.S. (Ed.), *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (2nd ed., pp. 633–648). Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- DeCaprio, A. P., Kinney, E. A., & Fowke, J. H. (1997). Regioselective binding of 2,5-hexanedione to high-molecular-weight rat neurofilament proteins in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *145*, 211–217. doi:10.1006/taap.1997.8181
- DeCaprio, A. P., Kinney, E. A., & LoPachin, R. M. (2009). Comparative covalent protein binding of 2,5-hexanedione and 3-acetyl-2,5-hexanedione in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *72*, 861–869. doi:10.1080/15287390902959508
- DeCaprio, A. P., Olajos, E. J., & Weber, P. (1982). Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *65*, 440–450.
- Dick, F., Semple, S., Chen, R., & Seaton, A. (2000). Neurological deficits in solvent-exposed painters: a syndrome including impaired colour vision, cognitive defects, tremor and loss of vibration sensation. *Quarterly Journal of Medicine*, *93*, 655–661. doi:10.1093/qjmed/93.10.655
- ECETOC European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. (1992). Evaluation of the Neurotoxic Effect of Chemicals. Consultado em 21 de Agosto de 2016, disponível em <http://www.ecetoc.org/>
- Eguchi, T., Kishi, R., Harabuchi, I., Yuasa, J., Arata, Y., Katakura, Y., & Miyake, H. (1995). Impaired colour discrimination among workers exposed to styrene: relevance of a urinary metabolite. *Occupational and Environmental Medicine*, *52*, 534–538.
- Eisen, A. (1995). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Internal Medicine*, *34*, 824–832.
- European Agency for Safety and Health at Work. 1998. Directive 98/24/EC - risks related to chemical agents at work. . Consultado em 29 de Agosto de 2016, Disponível em <https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/75>
- Fedtke, N., & Bolt, H. M. (1986). Methodological investigations on the determination of n-hexane metabolites in urine. *Occupational and Environmental Medicine*, *57*, 149–158.

- Fedtke, N., & Bolt, H. M. (1987). The relevance of 4,5-dihydroxy-2-hexanone in the excretion kinetics of n-hexane metabolites in rat and man. *Archives of Toxicology*, *61*, 131–137.
- Filser, J. G., Peter, H., Bolt, H. M., & Fedtke, N. (1987). Pharmacokinetics of the neurotoxin n-hexane in rat and man. *Archives of Toxicology*, *60*, 77–80.
- Genova, M. L., Pich, M. M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., ... Lenaz, G. (2004). The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Relation to Aging and Pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1011*, 86–100. doi:10.1196/annals.1293.010
- Gil, F., & Pla, A. (2001). Biomarkers as Biological Indicators of Xenobiotic Exposure. *Journal of Applied Toxicology*, *21*, 245–255. doi:10.1002/jat.769
- Gilgun-sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, *40*, 959–975.
- Graham, D. G. (1999). Neurotoxicants and the Cytoskeleton. *Current Opinion in Neurology & Neurosurgery*, *12*, 733–737.
- Graham, D. G., Amarnath, V., Valentine, W. M., Pyle, S. J., & Anthony, D. C. (1995). Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, *25*, 91–112.
- Graham, D. G., Anthony, D. C., & Boekelheide, K. (1982). In vitro and in vivo studies of the molecular pathogenesis of n-Hexane neuropathy. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, *4*, 629–634.
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*, *6736*, 1–12. doi:10.1016/S0140-6736(06)69665-7
- Griffin, J. W., Each, N., Anthony, D. C., Fahnestock, K. E., Hoffman, P. N., & Graham, D. G. (1984). 3,4-dimethyl-2,5-hexanedione impairs the axonal transport of neurofilament proteins. *The Journal of Neuroscience*, *4*, 1516–1526.
- Gu, X., Meer, S. G., Miyagi, M., Rayborn, M. E., Hollyfield, J. G., Crabb, J. W., & Salomon, R. G. (2003). Carboxyethylpyrrole protein adducts and antibodies, biomarkers for Age-related Macular Degeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 42027–42035. doi:10.1074/jbc.M305460200

- Hall, S. J., & Boekelheide, K. (1991). 2,5-Hexanedione exposure in the Rat Results in long-term testicular atrophy despite the presence of residual spermatogonia. *Journal of Andrology*, *12*, 18–26.
- Hamelin, G., Truchon, G., & Tardif, R. (2004). Comparison of unchanged n-hexane in alveolar air and 2,5-hexanedione in urine for the biological monitoring of n-hexane exposure in human volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *77*, 264–270. doi:10.1007/s00420-004-0506-5
- Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (1998). A Spectrophotometric Method for the Determination of Proteins Damaged by Oxidized Lipids. *Analytical Biochemistry*, *262*, 129–136.
- Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2001). Pyrrolization and Antioxidant Function of Proteins Following Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, *14*, 582–588.
- Hinson, J. A., & Roberts, D. W. (1992). Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *32*, 471–510.
- Horimoto, M., Isobe, Y., Isogai, Y., & Tachibana, M. (2000). Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexanedione. *Reproductive Toxicology*, *14*, 55–63.
- Huang, C. (2008). Polyneuropathy Induced by n-Hexane Intoxication in Taiwan. *Acta Neurologica Taiwanica*, *17*, 3–10.
- Issever, H., Malat, G., Sabuncu, H. H., & Yuksel, N. (2002). Impairment of colour vision in patients with n-hexane exposure-dependent toxic polyneuropathy. *Society of Occupational Medicine*, *52*, 183–186.
- Iwata, M., Takeuchi, Y., Hisanaga, N., & Ono, Y. (1983). Changes of n-Hexane Metabolites in Urine of Rats Exposed to Various Concentrations of n-Hexane and to Its Mixture with Toluene or MEK. *International Occupational and Environmental Health*, *53*, 1–8.
- Jenner, P. (1998). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement Disorders Journal*, *13*, 24–34.

- Jortner, B. S. (2000). Mechanisms of toxic injury in the peripheral nervous system: Neuropathologic considerations. *Society of Toxicologic Pathology*, 28, 54–69. doi:10.1177/019262330002800108
- Kawai, T., Mizunuma, K., Yasugi, T., Uchida, Y., & Ikeda, M. (1990). The method of choice for the determination of 2,5-hexanedione as an indicator of occupational exposure to n-hexane. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 62, 403–408.
- Kawai, T., Yasugi, T., Mizunuma, K., Horiguchi, S., Uchida, Y., Iwami, O., ... Ikeda, M. (1991). Dose-dependent increase in 2,5-hexanedione in the urine of workers exposed to n-hexane. *International Occupational and Environmental Health*, 63, 285–291.
- Kessler, W., Heilmaier, H., Kreuzer, P., Shen, J. H., Filser, M., & Filser, J. G. (1990). Spectrophotometric determination of pyrrole-like substances in urine of rat and man: an assay for the evaluation of 2,5-hexanedione formed from n-hexane. *Archives of Toxicology*, 64, 242–246.
- Kim, M., Park, H. R., Park, M., Kim, S. J., Kwon, M., Yu, B. P., ... Lee, J. (2009). Neurotoxic effect of 2,5-hexanedione on neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Journal of Toxicology*, 260, 97–103. doi:10.1016/j.tox.2009.03.013
- Krasavage, W. J., O'Donoghue, J. L., DiVincenzo, G. D., & Terhaar, C. J. (1980). The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52, 433–441.
- Kulig, B., Alleva, E., Bignami, G., Cohn, J., Cory-Slechta, D., Landa, V., ... Peakall, D. (1996). Animal Behavioral Methods in Neu rotoxicity Assessment: SGOMSEC Joint Report. *Environmental Health Perspectives*, 104, 193–204.
- Landrigan, P. J., Sonawane, B., Butler, R. N., Trasande, L., Callan, R., & Droller, D. (2005). Early Environmental Origins of Neurodegenerative Disease in Later Life. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1230–1233. doi:10.1289/ehp.7571
- Lapadula, D. M., Irwin, R. D., Suwita, E., & Abou-Donia, M. B. (1986). Cross-Linking of Neurofilament Proteins of Rat Spinal Cord In Vivo After Administration of 2,5-Hexanedione. *Journal of Neurochemistry*, 46, 1843–1850.

- Lehning, E. J., Dyer, K. S., Jortner, B. S., & LoPachin, R. M. (1995). Axonal Atrophy is a specific component of 2,5-Hexanedione peripheral neuropathy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *135*, 58–66.
- Lehning, E. J., Jortner, B. S., Fox, J. H., Arezzo, J. C., Kitano, T., & Lopachin, R. M. (2000). γ -Diketone Peripheral Neuropathy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *165*, 127–140. doi:10.1006/taap.2000.8937
- Llorens, J. (2013). Toxic neurofilamentous axonopathies - accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *Journal of Internal Medicine*, *273*, 478–489. doi:10.1111/joim.12030
- Lopachin, R. M. (2000). Redefining toxic distal axonopathies. *Toxicology Letters*, *113*, 23–33.
- Lopachin, R. M., & Barber, D. S. (2006). Synaptic Cysteine Sulfhydryl Groups as Targets of Electrophilic Neurotoxicants. *Toxicological Sciences*, *94*, 240–255. doi:10.1093/toxsci/kfl066
- Lopachin, R. M., & Decaprio, A. P. (2004). γ -Diketone neuropathy: axon atrophy and the role of cytoskeletal protein adduction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *199*, 20–34. doi:10.1016/j.taap.2004.03.008
- Lopachin, R. M., & Decaprio, A. P. (2005). Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. *Toxicological Sciences*, *86*, 214–225. doi:10.1093/toxsci/kfi197
- Lopachin, R. M., Gavin, T., & Barber, D. S. (2008). Type-2 alkenes mediate synaptotoxicity in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurotoxicology*, *29*, 871–882. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.016
- Lopachin, R. M., Gavin, T., Decaprio, A., & Barber, D. S. (2012). Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) Theory to Toxicant - Target Interactions. *Chemical Research in Toxicology*, *25*, 239–251.
- Manini, P., Andreoli, R., & Mutti, A. (2006). Application of liquid chromatography - mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals. *Toxicology Letters*, *162*, 202–210. doi:10.1016/j.toxlet.2005.09.023

- Manini, P., Andreoli, R., Mutti, A., Bergamaschi, E., & Franchini, I. (1999). Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicology Letters*, *108*, 225–231.
- Manini, P., Andreoli, R., Mutti, A., Bergamaschi, E., & Niessen, W. M. A. (1998). Determination of n -Hexane Metabolites by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry 2. Glucuronide-conjugated Metabolites in Untreated Urine Samples by Electrospray Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *1624*, 1615–1624.
- Manini, P., Andreoli, R., & Niessen, W. M. A. (2004). Liquid chromatography - mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *Journal of Chromatography A*, *1058*, 21–37. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.104
- Markel, A., Galaktionov, Y., & Efimov, V. (1989). Factor analysis of rat behavior in an open field test. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *19*, 279–286. doi:10.1007/BF01236015
- Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., ... Vance, J. M. (2001). Association of Single-Nucleotide Polymorphisms of the Tau Gene With Late-Onset Parkinson Disease. *Journal of American Medical Association*, *286*, 2245–2250.
- Mateus, M. L., Santos, A. P. M., & Batoréu, M. C. C. (2002). Evidence of Zinc Protection against 2,5-Hexanedione Neurotoxicity: Correlation of Neurobehavioral Testing with Biomarkers of Excretion. *Journal of Neurotoxicology*, *23*, 747–754.
- Mergler, D., & Blain, L. (1987). Assessing Color Vision Loss Among Solvent-Exposed Workers. *American Journal of Industrial Medicine*, *12*, 195–203.
- Mergler, D., Bowler, R., & Cone, J. (1991). Visual dysfunction among former microelectronics assembly workers. *Archives of Environmental Health*, *46*, 326–334.
- Migliore, L., & Coppedè, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *674*, 73–84. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.013

- Moffit, J. S., Bryant, B. H., Hall, S. J., & Boekelheide, K. (2007). Dose-Dependent Effects of Sertoli Cell Toxicants 2,5-Hexanedione, Carbendazim, and Mono-(2-ethylhexyl) phthalate in Adult Rat Testis. *Toxicologic Pathology*, 35, 719–727. doi:10.1080/01926230701481931
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2005). Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annual Review of Neurosciences*, 28, 57–87. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718
- Moretto, G., Passarin, M. G., Benedetti, M. D., Rizzuto, N., & Monaco, S. (1991). Cytoskeletal changes induced by 2,5-hexanedione on developing human neurons in vitro. *Archives of Toxicology*, 65, 409–413.
- Moscardo, E., Maurin, A., Dorigatti, R., Champeroux, P., & Richard, S. (2007). An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56, 239–255. doi:10.1016/j.vascn.2007.03.007
- Moser, V. C. (2001). Neurobehavioral Screening in Rodents. *Current Protocols in Toxicology*, 11. doi:10.1002/0471140856.tx1102s06
- Moser, V. C. (2011). Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicologic Pathology*, 39, 36–45. doi:10.1177/0192623310385255
- Moser, V. C., Aschner, M., Richardson, R. J., & Philbert, M. A. (2013). Toxic Responses of the Nervous System. In *Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons* (8th ed., pp. 733–766). Nova Iorque: McGraw-Hill.
- Moser, V. C., Becking, G. C., Macphail, R. C., & Kulig, B. M. (1997). The IPCS Collaborative Study on Neurobehavioral Screening Methods. *Fundamental and Applied Toxicology*, 35, 143–151.
- Mutti, A., Bergamaschi, E., Ghittori, S., Imbriani, M., & Franchini, I. (1993). On the need of a sampling strategy in biological monitoring: The example of hexane exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65, 171–176.
- Mutti, A., Falzoi, M., Lucertini, S., Arfini, G., Zignani, M., Lombardi, S., & Franchini, I. (1984). n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 41, 533–538.

- Nelson, S. D., & Pearson, P. G. (1990). Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30, 169–195.
- NRC. (1987). Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3–9. doi:10.2307/3430428
- OMS. (1991). Environmental Health Criteria 122: n-hexane. Consultado em 25 de Agosto de 2016, disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc122.htm>
- OMS. (2001). Environmental Health Criteria 222: Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Consultado em 27 de Agosto de 2016, disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
- Oțelea, M., Handra, C., & Rașcu, A. (2015). Registered cases of occupational n-hexane intoxication in Bucharest. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 23, 279–284. doi:10.4323/rjlm.2015.279
- Pearson, R. G. (1968). Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part II. *Journal of Chemical Education*, 45, 643–648.
- Pearson, R. G. (1987). Recent Advances in the Concept of Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of Chemical Education*, 64, 561–567.
- Perbellini, L., Amantini, M. C., Brugnone, F., & Frontali, N. (1982). Urinary Excretion of n-Hexane Metabolites. *Archives of Toxicology*, 50, 203–215.
- Perbellini, L., Brugnone, F., & Faggionato, G. (1981). Urinary excretion of the metabolites of n-hexane and its isomers during occupational exposure. *British Journal of Industrial Medicine*, 38, 20–26.
- Perbellini, L., Mozzo, P., Brugnone, F., & Zedde, A. (1986). Physiologicomathematical model for studying human exposure to organic solvents: kinetics of blood/tissue n-hexane concentrations and of 2,5-hexanedione in urine. *British Journal of Industrial Medicine*, 43, 760–768.
- Perbellini, L., Pezzoli, G., Brugnone, F., & Canesi, M. (1993). Biochemical and physiological aspects of 2,5-hexanedione: endogenous or exogenous product? *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 65, 49–52.

- Periago, J. F., Cardona, A., Marhuenda, D., Roe, J., Villanueva, M., Marti, J., & Luna, A. (1993). Short communication Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by exhaled air analysis and urinalysis. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *65*, 275–278.
- Pezzoli, G., Antonini, A., Barbieri, S., Canesi, M., Perbellini, L., Zecchinelli, A., ... Leenders, K. L. (1995). n-Hexane-induced parkinsonism: pathogenetic hypotheses. *Movement Disorders Journal*, *10*, 279–282.
- Picklo, M. J., Montine, T. J., Amarnath, V., & Neely, M. D. (2002). Carbonyl Toxicology and Alzheimer's Disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *184*, 187–197. doi:10.1006/taap.2002.9506
- Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2016). Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, *241*, 783–799. doi:10.1177/1535370216638770
- Pyle, S. J., Amarnath, V., Graham, D. G., & Anthony, D. C. (1992). The role of pyrrole formation in the alteration of neurofilament transport induced during exposure to 2,5-hexanedione. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *51*, 451–458.
- RCM - Leuprorrelina. (2015). INFARMED, Aprovado em 15-04-2015.
- Ridgway, P., Nixon, T. E., & Leach, J. P. (2003). Occupational exposure to organic solvents and long-term nervous system damage detectable by brain imaging, neurophysiology or histopathology. *Food and Chemical Toxicology*, *41*, 153–187.
- Saito, I., Shibata, E., Huang, J., Hisanaga, N., Ono, Y., & Takeuchi, Y. (1991). Determination of urinary 2,5-hexanedione concentration by an improved analytical method as an index of exposure to n-hexane. *British Journal of Industrial Medicine*, *48*, 568–574.
- Sanagi, S., Seki, Y., Sugimoto, K., & Hirata, M. (1980). Peripheral Nervous System Functions of Workers Exposed to n-Hexane at a Low Level. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *47*, 69–79.
- Savica, R., Rocca, W. A., & Ahlskog, J. E. (2010). When Does Parkinson Disease Start? *Archives of Neurology*, *67*, 798–801.

- Sayre, L. M., Shearson, C. M., Wongmongkolrit, T., Medori, R., & Gambetti, P. (1986). Structural basis of gamma-diketone neurotoxicity: non-neurotoxicity of 3,3-dimethyl-2,5-hexanedione, a gamma-diketone incapable of pyrrole formation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 84(36–44).
- Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, P. L. R., Perry, G., Salomon, R. G., & Smith, M. A. (1997). 4-Hydroxynonenal-Derived Advanced Lipid Peroxidation End Products Are Increased in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 68, 2092–2097.
- Schaumburg, H. H., & Spencer, P. S. (1976). Degeneration in central and peripheral nervous systems produced by pure n-hexane: an experimental study. *Brain a Journal of Neurology*, 99, 183–192.
- Scott, W. K., Martha, A., Watts, R. L., Hubble, P., Koller, W. C., Stern, M. B., ... Margaret, A. (2001). Complete Genomic Sreen in Parkinson Disease. *Journal of American Medical Association*, 286(18), 2239–2244.
- Selkoe, D. J., Luckenbill-Edds, L., & Shelanski, M. L. (1978). Effects of neurotoxic industrial solvents on cultured neuroblastoma cells: methyl n-butyl ketone, n-hexane and derivatives. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 37, 768–789.
- Singh, R. P., Sharad, S., & Kapur, S. (2004). Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 5, 218–225.
- Slikker, W., Acuff, K., Boyes, W. K., Chelonis, J., Crofton, K. M., Dearlove, G. E., ... Sobotka, T. J. (2005). Behavioral test methods workshop. *Journal of Neurotoxicology and Teratology*, 27, 417–427. doi:10.1016/j.ntt.2005.02.003
- Smith, A. G., & Albers, J. W. (1997). n-Hexane neuropathy due to rubber cement sniffing. *Muscle and Nerve*, 20, 1445–1450. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199711)20:11<1445::AID-MUS13>3.0.CO;2-0
- Sonnen, J. A., Keene, C. D., Montine, K. S., Li, G., Peskind, E. R., Zhang, J., & Montine, T. J. (2007). Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 7, 1021–1028.

- Spencer, P. S., Kim, M. S., & Sabri, M. I. (2002). Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205, 131–136.
- Spencer, P. S., & Schaumburg, H. H. (1975). Experimental neuropathy produced by 2,5-Hexanedione: a major metabolite of the neurotoxic industrial solvent methyl n-butyl ketone. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 38, 771–775.
- Spencer, P. S., & Schaumburg, H. H. (1978). Distal Axonopathy: One Common Type of Neurotoxic Lesion. *Environmental Health Perspectives*, 26, 97–105.
- Spencer, P. S., Schaumburg, H. H., Sabri, M. I., & Veronesi, B. (1980). The enlarging view of hexacarbon neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 7, 279–356. doi:10.3109/10408448009037489
- Spencer, P. S., Tshala-Katumbay, D. D., Palmer, V. S., Kayton, R. J., & Sabri, M. I. (2005). A new murine model of giant proximal axonopathy. *Acta Neuropathology*, 109, 405–410. doi:10.1007/s00401-005-0982-z
- Takeuchi, Y. (2006). Control of Hazardous Substances at Small Workplaces. *Industrial Health*, 44, 48–52.
- Thorne, P. . (2013). Occupational Toxicology. Em McGraw-Hill (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (8th ed., pp. 1031–1111). Nova Iorque.
- Tilson, H. A. (2000). New Horizons: Future Directions in Neurotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 108, 439–441.
- Tilson, H. A., Macphail, R. C., & Crofton, K. M. (1996). Setting Exposure Standards: A Decision Process. *Environmental Health Perspectives*, 104, 401–405.
- Topping, M. (2001). Occupational exposure limits for chemicals. *Occupational and Environmental Medicine*, 58, 138–144.
- Torres, M. E. da S. O. (2014). *Characterization of alternative biomarkers to control n-hexane exposure and prevent 2,5-hexanedione toxicity*. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

- Tshala-katumbay, D., Monterroso, V., Kayton, R., Lasarev, M., Sabri, M., & Spencer, P. (2008). Probing Mechanisms of Axonopathy. Part I: Protein Targets of 1,2-Diacetylbenzene, the Neurotoxic Metabolite of Aromatic Solvent 1,2-Diethylbenzene. *Toxicological Sciences*, *105*, 134–141. doi:10.1093/toxsci/kfn103
- Tshala-katumbay, D., Monterroso, V., Kayton, R., Lasarev, M., Sabri, M., & Spencer, P. (2009). Probing Mechanisms of Axonopathy. Part II: Protein Targets of 2,5-Hexanedione, the Neurotoxic Metabolite of the Aliphatic Solvent n-Hexane. *Toxicological Sciences*, *107*, 482–489. doi:10.1093/toxsci/kfn241
- Veulemans, H., Vlem, E. Van, Janssens, H., Masschelein, R., & Leplat, A. (1982). Experimental Human Exposure to n-Hexane. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *49*, 251–263.
- White, R. F., & Proctor, S. P. (1997). Solvents and neurotoxicity. *The Lancet*, *349*, 1239–1243.
- Yamanouchi, N., Okada, S., Kodama, K., Hirai, S., Sekine, H., Murakami, A., ... Sato, T. (1995). White Matter Changes Caused by Chronic Solvent Abuse. *American Journal of Neuroradiology*, *16*, 1643–1649.
- Yin, H., Guo, Y., Zeng, T., Zhao, X., & Xie, K. (2013). Correlation between Levels of 2,5-Hexanedione and Pyrrole Adducts in Tissues of Rats Exposure to n-Hexane for 5-Days. *Public Library of Science*, *8*, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0076011
- Yin, H., Zhang, C., Guo, Y., Shao, X., Zeng, T., Zhao, X., & Xie, K. (2014). Biological Exposure Indices of Pyrrole Adducts in Serum and Urine for Hazard Assessment of n-Hexane Exposure. *Public Library of Science*, *9*, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0086108
- Yokoyama, K., Feldman, R. G., Sax, D. S., Salzsider, B. T., & Kucera, J. (1990). Relation of Distribution of Conduction Velocities to Nerve Biopsy Findings in n-Hexane Poisoning. *Muscle and Nerve*, *13*, 314–320.
- Yuan, A., Sasaki, T., Rao, M. V., Kumar, A., Kanumuri, V., Dunlop, D. S., ... Nixon, R. A. (2009). Neurofilaments Form a Highly Stable Stationary Cytoskeleton after Reaching a Critical Level in Axons. *The Journal of Neuroscience*, *29*, 11316–11329. doi:10.1523/JNEUROSCI.1942-09.2009

- Zhang, L., Gavin, T., Decaprio, A. P., & Lopachin, R. M. (2010). γ -Diketone Axonopathy: Analyses of Cytoskeletal Motors and Highways in CNS Myelinated Axons. *Toxicological Sciences*, *117*, 180–189. doi:10.1093/toxsci/kfq176
- Zhu, M., Spink, D. C., Yan, B., Bank, S., & Decaprio, A. P. (1995). Inhibition of 2,5-Hexanedione-Induced Protein Cross-Linking by Biological Thiols: Chemical Mechanisms and Toxicological Implications. *Chemical Research in Toxicology*, *8*, 764–771.