**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

JOSILENE LUCIENE DUARTE

**Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica
em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com
chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro**

**BAURU
2013**

JOSILENE LUCIENE DUARTE

**Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica
em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com
chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

**BAURU
2013**

D85p Duarte, Josilene Luciene
Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro / Josilene Luciene Duarte. – Bauru, 2013.
108p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: a versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 019/2009
Data: 06/08/2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido e amado marido, **Marcio**, por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, proporcionando-me muita alegria, amor e companheirismo. Aos nossos filhos **Maria Eduarda** e **Henrique**, que são nossos tesouros e completam os nossos dias.

Aos meus queridos pais, **Ana Maria** e **Walter**; irmãs, **Janaina** e **Josiane**; e, sobrinhos, **Ana Laura** e **Vinícius**, por estarem sempre presentes nas grandes decisões da minha vida apoiando-me e pelo amor e paciência que me proporcionam.

Aos meus queridos cunhados, **Marcio** e **Marcel**, por estarem sempre presentes em minha vida dando apoio e auxiliando-me.

Aos meus queridos sogros **Eulázio** e **Maria Silvia**, por mostrarem-me os caminhos da pesquisa e acreditarem em mim.

Aos meus queridos avós maternos **Jacinta** e **José Benedito**, (*in memorian*); e avós paternos, **Aparecida** (*in memorian*) e **Waldemar** (*in memorian*).

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, por meio dos seus docentes e funcionários, por fazerem de mim a profissional que hoje sou.

À **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf** pela amizade, orientação na vida pessoal e profissional, pela paciência e compreensão em todos os momentos da execução deste trabalho. **Marília**, você é um exemplo para mim, como pessoa, mãe, esposa, profissional, amiga e orientadora.

À **Profa. Dra. Kátia de Freitas Alvarenga** e amiga, por sempre acreditar em mim, por fazer parte de acontecimentos tão especiais em minha vida, como meu casamento, nascimento de meus dois filhos e por me orientar em toda a minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **DEUS**, por acompanhar-me e auxiliar-me durante toda a elaboração deste trabalho, pois sem Ele nada disso seria possível.

À **coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas**, e aos **professores do departamento de Ciências Biológicas** por toda a dedicação e esforços despendidos para a formação de verdadeiros doutores.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira** pela amizade, consideração e ensinamentos.

Às queridas amigas da Clínica de Fonoaudiologia, **Luciane, Tatiana, Raquel B, Fabiana, Patricia, Raquel A, Thais, Liliane, Mariana, Ana Paola, Jéssica, Ariadnes, Raquel R, Lívia, Marlene e Milena** pelos momentos de alegria, descontração, companheirismo e amizade sempre. Cada uma de vocês é especial para mim.

Aos **funcionários da Pós-Graduação**, pela educação e esclarecimento e por estarem sempre dispostos a orientar-nos.

Ao **serviço de Biblioteca e documentação da FOB-USP**, por ser a “peça chave” em todos os trabalhos realizados nessa instituição.

À **Dra. Kelly Polido Kaneshiro Olympio** pela enorme contribuição científica para a elaboração do projeto e por sempre estar pronta para ajudar na concretização deste estudo.

À querida amiga e pesquisadora **Camila Peres Buzalaf**, por quem tenho grande admiração, e por ter contribuído muito com sua experiência em meu exame de qualificação.

À grande amiga **Fernanda Zucki** por ser este ser tão especial que, com certeza, foi enviada por Deus para fazer parte deste grupo de pesquisa, pois em toda esta trajetória ela foi um anjo.

À grande amiga **Maria Cecília de Freitas Ferreira**, por ter caminhado junto a mim em fases tão marcantes em minha vida, sempre sendo tão incentivadora, acolhedora e tão amiga.

À amiga **Aline de Lima Leite** por todo o carinho, atenção, orientação e ajuda científica em cada etapa deste trabalho.

À **Mileni Fernandes**, por não ter medido esforços para nos ajudar neste estudo.

A todos os pesquisadores da bioquímica (FOB-USP), **Ângela Bolanho, Larissa Thomassian, Camila Peres, Carina Melo, Priscila Muno, Flávia Levy, Taisa Delecrode, Melina Bellini, Bruno Zarella, Lucas Almeida, Thiemi Kato, Heloisa Pereira, Lívia Comar, Senda Charone, Cíntia Maria, Juliano Pessan, Kellen Gasque, Adriana Matos, Flávia Amadeu, Alessandra Machado, Juliane Carvalho**, que fazem deste laboratório um ambiente acolhedor, descontraído e altamente produtivo.

Aos queridos **amigos e funcionários do laboratório de Bioquímica da FOB-USP, Telma e Ovídio**, que sempre me ajudaram em toda a minha trajetória de pesquisa no laboratório de bioquímica.

Aos funcionários do **Biotério da FOB-USP, Luiz Carlos, Erasmo, Elias e Richard** que muito ajudaram no período de tratamento dos animais.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro na realização desse trabalho.

A **todos os amigos, colegas de profissão** que de forma direta ou indireta ajudaram para a concretização deste estudo.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado que pode ocasionar alterações nos sistemas nervoso central (SNC) e auditivo. Faltam estudos que demonstrem tais alterações clínicas, em conjunto com as alterações bioquímicas e morfológicas em cérebro de ratos expostos ao Pb. Tem sido relatado que o ferro (Fe) tem um efeito protetor na toxicidade cerebral causada pelo Pb. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade elétrica cerebral, analisar a concentração de Pb no sangue e tecido cerebral, e observar o aspecto morfológico do cérebro de ratos intoxicados por Pb, submetidos à suplementação com Fe ou não. Foi realizado um projeto piloto utilizando 20 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), que foram divididos em 5 grupos, sendo um controle e 4 experimentais (n=4/grupo). Nos grupos experimentais, os animais receberam por 6 semanas acetato de chumbo em água de beber nas concentrações de 100 mg/L e 400 mg/L de Pb, e em dois destes grupos houve administração simultânea de 20 mg/Kg de FeSO₄ a cada 2 dias, por gavagem gástrica, e no outro não. O grupo controle recebeu, água deionizada. Após estabelecida a relação entre o Pb administrado e a dosagem deste no sangue (10 µgPb/dL e 30 µgPb/dL para as dosagens 100 e 400 mg/L de Pb, respectivamente), o experimento foi realizado com 30 ratos recém-desmamados divididos em 6 grupos (n=5/grupo). Os cinco primeiros foram idênticos aos empregados no estudo piloto, incluindo um grupo no qual os animais receberam água deionizada e 20 mg/Kg FeSO₄ por gavagem gástrica a cada 2 dias, por 6 semanas. Após o período experimental, foi realizado o Potencial Evocado Auditivo Cortical (PEAC) com a análise da latência dos componentes P1, N1 e P2. Após a eutanásia, o cérebro dos animais foi removido, submetido ao processamento histológico (hematoxilina e eosina) e analisado ao microscópio óptico. Os dados foram analisados por ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis/Dunn e regressão linear (p<0,05). Foi observada uma dose-resposta em relação à concentração de Pb no sangue e no cérebro. A administração de FeSO₄ reduziu os níveis de Pb no sangue e no cérebro, e embora a diferença só tenha sido significativa para o sangue (grupo que recebeu 100 mg/L de Pb), houve correlação significativa entre os níveis de Pb no sangue e cérebro ($r^2 = 0,94$; p<0,0001). A latência média dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC foi maior para os animais do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄. Não foram observadas alterações morfológicas significativas no tecido cerebral dos animais dos diferentes grupos, com exceção de alguns espaços pericelulares nos animais do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄. Conclui-se que a ingestão de Pb sozinho não foi capaz de causar aumento nas latências dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC e alteração morfológica no tecido cerebral, com exceção da maior dose de Pb utilizada (400 mg/L), associada ao uso do Fe (20 mg FeSO₄). Além disso, a suplementação com o Fe foi capaz de diminuir os níveis do metal no sangue e no cérebro.

Palavras-chave: Chumbo. Ferro. Potenciais Evocados Auditivos. Morfologia. Cérebro.

ABSTRACT

Cortical Auditory Evoked Potential, biochemical and morphological analysis in brain of rats treated with subchronic lead: protective effect of supplementation with iron

Lead (Pb) is a heavy metal that may cause alterations in the central nervous system (CNS) and auditory system. There is lack of studies demonstrating these clinical alterations, combined to the biochemical and morphological alterations in the brain of rats exposed to Pb. It has been reported that iron (Fe) has a protective effect on the brain toxicity caused by Pb. This study evaluated the electrical brain activity, analyzed the Pb concentration in blood and brain tissue, and observed the morphological aspect of the brain in rats intoxicated by Pb, submitted or not to Fe supplementation. A pilot study was conducted on 20 recently weaned male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar type) divided in 5 groups, being one control and 4 experimental (n=4/group). In the experimental groups, the animals received lead acetate in drinking water for 6 weeks at concentrations of 100 mg/L and 400 mg/L of Pb, and in two of these groups there was simultaneous administration of 20 mg/Kg of FeSO₄ at every 2 days, by gastric gavage. The control group received deionized water. After establishing the relationship between the administered Pb and its concentration in blood (10 µgPb/dL and 30 µgPb/dL for concentrations of 100 and 400 mg/L of Pb, respectively), the study was conducted on 30 recently weaned rats divided in 6 groups (n=5/group). The five first groups were identical to those used in the pilot study, including one group in which the animals received deionized water and 20 mg/Kg FeSO₄ by gastric gavage at every 2 days, for 6 weeks. After the study period, the Cortical Auditory Evoked Potential (CAEC) was applied for analysis of latency of the components P1, N1 and P2. The animals were killed, their brains were removed and submitted to histological processing (hematoxylin and eosin) for light microscopy analysis. Data were analyzed by the ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis/Dunn and linear regression tests ($p < 0.05$). A dose-response relationship was observed in the Pb concentration in blood and brain. The administration of FeSO₄ reduced the Pb levels in blood and brain, and even though the difference was only significant for blood (group receiving 100 mg/L of Pb), there was significant correlation between the Pb levels in blood and brain ($r^2 = 0.94$; $p < 0.0001$). The mean latency of components P1, N1 and P2 of the CAEC was higher in animals in the group 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄. No significant morphological alterations were observed in the brain tissue of animals in the different groups, except for some pericellular spaces in animals in the group 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄. It was concluded that Pb ingestion individually was not able to increase the latencies of components P1, N1 and P2 of the CAEC and morphological alterations in the brain tissue, except for the highest Pb dose used (400 mg/L), associated to the use of Fe (20 mg FeSO₄). Additionally, the Fe supplementation was able to reduce the levels of the metal in the blood and brain.

Keywords: Lead. Iron. Evoked Potentials, Auditory. Morphology. Cerebrum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Desenho esquemático representando os Potenciais Evocados Auditivos de curta, média e longa latência e seus geradores cerebrais..... **40**
- Figura 2 -** Animal do grupo 400mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ mostrando, após a eutanásia, bexiga com presença de urina com coloração avermelhada em seu interior..... **65**
- Figura 3 -** Fotomicrografia do Córtex cerebral de ratos do grupo controle, tratado com água deionizada. Neurônios com corpo celular estrelado (seta vermelha) e feixes de dendritos sem particularidades (seta preta). Coloração HE..... **71**
- Figura 4 -** Fotomicrografia do Córtex cerebral de ratos do grupo tratado com água contendo 400 mg/L Pb + gavagem com FeSO₄ (20 mg/Kg peso corporal). Neurônios com corpo celular estrelado (seta vermelha), aumento na quantidade de células da glia e espaço pericelular que pode indicar edema cerebral. Coloração HE..... **71**

- GRÁFICO

- Gráfico 1 -** Correlação entre as concentrações de Pb encontradas no sangue total e no córtex cerebral dos animais dos diferentes grupos. Regressão linear ($r^2=0,94$; $p<0,0001$, $n=20$)..... **69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Consumo médio ($\pm$ Dp, mL) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	66
Tabela 2 -	Peso médio ($\pm$ Dp, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	67
Tabela 3 -	Concentração média ($\pm$ Dp) de Pb no sangue (μ g/dL) e córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	68
Tabela 4 -	Média ($\pm$ DP) da latência (ms) dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + FeSO ₄	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µg/dL	Microgramas/decilitro
µgPb/ml	Microgramas de chumbo/mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µmol	Micromoles
µV	Microvoltz
ACCLPP	Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention
ALA	Ácido δ-amino levulínico
ALAD	Ácido δ-amino levulínico desidratase
ANOVA	Análise de variância
Ca	Cálcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (centro de controle e prevenção de doenças)
CEATOX	Centro de Assistência Toxicológica
CRMs	Certified Reference Materials
Cu	Cobre
dBHL	Decibel hearing level
dBNA	Decibel nível de audição
dBnHL	Decibel normal hearing level
dBNPS	Decibel nível de pressão sonora
dBpeSPL	Decibel Sound Pressure equivalent Level Peak
dB SPL	Decibel Sound Pressure Level
dL	Decilitros
DMT1	Transportador de metal divalente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	Desvio padrão

ECoG	Eletrococleografia
EEG	Eletroencefalograma
EQAS	External Quality Control System
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
FeSO₄	Sulfato ferroso
g	Gramas
g/Kg	Gramas/quilograma
h	Hora(s)
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HNO₃	Ácido nítrico
Hz	Hertz
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
INSP	Instituto Nacional de Saúde Pública
JNK	Jun-N-terminal kinase
Kg	Quilogramas
kHz	Quilohertz
KW	Kruskal-Wallis
L	Litros
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC	Microfonismo Coclear
Mg	Magnésio
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas/quilograma
mg/L	Miligramas/Litro
mgFe/Kg	Miligramas de ferro/quilograma
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
Mn	Manganês
ms	Milissegundo(s)
n	Número
N	Pico Negativo

N1	Pico Negativo um do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
N1a	Pico Negativo 1a do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
N1b	Pico Negativo 1b do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
N2	Pico Negativo 2 do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
Na	Pico Negativo a do Potencial Evocado Auditivo de Média Latência
Nb	Pico Negativo b do Potencial Evocado Auditivo de Média Latência
ng	Nanogramas
ng/g	Nanogramas/grama
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano
NYSDOH	Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque
°C	Graus centígrados
OH[•]	Radical hidroxila
Onda I	Onda um do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
Onda II	Onda dois do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
Onda III	Onda três do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
Onda IV	Onda quatro do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
Onda V	Onda cinco do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
P	Fosfato
p	Nível de significância
P	Pico Positivo
P1	Pico Positivo um do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
P2	Pico Positivo 2 do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
P3	Pico Positivo 3 do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
P3a	Pico Positivo 3a do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
P3b	Pico Positivo 3b do Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
PA	Potencial de Ação
Pa	Pico Positivo a do Potencial Evocado Auditivo de Média Latência
Pb	Chumbo
Pb	Pico Positivo b do Potencial Evocado Auditivo de Média Latência
PbCO₃	Carbonato de chumbo
PbS	Sulfeto de chumbo
PbSO₄	Sulfato de chumbo
PEA	Potencial Evocado Auditivo
PEAC	Potencial Evocado Auditivo Cortical

PEACL	Potencial Evocado Auditivo de curta Latência
PEALL	Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência
PEAML	Potencial Evocado Auditivo de Média Latência
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
PKC	Proteína quinase C
PS	Potencial de Somação
QI	Quociente de inteligência
r²	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
SN10	Slow Negative 10
SNC	Sistema Nervoso Central
TMAH	Tetrametilamônio
Vitamina D	Calciferol
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O Pb.....	23
2.1.1	Propriedades físico-químico	23
2.1.2	Exposição e contaminação	23
2.1.3	Absorção.....	25
2.1.4	Excreção	26
2.1.5	Biomarcadores	26
2.1.6	Intoxicação e sintomatologia	27
2.1.7	Ações do Pb a nível molecular e celular	27
2.2	FERRO.....	28
2.2.1	Pb x Fe	30
2.3	O Pb NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	35
2.3.1	Efeitos da exposição ao Pb no hipocampo	37
2.4	O Pb NO SISTEMA AUDITIVO	39
2.4.1	Potenciais Evocados Auditivos	40
2.4.2	Potenciais Evocados Auditivos Corticais em ratos	43
3	PROPOSIÇÃO	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	55
4.2	POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS CORTICAIS	57
4.2.1	Preparo do animal	57
4.2.2	Registro dos Potenciais Evocados Auditivos Corticais	58
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	58
4.4	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	59
4.5	ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CÉREBRAL E SANGUE TOTAL	60
4.6	ANÁLISE DOS DADOS	61

5	RESULTADOS	63
5.1	CONSUMO DE ÁGUA	65
5.2	MASSA CORPORAL	66
5.3	ANÁLISE DE Pb NO SANGUE TOTAL E CÓRTEX CEREBRAL	67
5.4	POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS CORTICAIS	69
5.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA CEREBRAL	70
6	DISCUSSÃO	73
6.1	CONSUMO DE ÁGUA	75
6.2	PESO DOS ANIMAIS.....	75
6.3	Pb NO SANGUE	76
6.4	Pb NO CÉREBRO.....	77
6.5	POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL	77
6.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA	79
6.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

O chumbo (Pb) é um metal pesado detectável em todas as fases do meio inerte e sistemas biológicos e não apresenta nenhuma função fisiológica para o organismo (MAINENTI, 2006; MOREIRA; NEVES, 2008). As principais vias de contaminação são o trato respiratório, trato gastrointestinal e pele. Quando absorvido pelo organismo, ele cai na corrente sanguínea e é distribuído para os diversos órgãos e sistemas, sendo que 90 a 95% do conteúdo corpóreo total encontra-se acumulado no tecido ósseo (SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996; SANIN et al., 1998; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; SILVA, 2000).

A intoxicação por Pb pode comprometer vários sistemas fisiológicos e se manifestar a nível molecular, celular ou clínico. Os sistemas mais sensíveis à intoxicação pelo Pb são o nervoso central, o hematopoiético, o gastrointestinal, o cardiovascular, o musculoesquelético e o reprodutor (CAVALIERI-COSTA et al., 1994; SILVA, 2000; BECHARA, 2004; MOREIRA; MOREIRA, 2004; MAINENTI, 2006). No sistema nervoso, tanto a porção central quanto a porção periférica podem ser acometidas pelo Pb, sendo que a sensibilidade aumenta quando se trata do sistema nervoso central de crianças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; TOSCANO; GUILARTE, 2005). Em relação à neurotoxicidade da exposição a níveis baixos de Pb, e direcionando atenção especial às crianças, parece não existir um limiar mínimo inócuo ao organismo, ou seja, qualquer exposição ao Pb é prejudicial ao sistema nervoso central, e os sintomas podem levar a uma reflexão clínica sobre a região do cérebro preferencialmente envolvida.

O sistema auditivo também pode ser acometido pelos danos causados pelo Pb tanto em nível periférico (REPKO; CORUM, 1979; SCHWARTZ; OTTO 1987, 1991; FORST; FREELS; PERSKY, 1997; FARAHAT et al., 1997; TRONG-NENG et al., 2000), quanto central (HOLDESTEIN et al., 1986; LILLE et al., 1988; DISCALZI et al., 1992; ARAKI et al., 1992; DISCALZI et al., 1993; HIRATA; KOSAKA, 1993; ARAKI; MURATA; YOKOYAMA, 1994; ROTHENBERG; POBLANO; GARZA-MORALES, 1994; ARAKI et al., 2000; ROTHENBERG; POBLANO; SCHNAAS, 2000; BLEECKER et al., 2003; ZOU et al., 2003) ou ambos (OTTO et al.,

1985; OSMAN et al., 1999; COUNTER; BUCHANAN, 2002). Estes danos podem se manifestar desde a diminuição da acuidade auditiva em diferentes frequências e/ou alterações na função auditiva, mais precisamente déficits no processamento da informação sonora.

O Fe tem sido relatado como protetor na toxicidade cerebral causada pelo Pb quando administrado em níveis ideais. Acredita-se que ele atue prevenindo os danos oxidativos causados pelo Pb (WANG et al., 2007a, 2007b).

Outra ferramenta importante que ajudaria no entendimento das alterações clínicas causadas pelo Pb a nível do Sistema Nervoso Central (SNC) e, conseqüentemente, sistema auditivo, seria a análise morfológica do tecido cerebral após intoxicação subcrônica por este metal. Neste sentido, este tipo de análise poderia ser empregada para mostrar alterações que pudessem ocorrer no tecido cerebral após a intoxicação por Pb, na presença de suplementação com Fe ou não.

Este estudo se justifica pelo fato de a literatura não apresentar estudos que correlacionem as alterações clínicas em conjunto com as análises bioquímicas e morfológicas em cérebro e sistema auditivo de ratos expostos ao Pb, além de procedimentos preventivos e/ou terapêuticos que possam diminuir os danos causados pelo Pb no cérebro e sistema auditivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O Pb

2.1.1 Propriedades físico-químicas

O Pb, peso atômico 207,2, é um metal de coloração cinzenta (azulado brilhante), não elástico, mole, dúctil, maleável, possui razoável condutibilidade de calor e elétrica, baixa corrosão e se funde com facilidade, apresentando pontos de fusão e ebulição de 327° C e 1717° C, respectivamente (CHUMBO, c2011).

Este metal não é encontrado puro na natureza, mas sim na forma de compostos minerais, sendo o sulfeto de chumbo (PbS), também chamado de galena, o de maior abundância na crosta terrestre. Também pode se apresentar ligado a outros metais como o Cobre, Zinco, Prata e Urânio, além de outros minerais, como a cerusita (carbonato de chumbo, PbCO_3) e anglesita (Sulfato de chumbo, PbSO_4). Sua ocorrência na crosta terrestre é cerca de 0,002%, e não apresenta nenhuma função fisiológica no organismo humano (MAINENTI, 2006; MOREIRA; NEVES, 2008).

2.1.2 Exposição e contaminação

Por apresentar inúmeras características físico-químicas, sua aplicabilidade no setor industrial é muito grande, chegando a ser o sexto metal mais utilizado neste ramo. Dentre as atividades industriais, podem se destacar as indústrias extrativa, petrolífera, de acumuladores, tintas, corantes, gráfica e bélica (SILVA, 2000). Sendo assim, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição, ele é considerado um dos contaminantes mais comuns do ambiente (NAKAMURA, 2002; MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A contaminação pelo Pb pode ser derivada tanto de fatores industriais quanto ambientais (NAKAMURA, 2002), sendo que ela pode ocorrer por inalação (ar

atmosférico), ingestão (água, alimentos e solo contaminados) e pele (compostos lipossolúveis).

O principal meio de contaminação é a exposição ocupacional ao Pb. Entretanto, a exposição ambiental passou também a ser alvo de maior preocupação. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 1991) descreveu efeitos adversos na saúde devido a níveis baixos (10 $\mu\text{g/dL}$) desse metal em sangue. Na época, as normativas referentes ao controle ambiental do Pb foram então revistas, propondo-se a troca do nível de intervenção de 25 $\mu\text{g/dL}$ para 10 $\mu\text{g/dL}$. Recentemente, o comitê internacional que fiscaliza a prevenção da intoxicação por Pb em crianças, (ADVISORY COMMITTEE ON CHILDHOOD LEAD POISONING PREVENTION - ACCLPP, 2012), incluiu uma recomendação para eliminar o uso do termo "nível de intervenção de Pb sanguíneo" com base na evidência de efeitos adversos para a saúde dos níveis <10 $\mu\text{g/dL}$ em crianças. Em vez disso, ACCLPP recomendou adotar o "valor de referência" baseado no percentil 97,5 da distribuição do nível de chumbo no sangue de crianças americanas com idade entre 1-5 anos, que atualmente é de 5 $\mu\text{g/dL}$. A ACCLPP também recomendou que a prioridade do CDC seja o foco na implementação de estratégias em nível de prevenção primária, além de programa de orientação para crianças com níveis de chumbo no sangue acima do valor de referência. O CDC analisou e concordou com as recomendações da ACCLPP (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012).

De fato, estudos recentes têm demonstrado igualmente que níveis de Pb em sangue entre 10 e 20 $\mu\text{g/dL}$ não são considerados seguros, visto que podem causar distúrbio no sistema nervoso central, especialmente em crianças, alterando as habilidades de raciocínio, concentração memória e aprendizagem (NEEDLEMAN; GATSONIS, 1990; BELLINGER et al., 1991; DIETRICH et al., 1992; WASSERMAN et al., 1998; EMORY et al., 1998, 2003; CANFIELD; HENDERSON; CORY-SLECHTA, 2003; BELLINGER, 2008). Tem-se observado distúrbios de cognição, atenção e comportamento em crianças apresentando níveis de Pb no sangue em torno de 3 a 5 $\mu\text{g/dL}$ (LANPHEAR et al., 2000; CHIODO; JACOBSON; JACOBSON, 2004; CHIODO et al., 2007).

2.1.3 Absorção

A absorção do metal pelo organismo não é dependente, exclusivamente, da quantidade deste no meio ambiente. Alguns fatores como propriedades físico-químicas do composto, associados a fatores genéticos, tempo de exposição, idade, estado fisiológico e nutricional, como níveis de Ca, Mg, Fe, P e vitamina D presentes na dieta, também exercem influência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1977, 1995; SILVA, 2000). A absorção do Pb pode ocorrer mais precisamente por inalação ou ingestão. Estima-se que 35% do Pb inalado é depositado nos pulmões e que por volta de 30 a 50% deste metal seja absorvido pela via pulmonar. Já por via digestiva, a média de absorção é entre 10 e 15%, podendo haver diferenças entre adultos (16%), crianças (50%) e mulheres grávidas (50%), assim como no caso de o indivíduo estar em jejum (80%). A grande variabilidade existente na absorção do Pb pela via digestiva deve-se ao fato desta ser altamente dependente da dieta do indivíduo, ou seja, deficiências de Ca, Fe, P, Mg e proteínas, aumentam a absorção do Pb pela via digestiva, assim como a acidez estomacal. Pela via cutânea, apenas as formas orgânicas do metal podem ser absorvidas (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; MOREIRA; MOREIRA, 2004).

Uma vez absorvido pela corrente sanguínea, o Pb é distribuído por diversos órgãos e sistemas, sendo encontrado no sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; SILVA, 2000). Porém, ele não é homogeneamente distribuído pelo corpo. Ocorre um acúmulo rápido no sangue e tecidos moles, seguido por uma vagarosa redistribuição para o osso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995). O principal sítio de armazenamento é o tecido ósseo, que contém aproximadamente de 90 a 95% do conteúdo corpóreo total (SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996; SANIN et al., 1998), com meia vida de 27 a 36 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; SILVA, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004). De acordo com Silva (2000), após cair na corrente sanguínea e impregnar os tecidos, o metal volta à circulação, aumentando sua quantidade no sangue e aumentando a intoxicação ao longo dos anos. Além disso, a porcentagem de retenção do Pb para o corpo e seu

armazenamento, é muito maior em crianças e fetos, quando comparados aos adultos.

2.1.4 Excreção

As vias urinária e digestiva são as vias primárias de excreção do Pb, seguidas pelas vias secundárias (bile, suor, cabelo, unha, leite materno, entre outras) com menor importância (MOREIRA; MOREIRA, 2004). Cerca de 90% de Pb ingerido é eliminado pelas fezes e urina sob a forma de sulfetos insolúveis.

2.1.5 Biomarcadores

O biomarcador mais comumente utilizado para se medir a dosagem do Pb no corpo é o sangue (RABINOWITZ, 1995; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; SILVA, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004). Também são utilizados a urina o esmalte dentário (RABINOWITZ, 1995; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; SILVA, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004; GOMES et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007, 2008; OLYMPIO et al., 2009).

Embora o sangue seja o biomarcador mais utilizado para medir a dosagem de Pb no organismo (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999), esta medida se refere somente à exposição ambiental recente, ao contrário do osso que reflete a exposição acumulada (MOREIRA; MOREIRA, 2004; OLYMPIO, 2009). A dosagem do Pb no sangue é menor do que 2% do seu total no corpo. Destes, aproximadamente 5% estão presentes no plasma, representando a fração lábil e biologicamente ativa do Pb (MOREIRA; MOREIRA, 2004). A determinação do Pb no plasma promove uma medida mais exata do que no sangue, visto que este componente do plasma contém o Pb livre para cruzar as membranas celulares e causar seus efeitos tóxicos (HIRATA et al., 1995; BARBOSA et al., 2006).

2.1.6 Intoxicação e sintomatologia

A intoxicação por Pb pode comprometer vários sistemas fisiológicos. Clinicamente, os mais sensíveis são os sistemas nervoso central, hematopoiético, gastrointestinal, cardiovascular, musculoesquelético e reprodutor (CAVALIERI-COSTA et al., 1994; SILVA, 2000; BECHARA, 2004; MOREIRA; MOREIRA, 2004; MAINENTI, 2006). No sistema nervoso, tanto a porção central quanto a porção periférica podem ser acometidas pelo Pb, embora a literatura demonstre que existe uma sensibilidade maior para alterações do sistema nervoso central em crianças (TOSCANO; GUILARTE, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

Como sintomatologia da intoxicação por Pb, a literatura demonstra quadros de déficits na atenção e vigília (WINNEKE et al., 1983; LIPPMANN, 1990; WHITE et al., 1993; MORGAN et al., 2001; BELLINGER, 2008), prejuízos cognitivos (WHITE et al., 1993; PAYTON et al., 1998; BELLINGER, 2008), na função psicomotora, memória de curto prazo, habilidades visoespaciais e disfunção de linguagem (WHITE et al., 1993; CORDEIRO et al., 1996). Bechara (2004) verificou que crianças com dosagem de Pb acima de 10 µg/dL podem ainda apresentar, desde apatia, dores de cabeça, convulsões, diminuição de QI, perda de audição, comportamento agressivo, retardamento mental, dores abdominais, nas articulações, nefropatia e anemia, até mesmo morte dependendo no nível de Pb no sangue.

2.1.7 Ações do Pb a nível molecular e celular

Acredita-se que uma grande parte do dano causado pelo Pb na fisiologia celular seja devido à sua habilidade em substituir diversos cátions polivalentes (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} e outros cátions divalentes) em seus sítios de ligação (GODWIN, 2001). Estas interações permitem que o Pb afete diferentes processos biologicamente significativos, como o metabolismo energético, apoptose, maturação protéica e regulação genética. Estes processos podem ocorrer, em parte devido a disfunções mitocondriais causadas pelo Pb (GILMORE; WILSON, 1999; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003), visto que o início dos processos degenerativos coincide com um fenômeno

conhecido como permeabilidade de transmissão, a qual está associada a um colapso do potencial da membrana mitocondrial (ZORATTI; SZABO, 1995).

O Pb pode causar ainda efeitos tóxicos por estresse oxidativo (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003), devido ao acúmulo de radicais livres. Os radicais livres estão envolvidos em muitos processos normais e patológicos (BECHARA, 1996), e seu acúmulo pode causar danos à estrutura das biomoléculas de DNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares (MONTEIRO; BECHARA; ABDALLA, 1991). Tais danos podem resultar em disfunções e morte celular, principalmente para as células neuronais que são altamente sensíveis a esses radicais livres (MONTEIRO; BECHARA; ABDALLA, 1991; DEMASI et al., 1996; KIM; WON, GWAG, 2002; ADHIKARI et al., 2006).

2.2 FERRO

O Ferro (Fe) faz parte integral do metabolismo corpóreo devido a sua habilidade de ganhar e perder elétrons com facilidade (MILLS et al., 2010). Ele é essencial nos processos celulares básicos como, gerar ATP mitocondrial e replicação do DNA, age como um precursor na divisão celular de células cerebrais como astrocitos e oligodendrócitos, além de ser utilizado em várias funções neuronais, como síntese do neurotransmissor dopaminérgico e mielinização dos axônios (ZECCA et al., 2004; KE; QIAN, 2007; MOSS et al., 2007; LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; TODORICH et al., 2009; MILLS et al., 2010). Em condições normais, a maior parte do Fe corpóreo se liga a proteínas específicas, sendo que o restante, que é considerado biodisponível (lábil), encontra-se ligado a ligantes de baixo peso molecular (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009). Assim, setenta por cento do Fe total corpóreo é utilizado nas hemoglobinas, 10% nas mioglobinas, e a porção biodisponível (lábil) em outras proteínas heme. O Fe não heme se liga para transportar e armazenar proteínas e enzimas (GUTTERIDGE; QUINLAN, 1992; LEVENSON; TASSABEHJI, 2004; LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009).

O sistema nervoso central consome cerca de 20% da energia corpórea e é rico em Fe (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009). Seu nível em tecidos específicos é regulado para satisfazer as necessidades do metabolismo especializado e evitar a

citotoxicidade (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; MILLS et al., 2010). A absorção do mesmo é bem controlada por um mecanismo conhecido por homeostase do Fe (MILLS et al., 2010). No cérebro, a manutenção desta homeostase é muito importante, mas os mecanismos que envolvem a absorção do Fe no cérebro ainda não são muito bem compreendidos (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009).

O sistema nervoso é separado da circulação sistêmica pela barreira sanguínea cerebral e pela barreira fluídica sanguínea cerebroespinal encontrada no plexo coróide (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009). Os capilares do plexo coróide são fenestrados e permitem a passagem de substâncias, como nutrientes e drogas, entre as células. Acredita-se que ambas funcionam como porta de entrada do Fe no cérebro (RICHARDSON; PONCA, 1997; FILLEBEEN et al., 1999). Porém, a barreira sanguínea cerebral tem papel importante na limitação da entrada do Fe no cérebro pela via sanguínea por um sistema altamente regulado denominado transporte seletivo (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009). De acordo com Li, Swiercz e Englander (2009), existem células específicas para o transporte de Fe que determinam o nível de Fe absorvido, utilizado e armazenado, sendo que estas apresentam receptores transferrina (a maior proteína que armazena Fe), ferritina e transportadores de metal divalente.

Para o sistema nervoso ele é essencial para a vida ou tóxico quando seus níveis não estiverem bem regulados (HOROWITZ; GREENAMYRE, 2010; MILLS et al., 2010). No cérebro, a perda da homeostase pode ocorrer por condições agudas, como disfunção neuronal causada por Acidente Vascular Cerebral (quando a barreira sanguínea cerebral é comprometida), ou doenças neurológicas progressivas, como Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, além de ferritinopatias hereditárias e acúmulo de Pb e Cádmio (Cd) no plexo coróide (GUTTERIDGE, 1992; ZHENG, 2001; CURTIS et al., 2001; KE; MING QIAN, 2003; HOROWITZ; GREENAMYRE, 2010).

A absorção de Fe pelo cérebro é maior na criança quando comparado ao adulto, devido ao crescimento e desenvolvimento do mesmo. A deficiência do Fe tem um impacto negativo significativo para o desenvolvimento do cérebro e cognição (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009), principalmente quando ocorre no período de desenvolvimento cerebral, pois pode levar a alterações neurológicas como anemia precoce com posterior retardo mental (MILLS et al., 2010). O efeito da deficiência

celular de Fe pode ser atribuído à diminuição da atividade da redutase de ribonucleotídeos (JORDAN; REICHARD, 1998), uma enzima dependente de Fe que converte os ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos, como um pré-requisito para a síntese de DNA. Como resultado, ocorre uma paralisação do crescimento das células deficientes em Fe na fase S do ciclo celular (TOMOYASU et al., 1993).

Por outro lado, os mecanismos envolvidos na patofisiologia do excesso de Fe no cérebro são complexos (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009). O Fe possui a propriedade de doar elétrons para o oxigênio e o aumento dos níveis de Fe pode permitir a formação de radicais e ânions hidroxil via reação de *Fenton* ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$), e devido à peroxidação de lipídeos ser dependente de Fe^{2+} , também podem ser gerados radicais peroxil e acoolxil. Tais espécies reativas de oxigênio podem danificar macromoléculas celulares como proteínas, lipídeos e DNA (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; MILLS et al., 2010). Assim, ocorrem modificações que alteram propriedades básicas de proteínas reparadoras, incluindo atividade catalítica, de ligação ao DNA, estabilidade e compartimentalização. O Fe livre também pode aumentar de forma geral o dano oxidativo por gerar radicais livres que comprometem a integridade do DNA genômico, levando a danos pela perda do processo de reparo de DNA no cérebro (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009). Mesmo uma sobrecarga moderada de Fe pode afetar a capacidade de reparo do DNA e, conseqüentemente, comprometer a integridade genômica, levando a sequelas deletérias em longo prazo, incluindo disfunção neuronal e morte (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009).

2.2.1 Pb x Fe

De acordo com Rondó et al. (2006) a associação entre o Fe e Pb no organismo tem sido amplamente estudada, porém os resultados ainda são bem inconsistentes. Alguns estudos apontam que o Pb inibe a síntese da hemoglobina e diminui o tempo de vida dos eritrócitos circulantes resultando na estimulação da eritropoiese (HU et al., 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 1999; PEROTTONI et al., 2005). Em longo prazo, estes efeitos acabam por resultar em anemia. Tais

mecanismos podem estar relacionados com a inibição de diversas enzimas na síntese do grupo heme por ação do Pb, como ácido δ -amino levulínico sintetase, ácido δ -amino levulínico desidratase (ALAD), porfirinogênio deaminase, uroporfirinogênio descarboxilase, coproporfirinogênio oxidase e ferroquelatase, sendo que os efeitos sobre a ALAD agem provocando o acúmulo de ácido δ -amino levulínico (ALA), o que por sua vez proporciona danos oxidativos causando formação de espécies reativas (ONALAJA; CLAUDIO, 2000). Além disso, a inibição da ALAD também resultaria no aumento do ácido gama aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central.

Os eritrócitos têm uma alta afinidade pelo Pb e carregam a maioria do metal encontrado na corrente sanguínea. Este, por sua vez, induz mudanças na composição de proteínas e lipídeos da membrana eritrocitária, causando danos oxidativos, contribuindo para alterações de membrana e, conseqüentemente, diminuição da sobrevivência dos eritrócitos (LEGGETT, 1993; GURER-ORHAN; SABÝR; ÖZGUNE, 2004). A eritropoietina, fator de crescimento que atua sobre a linhagem eritróide, também está diminuída por ação do Pb (PORCELLI et al., 2002). Sendo assim, acredita-se que quando o indivíduo apresenta a anemia, os níveis de eritrócitos são menores e o Pb fica mais disponível no plasma, daí a maior toxicidade do metal nestes indivíduos.

O Pb também pode ser capaz de competir com o Fe, inibindo sua ligação com a proteína transportadora DMT1 (*Divalent Metal Transporter1*), já que esta pode transportar outros íons divalentes como o cobre, zinco e Pb, quando há deficiência de Fe no organismo (SOUZA; TAVARES, 2009; ALABDULLAH et al., 2005). Diante disto, tem sido recomendada a suplementação de Fe em crianças com risco de intoxicação por Pb, porém como a sobrecarga de Fe no organismo é muito prejudicial, mais estudos são necessários antes de adotar esta medida terapêutica (AHAMED; SIDDIQUI, 2007; SOUZA; TAVARES, 2009).

Bradman et al. (2001) avaliaram 319 crianças, de 1 a 5 anos, comparando os níveis de Pb no sangue de crianças com e sem deficiência de Fe, residentes em regiões com baixos, médios e altos níveis de contaminação por Pb. A média do nível de Pb no sangue foi de 4,9 $\mu\text{g/dL}$, sendo que 14% das crianças apresentaram índices acima de 10 $\mu\text{g/dL}$; muitas crianças apresentaram deficiência de Fe (24% com ferritina <12 ng/dL). Foi observado níveis elevados de Pb no sangue entre

crianças com deficiência de Fe, sendo que este persistiu após o ajuste de possíveis fatores de interferência. A regressão multivariada demonstrou que a maior diferença nos níveis de Pb no sangue entre as crianças com deficiência de Fe e normais foi em torno de 3 µg/dL. Estes autores apontam como mecanismo provável para a maior absorção de Pb, a substituição de Fe^{+2} por Pb^{+2} no sistema hematopoiético, aumentando o transporte ativo para o corpo e reduzindo a sua excreção.

Rondó et al. (2006) avaliaram a relação existente entre o Pb, hemoglobina, zinco protoporfirina e ferritina em crianças anêmicas e não anêmicas expostas ao Pb, e verificaram que este estava negativamente associado com a hemoglobina ($p < 0,017$), e positivamente associado com a zinco protoporfirina ($p < 0,004$), além de existir uma associação inversa entre as concentrações sanguíneas de hemoglobina e Pb, em crianças anêmicas. Neste estudo, os autores detectaram que há relação entre a anemia e níveis elevados de Pb no sangue, e sugeriram estudos epidemiológicos investigando o impacto de intervenções nutricionais com Fe na tentativa de diminuição dos níveis sanguíneos de Pb em crianças.

No que diz respeito aos efeitos da interação do Pb com Fe a nível celular, tem sido relatado que o tratamento com Pb rompe a homeostasia celular do Fe, o que pode contribuir com a apoptose celular induzida pelo Pb em nível do córtex cerebral (WANG et al., 2007a). Ele interfere no transporte normal do Fe pela transferrina e inibe a endocitose da transferrina e o transporte de Fe pela membrana celular do reticulócito (QIAN; MORGAN, 1990). Ao nível da membrana celular, o Pb produz danos peroxidativos a lipídeos e proteínas. Este efeito parece ser causado por uma combinação de mecanismos, como liberação de Fe (o que, por sua vez, está relacionado à formação de radicais livres), perturbação de mecanismos antioxidantes e efeitos oxidativos diretos do Pb (ADONAYLO; OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001). Estes mecanismos poderiam justificar a neurotoxicidade causada pelo Pb.

Tiffany-Castiglioni et al. (1987, 1988) trataram células da glia em cultura com Pb, com o intuito de verificar a relação existente entre este metal e a viabilidade do Fe e Cu em nível extra e intracelular. Os autores verificaram que o oligodendrócito foi o tipo celular mais sensível ao tratamento com Pb, sendo que após 4 a 11 dias de descontinuidade da exposição ao Pb, os oligodendrócitos foram

capazes de incorporar o Fe, porém, foi necessário uma alta concentração de Fe extracelular para alcançar os níveis de Fe intracelular comparáveis ao Pb, mas as concentração de Fe e Cu intracelular não foram afetadas. Por outro lado, o mesmo tratamento realizado para o tipo celular astrócito, demonstrou altos níveis de Fe e Cu intracelular quando do tratamento com Pb. Assim, os autores confirmam a hipótese de que elevados níveis intracelulares de Cu e Fe constituem-se em um mecanismo subcelular de neurotoxicidade.

Wang et al. (2007a) com o intuito de verificarem os efeitos da suplementação com Fe para prevenir a apoptose de células cerebrais induzida pelo Pb, avaliaram ratos machos (20-22 dias) com massa corporal de 30-50 g que receberam acetato de sódio em água de beber para o grupo controle e, no grupo experimental água de beber com acetato de Pb (400 µgPb/ml) e água de beber com acetato de Pb (342 µgPb/ml) + gavagem gástrica de FeSO₄ dia sim, dia não (20 mgFe/Kg para o terceiro grupo e 40 mgFe/Kg para o quarto grupo). Os autores verificaram que os animais expostos ao Pb apresentaram fragmentação de DNA, aumento na porcentagem da positividade para o TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling) e aumento de ativação de caspase 3, além de diminuir a concentração de Fe no córtex cerebral, quando comparados ao grupo controle. Nos animais suplementados com ambas as concentrações de Fe, o menor nível deste (20 mgFe/kg) restabeleceu as concentrações normais no cérebro, ao contrário do maior nível (40 mgFe/kg). Por outro lado, ambos reduziram a fragmentação de DNA, mostraram pouca porcentagem da positividade para o TUNEL e diminuíram a degradação da procaspase 3. Os autores acreditam que a suplementação com FeSO₄ (20 mg/Kg peso corporal) pode proteger contra a citotoxicidade e a apoptose induzidas pelo acetato de Pb (400 mg/L administrado na água de beber por 6 semanas). As vias envolvendo as MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos) parecem desempenhar um importante papel na apoptose cerebral induzida pelo Pb, ativando a via da MEK/ERK (receptor extracelular de quinases), que suprime a sinalização por JNK (quinase c-jun NH₂-terminal).

Wang et al. (2007b) com o intuito de verificarem os efeitos da suplementação com Fe para prevenir os danos que o Pb causa na barreira sanguínea cerebral, avaliaram ratos machos (20-22 dias) com massa corporal de 30-50 g que receberam acetato de sódio em água de beber para o grupo controle e, no

grupo experimental água de beber com acetato de Pb (342 µgPb/ml) e água de beber com acetato de Pb (342 µgPb/ml) + gavagem gástrica de FeSO₄ dia sim, dia não (7 mgFe/Kg para o terceiro grupo e 14 mgFe/Kg para o quarto grupo). Os autores verificaram que os animais expostos a Pb apresentaram, comparados ao grupo controle, níveis significativamente maiores de Pb no sangue e tecido cerebral; a microscopia eletrônica mostrou imagens sugestivas de edema cerebral, enquanto que o *Western blotting* mostrou que o tratamento com Pb reduziu de 29 a 68% a expressão de *occludin*; já os animais suplementados com baixo nível de Fe (7 mgFe/Kg) mostraram níveis mais reduzidos de Pb em sangue e cérebro, além de restaurarem a estrutura cerebral normal e a expressão de *occludin*; Por outro lado, os animais suplementados com 14 mgFe/Kg tiveram níveis mais altos de Pb em sangue e no córtex cerebral quando comparados aos demais grupos, porém a expressão de *occludin* também foi restaurada. Os autores concluíram que o Pb aumenta a permeabilidade da barreira sanguínea cerebral, facilitando o acúmulo deste metal no tecido cerebral, mas baixas doses de suplementação com Fe diminuem os efeitos tóxicos do Pb no cérebro.

Recentemente, Ferreira (2012) avaliou marcadores de estresse oxidativo no cérebro de ratos tratados com acetato de Pb (100 ou 400 mg/L) na água de beber, associado ou não a suplementação com FeSO₄ (20 mg/Kg de peso corporal) administrado por gavagem gástrica, a cada 2 dias. Os grupos controle receberam água deionizada e gavagem ou não com FeSO₄. A atividade das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase e a concentração de glutathione reduzida diminuíram nos grupos experimentais em relação ao controle. Hidroperóxido de lipídio apresentou tendência de aumento nos grupos experimentais sem suplementação com ferro, enquanto que a catalase demonstrou tendência de aumento na atividade em relação ao controle. A autora concluiu que as enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase e a glutathione reduzida no cérebro podem ser afetadas pelo acetato de Pb e o tratamento com FeSO₄ pode afetar esta dinâmica. Porém, estudos adicionais são necessários para se verificar se o FeSO₄ funcionaria como protetor ao efeito do Pb.

2.3 O Pb NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O Pb é capaz de danificar qualquer atividade biológica, sendo os sistemas enzimáticos potencialmente susceptíveis aos metais pesados. A toxicidade por Pb gera desde alterações em níveis clínicos a alterações bioquímicas, sendo estas últimas mais sutis. Este metal é capaz de alcançar e se acumular em quase todos os órgãos do corpo humano, porém no sistema nervoso central os efeitos do mesmo são mais deletérios e ocorrem em longo prazo (VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008; SHARIFI; MOUSAVI; JORJANI, 2010).

Acredita-se que a via de entrada do Pb no cérebro é por meio do plexo coroide, visto que este é o responsável pela estabilidade química do cérebro (ZHENG et al., 2003). Metais pesados como Pb, cádmio, mercúrio e arsênio tendem a se acumular no plexo coroide e no tecido cerebral em concentrações muito maiores do que aquelas observadas no fluido cerebrospinal, e o acúmulo destes metais causa danos morfológicos e funcionais nesta estrutura (ZHENG, 2001).

Alguns mecanismos são propostos para a neurotoxicidade do Pb, como estresse oxidativo, alterações biofísicas de membrana, alterações na sinalização celular e perda de neurotransmissores.

Estas alterações que ocorrem em nível molecular podem levar a danos no sistema cognitivo. De acordo com Otto e Fox (1993) os efeitos da exposição ao Pb na função cognitiva têm sido amplamente estudados, devido aos déficits causados no processamento visual e auditivo que refletem no processo de aprendizagem.

Lidsky e Schneider (2003) em um estudo de revisão apontaram como efeitos neurotóxicos do Pb no desenvolvimento do sistema cognitivo:

- **Apoptose ou morte celular programada.** Esta pode ser induzida por uma variedade de estímulos extrínsecos ou intrínsecos. Uma disfunção mitocondrial promove a abertura do poro de transição permitindo a despolarização mitocondrial, liberação do citocromo C, a ativação de uma variedade de caspases, clivagem de proteínas efetoras *upstream* de morte, resultando em morte celular. Um aumento intracelular de Ca^{2+} é um dos principais gatilhos e o acúmulo de Pb é outro, pois o Pb

rompe a homeostase do Ca^{2+} , causando um acúmulo deste em células expostas ao metal.

- **Efeitos no mecanismo regulatório intraneuronal.** O Pb substituindo o Ca^{2+} afeta a atividade dos segundos mensageiros. Em pequenas concentrações atua ativando a Calmodulina e, em altas concentrações, reduz sua atividade, influenciando na homeostase intracelular do Ca^{2+} .

O Pb também pode afetar a proteína quinase C, que participa de muitas funções celulares como na proliferação e diferenciação celular, e na plasticidade neuronal que está envolvida nas funções cognitivas de memória e aprendizagem.

- **Neurotransmissores.** Em nível pré-sináptico, o Pb afeta os canais de Ca^{2+} suprimindo sua atividade para a liberação de acetilcolina, dopamina e os neurotransmissores aminoácidos, além de aumentar o número de vesículas para a liberação do neurotransmissor. Associado a isto, afeta o armazenamento e liberação de neurotransmissores, como também altera os receptores do neurotransmissor, principalmente para o glutamato. Os sistemas de dopamina também sofrem efeitos negativos pelo Pb.
- **Efeitos sobre as células da glia.** O Pb é tóxico para a oligodendroglia e astroglia. Acredita-se que o acúmulo de Pb nos astrócitos pode servir para proteger os neurônios dos efeitos tóxicos desse metal, porém pode constituir um reservatório para a liberação contínua de Pb no cérebro, contribuindo para o dano de neurônios nas proximidades.

As alterações moleculares descritas acima são capazes de interferir em habilidades importantes para o desenvolvimento neurológico e psiquiátrico. Os danos cerebrais causados pelo Pb ocorrem preferencialmente no córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo, sendo estas regiões responsáveis pelas funções cognitivas, de execução de padrões motores, e de memória, respectivamente. Além disso, estes centros anatômicos modulam as respostas emocionais, memória, comportamento, aprendizagem e funções neuromusculares (VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008).

2.3.1 Efeitos da exposição ao Pb no hipocampo

O hipocampo apresenta duas propriedades básicas relacionadas à neuroplasticidade, sendo estas a potenciação de longa duração e a neurogênese em cérebros maduros (ALTMAN; DAS, 1965). Esta última caracteriza-se pelo nascimento de novos neurônios no giro denteado por toda a vida. Estruturalmente, a zona subgranular do giro denteado é abundante em células tronco que são capazes de se dividir e se diferenciar em neurônios. Estas células migram para a camada granulosa, expressam fenótipos neuronais, recebem contatos sinápticos, realizam conexões sinápticas funcionais e exibem atividade dependente de potenciação de longa duração (WANG; SCOTT; WOJCIOWICZ, 2000; GILBERT et al., 2005; XU et al., 2009). A presença de células tronco no cérebro maduro também serve como uma reserva de células neuronais para substituir células que morreram como resultado de várias injúrias ou doenças (GILBERT et al., 2005).

Os mecanismos que controlam a neurogênese no hipocampo são desconhecidos. Porém, sabe-se que a mesma está relacionada a fatores genéticos, infecções virais pré natais, idade, dieta e estresse psicossocial (GILBERT et al., 2005). O nascimento e a sobrevivência de novas células no giro denteado são aumentados por estimulação ambiental, redução da ingestão calórica, atividade física, aprendizado (hipocampo-dependente), e ativação fisiológica (atividade neuronal), ou insultos patológicos. A diminuição no nascimento destas células ocorre por estresse, idade e exposição crônica a drogas, incluindo opioides e álcool (LIU et al., 1998; EISCH et al., 2000; SHARMA et al., 2000; DERRICK; YORK; MARTINEZ; 2000; KEMPERMANN; GAST; GAGE, 2002; HERRERA et al., 2003). Alterações nas células tronco neuronais podem justificar alterações subjacentes do déficit de aprendizado e memória (XU et al., 2009).

Exposição ao Pb no desenvolvimento causa perda da função cognitiva em crianças e animais e reduz a plasticidade sináptica ativa-dependente no hipocampo de ratos (LASLEY; GILBERT, 2002; GILBERT et al., 2005; VERINA; ROHDE; GUILART, 2007; XU et al., 2009).

Altos níveis de Pb podem causar encefalopatias, coma, convulsão e morte. Por outro lado, exposição a baixas doses, podem levar à manifestação, em longo prazo, de perda na função intelectual e no comportamento afetivo, ausência

de manifestações aparentes na morfologia do cérebro ou déficits neurológicos evidentes (GILBERT et al., 2005). Já é certo que crianças expostas a baixos níveis de Pb durante o processo de desenvolvimento apresentam redução na capacidade cognitiva. O Pb pode interferir em mecanismos subjacentes à plasticidade neural, incluindo liberação de neurotransmissores, atividade da proteína quinase C (PKC) (GOLDSTEIN, 1990; LASLEY; GILBERT, 2002). Além disso, podem ocorrer alterações nas propriedades funcionais glutamatérgica, colinérgica e dopaminérgica dos neurotransmissores e o sinal de transdução, perda na indução, expressão e manutenção da potenciação de longa duração no hipocampo, que tem um importante papel na regulação do desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (GILBERT; MACK, LASLEY, 1996, 1999a, 1999b; LASLEY; GILBERT, 2000).

N-Metil-D-Aspartato é um subtipo de aminoácido excitatório que se expressa abundantemente no hipocampo. Estudos mostraram que na exposição crônica ao Pb durante os primeiros anos de vida, a expressão do N-Metil-D-Aspartato é alterada, e este efeito em longo prazo é associado com a perda da potenciação de longa duração (LASLEY; GILBERT, 2002; GILBERT et al., 2005; VERINA; ROHDE; GUILART, 2007; XU et al., 2009; NEAL; STANSFIELD; GUILARTE, 2012).

A diminuição na neurogênese das células granulares causada pelo Pb pode influenciar na inervação da região CA3 do hipocampo, alterando a conectividade neuronal, a excitabilidade das células piramidais e a formação da memória (VERINA; ROHDE; GUILART, 2007).

A expressão protéica de certas proteínas cerebrais já foi estudada. Lui et al. (2008) observaram os efeitos da exposição crônica ao Pb na expressão das proteínas quinase (PKC) e calmodulina (CaM) no hipocampo de ratos bebês. A espectrometria de absorção atômica foi utilizada para determinar a quantidade de Pb no cérebro dos ratos, que foi muito maior nos cérebros dos animais expostos ao Pb quando comparados aos grupo controle, e a análise por *Western blotting* foi utilizada para observar a expressão protéica da PKC e CaM, demonstrando um decréscimo no nível da expressão destas no hipocampo, o que pode ser relacionado a um dos mecanismos moleculares da perda da aprendizagem e memória que ocorrem na exposição ao Pb.

Ainda verificando a expressão de proteínas específicas, Gu et al. (2009) avaliaram o RNAm e os níveis de proteínas DMT1 (responsável pelo transporte de metais bivalentes pela membrana) no cerebelo, córtex e hipocampo, de 24 ratos que foram tratados intragastricamente com Pb, Cd ou não (controle). O nível de RNAm da DMT1 não diferiu entre os grupos, entretanto a expressão da proteína DMT1 foi significativamente aumentada no cerebelo, córtex e hipocampo dos animais tratados por Pb e Cd. Tais metais induzem a síntese da proteína DMT1 e têm implicação no transporte de íons tóxicos no cérebro de ratos em desenvolvimento.

Sendo assim, sugere-se que estas sejam algumas das explicações dos mecanismos envolvidos nas manifestações clínicas associadas com a exposição precoce ao Pb, como déficits cognitivos.

2.4 O Pb NO SISTEMA AUDITIVO

De acordo com Alvarenga (2005), apesar de haver inúmeros estudos na literatura sobre os efeitos da contaminação por Pb no organismo, principalmente com relação às desordens neurológicas, ainda existem muitos pontos obscuros em relação à função auditiva. Alguns trabalhos já demonstraram que o sistema auditivo pode estar alterado tanto em sua porção periférica (REPKO; CORUM, 1979; SCHWARTZ; OTTO, 1987, 1991; FORST; FREELS; PERSKY, 1997; FARAHAT et al., 1997; TRONG-NENG et al., 2000), quanto central (HOLDESTEIN et al., 1986; LILLE et al., 1988; DISCALZI et al., 1992; ARAKI et al., 1992; DISCALZI et al., 1993; HIRATA; KOSAKA, 1993; ARAKI; MURATA; YOKOYAMA, 1994; ROTHENBERG; POBLANO; GARZA-MORALES, 1994; ARAKI et al., 2000; ROTHENBERG, POBLANO; SCHNAAS, 2000; ALVARENGA et al., 2003; BLEECKER et al., 2003; MONTEIRO et al., 2003; ZOU et al., 2003; MARTINS et al., 2007) ou ambas (OTTO et al., 1985; OSMAN et al., 1999; COUNTER; BUCHANAN, 2002). A localização exata da região cerebral alterada, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nestas alterações, ainda são pouco estudados. Otto e Fox (1993) verificaram em estudo experimental em animais que o nervo coclear e as estruturas mais centrais do sistema auditivo são preferencialmente afetadas pelo Pb no processo de maturação do sistema auditivo, sendo encontradas na porção periférica

alterações na produção de mielina e degeneração de axônio. Clinicamente, Alvarenga (2005) e Alvarenga et al. (2012) não constataram perda auditiva sensorioneural, alterações em células ciliadas externas (CCE) e alterações na porção de nervo auditivo e tronco encefálico, ao avaliar, clinicamente, crianças com plumbemia média estimada por volta de $12,2 \pm 5,7 \mu\text{g/dL}$.

2.4.1 Potenciais Evocados Auditivos

Potencial Evocado Auditivo (PEA) é uma atividade elétrica que ocorre no sistema auditivo, gerada por estímulos sonoros ou elétricos. Esses PEAs, visualizados no registro como ondas, são gerados por diferentes estruturas do sistema auditivo, e podem ser captados por eletrodos implantáveis ou de superfície, localizados em diferentes regiões do crânio de acordo com o Sistema Internacional 10-20 (JASPER, 1958) (Figura 1).

Figura 1 - Desenho esquemático representando os Potenciais Evocados Auditivos de curta, média e longa latência e seus geradores cerebrais

De acordo com Goldstein (1984), a nomenclatura dos PEAs pode obedecer a diferentes critérios, como o tempo (Potencial Evocado Auditivo de Curta Latência – PEACL; Potencial Evocado Auditivo de Média Latência – PEAML; e, Potencial Evocado Auditivo de Longa Latência - PEALL); anatomia (Eletrococleografia – ECoG; Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico – PEATE; Potencial Evocado Auditivo Cortical - PEAC); propriedades específicas dos geradores da resposta (Potenciais Evocados Auditivos Exógenos ou Potenciais Evocados Auditivos Endógenos).

A ECoG, também denominada como um PEACL compreende a atividade elétrica gerada pelas células sensoriais da cóclea e porção distal do nervo auditivo, caracterizada pelo Microfonismo Coclear (MC), um potencial de corrente alternada gerado pelas células ciliadas externas da orelha interna; o Potencial de Somação (PS), um potencial de corrente direta gerado pelo produto de distorção das mudanças iônicas que ocorrem no líquido endolinfático durante a despolarização e hiperpolarização das células ciliadas externas e internas, com maior participação desta última. O mecanismo proposto para gerar este potencial é que durante a estimulação de uma onda sinusoidal na membrana basilar, a mudança de potencial que ocorre na despolarização das células ciliadas, é maior do que na hiperpolarização e, conseqüentemente, a escala média tende a se mover mais negativamente, devido às cargas do potencial endolinfático, enquanto que na hiperpolarização a corrente na célula ciliada é menor do que o normal; o Potencial de Ação (PA) é um potencial de corrente direta que reflete a atividade elétrica gerada na porção distal do nervo auditivo. O MC, clinicamente é considerado sem latência, e o PS é uma deflexão que ocorre em torno de 1 ms anterior ao PA, observado por volta de 1,5 a 2,0 ms após a apresentação do estímulo sonoro ou elétrico no sistema auditivo (PICKLES, 1991).

O PEATE, também denominado como um PEACL compreende a atividade elétrica que ocorre desde a porção distal do nervo auditivo até a região de colículo inferior no tronco encefálico. Seus componentes são sete picos de ondas denominados por algarismos romanos de acordo com seus geradores. Assim, a onda I é o potencial de ação gerado na porção distal do nervo auditivo (PA da ECoG); a onda II reflete o potencial de ação gerado na porção proximal do nervo auditivo; a onda III é gerada nos neurônios que emergem do complexo nos núcleos

cocleares na porção inferior do tronco encefálico; os geradores das ondas IV e V são núcleos do lemnisco lateral superior, com contribuições dos núcleos cocleares, sendo esta última (onda V), seguida por um grande potencial negativo, denominado *Slow Negative 10* (SN10), que é gerado pela despolarização do colículo inferior. As ondas VI e VII são possivelmente geradas por fibras do corpo geniculado medial. As sete ondas do PEATE aparecem por volta de 10 ms após a estimulação no sistema auditivo (STARR; HAMILTON, 1976; HASHIMOTO et al., 1981; MOLLER; JANNETTA, 1982; HALL, 1992; LEVINE et al., 1993; HALL, 2007).

O PEAML possui componentes representados por picos com voltagem positiva (P) ou negativa (N), que são denominadas pela ordem temporal em que são geradas, como Na, Pa, Nb e Pb. Estes podem ser visualizados no intervalo de 10 a 50 ms após a estimulação do sistema auditivo. Por serem mais evidentes, os componente Na e Pa do PEAML são os mais utilizados na prática clínica. Seus geradores são principalmente córtex auditivo primário e secundário, com contribuições de estruturas da região superior de tronco encefálico e tálamo. Sendo assim, o componente Na é gerado na região de tálamo e com contribuição de irradiações tálamo-corticais e o componente Pa se origina bilateralmente de dipolos corticais com participação do córtex auditivo primário, formação reticular do mesencéfalo e corpo geniculado medial (BURKARD; DON; EGGERMONT, 2007).

Os PEAC correspondem atividades elétricas geradas no sistema nervoso auditivo central, mais precisamente na região de córtex auditivo. Seus componentes, assim como nos PEAML, são denominados por picos com voltagem positiva (P) ou negativa (N) e que aparecem por volta de 50 a 250 ms após estimulação auditiva (PICTON; SMITH, 1978; HALL, 1992). O complexo P1-N1-P2 promove informações relacionadas à chegada e detecção da informação sonora em nível de córtex auditivo, podendo medir o início do processamento auditivo nesta região. O componente P1 deste complexo é representado por um pico com voltagem positiva que ocorre por volta de 50-80 ms após o início da estimulação, sendo seus geradores a região do córtex auditivo primário, giro de *Heschl's*, hipocampo, plano temporal e córtex lateral e temporal; O componente N1 deste complexo é representado por um pico com voltagem negativa que ocorre por volta de 100-150 ms após o início da estimulação, apresentando múltiplos geradores na região de córtex auditivo primário e secundário; o componente P2 deste complexo é

representado por um pico com voltagem positiva que ocorre por volta de 150-200 ms após o início da estimulação, e, assim como o N1, este apresenta múltiplos geradores na região de córtex auditivo primário e secundário, além do sistema de ativação reticular mesencefálico (HALL, 1992; BURKARD; DON; EGGERMONT, 2007; POULSEN; PICTON; PAUS, 2007).

Outros componentes do PEAC que refletem habilidades cognitivas do indivíduo relacionadas ao processamento da informação sonora são o N2 e P3. Estes componentes ocorrem por volta de 180-380 ms após o início da estimulação, e é gerado na região de córtex auditivo primário, secundário e sistema límbico, após a atenção e discriminação de um evento distinto na informação sonora (HALL, 1992; POULSEN; PICTON; PAUS, 2007).

Como seus geradores são múltiplas áreas corticais, os PEAC podem ser utilizados para monitorar mudanças neurofisiológicas que ocorrem durante o processo de aprendizagem auditiva (TREMBLAY et al., 2001). Purdy, Kelly e Thome (2001) acreditam que a ferramenta necessária para monitorar tais mudanças que ocorrem no sistema nervoso central são os teste eletrofisiológicos. Sendo assim, o estudo das alterações auditivas centrais decorrentes do Pb que afetam direta ou indiretamente habilidades cognitivas, importantes para o processo de aprendizagem como atenção e memória, podem ser avaliadas pelo PEAC.

2.4.2 Potenciais Evocados Auditivos Corticais em ratos

Os PEAC refletem o início do processamento cortical do som, ou seja, a presença do complexo P1, N1 e P2 determinam que o som foi detectado em nível cortical. Em animais, os PEAC têm sido utilizados principalmente para estudar o impacto de agentes farmacológicos nas funções corticais, além de ajudar a definir a organização das vias auditivas nesta região (SHAW, 1995). Alguns estudos experimentais analisaram os efeitos tóxicos do Pb no sistema auditivo (GOZDZIK-ZOLNIERKIEWICZ; MOSZYNSKI, 1969; WILPIZESKI, 1974; YAMAMURA et al., 1984; HOPPER; KERNAN; LLOYD, 1986; MORSE et al., 1987; YAMAMURA et al., 1989; LILIENTHAL; WINNEKE; EWERT, 1990; LASKY et al., 1995; LILIENTHAL; WINNEKE; EWERT, 1996; NEWLAND et al., 1996; RICE, 1997; LASKY et al., 2001;

LURIE; BROOKS; GRAY, 2006) e verificaram a similaridade entre os geradores dos PEA em humanos e em animais como o macaco (GOZDZIK-ZOLNIERKIEWICZ; MOSZYNSKI, 1969; HOPPER; KERNAN; LLOYD, 1986; MORSE et al., 1987; LILIENTHAL; WINNEKE: EWERT, 1990; LASKY et al., 1995; LILIENTHAL; WINNEKE: EWERT, 1996; NEWLAND et al., 1996; RICE, 1997; LASKY et al., 2001) e ratos (WILPIZESKI, 1974; YAMAMURA et al., 1984; YAMAMURA et al., 1989; EHLERS et al., 1991; OTTO; FOX, 1993; SHAW, 1995; SHINBA, 1997; EHLERS et al., 1998; SHINBA, 1999; SHINBA, 2002; LAZAR; METHERATE, 2003; SAKATA; ONODA, 2006; POULSEN; PICTON; PAUS, 2007), sendo este último o animal mais utilizado como modelo experimental para o estudo dos PEA.

Mais do que a similaridade entre os geradores dos PEA entre humanos e ratos, é muito importante o conhecimento da topografia no modelo animal, a fim de se obter o melhor registro destes potenciais. Os componentes P1 e N1 são similares entre ratos e humanos em termos de superfície topográfica, já o componente P2 no rato difere do humano em termos de topografia e função, pois o P2 em humanos é proeminente na região frontal e resistente às mudanças em nível de atenção. Ao contrário, no rato, as maiores amplitudes deste componente são registradas na região parietal, sofrendo variação quando da execução de atividade de identificação do paradigma ativo, ou seja, em *oddball paradigm*. O componente P3 pode ser identificado no rato tanto no paradigma passivo quanto no ativo e é correspondente aos componentes P3a e P3b no humano (SHINBA, 1997). Neste estudo, Shinba (1997) utilizou seis ratos Fisher (machos) com massa corporal variando entre 378-465 g, cujos eletrodos implantáveis foram inseridos cirurgicamente nas regiões frontal, temporal e parietal. Os parâmetros utilizados para gerar os PEA foram tom puro de 10 ms de duração apresentados em *oddball paradigm* (10 kHz para o estímulo raro e cinco kHz para o estímulo frequente) na intensidade de 85 dB SPL e probabilidade de um para quatro, sendo utilizado *cutoff filter* de 1 kHz. Como resultado, foram obtidos os componentes P1, N1, P2, N2 e P3 do PEAC, cujas latências variaram de 12,7 a 37,7 ms; 40,0 a 80,6 ms; 91,7 a 202,7 ms; 183,7 a 246,7 ms; e, 265,7 a 462, 7 ms, respectivamente. Para o estímulo frequente, a amplitude foi maior quando registrada nas regiões frontal e parietal para o componente P1; na região parietal para o componente N1, e nas regiões temporal e parietal para o componente P2. O mesmo ocorreu para a latência do componente P1

que foi maior quando registrada na região frontal e o componente P2 nas regiões temporal e parietal. Para o estímulo infrequente, a amplitude do componente N2 foi maior região frontal. O componente P3 mostrou latências maiores e amplitudes menores para o estímulo frequente, comparado ao estímulo infrequente. Shinba (1999) avaliou os PEAC em ratos para verificar o papel do hipocampo para gerar estas respostas. Para tanto, utilizou três ratos machos (*Wistar*) que receberam eletrodos implantáveis diretamente nas fibras do hipocampo dorsal (ativo), na região superficial cortical (ativo) e seio nasal (referencia). Para gerar as respostas, foram utilizados tom infrequente de 10 kHz e frequente de cinco kHz (85 dB SPL e 10 ms de duração) com probabilidade de 1/4. Para o registro das respostas, foi utilizado filtro ajustado de 0,5 a 100 Hz. Na superfície cortical foram obtidas respostas com maior amplitude no estímulo infrequente para os componentes P2, N2 e P3 com latências por volta de 100, 200 e 450 ms, respectivamente; para o estímulo frequente os componentes N2 e P3 foram observados, porém não foram muito evidentes.

Shinba (2002) avaliou o PEAC de três ratos Fisher (machos) com massa corporal variando entre 274 e 307 g e os eletrodos foram posicionados superficialmente e outro inserido nas fibras dos neurônios do córtex medial agranular na região pré-frontal. Para gerar as respostas foram utilizados tom infrequente de 10 kHz e frequente de cinco kHz (85 dB SPL e 10 ms de duração) com probabilidade de 1/4. Para o registro das respostas, foi utilizado filtro ajustado de 0,5 a 100 Hz. Os PEAC foram registrados tanto superficialmente quanto nos eletrodos inseridos nas fibras neuronais, sendo identificados os componentes P100, N *late* e P *late*, assim denominados pelo autor, cujas latências foram 103,4 ($\pm 15,9$); 274,3 ($\pm 90,9$); 488,8 ($\pm 122,0$) para os eletrodos superficiais e 96,9 ($\pm 8,0$); 254,6 ($\pm 99,9$); 449,8 ($\pm 136,8$) ms, para os eletrodos inseridos na fibras neuronais, respectivamente. Os autores concluíram que o componente P100 é relativo à atividade das fibras dos neurônios do córtex medial agranular na região pré-frontal, sendo mais evidente em estado de atenção ao estímulo e, correspondente aos componentes negativos e P3a nos humanos. Além disso, os componentes P *late*, que foram mais evidentes após o estímulo infrequente, são correspondentes ao componente P3b.

Ainda com o objetivo de avaliar os geradores dos PEAC, alguns estudos utilizaram técnica de lesão. Ehlers et al. (1991) utilizaram ratos *Wistar* (machos) com

massa corporal variando entre 280 e 300 g, dos quais nove sofreram lesão encefálica bilateralmente na região ventral segmental por injeção de 6-hidroxidopamina administrada por um período de seis minutos, e oito sofreram depleção da serotonina. Eletrodos implantáveis foram inseridos cirurgicamente nas regiões de hipocampo, amígdala e córtex frontal em todos os grupos. Os parâmetros utilizados para gerar os PEAC foram tom puro de 20 ms de duração apresentados em *oddball paradigm* (1 kHz para o estímulo raro e 2 kHz para o estímulo frequente) nas intensidade de 70 e 85 dB-SPL, respectivamente, em campo livre com caixas acústicas posicionadas a 20 cm acima da cabeça do animal; filtro passa banda ajustado de 0,3 e 70 Hz. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que não houve diferença nos PEAC entre os animais saudáveis e os lesionados. Na região de córtex auditivo, considerando ambos os estímulos frequente e infrequente, foram identificados os componentes P1 e N1 com latências de 25 ms e de 50-100 ms, sendo ainda possível identificar os componentes N1a e N1b com latências variando entre 50-70 ms e 80-100 ms, respectivamente; na região do hipocampo foram obtidas latências de 25 ms para o componente P1, 40-60 ms para o componente N1, 100-200 ms para o componente P2; considerando ambos os estímulos frequente e infrequente, a amplitude foi significativamente maior para todos os componentes na apresentação do estímulo infrequente; na região da amígdala foram identificados os componentes P1, N1 com latências variando entre 50 e 150 ms, seguido pelo complexo de ondas P2-P3. Os autores concluíram que os PEAC (P1, N1, P2, N2 e P3) são passíveis de registro em ratos, sendo este um modelo experimental em potencial para o estudo de medidas eletrofisiológicas.

Ehlers et al. (1998) avaliaram os PEAC gerados nas regiões da amígdala, córtex frontal, núcleo acumbente e hipocampo em 50 ratos *Wistar*, dos quais 20 sofreram lesão na região do núcleo basal. Os estímulos utilizados foram tom de 2 kHz (20 ms, 60 dB e 15% de apresentação) e tom de 1 kHz (20 ms, 60 dB e 85% de apresentação) e os parâmetros para o registro foram eletrodos implantados nas regiões da amígdala, córtex frontal, núcleo acumbente e hipocampo. Os resultados encontrados demonstraram que houve redução significativa no componente N1 na região de córtex frontal e no componente P2 na região da amígdala quando os animais não recebiam a recompensa (alimento) associada à discriminação do estímulo raro; a lesão na região do núcleo basal não alterou a morfologia dos PEAC.

O estudo dos diferentes parâmetros para o registro dos PEAC também pode ser realizado utilizando o rato como modelo experimental. Shaw (1995) utilizou nove diferentes extensões de filtros passa banda (filtro passa alta com frequência de corte fixo em 3,2 Hz e filtro passa baixa com frequência de corte ajustado para 32; 80; 160; 320; 800 Hz e 1,6; 3,2; 8 e 16 kHz) para o registro dos PEAC em 24 ratos (machos) com massa corporal variando entre 300 e 400 g, dos quais 12 foram avaliados anestesiados (60 mg/kg de pentobarbital) e 12 acordados (sob efeito de bloqueador muscular), cujos eletrodos implantáveis foram inseridos cirurgicamente nas regiões de córtex auditivo primário e osso nasal. Os parâmetros utilizados para gerar os PEA foram estímulo clique com taxa de apresentação de 2/seg e 104 dBpeSPL apresentados de forma monoaural por transdutor TDH39. Os resultados demonstraram que os efeitos dos diferentes ajustes do filtro passa banda nos animais anestesiados e acordados foram similares e que no primeiro grupo foi identificado somente o componente P1 cuja latência foi em média 0,8 ms maior do que nos animais acordados.

Outro aspecto importante que favorece a utilização de animais para o estudo dos PEAC é que estes podem ser gerados também sob estado de sedação. Lazar e Metharate (2003) avaliaram os PEAC em animais anestesiados e, para este fim, nove ratos machos (*Sprague-Dawley*) com massa corporal variando entre 250 e 500 g foram anestesiados com uretano (1,5 g/kg), xilazina (10 mg/kg) e atropina (0,6 mg/kg) e eletrodos implantáveis foram inseridos cirurgicamente na região de córtex auditivo primário e músculo do couro cabeludo. Os parâmetros utilizados para gerar e registrar os PEAC foram, filtro passa banda de 0,1 a 10 kHz, estímulos tom puro de 10 kHz (raro) e 9,75; 9,5; 9,0; 5,0; 2,5; e 1,25 (frequente) com 10 ms de duração, taxa de apresentação de 2/seg e 70 dB, apresentados em *oddball paradigm* por caixa acústica posicionadas a 3 cm da orelha esquerda. Os autores avaliaram a amplitude dos componentes P1 e P2 do PEAC e verificaram que a resposta se modifica frente à apresentação do estímulo raro e que o grau de modificação varia sistematicamente com a separação do espectro acústico entre os estímulos raro e frequente.

A utilização do rato como modelo experimental também pode contribuir para o estudo das habilidades auditivas. Sakata e Onoda (2006) avaliaram o PEAC em oito ratos *Wistar* (machos) com três meses de idade e massa corporal variando

entre 300 e 350 g, cujos eletrodos implantáveis foram inseridos cirurgicamente nas regiões de córtex frontal, corpo estriado, hipocampo, tálamo e cerebelo. Os parâmetros utilizados para gerar os PEA foram tom puro de 1 kHz na intensidade de 80 dB e 100 ms de duração, que foram apresentados com intervalo inter-estímulo de 500 e 2000 ms, sendo os estímulos frequentes apresentados sempre com 500 ms de intervalo inter-estímulo. Os animais foram treinados a pressionar uma placa localizada a sua esquerda, quando detectado o estímulo frequente (500 ms) e uma placa localizada a sua direita quando detectado o estímulo infrequente (2000 ms). As diferenças no registro dos PAELL foram atribuídas à discriminação temporal entre os estímulos, sendo que tanto para o paradigma infrequente quanto para o paradigma frequente, os registros foram similares para as diferentes regiões avaliadas. Os componentes P2 e N2 foram evocados para o intervalo de 500 ms, com latências variando entre 71 a 82 e 137 a 165 ms, respectivamente; o componente P3 foi evocado tanto para 500 quanto 2000 ms, com latência variando de 273 a 338 ms e, nenhum PEAC foi detectado para 2000 ms de intervalo inter-estímulo. Os autores concluíram que as regiões avaliadas contribuem para a discriminação temporal.

Assim, a avaliação do PEAC em ratos parece ser uma boa variável de resposta a fim de que prováveis alterações clínicas auditivas causadas pela exposição ao Pb, bem como sua reversão/prevenção pelo tratamento com FeSO_4 possam ser investigados.

3 PROPOSIÇÃO

---

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a atividade elétrica cerebral, a dosagem bioquímica de Pb e o aspecto morfológico do cérebro de ratos intoxicados por duas doses diferentes de Pb, submetidos simultaneamente à suplementação com Fe.

4 MATERIAL E MÉTODOS

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

O protocolo deste estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP (processo número 019/2009 - Anexo A).

- Projeto Piloto

Inicialmente foi realizado um projeto piloto utilizando 20 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*), oriundos do Biotério Central da FOB-USP, que foram divididos em cinco grupos de quatro animais cada (um controle e quatro experimentais). O projeto piloto foi realizado a fim de auxiliar na definição das doses de Pb a serem administradas aos animais para atingir os níveis de 10 µg/dL e 30 µg/dL de Pb no sangue total, bem como para padronização dos testes auditivos.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, numa sala com um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, temperatura e umidade controladas, livre acesso a uma dieta padrão de laboratório e água de beber pré-preparada, por seis semanas. A dieta escolhida foi a ração da marca Purina, a mesma utilizada no Biotério Central da FOB-USP, pois em análise prévia, foi verificado que a mesma apresenta quantidade insignificante do metal Pb, não interferindo assim nos resultados da pesquisa.

A água de beber foi preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada em duas concentrações distintas (400 mgPb/L e 100 mgPb/L). A dose mais alta de exposição ao Pb escolhida (400 mg/L), quando administrada a ratos por seis semanas, está associada a déficits súbitos de desenvolvimento (CORY-SLECHTA; WEISS; COX, 1983), sendo que concentrações maiores podem induzir hemorragias cerebrais (PRESS, 1977). De acordo com Wang et al. (2007a), a dose mais alta deve produzir níveis de Pb no sangue em torno de

30 µg/dL, e a dose mais baixa níveis de Pb no sangue em torno de 10 µg/dL, que de acordo com o CDC, corresponde ao nível aceitável de Pb no sangue. Sendo assim, dois grupos experimentais de ratos (n=4 por grupo) receberam água de beber contendo acetato de Pb a 100 mgPb/L e um destes grupos recebeu concomitantemente, por gavagem gástrica, a cada 2 dias, uma solução de FeSO₄ na dose de 20mg/Kg de peso corporal, enquanto que no outro grupo a gavagem gástrica foi realizada com água deionizada, por seis semanas. O mesmo ocorreu para os outros dois grupos experimentais que receberam água de beber contendo acetato de Pb a 400 mgPb/L. O grupo controle recebeu apenas água de beber deionizada, além de gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias, durante seis semanas.

Após o período experimental, foi realizada a dosagem de Pb no sangue no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) na cidade de Botucatu, onde foram encontrados valores médios ($\pm$ dp) de 6,69 ($\pm$ 3,38) µg/dL de Pb, e 15,22 ($\pm$ 9,00) µg/dL de Pb no sangue total, para os animais tratados com 100 mg/L e 400 mg/L, respectivamente.

Depois de estabelecidas a relação entre a quantidade de Pb administrada e as dosagens de Pb esperadas em sangue total, foi realizado o estudo definitivo. Para tanto, 30 ratos machos (*Rattus norvergicus*, variedade *Wistar*), recém-desmamados (21 dias) receberam, por seis semanas, o mesmo tratamento dos animais do estudo piloto, com a inclusão de um animal a mais por grupo e um grupo que recebeu como tratamento água de beber deionizada e gavagem a cada dois dias com FeSO₄. Sendo assim, os animais foram divididos em seis grupos de cinco animais cada (dois controles e quatro experimentais) que foram tratados da seguinte maneira:

- Grupo 1 – controle – tratamento com ração e água de beber deionizada + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- Grupo 2 – controle – tratamento com ração e água de beber deionizada + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO₄ a cada dois dias;
- Grupo 3 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e

deionizada na concentração de 100 mg/L de Pb + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;

- Grupo 4 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 100 mg/L de Pb + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO₄ a cada dois dias;
- Grupo 5 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 400 mg/L de Pb + gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias;
- Grupo 6 – experimental – tratamento com ração e água de beber preparada pela dissolução de acetato de Pb em água destilada e deionizada na concentração de 400 mg/L de Pb + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO₄ a cada dois dias.

4.2 POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS CORTICAIS

4.2.1 Preparo do animal

Após o período de seis semanas os PEAC foram registrados por meio de eletrodos de superfície posicionados no crânio. Para o processo de colocação dos eletrodos, os animais foram levemente sedados por meio de injeção intramuscular de Quetamina (0,1 ml) e Xilazina (0,1 ml), a fim de se evitar a movimentação do animal durante a coleta dos PEAC, o que poderia gerar artefatos e contaminar o registro. A quantidade de sedação (ml) foi determinada após a verificação da menor quantidade suficiente para fazer com que o animal permanecesse imóvel somente durante o registro dos PEAC, esperando-se que o mesmo fosse capaz de sair andando ao final do registro (± 20 min).

Foi realizada a tricotomia do crânio, limpeza da pele com esfoliante da marca *Nuprep*, aplicação de pasta eletrolítica da marca TEN 20™ *Conductive EEG Paste* e colagem dos eletrodos de superfície da marca *Embramac* na porção

epidural sobre o córtex frontal (eletrodo ativo), mastóide (eletrodo referência) e pata inferior (eletrodo terra).

4.2.2 Registro dos Potenciais Evocados Auditivos Corticais

Para a coleta dos PEAC, os eletrodos foram conectados no pré-amplificador do equipamento SMART– *Interacoustic* utilizado para a estimulação acústica e aquisição do sinal, por meio da filtragem, amplificação e promediação. O estímulo acústico utilizado foi o clique com polaridade alternada e taxa de apresentação de 1.1 estímulos por segundo, apresentado na intensidade de 70 dBnHL de forma monoaural (orelha direita) por meio do fone de inserção (*EAR TONE 3A*). O filtro passa-banda foi ajustado de 1 a 30 Hz e a janela utilizada de 500 ms, ganho de 50.000 μ V.

Os componentes do PEAC, complexo P1- N1-P2, foram avaliados visualmente dentro de uma faixa de latência e foram medidas as latências, comparativamente nos grupos controle e experimental. A reprodutibilidade das ondas foi o critério utilizado para definir a presença ou ausência de resposta.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final do período experimental, os animais foram pesados e sacrificados por eutanásia (injeção intramuscular de Quetamina e Xilazina). Foi realizada punção cardíaca para a retirada da amostra de sangue total, que foi utilizada para a determinação de Pb sanguíneo.

Posteriormente à punção cardíaca, os cérebros dos animais foram rapidamente dissecados, sendo removida e descartada a região de tronco encefálico e cerebelo, e preservando a região cortical. Uma parte dos cérebros foi reservada para análise histológica, enquanto que a outra parte foi imediatamente inserida em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C, para posterior análise de Pb.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento histológico dos cérebros dos animais para a obtenção das lâminas histológicas foi realizado na seguinte sequência:

- fixação em formol 10% por um período de sete dias;
- lavagem em água por 24 h;
- Imersão em álcool 70% por um período de 30 dias;
- desidratação em três banhos de álcool absoluto (manhã, tarde e noite);
- diafanização em três banhos de xilol (50 min cada banho);
- imersão em parafina líquida e permanência na estufa (62°C) por um período de uma hora e trinta min;
- troca da parafina líquida e permanência na estufa (62°C) por um período de quatro h;
- inclusão da peça em parafina líquida;
- cortes histológicos em micrótomo com espessura de 5 µm da peça incluída em parafina;
- permanência das lâminas contendo os cortes histológicos em estufa (62°C) por um período de 3 h;
- três banhos em xilol de 15 min cada (desparafinizar);
- quatro banhos em álcool por cinco min cada, sendo os três primeiros em álcool absoluto e o último em álcool 70% (hidratar);
- lavagem das lâminas em água corrente por 10 min;
- permanecerem por um min e 40 seg em hematoxilina de Harris;
- lavagem em água corrente por 10 min;
- permanência por três min em eosina de Lison;
- lavagem das lâminas em água;
- rápida imersão em álcool 70%;
- dois banhos de três min cada em álcool absoluto (desidratar);

- três banhos de três min em xilol (diafanizar);
- montagem das lamínulas sobre os cortes histológicos corados.

4.5 ANÁLISE DE Pb NO CÓRTEX CÉREBRAL E SANGUE TOTAL

A determinação de Pb^{2+} foi realizada no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, utilizando um Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, equipado com uma célula de reação (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA), conforme descrito por Batista et al. (2009). Em resumo, para as amostras de tecido e materiais de referência certificados (CRMs), aproximadamente 75 mg foram pesados em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson). Então, 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 50% (v/v) foi adicionado às amostras e incubado à temperatura ambiente por 12 h num homogeneizador rotacional. Após solubilização, o volume foi trazido para 10 mL com uma solução diluída contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu g/L$ Ródio (Rh) e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 $\mu g/L$ de Pb^{+2} , utilizando a mesma solução das amostras. O limite de detecção para o Pb^{2+} foi de 0,0066 $\mu g/L$.

Para as amostras de sangue, 200 μL de cada amostra foi colocada em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson), para um volume final de 10 mL (diluição de 50 vezes) com uma solução contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu g/L$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 $\mu g/L$ de Pb^{+2} , no mesmo diluente. A curva foi feita por ajuste de matriz, a qual continha os padrões de calibração, sangue ovino diluído 50 vezes (sangue base) e diluente.

Após a preparação da amostra, a mesma foi diretamente injetada no equipamento. O controle de qualidade para as análises de Pb^{2+} foi assegurado por meio da análise de materiais de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano (NIST 955c). Em adição, outros materiais de referência fornecidos tanto pelo Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque (NYSDOH

programa de teste de proficiência para elementos traço em sangue total) quanto pelo Instituto Nacional de saúde Pública de Quebec, Canadá (INSP – esquema de análise de qualidade externa (EQAS) para elementos traço no sangue) foram também analisados.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados, foi utilizado o *software* GraphPad InStat (versão 3.0 para *Windows*, GraphPad software Inc. La Jolla, CA, EUA). Inicialmente foram checadas a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade dos dados (teste de Bartlett), para a seleção do teste estatístico apropriado. As variáveis peso inicial e final dos animais, latência do componente N1 e latência e amplitude do componente P2 dos PEAC passaram no teste de normalidade e homogeneidade, sendo analisadas por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparações individuais. Os dados referentes à concentração de Pb no córtex cerebral e sangue e latência do componente P1 do PEAC passaram no teste de normalidade, mas não no de homogeneidade. Foram então analisados por ANOVA, após transformação logarítmica e teste de Tukey para comparações individuais. Os dados do consumo de água não passaram no teste de normalidade, mesmo após transformação logarítmica, sendo analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais.

Também foi analisada a correlação entre a concentração de Pb no sangue e no córtex cerebral, bem como entre os níveis de Pb no sangue e no córtex com a latência dos componentes N1, P1 e P2 dos PEAC, utilizando regressão linear.

Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

No período experimental de seis semanas, foi observado que na quinta semana de experimento, um animal pertencente ao grupo 400mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄, começou a apresentar sangramento na urina, o que o levou a óbito no dia posterior. Em outro animal, também pertencente a este grupo, foi observada, após a eutanásia, presença de urina com coloração avermelhada, sugerindo a presença de sangue (Figura 2).

Figura 2 - Animal do grupo 400mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ mostrando, após a eutanásia, bexiga com presença de urina com coloração avermelhada em seu interior

5.1 CONSUMO DE ÁGUA

A Tabela 1 apresenta a média e o desvio padrão do consumo de água diário (mL) dos grupos controle e experimentais durante o período de seis semanas.

O teste de Kruskal-Wallis encontrou diferença significativa entre os grupos ($KW=158,75$, $p<0,0001$). Os maiores consumos de água, em torno de 14 mL/dia, foram observados para os grupos controle e 20 mg/Kg $FeSO_4$, que não diferiram significativamente entre si. A adição de Pb à água reduziu significativamente a ingestão de água, de maneira dose-resposta, sendo que apenas o grupo que recebeu 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg $FeSO_4$ não diferiu significativamente do controle e do grupo que recebeu apenas $FeSO_4$.

Tabela 1 - Consumo médio ($\pm DP$, mL) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg $FeSO_4$

Grupos	Consumo médio diário de água (mL)
Controle	14,7 $\pm$ 4,0 ^a
20 mg/Kg $FeSO_4$	14,5 $\pm$ 2,9 ^a
100 mg/L Pb	13,2 $\pm$ 2,1 ^{bc}
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg $FeSO_4$	13,9 $\pm$ 3,1 ^{ab}
400 mg/L Pb	12,8 $\pm$ 2,5 ^c
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg $FeSO_4$	10,9 $\pm$ 2,9 ^d

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferença significativa (Kruskal-Wallis e Dunn, $p<0,05$, $n=5$)

5.2 MASSA CORPORAL

A Tabela 2 reporta a massa corporal média dos animais dos diferentes grupos, e seus respectivos desvios padrão. As massas foram aferidas a cada dois dias, sendo considerados, para esta análise, os dados do primeiro e último dia do experimento, correspondendo aos pesos inicial e final dos animais, respectivamente. Observa-se que todos os animais apresentaram ganho de massa corporal durante o período experimental. Os pesos iniciais foram bastante parecidos, não havendo diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $F=2,083$, $p=0,103$); o que também foi observado para o peso final (ANOVA, $F=1,655$, $p=0,188$).

Tabela 2 - Peso médio ($\pm$ DP, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb e Pb+ 20 mg/Kg FeSO₄

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	100,40 $\pm$ 4,67	272,20 $\pm$ 19,89
20 mg/Kg FeSO ₄	98,00 $\pm$ 5,00	281,80 $\pm$ 30,83
100 mg/L Pb	97,00 $\pm$ 8,46	260,40 $\pm$ 20,11
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	105,00 $\pm$ 5,48	271,50 $\pm$ 16,20
400 mg/L Pb	102,80 $\pm$ 3,56	294,80 $\pm$ 43,51
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	96,60 $\pm$ 2,19	281,80 $\pm$ 12,72

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0,103$ e $p=0,188$ para os pesos inicial e final, respectivamente, $n=5$)

5.3 ANÁLISE DE Pb NO SANGUE TOTAL E CÓRTEX CEREBRAL

A Tabela 3 apresenta a concentração média de Pb no sangue total ($\mu\text{g/dL}$) e no córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais.

Em relação à concentração de Pb no sangue total, foi observado um efeito dose-resposta e uma redução nos níveis de Pb no sangue quando foi administrado o FeSO₄. A ANOVA após transformação logarítmica detectou diferença significativa entre os grupos ($F=191,15$, $p<0,0001$). As menores concentrações de Pb no sangue foram observadas nos grupos controle e FeSO₄, que não diferiram significativamente entre si. Valores intermediários foram encontrados para os grupos que receberam água contendo 100 mg/L Pb, que diferiram significativamente dos anteriores e também dos grupos que receberam água contendo 400 mg/L de Pb. A administração concomitante de FeSO₄ ao Pb foi capaz de reduzir os níveis deste metal no sangue dos animais, em cerca de 65% e 50% para os grupos que receberam água contendo 100 e 400 mg/L de Pb, respectivamente, embora esta diferença só tenha sido significativa para o grupo que recebeu 100 mg/L de Pb.

Uma tendência similar foi observada para as concentrações de Pb no córtex cerebral, confirmada pela correlação positiva e significativa entre as variáveis ($r^2=0,94$, $p<0,0001$, $n=29$, Figura 2). Para o córtex, a ANOVA após transformação logarítmica detectou diferença significativa entre os grupos

($F=191,15$, $p<0,0001$). As menores concentrações de Pb no sangue foram observadas nos grupos controle e FeSO_4 , que não diferiram significativamente entre si. Valores intermediários foram encontrados para os grupos que receberam água contendo 100 mg/L Pb, que diferiram significativamente dos grupos que receberam água contendo 400 mg/L de Pb. Por outro lado, o grupo que recebeu água contendo 100 mg/L de Pb diferiu significativamente dos grupos controle e FeSO_4 , mas a administração concomitante de FeSO_4 (Grupo 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4) foi capaz de reduzir as concentrações de Pb no cérebro, de forma que, embora este grupo não tenha sido significativamente diferente do que recebeu somente 100 mg/L Pb, ele não diferiu significativamente dos grupos controle e FeSO_4 . A administração concomitante de FeSO_4 reduziu os níveis de Pb no cérebro dos animais expostos a este elemento, em cerca de 30% e 15% para os grupos que receberam água contendo 100 e 400 mg/L de Pb, mas estes grupos não foram significativamente diferentes daqueles em que foi administrada apenas a concentração correspondente de Pb.

Tabela 3 - Concentração média ($\pm$ DP) de Pb no sangue ($\mu\text{g/dL}$) e córtex cerebral (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + 20 mg/Kg FeSO_4

Grupos	[Pb] sangue ($\mu\text{g/dL}$)	[Pb] córtex (ng/g)
Controle	$0,19 \pm 0,10^d$	$13,51 \pm 5,48^c$
20 mg/Kg FeSO_4	$0,13 \pm 0,02^d$	$11,59 \pm 2,54^c$
100 mg/L Pb	$10,56 \pm 5,29^b$	$32,14 \pm 12,01^b$
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4	$3,89 \pm 2,04^c$	$23,21 \pm 11,77^{bc}$
400 mg/L Pb	$48,39 \pm 8,66^a$	$350,57 \pm 55,86^a$
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO_4	$25,85 \pm 3,61^a$	$293,52 \pm 73,16^a$

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA após transformação logarítmica, $p<0,0001$, $n=5$)

Gráfico 1 - Correlação entre as concentrações de Pb encontradas no sangue total e no córtex cerebral dos animais dos diferentes grupos. Regressão linear ($r^2=0,94$; $p<0,0001$, $n=20$)

5.4 POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS CORTICAIS

A Tabela 4 apresenta a latência (ms) média ($\pm$ DP) dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC dos animais dos grupos controles e experimentais. A ANOVA detectou diferença significativa entre os grupos ($F=8,833$, $p<0,0001$; $F=4,810$, $p<0,004$; $F=4,182$, $p<0,008$ para os potenciais P1, N1 e N2, respectivamente). Para todos os componentes do PEAC, o grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ apresentou os maiores valores e os demais grupos não diferiram significativamente entre si. No caso do componente P1, este grupo diferiu significativamente de todos os demais. Para o componente N1, o grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ diferiu significativamente apenas dos grupos controle, 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ e 400 mg/L Pb. Já para o componente P2, o grupo 400 mg/L Pb + FeSO₄ diferiu significativamente de todos os demais, com exceção do 400 mg/L Pb.

Tabela 4 - Média ($\pm$ DP) da latência (ms) dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com água contendo diferentes concentrações de Pb ou Pb + FeSO₄

Grupos	P1 (ms)	N1 (ms)	P2 (ms)
Controle	68,99 $\pm$ 14,12 ^a	110,50 $\pm$ 15,72 ^a	192,25 $\pm$ 13,43 ^a
20 mg/Kg FeSO ₄	74,75 $\pm$ 17,90 ^a	125,40 $\pm$ 22,01 ^{a,b}	188,00 $\pm$ 35,36 ^a
100 mg/L Pb	64,40 $\pm$ 1,95 ^a	133,00 $\pm$ 22,00 ^{a,b}	191,40 $\pm$ 18,30 ^a
100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	58,60 $\pm$ 7,96 ^a	105,80 $\pm$ 17,35 ^a	190,60 $\pm$ 12,14 ^a
400 mg/L Pb	62,00 $\pm$ 11,80 ^a	107,60 $\pm$ 20,37 ^a	208,20 $\pm$ 23,04 ^{a,b}
400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO ₄	121,00 $\pm$ 22,11 ^b	174,25 $\pm$ 43,11 ^b	257,00 $\pm$ 44,75 ^b

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA ou ANOVA após transformação logarítmica, p=0,0001, p=0,004 e p=0,008 para P1, N1 e P2, respectivamente). n=4-5

Não houve correlação entre o nível de Pb no sangue total e a latência dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC ($r=-0,17$, $p=0,48$; $r=-0,22$, $p=0,35$; $r=0,19$, $p=0,44$, e $r=0,14$, $p=0,52$; $r=-0,05$, $p=0,80$; $r=0,47$, $p<0,02$), respectivamente. Também não houve correlação entre o nível de Pb no córtex cerebral e a latência dos componentes P1 e N1 do PEAC ($r=0,14$, $p=0,52$ e $r=-0,05$, $p=0,80$, respectivamente), mas uma correlação significativa foi observada para a latência do componente P2 do PEAC ($r=0,48$, $p=0,02$).

5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA CEREBRAL

A análise do córtex cerebral dos animais do grupo controle mostrou a presença de neurônios com corpos celulares estrelados e neurônios com corpos celulares arredondados, feixes de dendritos sem particularidades e feixes de axônios mielinizados e a presença de células da Glia com quantidade, disposição e histoarquitetura preservadas (Figura 3). Foi observada também a presença de capilares sanguíneos com aparência e calibre preservados.

Ao comparar as imagens histológicas dos córtices cerebrais dos animais do grupo controle com os diferentes grupos experimentais, não foram observadas alterações morfológicas significativas entre os neurônios, com exceção do grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄, em que foi observada quantidade aumentada das células da glia, principalmente para a micróglia, e espaços pericelulares podendo indicar início de edema cerebral (Figura 4).

Figura 3 - Fotomicrografia do Córtex cerebral de ratos do grupo controle, tratado com água deionizada. Neurônios com corpo celular estrelado (seta vermelha) e feixes de dendritos sem particularidades (seta preta). Coloração HE

Figura 4 - Fotomicrografia do Córtex cerebral de ratos do grupo tratado com água contendo 400 mg/L Pb + gavagem com FeSO₄ (20 mg/Kg peso corporal). Neurônios com corpo celular estrelado (seta vermelha), aumento na quantidade de células da glia e espaço pericelular que pode indicar edema cerebral. Coloração HE

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSUMO DE ÁGUA

Na análise do consumo médio de água pelos animais dos diferentes grupos (Tabela 1), houve uma diminuição na ingestão de água, de maneira dose-resposta, visto que quanto maior a concentração de Pb na água, menor foi o consumo médio. Os animais que não receberam Pb na água, tiveram maior consumo médio, não diferindo entre si, porém diferiram dos demais grupos, com exceção dos animais que receberam 100 mg/L Pb suplementado com FeSO_4 . Um dado importante a ser observado é que houve um comportamento diferente entre os grupos que receberam 100 mg/L Pb e 400 mg/L Pb, quando suplementados com FeSO_4 , já que no primeiro caso os animais aumentaram a ingestão de água, e no segundo caso, os animais diminuíram de forma significativa a ingestão de água. Este achado pode ter ocorrido em virtude de variações individuais.

6.2 PESO DOS ANIMAIS

Os animais dos grupos experimentais e controle apresentaram valores muito próximos entre si em relação aos pesos médios (g) aferidos no início e no final do período de tratamento (Tabela 2), não apresentando, portanto, diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dois períodos. Comparando-se os pesos iniciais e finais dos animais observou-se ganho de massa corporal média em todos os grupos de maneira equilibrada. Tais resultados estão de acordo com o estudo de Gautam e Flora (2010), que trataram ratos *Wistar* com 0,5% (5000 mg/L) de Pb na água de beber por 3 semanas, em que não foram observadas mudanças na massa corporal dos animais.

6.3 Pb NO SANGUE

Na análise da concentração média de Pb no sangue total ($\mu\text{g/dL}$) dos animais nos diferentes grupos (Tabela 3), os resultados demonstraram um efeito dose-resposta, sendo que a concentração deste metal no sangue total foi maior quanto maior a sua concentração na água de beber. Assim, os grupos controle e FeSO_4 apresentaram os menores valores e diferiram de forma significativa dos demais, seguido dos grupos de 100 mg/L Pb, e os grupos de 400 mg/L Pb que mostraram os maiores valores de concentração de Pb no sangue total. Estes resultados sugerem uma eficácia do delineamento metodológico utilizado, o que demonstra a validade do estudo.

Importante ressaltar que os nossos resultados corroboram com os achados de Wang et al. (2007a, 2007b), pois ao ser administrada a suplementação com o FeSO_4 foi observada uma tendência em reduzir a concentração do Pb no sangue total quando comparado aos seus pares tratados com a mesma concentração de Pb. Isto ocorreu principalmente para o grupo que recebeu a dosagem de 100 mg/L Pb, que quando suplementado com FeSO_4 , diferiu de forma significativa de seu par.

De acordo com Rondó et al. (2006) uma das possíveis justificativas para a capacidade do Fe em reduzir os níveis de Pb no sangue é que o Fe aumenta a quantidade de hemoglobina no sangue e isto levaria a uma redução nos níveis de Pb. Esta hipótese pode ser reforçada quando analisamos os estudos que mostram que, ao contrário disto, a deficiência do Fe aumenta os níveis de Pb no sangue (BRADMAN et al., 2001; RONDÓ et al., 2006). Como já relatado por Alabdullah et al. (2005) e Souza e Tavares (2009) o Pb compete com o Fe, inibindo sua ligação com a proteína transportadora DMT1, já que esta pode transportar outros íons divalentes como o Cu, Zn e Pb, quando há deficiência de Fe no organismo.

A redução dos níveis de Pb no sangue também foi observada em estudos utilizando outros suplementos, como flavonoides (GAUTAM; FLORA, 2010) e antioxidantes (GURER; ERCAL, 2000).

6.4 Pb NO CÉREBRO

No cérebro, foi observado um efeito similar ao comportamento do Pb no sangue (Tabela 3), no que diz respeito à dose-resposta. Comportamento este esperado, já que houve alta correlação entre a concentração do Pb no sangue com a concentração do Pb no cérebro ($r^2 = 0,94$; $p < 0,0001$) (Gráfico 1), de acordo com os achados recentes de Baranowska-Bosiacka et al. (2012). Os grupos controle e FeSO₄ apresentaram os menores valores, seguidos dos grupos que receberam 100 mg/L Pb e, por fim, dos grupos que receberam 400 mg/L Pb. A maior dosagem de Pb na água de beber mostrou os maiores valores de concentração de Pb no cérebro, corroborando com Wang et al. (2007a).

Os grupos controle e FeSO₄ diferiram dos demais grupos de forma significativa, com exceção do grupo que recebeu 100 mg/L Pb suplementado com FeSO₄. Este achado poderia sugerir que a suplementação com o FeSO₄ quando utilizada em baixas doses de Pb, pode funcionar como um protetor dos efeitos do Pb nos tecidos, já que efeito similar foi observado no sangue, em relação à diminuição da concentração do Pb. Apesar da suplementação com FeSO₄ ter reduzido a concentração do Pb no grupo que recebeu 400 mg/L Pb, não houve diferença significativa entre os grupos. O efeito da diminuição do Pb nos animais tratados com sulfato ferroso pode ser devido à diminuição da absorção do Pb no trato gastrointestinal, como relatado por Gurur e Ercal (2000).

6.5 POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL

Neste estudo foram utilizados os PEAC para medir possíveis mudanças fisiológicas que pudessem ocorrer em nível de córtex auditivo de ratos *Wistar* em decorrência da intoxicação por Pb, já que a literatura reporta este animal como um excelente modelo experimental para este fim (WILPIZESKI, 1974; YAMAMURA et al., 1984; YAMAMURA et al., 1989; EHLERS et al., 1991; OTTO; FOX, 1993; SHAW, 1995; SHINBA, 1997; EHLERS et al., 1998; SHINBA, 1999; SHINBA, 2002; LAZAR; METHERATE, 2003; SAKATA; ONODA, 2006; POULSEN; PICTON; PAUS, 2007). Foram utilizados os PEAC, sendo estes registrados com o uso de eletrodos de

superfície e medida a latência absoluta dos componentes P1, N1 e P2, as quais foram passíveis de registros em todos os animais avaliados, corroborando com os estudos da literatura que utilizaram eletrodos de superfície, e ou implantáveis (SHAW, 1995; SHINBA, 1997; EHLERS et al., 1998; SHINBA, 1999; SHINBA, 2002; LAZAR; METHERATE, 2003; SAKATA; ONODA, 2006). Os valores médios ($\pm$ DP) das latências encontradas para os componentes P1, N1 e P2 do PEAC dos animais do grupo controle foi de 68,99 ($\pm$ 14,12); 110,50 ($\pm$ 15,72); e 192,25 ($\pm$ 13,43) ms, respectivamente (Tabela 4). Estes valores estão condizentes com os achados da literatura, já que nos diferentes estudos foram encontrados valores médios entre 12,7 a 120,0 ms (EHLERS et al., 1991; SHINBA, 1997; SHINBA, 2002), 40,0 a 100,0 ms (EHLERS et al., 1991; SHINBA, 1997) e 71,0 a 207,7 ms (EHLERS et al., 1991; SHINBA, 1997; SAKATA; ONODA, 2006) para os componentes P1, N1 e P2, respectivamente. Vale ressaltar que a variabilidade nos valores de latência para os diferentes estudos deve-se aos diferentes parâmetros utilizados para o registro dos PEAC.

Os resultados demonstraram que o grupo 400 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ apresentou os maiores valores de latência, sendo que os demais grupos não diferiram entre si. A latência do componente P1 foi significativamente maior para este grupo comparada aos demais; a latência do componente N1 também foi maior para este grupo diferindo significativamente apenas dos grupos controle, 100 mg/L Pb + 20 mg/Kg FeSO₄ e 400 mg/L Pb; para o componente P2, o grupo 400 mg/L Pb + FeSO₄ diferiu significativamente de todos os demais, com exceção do 400 mg/L Pb (Tabela 4).

Como já relatado anteriormente o Pb causa dano ao SNC pelo fato das células neuronais serem altamente sensíveis a radicais livres, resultando em disfunção e morte celular (MONTEIRO; BECHARA; ABDALLA, 1991; DEMASI et al., 1996; KIM; WON; GWAG, 2002; ADHIKARI et al., 2006).

Ao contrário do que se acreditava no início deste estudo, o Fe não funcionou como um protetor, reduzindo os efeitos deletérios do Pb, mas sim como um potencializador dos danos quando foi utilizada a dose mais alta de Pb (400 mg/L). Mesmo quando utilizada a menor dosagem de Pb (100 mg/L), não foi observada uma redução significativa na latência ao se utilizar o Fe como

suplemento, porém este grupo apresentou valores que não diferiram de forma significativa do grupo controle.

A entrada de Fe no SNC é regulada para evitar a citotoxicidade (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; MILLS et al., 2010), porém, a exposição ao Pb aumenta a permeabilidade da barreira sanguínea cerebral, permitindo o acúmulo do Fe no cérebro a nível extracelular e intracelular, além de romper a homeostasia celular do Fe, contribuindo com a apoptose celular induzida pelo Pb em nível do córtex cerebral (TIFFANY-CASTIGLIONI et al., 1987, 1988; WANG et al., 2007a, 2007b). Na membrana celular, o Pb produz danos peroxidativos a lipídeos e proteínas. Este efeito parece ser causado por uma combinação de mecanismos, como liberação de Fe (o que, por sua vez, está relacionado à formação de radicais livres), perturbação de mecanismos antioxidantes e efeitos oxidativos diretos do Pb (VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001; ADONAYLO; OTEIZA, 1999). O aumento do Fe no SNC promove modificações que alteram a capacidade de reparo do DNA, comprometendo a integridade genômica, levando a sequelas deletérias como disfunção neuronal e morte (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009). Tais fatores poderiam então justificar o aumento da latência dos componentes P1, N1 e P2 no grupo que recebeu 400 mg/L Pb + FeSO₄. Além disso, foi verificado em um estudo recente com protocolo similar ao presente estudo, que o Fe associado ao Pb tende a provocar um efeito oxidante e não neutralizador no SNC (FERREIRA, 2012).

O complexo P1-N1-P2, componentes do PEAC, promove informações relacionadas à chegada e detecção da informação sonora em nível de córtex auditivo, medindo o início do processamento auditivo nesta região, além de participar do processo de aprendizagem e memória. Neste estudo, os valores das latências destes componentes foram muito similares para os diferentes grupos, com exceção dos grupos que receberam as maiores dosagens de chumbo (400 mg/L), suplementado ou não com o Fe.

6.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foi realizada a análise morfológica do córtex cerebral com o intuito de verificar se estas puderiam ilustrar os possíveis achados do PEAC. Com exceção do

grupo que recebeu 400 mg/L Pb + FeSO₄, todos os grupos analisados demonstraram tecido cerebral preservado, com a presença de neurônios com corpos celulares estrelados, neurônios com corpos celulares arredondados, feixes de dendritos sem particularidades, feixes de axônios mielinizados, células da Glia com quantidade, disposição e histoarquitetura preservadas, e também a presença de capilares sanguíneos com aparência e calibre preservados (Figura 3). Recentemente Baranowska-Bosiacka et al. (2012), verificaram alterações no número de neurônios na região do hipocampo de ratos com níveis sanguíneos de Pb por volta de 10 µg/dL.

Já no grupo que recebeu 400 mg/L Pb + FeSO₄, houve a presença de quantidade aumentada das células da glia, principalmente para a micróglia, e espaços pericelulares podendo indicar início de edema cerebral (Figura 4), de acordo com Wang et al. (2007b) que verificou na microscopia eletrônica imagens sugestivas de edema cerebral.

Os achados da análise histológica estão de acordo com os resultados encontrados no PEAC, já que o grupo que recebeu 400 mg/L Pb + FeSO₄ obteve os maiores valores de latência para os componentes P1, N1 e P2, e também apresentou tecido cerebral com morfologia alterada, quando comparado aos demais grupos. Estes achados também podem ser atribuídos ao fato do Fe associado ao Pb provocar efeito oxidante e não neutralizador no SNC, como relatado por Ferreira (2012).

6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que o Pb sozinho, mesmo em altas doses, não foi capaz de causar alterações nos componentes P1, N1 e P2 dos PEAC, ao contrário do que foi observado quando utilizada alta dose de Pb associada ao uso do Fe. Neste sentido, acredita-se que tanto o aumento de latência dos componentes P1, N1 e P2 do PEAC, assim como as alterações na morfologia do tecido cerebral, podem ser justificados pela ação do Fe, pois como já relatado anteriormente por Wang et al. (2007b) o Pb rompe a barreira hematoencefálica aumentando a sua permeabilidade e, neste caso, tanto o Pb

quanto o Fe podem ter cruzado esta barreira e se acumulado em excesso no tecido cerebral. Porém, os astrócitos têm a capacidade de reter o Pb cerebral (com meia vida de dois anos), acumulando cerca de 24 vezes mais Pb do que o neurônio (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003). Sendo assim, por se tratar de um estudo subcrônico de exposição ao Pb, pode não ter havido tempo para que pudessem ser observados os danos causados pelo Pb. Por outro lado, Ferreira (2012) demonstrou, em estudo com metodologia similar a este, que o Fe causou danos oxidativos ao cérebro.

Outro fator importante é que, em longo prazo, os danos causados pelo Pb poderiam ser mais evidentes, pois, além de se acumular nos astrócitos, 90 a 95% do metal se acumula e é armazenado nos ossos (SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996; SANIN et al., 1998), com meia vida de 27 a 36 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; SILVA, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004)., Após cair na corrente sanguínea e impregnar os tecidos, o metal volta à circulação, aumentando sua quantidade no sangue e aumentando a intoxicação ao longo dos anos (SILVA, 2000). Por isso, seria interessante que futuros estudos utilizassem suplementação de Fe em doses mais baixas do que a utilizada neste estudo, a fim de verificar se esta poderia proteger o SNC contra os danos causado pelo Pb. Além disso, é interessante protocolos de estudo com tempo de exposição prolongado (100 dias) para ver se a dose mais baixa de Pb (100 mg/L) se tornaria tóxica, sendo capaz de aumentar o PEAC e alterar a morfologia cerebral.

7 CONCLUSÃO

---

7 CONCLUSÃO

A ingestão de Pb em água de beber por 6 semanas foi capaz de aumentar a concentração deste metal no sangue e no tecido cerebral de maneira dose-resposta. A suplementação com o Fe a cada dois dias diminuiu os níveis do metal no sangue e no cérebro. O Pb, por si só, não foi capaz de causar alterações fisiológicas na resposta elétrica cerebral relacionadas aos componentes P1, N1 e P2 do PEAC, e nem alterações morfológicas no tecido cerebral. A maior dose de Pb utilizada (400 mg/L Pb), associada ao uso do Fe (20 mg/Kg FeSO_4) causou aumento da latência absoluta dos componentes P1, N1 e P2 e alteração na morfologia do tecido cerebral.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Adhikari A, Penatti CA, Resende RR, Ulrich H, Britto LR, Bechara EJH. 5-Aminolevulinate and 4,5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res.* 2006;1093(1):95-104.

Adonaylo VN, Oteiza PI. Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicol.* 1999;132(1):19-32.

Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention; 2012 [acesso 2013 janeiro 05]. Disponível em: http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_010412.pdf.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, July. 1999.

Ahamed M, Siddiqui MKJ. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin Nutr.* 2007;26(4):400-8.

Alabdullah H, Bareford D, Braithwaite R, Chipman K. Blood lead levels in iron-deficient and non iron-deficient adults. *Clin Lab haematol.* 2005;27:105-9.

Almeida GRC, Guerra CS, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. A plateau detected in lead accumulation in surface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. *Environ Res.* 2008;107:264-70.

Almeida GRC, Saraiva MCP, Barbosa F Junior, Krug FJ, Cury JA, Souza MLR, et al. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 2007;104(3):337-45.

Altman J, Das DD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319-36.

Alvarenga KF, Jacob LCB, Martins CHF, Costa Filho OA, Coube CZV, Marques JM. Emissões otoacústicas - produto de distorção em indivíduos expostos ao chumbo e ao ruído. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69(5):681-89.

Alvarenga KF, Manoel DO, Zucki F, Jacob-Corteletti LCB, Lopes AC, Feniman MR. Avaliação audiológica em crianças com baixo nível de exposição cumulativa ao chumbo. Rev CEFAC (serial na internet). 2012 [acesso 2012 dez 14]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rcefac/2012nahead/186-11.pdf>.

Alvarenga KF. Avaliação do sistema auditivo periférico e central em crianças com histórico de contaminação por chumbo [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Araki S, Murata K, Yokoyama K, Uchida E. Auditory event-related potencial (P300) in relation to peripheral nerve conduction in workers exposed to lead, zinc, and copper: effects of Lead on cognitive function and central nervous system. Am J Ind Med. 1992;21(4):539-47.

Araki S, Murata K, Yokoyama K. Application of neurophysiological methods in occupational medicine in relation to psychological performance. Ann Acad Med Singapore. 1994;23(5):710-8.

Araki S, Sato H, Yokoyama K, Murata K. Subclinical neurophysiological effects of lead: a review on peripheral, central and autonomic nervous system effects in lead workers. Am J Ind Med. 2000;37(2):193-204.

Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Marchetti C, Kurzawski M, Dziedziejko V, et al. Disrupted pro-and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. Brain Research. 2012;1435(30):56-71.

Barbosa F Junior, Rodrigues MHC, Buzalaf MRA, Krug FJ, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. Arch Toxicol. 2006;80(10):633-37.

Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VCO, Barbosa F Junior. Determinate of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. Analytica Chimica Acta. 2009;646:23-9.

Bechara EJH. Chumbo, intoxicação e violência. In: Informativo Conselho Regional de Química – V Região, artigo. 2004;(65):8-10.

Bechara EJH. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. Braz J Med Biol Res. 1996;29:841-51.

Bellinger D, Sloman J, Leviton A, Raboniwitz M, Needleman H, Waternaux C. Low-level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years. *Pediatrics*. 1991;87(2):219-27.

Bellinger D. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr*. 2008;20(2):172-77.

Bleecker ML, Ford DP, Lindgren KN, Scheetz K, Tiburzi MJ. Association of chronic and current measures of lead exposure with different components of brainstem auditory evoked potentials. *Neurotoxicology*. 2003;24:625-31.

Bradman A, Eskenazi B, Sutton P, Athanasoulis M, Goldman LR. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect*. 2001;109(10):1079-1084.

Burkard FR, Don M, Eggermont JJ. Auditory Evoked Potentials: Basic principles and clinical application. 1st Ed. Philadelphia (Baltimore): Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Canfield RL, Henderson CR, Cory-Slechta DA. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microgram per deciliter. *New Engl J Med*. 2003;348:1517-26.

Cavaliere-Costa R, Stape CA, Suzuki I, Targa WHC, Bernabé AC, Miranda FG, et al. Saturnismo causado por arma de fogo no quadril: relato de três casos. *Rev Bras Ortop* 1994;29(6):374-78.

Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services. Lead: Topic Home. [homepage na internet]; 1991 [cited 2009 Apr 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/lead/>.

Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services. Lead: CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention recommendations in "Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention." Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2012 [acesso 2013 jan 05]. Disponível em: http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/cdc_response_lead_exposure_recs.pdf.

Chiodo LM, Covington C, Sokol RJ, Hannigan JH, Jannise J, Ager J, et al. Blood lead levels and specific attention effects in young children. *Neurotoxicol Teratol*. 2007;29(5):538-46.

Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol*. 2004;26:359-71.

Chumbo [homepage na internet]. c2011 [acesso 2013 jan 11]. Disponível em: http://www.tabela.oxigenio.com/outros_metalis/elemento_quimico_chumbo.htm.

Cordeiro R, Lima Filho EC, Salgado PET, Santos CO, Constantino L, Malatesta MLLS. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue. II – Disfunções neurocomportamentais. Rev Saude Publica. 1996;30(4):358-63.

Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol Appl Pharmacol. 1983;71:342-52.

Counter SA, Buchanan LH. Neuro-ototoxicity in andean adults with chronic lead and noise exposure. J Occup Environ Med. 2002;44(1):30-8.

Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. Nat Genet. 2001;28(4):350-54.

Demasi M, Costa CA, Pascual C, Lesuy S, Bechara EJH. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. Free Rad Res. 1996;26(3):235-46.

Derrick BE, York AD, Martinez JL Junior. Increased Granule Cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term potentiation. Brain Res. 2000;857:300-07.

Dietrich KN, Succop PA, Berger OG, Keith RW. Lead exposure and the central auditory processing abilities and cognitive development of urban children: the Cincinnati lead study cohort at age 5 years. Neurotoxicol Teratol. 1992;14(1):51-6.

Discalzi G, Fabbro D, Meliga F, Mocellini A, Capellaro F. Effects occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials. Int J Psychophysiol. 1993;14(1):21-5.

Discalzi GL, Capellaro F, Bottalo L, Fabbro D, Mocellini A. Auditory brainstem evoked potentials (BAEPs) in lead-exposure workers. Neurotoxicology. 1992;13(1):207-9.

Ehlers CL, Somes C, Lopez AL, Robledo P. Long latency event-related potentials in rats: response of amygdale, nucleus accumbens, dorsal hippocampus and frontal cortex to changes in reward characteristics of conditioned stimuli. Brain Resch. 1998;780(1):138-42.

Ehlers CL, Wall TL, Chaplin RI. Long Latency Event Related Potentials in Rats: Effects of Dopaminergic and Serotonergic Depletions. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;38(4):789-93.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(3):7579-84.

Emory E, Ansari Z, Pattillo R, Archibold E, Chevalier J. Maternal blood lead effects on infant intelligence at age 7 months. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188s:26-32.

Emory E, Pattillo R, Archibold E, Bayorh M, Sung F. Neurobehavioral effects of low-level lead exposure in human neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;181:2-11.

Farahat TM, Abdel-Rasoul GM, El-Assy AR, Kandil SH, Kabil MK. Hearing thresholds of workers in a printing facility. *Environ Res.* 1997;73(1-2):189-92.

Ferreira MCF. Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas antioxidantes [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012.

Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, et al. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1999;274:7011-17.

Forst LS, Freels S, Persky V. Occupational lead exposure and hearing loss. *J Occup Environm Med.* 1997;39(7):658-60.

Gautam MSP, Flora SJS. Oral supplementation of gossypin durring lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2010;26:563-570.

Gilbert ME, Kelly ME, Samsam TE, Goodmam JH. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicol Scienc.* 2005;86(2):365-74.

Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. Chronic developmental lead (Pb++) exposure increases threshold for long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res.* 1996;736(1-2):118-24.

Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. Developmental lead exposure reduces the magnitude of long-term potentiation. *Neurotoxicol.* 1999b;20:71-82.

Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. The influence of a developmental period of lead exposure on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Neurotoxicol.* 1999a;20(1):57-70.

Gilmore K, Wilson M. The use of Chloromethyl-X-Rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry.* 1999;36:355-58.

Godwin HA. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5:223-27.

Goldstein GW. Lead Poisoning and brain cell function. *Environ Health Perspect.* 1990;89:91-4.

Goldstein R. Dimensions of the averaged electroencephalic response (AER). *Ear Hear.* 1984;5(4):185-6.

Gomes VE, Souza MLR, Barbosa F Junior, Krug FJ, Saraiva MCP, et al. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ.* 2004;320(1):25-35.

Gozdzik-Zolnierkiewicz T, Moszynski B. VIII nerve in experimental lead poisoning. *Acta Oto-Laryngol.* 1969;68(1):85-9.

Gu C, Chen S, Xu X, Zheng L, Li Y, Wu K, et al. Lead and cadmium synergistically enhance the expression of divalent metal transporter 1 protein in central nervous system of developing rats. *Neurochem Res.* 2009;34(6):1150-56.

Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000;29:927-45.

Gurer-Orhan H, Sabýr HU, Özgüne H. Correlations between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.* 2004;195:147-54.

Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1159(3):248-54.

Gutteridge JMC. Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol.* 1992;32:16-21.

Hall JW. Handbook of auditory evoked responses. Massachusetts: Allyn and Bacon; 1992.

Hall JW. New handbook of auditory evoked responses. Massachusetts: Allyn and Bacon; 2007.

Hashimoto I, Ishiyama Y, Yoshimoto T, Nemoto S. Brain-stem auditory evoked potentials recorded directly from human brain-stem and thalamus. *Brain*. 1981;104(pt4):841-59.

Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:7919-24.

Hirata M, Kosaka H. Effects of lead exposure on neurophysiological parameters. *Environ Res*. 1993;63:60-9.

Hirata M, Yoshida T, Miyajima K, Kosaka H, Tabuchi T. Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1995;68:58-63.

Holdestein Y, Pratt H, Goldsher M, Rosen G, Shenhav R, Linn S, Mor A, Barkai A. Auditory brainstem evoked potentials in asymptomatic lead-exposed subjects. *J Laryngol Otol*. 1986;100(9):1031-6.

Hopper DL, Kernan WJ, Lloyd WE. The behavioral effects of prenatal and early postnatal lead exposure in the primate *Macaca fascicularis*. *Toxicol Ind Health*. 1986;2(1):1-16.

Horowitz MP, Greenamyre JT. Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2010;20:S551-568.

Hu H, Watanabe H, Payton M, Korrick S, Rotnitzky A. The relationship between bone lead and hemoglobin. *JAMA*. 1994;272(19):1512-1517.

Jasper HH. The ten-twenty electrode system of the international federation. *Electroenc Clin Neurophysiol*. 1958;10:371-5.

Jordan A, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Ann Rev Biochem*. 1998;67:71-98.

Ke Y, Ming Qian Z. Iron Misregulation in the brain: a primary cause of neurodegeneration disorders. *Lancet Neurol.* 2003;2(4):246-53.

Ke Y, Qian ZM. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol.* 2007;83(3):149-73.

Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol.* 2002;52(2):135-43.

Kim DY, Won SJ, Gwag BJ. Analysis of mitochondrial free radical generation in animal models of neuronal disease. *Free Rad Biol Med.* 2002;33(5):715-23.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL. In: US children and adolescents. *Public Health Rep.* 2000;115(6):521-99.

Lasky RE, Maier MM, Snodgrass EB, Hecox KI, Laughlin NK. The effects of lead on otoacoustic emissions and auditory evoked potentials in monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 1995;17(6):633-44.

Lasky RE, Melissa LL, Torre P, Laughlin NK. The effects of lead early exposure on auditory function in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23:639-49.

Lasley SM, Gilbert ME. Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Neurotoxicol.* 2000;21(6):1057-68.

Lasley SM, Gilbert ME. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol Scienc.* 2002;66:139-47.

Lazar R, Metherate R. Spectral interactions, but no mismatch negativity, in auditory cortex of anesthetized rat. *Hear Resch.* 2003;181(1-2):51-6.

Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect.* 1993;101:598-616.

Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2004;3(3):251-63.

Levine RA, Gerdner JC, Fullerton BC, Stufflebeam SW, Carlisle EW, Furst M, et al. Effects of multiple sclerosis brainstem lesions on sound lateralization and brainstem auditory evoked potentials. *Hear Res.* 1993;68:73-88.

Li H, Swiercz R, Englander EW. Elevated metals compromise repairs of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron-overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *J Neurochem.* 2009;110(6):1774-83.

Lidsky TI, Schneider JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain.* 2003;126(1):5-19.

Lilienthal H, Winneke G, Ewert T. Effects of lead on neurophysiological and performance measures: animal and human data. *Environ Health Persp.* 1990;89:21-5.

Lilienthal H, Winneke G. Lead effects on the brain stem auditory evoked potential in monkeys during and after the treatment phase. *Neurotoxicol Teratol.* 1996;18(1):17-32.

Lille F, Hazemann P, Garnier R, Dally S. Effects of lead and mercury intoxications on evoked potentials. *Clin Toxicol.* 1988;26(1-2):103-16.

Lippmann M. Lead and Human Health: Background and Recent Findings. *Environ Res.* 1990;51(1):1-24.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased Neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci.* 1998;18(19):7768-78.

Lui J, Han D, Li Y, Zheng L, Gu C, Piao Z, et al. Lead affects apoptosis and related gene XIAP and Smac expression in the hippocampus of developing rats. *Neurochemical Research.* 2008;35(3):473-79.

Lurie DI, Brooks DM, Gray LC. The effects of lead on the avian auditory brainstem. *Neurotoxicol.* 2006;27(1):108-17.

Mainenti HRD. Correlação entre a exposição ao chumbo e a atividade enzimática ácido δ-aminolevulínico desidratase (ALA-D), paratormônio (PTH) e fatores nutricionais em crianças [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2006.

Martins CHF, Vassoler TMF, Bergonse GFR, Alvarenga KF, Costa AO. Emissões Otoacústicas e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico em trabalhadores expostos a ruído e ao chumbo. *Acta ORL*. 2007;25:293-8.

Mills E, Dong X, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*. 2010;2(1):51.

Moller AR, Jannetta PJ. Auditory evoked potentials recorded intracranially from the brain stem in man. *Exp Neurol*. 1982;78(1):144-57.

Monteiro HP, Bechara EJH, Abdalla DSP. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem*. 1991;103(1):73-83.

Monteiro LP, Faria FV, Ferreira MV, Alvarenga KF, Martins CH Costa AO, et al. Efeitos da exposição ao chumbo e ao ruído sob o sistema auditivo periférico e central: estudo eletrofisiológico. In: Academia Brasileira de Audiologia, 18º Encontro Internacional de Audiologia. Curitiba; 11-13, Abr 2003.

Moreira MFR, Neves EB. Uso de chumbo em urina como indicador de exposição e sua relação com chumbo no sangue. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(9):2151-59.

Moreira RF, Moreira J. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos a saúde. *Quim Nov*. 2004;27:251-60.

Morgan RE, Garavan H, Smith EG, Driscoll LL, Levitsky DA, Strupp BJ. Early lead exposure produces lasting changes in sustained attention, response initiation, and reactivity to errors. *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(6):519-31.

Morse PA, Molfese D, Laughlin NK, Linnville S, Wetzel F. Categorical perception for voicing contrasts in normal and lead-treated rhesus monkeys: Electrophysiological. *Brain Lang*. 1987;30(1):63-80.

Moss T, Rosengren NT, Skjorringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem*. 2007;103:1730-40.

Nakamura MS. Intoxicação por chumbo. *Rev Oxidol*. 2002;Jan/Fev/Mar:37-42.

Neal AP, Stansfield KH, Guilarte TR. Enhanced nitric oxide production during lead (Pb²⁺) exposure recovers protein expression but not presynaptic localization of synaptic proteins in developing hippocampal neurons. *Brain Res*. 2012;1439:88-95.

Needleman HL, Gatsonis HL. Low-level lead exposure and the IQ of children: a meta-analysis of modern studies. *JAMA*. 1990;263(5):673-78.

Newland MC, Yezhou S, Logdberg B, Berlin M. In utero lead exposure in squirrel monkeys: motor effects seen with schedule-controlled behavior. *Neurotoxicol Teratol*. 1996;18(1):33-40.

Olympio KPK, Oliveira PV, Naozuka J, Cardoso MRA, Gunther WMR, Bechara EJH. Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. *The Toxicologist (Supplement to Toxicological Sciences)*. 2009;108(1):76-7.

Olympio KPK. Exposição a chumbo e comportamento anti-social em adolescentes [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2009.

Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect*. 2000;108(suppl 1):23-8.

Osman K, Pawlas K, Schutz A, Gazdzik M, Sokal JÁ, Vahter M. Lead exposure and hearing effects in children in Katowice, Poland. *Environ Res*. 1999;80(1):1-8.

Otto D, Robinson G, Baumann S, Schroeder S, Mushak P, Kleinbaum D. et al. 5-year follow-up study of children with low-to-moderate lead absorption: electrophysiological evaluation. *Environ Res*. 1985;38(1):168-86.

Otto DA, Fox DA. Auditory and visual dysfunction following lead exposure. *Neurotoxicol*. 1993; 14(2-3):191-207.

Payton M, Riggs KM, Spiro A, Weiss ST, Hu H. Relations of bone and blood lead to cognitive function: the VA normative aging study. *Neurotoxicol Teratol*. 1998;20(1):19-27.

Perottoni J, Meotti FC, Folmer V, Pivetta L, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinate dehidratase. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005;19(2):239-248.

Pickles JO. An introduction to the physiology of hearing. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1991.

Picton TW, Smith A. The practice of evoked potential audiometry. *Otolaryngol Clin North Am*. 1978;11(2):263-82.

- Porcelli B, Terzuoli L, Frosi B, Pagani R, Montomoli L, Romeo R, Sartorelli P. Blood concentrations of lead and erythropoietin. *J Lab Clin Med.* 2002;139:125.
- Poulsen C, Picton TW, Paus T. Age-related changes in transient and oscillatory brain responses to auditory stimulation in healthy adults 19-45 year old. *Cereb Cortex.* 2007;17(6):1454-67.
- Press MF. Lead encephalopathy in neonatal Long-Evans rats: morphologic studies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1977;36(1):169-93.
- Purdy SC, Kelly AS, Thome PR. Auditory evoked potential as measures of plasticity in humans. *Audiol Neurol.* 2001;6(4):211-5.
- Qian ZM, Morgan EH. Effect of lead on the transport of transferrin-free and transferrin-bound iron into rabbit reticulocytes. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(5):1049-54.
- Rabinowitz MB. Relating Toth and blood lead levels in children. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1995;55:853-57.
- Repko JD, Corum CR. Critical review and evaluation of the neurological and behavioral sequelae of inorganic lead absorption. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1979;6:135-87.
- Rice DC. Effectes of lifetime lead exposure in monkeys on detection of pure tones. *Fun Appl Toxicol.* 1997;36(2):112-8.
- Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1331(1):1-40.
- Rondó PHC, Carvalho MFH, Souza MC, Moraes F. Concentrações de chumbo, hemoglobina, zinco protoporfirina e ferritina em crianças. *Rev Saúde Pública.* 2006;40(1):71-6.
- Rothenberg SJ, Poblano A, Garza-Morales S. Prenatal and perinatal low level lead exposure alters brainstem auditory evoked responses in infants. *Neurotoxicol.* 1994;15(3):695-9.
- Rothenberg SJ, Poblano A, Schnaas L. Brainstem auditory evoked response at five years and prenatal and postnatal blood lead. *Neurotoxicol Teratol.* 2000;22:503-10.

Rouault TA, Zhang L, Jeong SY. Brain Iron Homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab Brain Dis*. 2009;24(4):673-84.

Sakata S, Onoda K. An ERP study of temporal discrimination in rats. *Behav Process*. 2006;71(2-3):235-40.

Sanin LH, Cossio TG, Romieu I, Avila MH. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Publica Mex*. 1998;40(4):359-68.

Schwartz J, Otto D. Blood lead, hearing thresholds, and neurobehavioral development in children and youth. *Arch Environ Health*. 1987;42(3):153-60.

Schwartz J, Otto D. Lead and minor hearing impairment. *Arch Environ Health*. 1991;46(5):300-5.

Sharifi AM, Mousavi SH, Jorjani, M. Effect of chronic lead exposure on pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression in rat hippocampus in vivo. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; doi: 10.1007/s10571-010-9504-1.

Sharma A, Valadi N, Millerm AH, Pearce BD. Neonatal viral infection decreases neuronal progenitors and impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *Neurobiol Dis*. 2002;11(2):246-56.

Shaw NA. The effects of low-pass filtering on the primary cortical auditory potential of the rat. *J Neurosc Methods*. 1995;59(2):209-16.

Shinba T. Event-related potentials of the rat during active and passive auditory oddball paradigms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1997;104(5):447-52.

Shinba T. Medial agranular cortex activity related to event-related potential generation in the rat. *Cogn Brain Res*. 2002;14(2): 264-8.

Shinba T. Neuronal firing activity in the dorsal hippocampus during the auditory discrimination oddball task in awake rats: relation to event-related potential generation. *Cogn Brain Res*. 1999;8(3):241-50.

Silva IFTM. Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo [dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2000.

Smith RD, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. *Environ. Health Perspect.* 1996;104(1):60-66.

Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2009;42(3):337-40. [acesso 2009 maio 14]. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista>.

Starr A, Hamilton AE. Correlation between confirmed sites of neurological lesions and abnormalities of field auditory brainstem responses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1976;41(6):595-608.

Tiffany-Castiglioni E, Garcia DM, Wu JN, Zmudzki J, Bratton GR. Effects of lead on viability and intracellular metal content of C6 rat glioma cells. *J Toxicol Environ Health.* 1988;23(2):267-79.

Tiffany-Castiglioni E, Zmudzki J, Wu JN, Bratton GR. Effects of lead treatment on intracellular iron and copper concentrations in cultured astroglia. *Metab Brain Dis.* 1987;2(1):61-79.

Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia.* 2009;57:467-78.

Tomoyasu S, Fukuchi K, Yajima K, Watanabe K, Suzuki H, Kawakami K, et al. Suppression of HL-60 cell proliferation by deferoxamine: changes in c-myc expression. *Anticancer Res.* 1993;13:407-10.

Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res Rev.* 2005;49:529-54.

Tremblay K, Kraus N, McGee T, Ponton C, Otis B. Central Auditory Plasticity: changes in N1-P2 complex after speech-sound training. *Ear Hear.* 2001;22(2):79-90.

Trong-Neng W, Chen-Yang S, Jim-Shoung L, Chain-Fun G, Kquei-Nu K, Hsueh-Yun C, et al. Effects of lead and noise exposure on hearing ability. *Arch Env Health.* 2000;55(2):109-18.

Verina T, Rohde CA, Guilarte TR. Environmental Pb⁺² exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. *Neurosci.* 2007;145(3):1037-47.

Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch toxicol*. 2008;82(11):789-802.

Villeda-Hernandez J, Barroso-Moguel R, Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Huerta-Romero R, Rios C. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull*. 2001;55:247-51.

Wang Q, Luo W, Zhang W, Dai Z, Chen Y, Chen J. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex. *Neurotoxicol*. 2007b;28(4):850-59.

Wang Q, Luo W, Zheng W, Liu Y, Xu H, Zheng G. et al. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood-brain barrier during rat development. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007a;219(1):33-41.

Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM. Heterogeneous properties of dentate granule neurons in the adult rats. *J Neurobiol*. 2000;42(2):248-57.

Wasserman GA, Staghezza-Jaramillo B, Shrout P, Popovac D, Graziano JH. The effects of lead exposure on behavior problems in preschool children. *Am J Public Health*. 1998;88(3):481-86.

White RF, Diamond R, Proctor S, Morey C, Hu H. Residual cognitive deficits 50 years after lead poisoning during childhood. *Br J Ind Med*. 1993;50(7):613-22.

Wilpizeski C. Effects of lead on the vestibular system: preliminary findings. *Laryngoscope*. 1974;84:821-32.

Winneke G, Kramer U, Brockhaus A, Ewers U, Kujanek G, Lechner H, et al. Neuropsychological studies in children with elevated tooth lead concentrations. II. Extended study. *Int Arch Occup Environ Health*. 1983;51:231-52.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 3: Lead. Geneva (United Kingdom); 1977.

World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead. Finland (Vammala); 1995.

Xu J, Yan HC, Yang B, Tong LS, Zou YX, Tian Y. Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats. *J Negative Results BioMed*. 2009;8(5):1-8.

Yamamura K, Kishi R, Maehara N, Sadamoto T, Uchino E. An experimental study of the effects of lead acetate on hearing. Cochlear microphonics and action potential of the guinea pig. *Toxicol Lett*. 1984;21(1):41-7.

Yamamura K, Terayama K, Yamamoto N, Kohyama A, Kishi R. Effects of acute lead acetate exposure on adult guinea pigs: electrophysiological study of the inner ear. *Fundam Appl Toxicol*. 1989;13:509-15.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):863-73.

Zheng W, Aschner M, Gherzi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;192(1):1-11.

Zheng W. Toxicology of choroid plexus: special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc Res Tech*. 2001;52(1):89-103.

Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1241(2):139-76.

Zou C, Zhao Z, Tang L, Chen Z, Du L. The effect of lead on brainstem auditory evoked potentials in children. *Chin Med J (England)*. 2003;116(4):565-8.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 019/2009

Bauru, 6 de agosto de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado ***"Potencial evocado auditivo relacionado a eventos e análise proteômica e morfológica em cótex auditivo de ratos submetidos tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com Ferro"***, de autoria de Josilene Luciene Duarte foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (relatório final) **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais** **CEEPA-Proc. Nº 019/2009.**

Bauru, 19 de fevereiro de 2013.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que, após análise por um Relator desta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o Relatório Final referente à etapa da pesquisa intitulada *POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO CORTICAL, ANÁLISE BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM CHUMBO: EFEITO PROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO*, desenvolvida por Josilene Luciene Duarte, sob sua orientação, foi **APROVADO** em reunião realizada no dia **18 de fevereiro de 2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>