Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

MARIA CECÍLIA DE FREITAS FERREIRA

**Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato
ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas
antioxidantes**

BAURU
2012

MARIA CECÍLIA DE FREITAS FERREIRA

**Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato
ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas
antioxidantes**

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.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão Corrigida

BAURU
2012

F413e Ferreira, Maria Cecília de Freitas
Efeito do acetato de chumbo associado ou não
ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das
enzimas antioxidantes / Maria Cecília de Freitas
Ferreira. – Bauru, 2012.
122 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de
Oliveira

Nota: A versão original desta dissertação/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 dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

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

ERRATA

DEDICATÓRIA

À minha família, meu pai Hiram, minha irmã Dulce Maria e especialmente à minha mãe Olinda, que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos, permitindo a concretização de mais uma etapa. E, além disso, por acreditarem no meu valor como ser humano, fruto dos seus exemplos de dignidade e honestidade. Ao meu futuro esposo, Bruno, pelo amor, companheirismo, carinho, incentivo e paciência. A conquista é de todos nós.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira pela orientação, por me dar essa oportunidade, por apoiar e acreditar em mim. Obrigada pelo respeito, cordialidade e atenção dispensada em todo esse tempo;

À Prof^a. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf por todos os ensinamentos, carinho e dedicação, por sua abertura em discutir teorias e soluções, pelo bom exemplo de dedicação ao ofício, pelo acolhimento e parceria;

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes pela participação imprescindível, por abrir as portas do seu laboratório, pela dedicação, atenção e por tornar este trabalho possível;

À Profa. Dra. Simone Rocha de Vasconcelos Hage, minha 'mãe científica'. Obrigada por ser para mim, um exemplo de competência, postura e ética profissional, demonstrando sempre fidelidade a seus princípios e valores morais; e também por me permitir realizar o Programa de Aperfeiçoamento de ensino ao seu lado, foi um enorme prazer e aprendizado;

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Jr da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, pelo auxílio, disponibilidade e atenção;

À Dra. Kelly Polido Kaneshiro Olympio pela colaboração no início do trabalho, disponibilidade em ajudar;

À Fernanda Zucki pela sua grande amizade, sensibilidade e apoio em um momento importante e decisivo de minha vida. Muito obrigada pelos bons exemplos, pelas atitudes firmes e carinhosas. Você é especial!

À Josilene Duarte por sua longa amizade e companheirismo e por iniciar o caminho dessa tese desde nosso mestrado, por estar sempre ao lado com palavras positivas e idéias criativas;

À amiga Flávia Iano por acompanhar várias etapas deste trabalho e me ajudar diretamente nelas, à sua confiança, ao seu respeito, à nossa parceria de sucesso, ao apoio profissional e pessoal;

À amiga Aline de Lima Leite pela força, pelas palavras de incentivo, pelo apoio científico, pelo exemplo de dedicação e trabalho, pelo enorme apoio na vida pessoal;

À Mileni Fernandes pela amizade verdadeira, por estar ao meu lado desde o ingresso nessa jornada, pelo exemplo de educação e ética e pela importante ajuda;

À amiga e futura química Giovana Brino Quaggio pelo indispensável auxílio no decorrer do trabalho;

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FOB-USP, Telma, Ovídio, Larissa e Aline pelo apoio e ajuda oferecida;

Aos funcionários do Biotério da FOB-USP: Luiz Carlos, Erasmo, Elias e Richard que ajudaram no período de exposição dos animais;

À todos os professores da Biologia Oral da FOB-USP, pela oportunidade de aprendizado proporcionada;

À todos os antigos e novos amigos 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, pelo companheirismo e apoio nesses anos juntos;

Às professoras inesquecíveis Liliane Stumm, Laís Odila Camargo e Sandra Saes por iniciar este caminho desde a graduação e acompanhá-lo com carinho;

Às minhas queridas e muito amadas amigas: Márcia Kfour, Vívian Andrade, Marina Ruocco, Graziela Parisoto, Ana Paola Nicolielo, Jaqueline Mortari, Patrícia Nascimento, Lívia Ciarlo, Bárbara Mello, Liliane Stumm e Mariana Blecha, por se tornarem minha verdadeira família no decorrer desses anos. Nossa convivência foi/vai muito além da amizade, e o aprendizado permanecerá eternamente em meu coração e em minhas atitudes;

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelo apoio financeiro na realização desse trabalho;

Para todas as demais pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta na a realização deste trabalho;

À todos os amigos e familiares que de longe ou de perto e direta ou indiretamente participaram da minha jornada. Muito obrigada pelo carinho!

“A verdadeira viagem do conhecimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos”

Marcel Proust

“Só os que perseverarem sentirão o verdadeiro sabor da vitória”

Frei Inácio Larranhaga

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado, tóxico e está presente em diversos sistemas biológicos. Quando absorvido pelo organismo na forma iônica (Pb^{2+}) atua em vários órgãos e sistemas, podendo ocasionar alterações graves no sistema nervoso central. Em adição, tem sido relatado que o íon ferroso (Fe^{2+}) pode apresentar, entre outros, um efeito protetor na neurotoxicidade causada pelo Pb^{2+} . Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores de estresse oxidativo no cérebro de ratos expostos com acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) associado ou não ao sulfato ferroso (FeSO_4). Assim, 36 ratos machos (*Rattus norvegicus*) recém desmamados, divididos em 6 grupos (G), de 6 animais cada, foram expostos durante 6 semanas. No grupo controle (G1) os animais ingeriram água deionizada; G2 e G3 receberam 0,26 mM e G4 e G5 1,05 mM de acetato de chumbo, somado a isso G3 e G5 foram suplementados com 20 mg de sulfato ferroso/Kg peso corporal a cada 2 dias; e para G6 utilizou-se água deionizada e sulfato ferroso. O cérebro dos animais foi coletado para a análise da atividade enzimática de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), a concentração de glutathione reduzida (GSH), lipoperoxidação (TBARS), hidroperóxido de lipídio (HL) e das substâncias antioxidantes totais (SAT) (técnicas ABTS e DPPH'). A atividade das enzimas GPx e SOD nos grupos experimentais diminuiu em relação ao controle, assim como ocorreu com a concentração de GSH ($p < 0,05$). Quanto às análises de HL e CAT, a primeira apresentou tendência de aumento na concentração dos grupos experimentais sem exposição concomitante, já a segunda demonstrou discreta inclinação de aumento na atividade em relação ao controle ($p > 0,05$). A dosagem de SAT-ABTS mostrou aumento nos grupos expostos com 1,05 mM de acetato de chumbo. Em relação à SAT-DPPH' houve diminuição nos grupos experimentais ($p < 0,05$). De acordo com os resultados, as enzimas SOD e GPx e a GSH são afetadas pelo acetato de chumbo e a exposição ao sulfato ferroso altera essa dinâmica. No entanto, estudos posteriores são necessários para verificar se o sulfato ferroso funcionaria como protetor ao efeito tóxico do acetato de chumbo.

Palavras-chave: Antioxidantes. Acetato de chumbo. Sulfato Ferroso. Cérebro.

ABSTRACT

Effect of lead acetate with or without iron sulfate in brain of rats: Analysis of antioxidant enzymes

Lead (Pb^{2+}) is a toxic heavy metal, found in all stages of the inert environment and in several biological systems. When uptaken by the organism, acts on several organs and systems and may cause severe damage in Central Nervous System. In addition, it has been reported that iron (Fe^{2+}) may present, a protective effect on neurotoxicity caused by Pb^{2+} . Therefore, the aim of this study was to evaluate the markers of oxidative stress in the brain of rats exposed with lead acetate ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) associated or not with ferrous sulfate (FeSO_4). Thus, 36 rats weaning (*Rattus norvegicus*) were, divided into 6 groups (G) of six animals and were exposed for six weeks. In the control group (G1), the animals received deionized water; G2 and G3 received 0,26 mM, G4 and G5 1,05 mM of lead acetate; in addition to this G3 and G5 were supplemented with 20mg of ferrous sulfate/Kg body weight every 2 days; G6 received deionized water and ferrous sulfate were used. The animals' brains were collected for analysis of the enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), the concentration of reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (TBARS), lipid hydroperoxide (LH) and total antioxidant substances (TAS) (ABTS and DPPH' techniques). The activity of the enzymes SOD and GPx in the experimental groups decrease compared to control, as well as the concentration of GSH ($p < 0.05$). Concerning to the analysis of HL and CAT, the first tended to increase the concentration in experimental groups without concomitant exposure with FeSO_4 , while the second showed a slight tendency for increase in activity compared to control ($p > 0.05$). The dosage of TAS-ABTS showed an increase in the groups exposed with 1,05 mM of lead acetate. Regarding the SAT-DPPH' there was a decrease in the experimental groups ($p < 0.05$). According to the results, the enzymes SOD and GPx and GSH were affected by lead acetate and exposure with ferrous sulfate change this dynamic. However, further studies are needed to verify if ferrous sulfate acts as a protective against toxic effect of lead acetate.

Key words: Antioxidants. Lead acetate. Ferrous sulfate. Brain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fases da peroxidação lipídica	32
Figura 2 -	Curva padrão de MDA (mM)	62
Figura 3 -	Curva padrão de trolox (μM)	64
Figura 4 -	Curva padrão de GSH (μM)	65
Figura 5 -	Curva padrão de GSH (mM).....	66
Figura 6 -	Média do consumo diário em mL da água de beber dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	74
Figura 7 -	Peso médio inicial e final dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo administrados por meio da água de beber e/ou 20 mg/kg de sulfato ferroso administrado por meio de gavagem gástrica. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	76
Figura 8 -	Concentração média de Pb^{2+} no sangue ($\mu\text{g/dL}$) em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	79
Figura 9 -	Concentração média de Pb^{2+} no cérebro (ng/g) em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	79
Figura 10 -	Concentração média de HL nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos,	

	controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).....	80
Figura 11 -	Concentração média de TBARS nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ tecido) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$)	81
Figura 12 –	Substâncias antioxidantes totais relativas ao trolox (TEAC) referentes à técnica SAT-DPPH• nas amostras de cérebro dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).....	82
Figura 13 –	Substâncias antioxidantes totais relativas ao trolox (TEAC) referentes à técnica SAT-ABTS nas amostras de cérebro dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)	83
Figura 14 -	Concentração média de GSH nas amostras de cérebro ($\text{nmol GSH}/\text{mg}$ proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)	84
Figura 15 -	Atividade de GPx nas amostras de cérebro ($\mu\text{g GSH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.	

Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 85

Figura 16 - Atividade de SOD nas amostras de cérebro (U/mg proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)..... 86

Figura 17 - Atividade de CAT nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Consumo médio ($\pm$ dp, mL) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais expostos com água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso	74
Tabela 2.	Peso médio ($\pm$ dp, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais expostos com água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.....	75
Tabela 3.	Concentração média ($\pm$ dp) de Pb^{2+} no sangue (μ g/dL) e no cérebro (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais expostos com água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.....	78

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol
abs	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ANOVA	Análise de variância para comparações paramétricas
AO	Antioxidante
ATP	Adenina trifosfato
BHT	Di-terc-butil metil fenol
BSA	Albumina de Soro Bovino
C ₃₁ H ₂₈ N ₂ Na ₄ O ₁₃ S	Alaranjado de xilenol
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CEATOX	Centro de Assistência Toxicológica
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CH ₄ OH	Metanol
Cu ²⁺	Íon Cobre
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dp	Desvio padrão
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	Ácido 5,5' ditiobis (2 nitrobenzóico)
ECSOD	Superóxido dismutase extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Íon Ferro

$\text{FeH}_{20}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}_2$ Sulfato ferroso amoniacal

FeSO_4 Sulfato ferroso

g Grama

G6PD Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx Glutaciona peroxidase

GRH Glutaciona redutase

GSH Glutaciona reduzida

GSSG Glutaciona oxidada

h Hora

H_2O Água

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4 Ácido sulfúrico

HCl Ácido clorídrico

HIF-1 α Fator induzido por hipóxia alfa 1

HL Hidroperóxido de lipídio

HNO_3 Ácido nítrico

HPO_3 Ácido metafosfórico

INSP Instituto Nacional de Saúde Pública de Quebec, Canadá

K_2HPO_4 Fosfato de potássio monobásico

K_2HPO_4 Fosfato de potássio dibásico

$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ Persulfato de potássio

Kg Quilograma

KW Análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis

L Litro

I Distância percorrida pela luz através da substância

$\text{L}^\bullet$ Radical lipídico

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LH Ácido graxo polinsaturado

$\text{LO}^\bullet$ Radical alcóxila

$\text{LOO}^\bullet$ Radical peróxila

M Molar

MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno

MDA Malondialdeído

mg	Miligramas
Mg ²⁺	Íon Magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
mV	Milivolt
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NBT	Azul de nitro tetrazólio
ng	Nanograma
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NYSDOH	Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
°C	Graus centígrados
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
OPT	Orto- ftalaldeído
p	Nível de significância
P	Posfato
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	Acetato de chumbo
Pb	Íon chumbo
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial de hidrogênio
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
QI	Quociente intelectual

RFU	Unidades relativas de fluorescência
Rh	Ródio
RO [•]	Radical alcoxila
ROO [•]	Radical peroxila
ROOH	Hidroperóxido orgânico
rpm	Rotação por minuto
SAT	Substâncias antioxidantes totais
SH	grupo sulfidril
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao trolox
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
U	Unidades
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Fração volumétrica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Zn	Zinco
Δ_{abs}	Variação de absorbância
ϵ	Coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	RADICAIS LIVRES/ ESPÉCIES REATIVAS	29
2.2	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	32
2.3	ANTIOXIDANTES	33
2.3.1	Superóxido Dismutase (SOD)	34
2.3.2	Catalase (CAT)	35
2.3.3	Glutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GRH) e Glutathione reduzida (GSH)	35
2.4	CHUMBO	36
2.4.1	Chumbo no Sistema Nervoso Central (SNC)	39
2.5	FERRO	42
2.6	INTERAÇÕES ENTRE CHUMBO E FERRO	44
3	PROPOSIÇÃO	49
3.1	PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	ESTUDO PILOTO	55
4.2	ESTUDO DEFINITIVO	56
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	57
4.4	ANÁLISES DE Pb ²⁺ NO SANGUE TOTAL E NO CÉREBRO	57
4.5	REAGENTES QUÍMICOS	58
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS	59
4.7	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TOTAIS	60
4.8	DOSAGEM DE HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIO (HL)	60
4.9	LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS)	61
4.10	SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES TOTAIS (SAT)	62
4.10.1	Técnica DPPH'	62
4.10.2	Técnica ABTS	63
4.11	ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	64
4.12	ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)	65
4.13	ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	66

4.14	ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)	67
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5	RESULTADOS	71
5.1	CONSUMO DE AGUA	73
5.2	PESO DOS ANIMAIS	75
5.3	ANALISE DE Pb^{2+} NO SANGUE TOTAL E NO CÉREBRO	77
5.4	DOSAGEM DE HL	80
5.5	DOSAGEM DE TBARS	81
5.6	SUBSTANCIAS ANTIOXIDANTES TOTAIS (SAT)	82
5.6.1	Técnica <i>DPPH'</i>	82
5.6.2	Técnica <i>ABTS</i>	83
5.7	DOSAGEM DE GSH	84
5.8	DOSAGEM DE GPx	85
5.9	DOSAGEM DE SOD	86
5.10	DOSAGEM DE CAT	87
6	DISCUSSÃO	89
6.1	CONSUMO DE ÁGUA	93
6.2	PESO DOS ANIMAIS	93
6.3	CHUMBO NO SANGUE	93
6.4	CHUMBO NO CÉREBRO	94
6.5	TBARS e HL	95
6.6	SAT-ABTS e SAT-DPPH'	96
6.7	GSH	97
6.8	GPx	97
6.9	SOD	98
6.10	CAT	99
6.11	FERRO	99
7	CONCLUSÕES	101
8	REFERÊNCIAS	105
9	ANEXOS	119

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica dos seres humanos, nesse processo o oxigênio pode dar origem a algumas espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas estão os radicais livres e as espécies que não possuem elétrons desemparelhados. Essas espécies são produzidas continuamente em organismos vivos no decorrer dos ciclos de vida, devido à respiração aeróbia, estímulos extracelulares, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A produção de EROs no organismo humano é observada em condições fisiológicas e tem importante função biológica, como no crescimento celular. Por outro lado quando sua produção está aumentada, podem causar danos como a diversas estruturas celulares (URSO; CLARKSON, 2003). Nessa situação o organismo possui um sistema antioxidante capaz de controlar e restabelecer o equilíbrio (HALLIWELL, 1994). Entretanto, no momento em que a quantidade de antioxidantes é inferior à quantidade de EROs ou insuficiente para proteger o organismo, ocorre o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

O cérebro é um tecido particularmente sensível aos danos oxidativos porque utiliza alta quantidade de oxigênio (aproximadamente 20% do total utilizado pelo corpo em repouso), possui alto teor de ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis, e presença de metais redutores ativos (cobre e ferro) (VERSTRAETEN et al., 2008; VALKO et al., 2007). O estresse oxidativo nesse tecido causa efeitos deletérios sendo um mediador de danos a estruturas celulares como lipídios, membranas, mitocôndrias e proteínas, que levam a consequências graves no Sistema Nervoso Central (SNC).

O estresse oxidativo no cérebro ocorre também quando há aumento nas concentrações de um mediador de processos oxidativos como o chumbo. Esse elemento é um metal tóxico que não possui função biológica conhecida em humanos, é encontrado na natureza como um cátion bivalente (Pb^{2+}) que forma complexos estáveis com outras substâncias ou moléculas, além disso possui alta eletronegatividade o que favorece suas reações com grupos de proteínas (GODWIN, 2001), assim é considerado um contaminante com elevado risco/perigo para a saúde (CDC, 2012).

O Pb^{2+} é um importante neurotóxico, cuja meia vida biológica é de cerca de 2 anos no cérebro (SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996; SANIN et al., 1998). A exposição acontece durante diversos períodos do desenvolvimento podendo causar diferentes implicações funcionais no SNC, tais como encefalopatias, déficits nas funções cognitivas, prejuízos no desenvolvimento de linguagem e aprendizagem, hiperatividade (HSIANG; DÍAZ, 2011; OLYMPIO et al., 2009; BELLINGER, 2008; LANPHEAR et al., 2000) e doenças degenerativas (NAVA-RUIZ; MÉNDEZ-ARMENTA; RÍOS, 2012).

Tem sido relatado que a exposição ao Pb^{2+} rompe a homeostasia celular do ferro, o que pode contribuir com a apoptose celular induzida pelo Pb^{2+} no córtex cerebral (WANG et al., 2007b). Na membrana celular, o Pb^{2+} produz danos peroxidativos a lipídios e proteínas, esse efeito parece ser causado por uma combinação de mecanismos, como a liberação de ferro, perturbação de mecanismos pró e anti-oxidantes diretos do Pb^{2+} (VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001; ADONAYLO; OTEIZA, 1999).

Desse modo o ferro (Fe^{2+}) pode se comportar como um antioxidante, pois é um elemento fundamental para funções metabólicas dos seres vivos (SALVADOR; URANGA; GIUSTO, 2010). Adicionam-se a isso, poucas e, de alguma maneira, ineficazes alternativas de cuidados para o combate ao estresse oxidativo causado pelo Pb^{2+} . Dessa maneira, é interessante avaliar se a associação com sulfato ferroso (FeSO_4) poderia alterar os níveis de estresse oxidativo causados pelo acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) no cérebro, o que poderia ser uma importante informação para políticas de promoção de saúde.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RADICAIS LIVRES/ ESPÉCIES REATIVAS

Radical livre é um termo geral usado para definir qualquer átomo, grupo de átomos ou moléculas que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). As espécies com elétrons desemparelhados são altamente reativas, porém existem espécies reativas que podem não apresentar elétrons desemparelhados e são igualmente reativas. Essas substâncias são classificadas como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs). As principais EROs são: radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido orgânico (ROOH), peroxila ($ROO^{\cdot}$) e alcóxila ($RO^{\cdot}$); e as principais ERNs são: óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), dióxido de nitrogênio (NO_2) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DROGE, 2002).

As EROs são produzidas continuamente em organismos vivos, devido à respiração, estímulos extracelulares, metabolismo, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Em organismos aeróbios, o oxigênio molecular (O_2) é utilizado como acceptor final de elétrons, durante a fosforilação oxidativa, em que é reduzido a água (H_2O). Esta via metabólica é responsável pela manutenção do equilíbrio energético nesses seres. A redução incompleta do oxigênio pela mitocôndria durante a fosforilação oxidativa, na cadeia de transporte de elétrons, pode gerar espécies reativas, tais como: superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (Eq. 1). Em tecidos sob condições normais, menos de 1% do oxigênio acceptor final se torna uma espécie reativa (TURRENS, 2003; BUETTNER, 2011).

Equação 1: Processo de redução do oxigênio molecular em água (IMLAY, 2008).

A produção contínua das EROs durante processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa para limitar as concentrações intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). As substâncias de defesa das EROs são os antioxidantes que controlam as concentrações de espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), regeneram o substrato oxidável e previnem a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 1994).

A importância referente ao desempenho dos antioxidantes depende dos fatores: tipos de espécies reativas formadas; onde e como são geradas e concentrações ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que uma substância atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL et al., 1995).

Qualquer estímulo que leve à produção excessiva de espécies reativas e/ou a depleção de antioxidantes conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção das EROs (URSO; CLARKSON, 2003). Assim, o desequilíbrio ou desbalanço entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares pelas EROs/ERNs, chama-se de estresse oxidativo (SIES, 1993).

Uma pequena porcentagem de EROs é encontrada em processos fisiológicos, como no sistema de defesa de macrófagos, modulação da atividade de alguns fatores de transcrição e também na ativação de vias de sinalização intracelular, consequentemente controlando a expressão de alguns genes (USHIO-FUKAI; URAO, 2009; KIM et al., 2011; BUETTNER, 2011; VURUSANER; POLI. BASAGA, 2012) e regulando, a sinalização autócrina e parácrina (ZANGAR et al., 2011). As EROs participam do fornecimento de energia, da sinalização química e da função imune, assim são continuamente produzidas no organismo (DROGE, 2002).

A ocorrência de um aumento brando de espécies reativas frequentemente é acompanhado por aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de espécies reativas pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

As espécies reativas podem atuar em uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata em que um radical reage com um composto gerando novos radicais. Os alvos celulares podem ser proteínas, lipídios e DNA que estão relacionados ao sítio de formação destes radicais. Um alvo clássico são os ácidos

graxos poliinsaturados (PUFAS) presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas. O processo de oxidação no qual os radicais livres atuam sobre a membrana chama-se lipoperoxidação (KEHER, 1993).

Erros em proteínas, danos nas membranas, falhas de reparo, bem como alterações em genes determinantes da longevidade poderiam direta ou indiretamente estar relacionados ao estresse oxidativo, situação esta em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa antioxidante (FREEMAN; CRAPO, 1982).

Uma vez que as membranas celulares são constituídas basicamente por lipídios e proteínas, as EROs podem causar peroxidação dos lipídios insaturados das membranas, podendo levar à perda de função e à morte celular. A produção elevada de lipoperóxidos, associada à redução na atividade de enzimas antioxidantes, tem sido relacionada a diversos mecanismos celulares que podem acarretar câncer, doenças cardíacas, inflamação, diabetes, dano renal, enfisema pulmonar e artrite reumatóide (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados (TAPPEL, 1973).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia que pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação, de acordo com a figura 1:

Figura 1 – Fases da peroxidação lipídica

A figura (1) acima mostra as fases da peroxidação lipídica, que se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo $\text{OH}^\bullet$ (radical hidroxila) ou pelo $\text{LO}^\bullet$ (radical alcóxila), com consequente formação do $\text{L}^\bullet$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $\text{L}^\bullet$ reage rapidamente com o O_2 , resultando na formação de $\text{LOO}^\bullet$ (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do LH, formando novamente o $\text{L}^\bullet$ na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($\text{L}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até que ocorra a autodestruição (TAPPEL, 1973).

Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são: perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, formação de produtos citotóxicos e até a morte celular (HERSHKO, 1989).

Os danos na permeabilidade das membranas podem resultar em uma perda da seletividade de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA; WILHEM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BABER; HARRIS, 1994).

O aumento na geração de EROs e peroxidação lipídica estão envolvidos na patogênese de muitas doenças com etiologia conhecida e desconhecida, assim como com a toxicidade de muitos compostos (SHIVARAJASHANKARA et al., 2001).

Diferentes trabalhos relacionam o desenvolvimento de condições patológicas, com a produção elevada de lipoperóxidos e alterações na atividade de enzimas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ABUJA; ALBERTINI, 2001; DOI et al., 2001; CECONI et al., 2003).

A administração oral de altas doses de hidroperóxido de lipídios (HL) em animais causa algumas injúrias, como danos no sistema imunológico de camundongos, porém a toxicidade é baixa. No entanto, a toxicidade pode estar envolvida com radicais carbonila formados pela decomposição do HL no estômago (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um dos métodos mais antigos e frequentemente utilizado para analisar a peroxidação. Pequenas quantidades de malondialdeído (MDA) livre são formadas na peroxidação da maioria dos sistemas de membrana, especialmente microssomos. O MDA reage no teste de TBA (ácido tiobarbitúrico) para gerar um produto com cor, complexo (TBA)₂-MDA, que em solução ácida absorve luz a 532 nm. A adição de um antioxidante BHT (butil etil tolueno) ao meio de reação, é importante para suprimir a decomposição de peróxidos de lipídios durante o estágio de aquecimento na presença de ácidos da reação, que poderia levar à geração de MDA que não estaria originalmente presente na amostra (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias capazes de controlar os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (ABUJA; ALBERTINI, 2001).

As células são capazes de se defender contra os efeitos deletérios das espécies reativas por mecanismos de defesa antioxidante. Em organismos aeróbios saudáveis, as concentrações de EROs estão em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante (SIES, 1991). Esse desequilíbrio pode ser causado por diferentes fatores, dentre eles:

- A- Diminuição da defesa antioxidante causada por mutações nas enzimas de defesa;
- B- Diminuição da ingestão de vitaminas e outros constituintes na dieta;
- C- Aumento da produção de EROs causada por fatores ambientais como, por exemplo, fumo, radiação (ultravioleta, raios X etc.);
- D- Excesso de atividade física;
- E- Ingestão de gorduras;
- F- Consumo de álcool;
- G- Estresse físico e mental;
- H- Inflamações e infecções, entre outros (ATHAR, 2002; DROGE, 2002; URSO; CLARKSON, 2003).

Como foi visto, os agentes protetores das células contra os efeitos nocivos do acúmulo das EROs podem ser enzimáticos e não-enzimáticos (HALLIWELL, 1994). Os últimos são provenientes da dieta, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos em que se destacam os flavonóides e poliflavonóides (PIETTA, 2000). Já entre os antioxidantes enzimáticos estão a glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRH), catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD).

2.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi descoberta em 1969 por Mccord e Fridovich e catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 . Está presente sob duas formas: CuZn-SOD, a qual está localizada no citosol e tem em seu sítio catalítico um átomo de cobre e de zinco ou Mn-SOD, que é mitocondrial e apresenta um átomo de manganês em seu sítio ativo. Em geral, a SOD está presente quase que exclusivamente no meio intracelular, apresentando pequenas concentrações no plasma e fluido espinhal, sendo que estas formas recebem a designação de SOD extracelular ("ECSOD") (FUJII; IUCHI; OKADA, 2005). Essa isoforma (ECSOD) tem sido descrita com importância na regulação da expressão de algumas moléculas como a VEGF e HIF-1 α entre outras (KIM et al., 2011), participando na regulação de algumas vias.

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de $O_2^{\cdot-}$ e a atividade da Mn-SOD é de grande importância na regulação das concentrações de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (CHEN; THOMAS; KEANEY, 2003). Os radicais superóxido gerados no metabolismo mitocondrial são, pela ação da SOD, convertidos em H_2O_2 (Eq. 2) sendo posteriormente transformados em H_2O pela ação da catalase e/ou do sistema glutathiona.

2.3.2 Catalase (CAT)

A CAT está presente em todos os órgãos (CHANCE et al., 1979). Trata-se de uma hemoproteína, que funciona como catalisador da decomposição do H_2O_2 , ou seja, age removendo o H_2O_2 gerado (Eq. 3). Esta enzima se apresenta ligada em organelas denominadas peroxissomos e age sobre o H_2O_2 , não apresentando atividade para hidroperóxidos orgânicos (WASSMANN, WASSMANN; NICKENING, 2004).

2.3.3 Glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GRH) e glutathiona reduzida (GSH)

A GSH desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, entre eles, a síntese de proteínas e de DNA, como cofator de várias enzimas, na proteção celular contra agentes ionizantes e compostos exógenos e, principalmente, contra as espécies reativas. A glutathiona celular e a intracelular estão presentes na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (KAYNAR et al., 2005).

Dessa forma, a glutathiona pode ser considerada fundamental no metabolismo do H_2O_2 , peróxidos orgânicos, bem como espécies reativas, pois age como doadora de elétrons nas reações catalisadas pela GPx, (Eq. 4 e 5) (KAYNAR et al., 2005).

Equação 5

Assim, ela protege as células dos danos causados pelas espécies reativas. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH em GSSG (SHAN; AW; JONES, 1990).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (HEBBEL, 1986). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathione redutase (GRH), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT; Mc LEAN, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de GRH é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FRISCHER; AHMAD, 1987). A GRH é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (ROSS, MOLDEUS, 1991). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GRH (SHAN; AW; JONES, 1990).

2.4 CHUMBO

O chumbo (Pb) pertence ao grupo IVa dos elementos, é um metal pesado, apresenta um raio iônico relativamente largo e uma alta eletronegatividade, o que favorece suas reações com grupos de proteínas, no contexto de ligações covalentes (GODWIN, 2001).

Há mais de 8000, anos o Pb tem sido usado para diversas aplicações industriais, dentre elas se destacam as indústrias extrativista, petrolífera, de acumuladores, tintas, corantes, gráfica e bélica (SILVA, 2000). Fontes de Pb na água e nos alimentos incluem o uso de louças de cerâmica, encanamentos metálicos e latas alimentícias que contêm solda de Pb (WHITE et al., 2007). Por meio ocupacional, muitos trabalhadores tem sido expostos, principalmente vindos de fontes industriais como fundições e indústrias que usam o elemento em seu processo de fabricação. O risco de contaminação advindo da exaustão de motores veiculares cuja gasolina contém Pb também é uma fonte importante de exposição,

porém diminuiu nos últimos dez anos devido à redução de sua utilização adicionado no combustível (STRÖMBERG; LUNDH; SKEFVING, 2008).

Este elemento químico não é encontrado puro na natureza, mas sim na forma de compostos minerais ligados a outros elementos como Cobre, Zinco, Prata e Urânio. Sua ocorrência na crosta terrestre é de cerca de 0,002% e não apresenta nenhuma função fisiológica conhecida no organismo humano (SILVA, 2000, MAINENTI, 2006, MOREIRA; NEVES, 2008).

O íon chumbo é responsável pelos efeitos tóxicos no organismo onde ocorrem diversos tipos de respostas e atividades biológicas, todavia o acesso variado aos componentes biológicos faz com que certos tipos de respostas predominem (KOSNETT, 2010). Nos organismos vivos, o acesso dos metais pesados pode ser limitado pelas estruturas anatômicas, metabolismo e absorção, além disso os sítios ligantes inertes podem competir pelo íon metálico. Por essas razões, frequentemente existem consideráveis diferenças de sensibilidade entre diferentes órgãos e tecidos, assim como na ação observada em experimentos *in vivo* e *in vitro*, em espécies e em respostas típicas de intoxicação clínica (CAVALIERI-COSTA et al., 1994; BECHARA, 2004; KOSNETT, 2010).

Clinicamente, os sistemas mais sensíveis aos efeitos do chumbo são os sistemas nervoso central (SNC), hematopoiético, gastrointestinal, cardiovascular, musculoesquelético e reprodutor (CAVALIERI-COSTA et al., 1994; SILVA, 2000; BECHARA, 2004; MOREIRA; MOREIRA, 2004; MAINENTI, 2006). Existe uma sensibilidade maior para alterações do SNC em crianças em virtude do período de desenvolvimento (TOSCANO; GUILARTE, 2005; WHO, 1995).

O biomarcador utilizado para detectar a concentração de chumbo no organismo é o sangue (RABINOWITZ, 1995; ATSDR, 1999; SILVA, 2000; ROBERTS et al., 2001; MOREIRA; MOREIRA, 2004; BARBOSA et al, 2006), além dele o esmalte dentário (GOMES et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; OLYMPIO et al., 2009). A análise sanguínea reflete a exposição ambiental recente, ao contrário da óssea que reflete a exposição acumulada (MOREIRA; MOREIRA, 2004; OLYMPIO, 2009).

Sua presença na corrente sanguínea o distribui por diversos órgãos e sistemas, sendo encontrado no sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados (ATSDR, 1999; SILVA, 2000). O principal sítio de armazenamento é o tecido ósseo,

que contém entre 90 e 95% do conteúdo corpóreo total (SMITH et al., 1996; SANÍN et al., 1998) com meia vida de 27 anos (SILVA, 2000; MOREIRA; NEVES, 2008).

A susceptibilidade à toxicidade do Pb é influenciada por diversos fatores como propriedades físico-químicas do composto, associados a fatores genéticos, tempo de exposição, idade, estado fisiológico e nutricional, como as concentrações de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), fosfato (P) e vitamina D presentes na dieta também exercem influência (WHO, 1977, 1995, SILVA, 2000). Além disso, os efeitos tóxicos dependem tanto do período de exposição quanto da concentração. Embora a permanência no sangue seja de apenas, em média 35 dias, no cérebro é de cerca de 2 anos, persistindo por mais tempo nos ossos. As reservas de Pb nos ossos podem representar uma ameaça para mulheres na idade reprodutiva tempos depois da exposição ter cessado. Durante a gestação e o período pós parto, o Pb é liberado das reservas ósseas para a corrente sanguínea, aumentando, assim, as concentrações de chumbo no sangue (GULSON et al., 1999). Alta exposição ao chumbo em mulheres grávidas pode causar baixo peso ao nascimento, prematuridade, aborto e natimorto. Quando a concentração de Pb aumenta no sangue materno, esta também aumenta no leite materno, causando um risco adicional ao neonato (LI et al., 2000).

Crianças são especialmente sensíveis a efeitos deletérios do chumbo. Elas podem absorver 30-75% do Pb ingerido (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003; TOSCANO; GUILARTE, 2005, WHO, 1995), enquanto adultos absorvem por volta de 11% do Pb ingerido. Além disso, exposições pré e peri natais causam maior acúmulo cerebral que exposições pós natais devido à barreira hematoencefálica no início da vida (TOSCANO; GUILARTE, 2005).

O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) estabeleceu um valor limite de referência para a intoxicação infantil como guia de tomada de decisões para estratégias de implementação de prevenção primária, em que a concentração de Pb no sangue deve ser de 5 µg/dL (ADVISORY COMMITTEE ON CHILDHOOD LEAD POISONING PREVENTION, 2012; CDC, 2012). Contudo, dados recentes sugerem que efeitos nocivos à cognição infantil no período de desenvolvimento podem ocorrer mesmo em concentrações de Pb no sangue abaixo de tal padrão (LAMPHEAR et al., 2000; CANFIELD et al., 2003; BELLINGER, 2008). Klaassen (2001) em um estudo epidemiológico infantil demonstrou que para cada 1

µg/mL de acréscimo de Pb no sangue dentro da faixa de concentração de 5-35 µg/mL, o quociente intelectual (QI) é reduzido entre 2 e 4 pontos. As consequências do aumento das concentrações de Pb no sangue em crianças podem ser irreversíveis, dentre elas estão as dificuldades de aprendizagem, como o raciocínio abstrato, flexibilidade cognitiva, memória verbal, fluência verbal (WHITE et al., 1993) e problemas comportamentais (OLYMPIO, 2009). Por meio de exame de imagem funcional realizado em crianças expostas ao Pb foi possível afirmar que há diminuição do funcionamento de áreas cerebrais relacionadas à linguagem, causando impacto significativo e persistente na reorganização cerebral associada às funções linguísticas (YUAN et al., 2006).

O estado nutricional é outro fator de risco significativo para a intoxicação e seus efeitos. Deficiência de ferro, zinco e cálcio aumentam a retenção do Pb ingerido, o qual pode aumentar a absorção gastrointestinal (GOYER 1996; RUFF et al., 1996) e afetar a susceptibilidade à neurotoxicidade (AIMO; OTEIZA, 2006).

As alterações hematológicas produzidas pelo Pb, e que levam à anemia são o resultado de sua ação tóxica sobre as hemácias e as células eritropoiéticas na medula óssea. Esses efeitos incluem inibição da síntese da hemoglobina e diminuição do tempo de vida dos eritrócitos circulantes resultando na estimulação da eritropoiese. A anemia é uma manifestação associada a prolongados períodos de exposição à doses elevadas e a outros efeitos concomitantemente (HU et al, 1994; WHO, 1995; ASTR, 1999; PEROTTONI et al, 2006)

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 coincidem com um fenômeno conhecido como permeabilidade de transmissão, a qual está associado a uma alteração do potencial da membrana mitocondrial (ZORATTI; SZABO, 1995).

2.4.1 Chumbo no sistema nervoso central

O Pb é capaz de danificar qualquer atividade biológica, sendo os sistemas enzimáticos potencialmente susceptíveis. Sua toxicidade gera desde alterações em níveis clínicos à alterações bioquímicas. Este elemento tem a capacidade de se depositar em quase todos os órgãos do corpo humano, porém no SNC os efeitos são muito prejudiciais e ocorrem em longo prazo (VERSTRAETEN et al., 2008, SHARIFI et al., 2010). Apesar de serem extensas as bases moleculares, ainda não são bem conhecidas, 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 moleculares podem levar a danos no sistema cognitivo. Os efeitos da intoxicação na função cognitiva têm sido amplamente estudados, devido aos déficits causados no processamento visual e auditivo, na acuidade auditiva, na linguagem e aprendizagem, principalmente nos períodos de maturação cerebral (ALVARENGA et al, 2003; ALVARENGA, 2005; MARTINS et al, 2007; GAHYVA et al, 2008; JORGE et al, 2008).

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 elemento.

- Efeitos no mecanismo regulatório intraneuronal. O Ca^{2+} substituído pelo Pb^{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 a proliferação e diferenciação celular, e a plasticidade neuronal que está envolvida nas funções cognitivas de memória e aprendizagem.

– 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 elemento, porém pode constituir um reservatório para a liberação contínua de Pb no cérebro, contribuindo para o dano de neurônios nas proximidades.

No caso do Pb, caracterizado como agente neurotóxico, existem diferentes mecanismos que podem estar envolvidos em ações oxidativas (pró-oxidantes) (AHAMED; SIDDIQUI, 2007). O chumbo pode induzir o estresse oxidativo pela inibição da enzima delta-aminolevulínica ácida desidratase, que resulta em acúmulo de ácido delta-aminolevulínico, o qual pode rapidamente oxidar e gerar $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{HO}^{\cdot}$ e H_2O_2 (BECHARA, 1996). O Pb pode também estimular o início da oxidação lipídica da membrana, por mudanças de indução nas propriedades físicas das membranas (ADONAYLO; ORTEYZA, 1999). Pode ainda aumentar o potencial oxidativo de espécies pro-oxidantes que poderá formar o complexo $\text{Pb}^{+2} + \text{O}_2^{\cdot-}$, com maior capacidade oxidante que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ por si só (ADONAYLO; ORTEYZA, 1999). Além disso, o Pb, provavelmente, diminuirá as concentrações da glutathione, isso acontece porque se liga exclusivamente aos grupos tiol, diminuindo potencialmente as concentrações de glutathione peroxidase, provocando, assim interferência em sua atividade antioxidante (HERMES-LIMA; PERREIRA; BECHARA, 1991; SANDHIR; JULIA; GILL, 1994; GURRER; ERCAL, 2000).

O Pb causa efeitos tóxicos por estresse oxidativo por meio da perturbação do equilíbrio pro/anti-oxidante levando à dano cerebral devido às alterações oxidativas (OTEIZA et al., 1995; ADONAYLO; OTEIZA 1999; ANTONIO; CORREDOR; LERET, 2003; DANIEL et al., 2004; VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001; VILLEDA HERNANDEZ et al., 2006). A exposição induz mudanças nas atividades de enzimas antioxidantes, que podem ser atribuídas à alta afinidade do elemento com grupos sulfidril ou co-fatores do Pb. Os consequentes danos podem

resultar em disfunções e morte celular, principalmente para as células neuronais que são altamente sensíveis às espécies reativas (MONTEIRO; BECHARA; ABDALLA, 1991, DEMASI et al., 1997, KIM et al., 2002, ADHIKARI et al., 2006). Alguns autores relataram que o chumbo pode induzir a diminuição da atividade da SOD e CAT em cérebros de camundongos e de ratos adultos (SKOCZYNSKA; SMOLIK; JELEN, 1993; NEHRU; KANWAR 2004; MOREIRA et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por Wang e colaboradores (2006), que constataram que a atividade da SOD, GPx e GSH foi reduzida significativamente em cérebros de ratos expostos ao Pb durante a gestação.

Por diversas razões, o SNC é especialmente sensível à indução do estresse oxidativo pelo chumbo: o cérebro contém uma alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis, relacionados à pequena atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx), tem alto consumo de oxigênio e alto teor de ferro (VERSTRAETEN; LUCILA; ORTEIZA, 2008).

2.5 FERRO

O Ferro (Fe^{2+}) faz parte integral do metabolismo corpóreo devido a sua habilidade em ganhar e perder elétrons com facilidade (MILLS et al., 2010). Ele é essencial nos processos celulares como, geração de ATP mitocondrial e replicação do DNA, age como um precursor na divisão celular de células cerebrais, além de ser utilizado em várias funções neuronais, como síntese do neurotransmissor dopaminérgico e mielinização dos axônios (ZECCA et al., 2004; KE; QIAN, 2003; MOSS et al., 2007; LI et al., 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, considerado biodisponível, encontra-se unido a ligantes de baixo peso molecular (LI et al., 2009).

O efeito da deficiência celular de Fe pode ser atribuído à diminuição da atividade de ribonucleotídeos (JORDAN; REICHARD, 1998), uma enzima dependente de Fe que converte os ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos, 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). A morte celular por intoxicação ao Pb no córtex cerebral de ratos *in vivo* pode ser parcialmente devido à apoptose, a qual, por sua vez, pode ser causada

pela diminuição das concentrações corticais de Fe. Em adição, a suplementação com FeSO_4 pode proteger contra a citotoxicidade e a apoptose induzidas pelo acetato de Pb (WANG et al., 2007b).

O SNC consome cerca de 20% da energia corpórea e é rico em Fe (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009). Sua concentração em tecidos específicos é regulado para satisfazer as necessidades do metabolismo especializado e evitar a citotoxicidade (LI et al., 2009; MILLS et al., 2010). A absorção do mesmo é eficaz e controlada por um mecanismo conhecido por homeostase do Fe (MILLS et al., 2010). No cérebro, a manutenção desta homeostase é muito importante, contudo, os mecanismos que envolvem a absorção do Fe no cérebro ainda não são claramente compreendidos (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009).

A barreira sanguínea cerebral e a barreira fluídica sanguínea cerebroespinal, encontrada no plexo coróide, são as redes de circulação sistêmica do sistema nervoso (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 funcionem 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 nesta estrutura, sendo esta entrada comandada pela via sanguínea, por meio do transporte seletivo (ROUAULT; ZHANG; JEONG, 2009).

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 a anemia precoce com posterior retardo mental (MILLS et al., 2010).

Por outro lado, os mecanismos envolvidos na patofisiologia do excesso de Fe no cérebro são complexos (LI et al., 2009). O Fe possui a propriedade de doar elétrons para o oxigênio e o aumento das concentrações de Fe pode permitir a formação de espécies reativas e ânions hidroxil via reação de *Fenton* (Eq. 6) e devido à peroxidação de lipídios ser dependente de Fe^{2+} , também podem ser gerados radicais peroxil e alcóxil. Tais EROs podem danificar macromoléculas celulares como proteínas, lipídios e DNA (LI et al., 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/EROs que comprometem a integridade do DNA genômico, levando a danos pela perda do processo de reparo de DNA no cérebro (LI et al., 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 et al., 2009).

Equação 6

2.6 INTERAÇÃO ENTRE CHUMBO E FERRO

Pesquisas desenvolvidas ao longo dos anos têm demonstrado uma íntima relação entre exposição ao Pb e o metabolismo do Fe em sistemas biológicos, em que a deficiência de Fe pode levar a um aumento da absorção do Pb (WRIGHT et al., 1999; BRADMAN et al., 2001), da mesma forma que a suplementação com Fe pode reduzir a absorção de Pb pelo intestino (CHOI; KIM, 2003; HAMMAD; SEXTON; LANGENBERG, 1996; KIM et al., 2003).

De acordo com Wang et al. (2007a) o Pb é capaz de romper a homeostasia celular do Fe, podendo contribuir com o processo de apoptose celular do córtex cerebral, que por sua vez, pode ser causada pela diminuição das concentrações corticais de Fe.

O chumbo, na membrana celular, gera danos tanto para lipídios quanto para proteínas, sendo estes, gerados por alterações na liberação de Fe e conseqüente formação de radicais livres/EROs; nos mecanismos que controlam a formação de antioxidantes, assim como nos efeitos oxidativos do próprio Pb (ADONAYLO; OTEIZA, 1999; VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001).

Bradman e colaboradores (2001) observaram a presença de concentrações elevadas de Pb em animais com deficiência de ferro. Para os autores, o mecanismo provável para maior absorção de chumbo seria a substituição de Fe^{+2} por Pb^{+2} no sistema hematopoiético, aumentando o transporte ativo para o corpo e reduzindo a excreção de chumbo.

Os resultados em estudos com humanos acerca da deficiência de ferro e absorção de chumbo em adultos são menos definitivos (FLANAGAN; CHAMBERLAIN; VALBERG, 1982; MAHAFFEY, 1985; WATSON et al., 1986; MAHAFFEY, 1990). Vários estudos epidemiológicos em crianças apontaram uma correlação entre a deficiência de ferro e maiores concentrações de chumbo no sangue (YIP; NORRIS; ANDERSON, 1981; YIP; DALLMAN, 1984; MARKOWITZ; ROSEN; BIJUR, 1990; HAMMAD; SEXTON; LANGENBERG, 1996; RUFF et al., 1996; WRIGHT et al., 1999). Outros estudos com crianças não encontraram relação entre a ingestão ou deficiência de ferro e a concentração de Pb em sangue (HERSHKO et al., 1984; LUCAS; SEXTON; LANGENBERG, 1996).

Portanto é clara a necessidade de aprofundar as investigações acerca da associação entre o Fe e o Pb, para que se possa definitivamente afirmar se a administração do Fe é ou não capaz de proteger o organismo contra a intoxicação do Pb (WANG et al., 2007a).

Bradman et al. (2001) consideraram contraditórias as evidências que indicam que a deficiência de ferro aumenta a concentração de chumbo em crianças, pois tais evidências seriam baseadas principalmente em dados obtidos em pesquisas com animais, não extrapoladas para estudos em humanos. Para eles, as pesquisas não apresentam qual seria o estado de ferro necessário para conferir efeito de proteção contra o chumbo para uma criança. Por esta razão, os referidos autores promoveram um estudo comparando as concentrações de chumbo no sangue de crianças com deficiência e normalidade de ferro de regiões com baixas, médias e altas concentrações de contaminação por chumbo. Foram avaliadas 319 crianças, de um a cinco anos, verificou-se o tempo de habitação no local contaminado, e foi coletado sangue para quantificação de chumbo e ferro. A média da concentração de chumbo no sangue foi de 4,9 µg/dL, contudo, 14% das crianças apresentaram índices superiores a 10 µg/dL; com relação ao ferro, muitas crianças apresentaram deficiência de ferro (24% com ferritina <12 ng/dL). Concentração elevada de Pb no sangue entre crianças com deficiência de ferro persistiram após o ajuste de possíveis covariáveis, por meio de regressão multivariada, em que a maior diferença nas concentrações de Pb no sangue entre as crianças com deficiência de ferro e normais foi em torno de 3 µg/dL, observada entre aqueles que vivem em ambientes mais contaminados. De acordo com os autores, faz-se necessário sanar

a problemática da deficiência de ferro, bem como reduzir a exposição ao chumbo, especialmente de crianças que vivem em ambientes mais contaminados.

Buscando apresentar resultados concretos acerca da eficácia da suplementação com Fe para os efeitos adversos do Pb, Wang et al. (2007a) avaliaram ratos machos (20-22 dias) por um período de seis semanas, divididos em grupo controle e três grupos experimentais expostos com a mesma concentração de acetato de Pb (0,9 mM) na água de beber. O grupo experimental 1 (GE1) recebeu apenas acetato de Pb; GE2 acetato de Pb + gavagem gástrica de FeSO₄ (7 mg/Kg) a cada dois dias e o GE3 acetato de Pb (0,9 mM) + gavagem gástrica de FeSO₄ (14 mg/Kg) a cada dois dias. De acordo com os autores, os animais expostos ao Pb apresentaram concentrações significativamente maiores de Pb no sangue e tecido cerebral em comparação ao grupo controle; as imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica foram sugestivas de hemorragia vascular encefálica. Para os animais expostos ao Pb e suplementados com Fe, foi possível observar a manutenção do padrão de normalidade da estrutura cerebral, bem como a restauração da expressão da proteína *occludin* (associada a células epiteliais e endoteliais, sua expressão é regulada por ácidos graxos poliinsaturados) a concentrações normais. Além disso, a baixa dose de suplemento de Fe (7 mg/Kg) reduziu significativamente a concentração de Pb no sangue e tecidos cerebrais. Já os animais suplementados com doses maiores de Fe (14 mg/Kg), apresentaram concentrações mais elevadas de Pb no sangue e no córtex cerebral em comparação aos demais grupos, porém a expressão de *occludin* também foi restaurada. Com base nestes resultados, os autores consideraram que a exposição ao Pb rompe a estrutura da barreira hematoencefálica, facilitando com isso o acúmulo do elemento no tecido cerebral. Por outro lado, a suplementação com baixas doses de Fe parece proteger a integridade da barreira hematoencefálica contra os efeitos adversos do Pb.

Ainda acerca da interação entre ferro e chumbo, Wang et al. (2007b) pesquisaram o papel do ferro nos efeitos da apoptose de células corticais induzida pelo chumbo, durante o desenvolvimento de ratos. A amostra do estudo foi composta por ratos divididos aleatoriamente em quatro grupos, um controle e três experimentais que receberam 400 mg/mL (1,05 M) solução de acetato de Pb na água de beber, entre os quais dois dos grupos foram simultaneamente

suplementados, a cada dois dias por meio de gavagem gástrica, com uma solução de FeSO_4 de 20 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por seis semanas.

Os autores (WANG et al., 2007b) apontaram ao final do estudo, a ocorrência de fragmentação do DNA e das atividades de ativação da caspase 3, em contrapartida, diminuição significativa nas concentrações de Pb no córtex, em comparação com os controles. Com relação à suplementação concomitante com diferentes concentrações de Fe, essa pareceu restaurar as concentrações corticais de Pb a padrões normais. Embora a baixa concentração de Fe tenha restaurado a concentração de Pb no cérebro a padrões considerados normais e a alta dose de Fe não, ambos reduziram a formação de fragmentos de DNA e inibiram a degradação da procaspase-3 induzida pelo Pb. Segundo os autores, o estudo foi capaz de sugerir que a suplementação de Fe durante a exposição ao Pb previne contra citotoxicidade e apoptose induzida por este elemento, em que as vias MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos) desempenham um papel importante na apoptose cerebral induzida por Pb, ativando a via do receptor extracelular de quinases (MEK/ERK), que suprime a sinalização por JNK (quinase c-jun NH_2 -terminal).

Portanto os mecanismos bioquímicos que envolvem a neurotoxicidade relacionada ao Pb ainda são pontos a serem investigados, como possíveis mecanismos do estresse oxidativo, danos oxidativos a componentes celulares, além dos efeitos deletérios dos radicais livres/EROs. Assim, torna-se interessante avaliar se a associação com Fe poderia alterar os níveis de estresse oxidativo no cérebro de ratos causado pelo Pb, o que poderia ser uma importante informação para políticas de promoção de saúde.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os marcadores de estresse oxidativo no cérebro de ratos expostos ao acetato de chumbo e ao sulfato ferroso.

3.1 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS:

1- quantificar o Pb^{2+} no sangue e no cérebro dos animais controle e experimentais.

2- analisar a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no cérebro dos animais controle e experimentais;

3- analisar a lipoperoxidação, o hidroperóxido de lipídio, a glutathione reduzida e as substâncias antioxidantes totais no cérebro dos animais controle e experimentais;

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP, processo número 019/2009 (Anexos 1 e 2).

4.1 ESTUDO PILOTO

Inicialmente realizou-se um projeto piloto utilizando 20 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), oriundos do Biotério Central da FOB-USP, que foram divididos em 5 grupos de 4 animais cada (1 controle e 4 experimentais). O projeto piloto foi realizado a fim de auxiliar na definição das doses de chumbo (Pb^{2+}) a serem administradas aos animais para atingir determinadas concentrações de Pb^{2+} no sangue (conforme estabelecido a seguir).

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, dois em cada, em sala com ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, temperatura e umidade controladas, com livre acesso à dieta e água de beber pré-preparada, pelo período de 6 semanas. A dieta escolhida foi ração comercial da marca Purina® a mesma utilizada no Biotério Central da FOB-USP, pois em análise prévia verificou-se que apresenta baixa concentração de Pb^{2+} (0,36 mg/kg), a qual não interferiu nos resultados da pesquisa.

A água de beber foi preparada pela dissolução de acetato de chumbo (II) ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) em água deionizada em duas concentrações distintas (1,05 mM e 0,26 mM). A dose mais alta de exposição ao Pb^{2+} selecionada, 1,05 mM, quando administrada a ratos por 6 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 e colaboradores (2007b) espera-se que a concentração mais alta produza concentrações de Pb^{2+} no sangue em torno de 30 µg/dL, e a mais baixa produza concentrações de Pb^{2+} no sangue em torno de 10 µg/dL, valor acima do qual (5 µg/dL), o *Center for Disease Control* (CDC, 2012) alerta para a preocupação. Sendo assim, dois grupos experimentais de ratos (n = 4 por grupo) receberam água de beber contendo acetato de chumbo com uma dose de 0,26 mM e um destes grupos

recebeu concomitantemente, por gavagem gástrica, a cada 2 dias, uma solução de sulfato ferroso (FeSO_4) na dose de 20 mg/Kg de peso corporal, enquanto que no outro grupo a gavagem gástrica foi feita com água deionizada, por 6 semanas. O mesmo ocorreu para os outros dois grupos experimentais que receberam água de beber contendo 1,05 mM de acetato de chumbo. O grupo controle recebeu água de beber deionizada, além de gavagem gástrica com água deionizada a cada dois dias, igualmente por 6 semanas.

4.2 ESTUDO DEFINITIVO

Durante o período experimental, 36 ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), foram expostos no Biotério Central da FOB-USP, com os mesmos cuidados que no estudo piloto. Os animais foram divididos em 6 grupos (6 animais cada), sendo 1 controle e 5 experimentais, os quais foram expostos da maneira descrita adiante.

Grupo 1 – controle – água de beber deionizada + gavagem gástrica com água deionizada a cada 2 dias;

Grupo 2 – água de beber preparada com a dissolução de acetato de chumbo em água deionizada na concentração de 0,26 mM + gavagem gástrica com água deionizada a cada 2 dias;

Grupo 3 – água de beber preparada com a dissolução de acetato de chumbo em água deionizada na concentração de 0,26 mM + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada 2 dias;

Grupo 4 – água de beber preparada com a dissolução de acetato de chumbo em água deionizada na concentração de 1,05 mM + gavagem gástrica com água deionizada a cada 2 dias;

Grupo 5 – água de beber preparada com a dissolução de acetato de chumbo em água deionizada na concentração de 1,05 mM + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada 2 dias;

Grupo 6 – água de beber deionizada + gavagem gástrica com 20 mg/Kg de FeSO_4 a cada 2 dias.

Dessa maneira, a cada dois dias todos os animais foram pesados para o cálculo do suplemento FeSO_4 administrado na forma de gavagem gástrica. Além

disso, foi mensurado o consumo da água de beber a cada dois dias em todas as gaiolas metabólicas dos diferentes grupos expostos.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final dos períodos experimentais (piloto e definitivo) os animais foram pesados e sacrificados por eutanásia (injeção intramuscular de Cloridrato de Quetamina - Dopalen[®] e Cloridrato de Xilazina - Anasedan[®]). Em ambos realizou-se punção cardíaca para a retirada das amostras de sangue, utilizado para a determinação da concentração do Pb^{2+} sanguíneo. No estudo definitivo, posteriormente à punção cardíaca, os cérebros dos animais foram rapidamente dissecados, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada, imediatamente inseridos em nitrogênio líquido e depois armazenados a $-80^{\circ}C$, para as posteriores análises de Pb^{2+} , dos marcadores e dos antioxidantes objetivados. Para todas as análises realizadas utilizou-se o córtex cerebral, aqui chamado de cérebro.

4.4 ANÁLISE DE Pb^{2+} NO SANGUE TOTAL E NO CÉREBRO

No estudo piloto as análises da concentração de Pb^{2+} nos diferentes grupos do estudo foram feitas por absorção atômica (GBC modelo AA932), no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) na cidade de Botucatu.

Já no estudo definitivo a determinação de Pb^{2+} tanto no sangue quanto no cérebro 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 horas 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 µg/L de Pb^{+2} , utilizando a mesma solução das amostras. O limite de detecção para o Pb^{2+} foi de 0,0066 µg/L.

Para as amostras de sangue, 200 µL de cada amostra foi colocado 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 µg/L Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 µg/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.

4.5 REAGENTES QUÍMICOS

2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), acetato de chumbo (II) ($Pb(C_2H_3O_2)_2$), ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado (ABTS), ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), ácido metafosfórico (HPO_3), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), alaranjado de xilenol ($C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$), azul de nitro tetrazólio (NBT), Di-terc-butil metil fenol (BHT), glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA), orto-ftalaldeído (OPT), sulfato ferroso ($FeSO_4$), sulfato ferroso amoniacal ($FeH_{20}N_2O_{14}S_2$), trolox, xantina oxidase, xantina e foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos da América). O ácido clorídrico (HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido sulfúrico (H_2SO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), dibásico (Na_2HPO_4), metanol (CH_4OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram adquiridos da Merck (Alemanha). O *kit Quick Start™*

Bradford Protein Assay foi comprado na Bio-rad, Hercules (CA, Estados Unidos da América). Cloreto de sódio (NaCl), etanol (CH₃ CH₂OH) e persulfato de potássio (K₂S₂O₈) foram provenientes da Synth (São Paulo, Brasil). O ácido metafosfórico (HPO₃) foi adquirido da empresa Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil).

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados utilizando o equipamento da marca Marconi modelo MA099, homogeneizador rotacional com *potter* de vidro borossilicato transparente com bico de drenagem e pistilo de politetrafluoretileno serrilhado em baixo relevo, sendo que foram realizados 3 ciclos de 15 agitações sequenciais nas direções verticais, com intervalos de 30 segundos entre eles.

Na homogeneização dos tecidos para as posteriores análises de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) foram usados 100 mg de tecido para 1 mL de tampão, as alíquotas de cérebro foram adicionadas ao tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 e homogeneizadas, depois os homogenatos foram centrifugados (Eppendorf AG, modelo 5804 R, Hamburgo, Alemanha) a 10.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C e as alíquotas de sobrenadante armazenadas a -80°C para as análises subseqüentes.

Em relação à homogeneização dos tecidos para a realização das técnicas de lipoperoxidação (TBARS) e hidroperóxido de lipídio (HL) utilizou-se tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e 22 µL de BHT 1% (butil hidroxi tolueno) diluído em metanol, após isso as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000 r.p.m., sendo coletado o sobrenadante e mantido a -80°C. Para TBARS utilizou-se 100 mg de tecido para 1 mL de tampão, já para HL 50 mg de tecido para 1 mL de tampão.

Na homogeneização necessária para a técnica da glutathione reduzida (GSH), utilizou-se 100 mg de amostras de cérebro com 750 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,005 M e 250 µL de HPO₃ (ácido metafosfórico) a 25%, que foi utilizado como agente precipitante das proteínas. Esses homogenatos foram centrifugados a 14.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, seus sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C.

A homogeneização do cérebro para desenvolver as técnicas das substâncias antioxidantes totais (SAT), a técnica do DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e a técnica do ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado), foi

realizada utilizando-se 50 mg de tecido cerebral em 1 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 7,4, sendo o homogenato centrifugado a 10.000 r.p.m. por 10 min. a 4°C, depois coletados os sobrenadantes e armazenados a -80°C.

4.7 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o *kit Quick StartTM Bradford Protein Assay* (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) baseado no método de Bradford em triplicata (BRADFORD, 1976). Para cada reação utilizaram-se 150 µL de cada amostra (diluídas 400 vezes) ou padrões e 150 µL do reagente de coloração e após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em leitora de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha).

As concentrações proteicas foram calculadas por meio de comparação com uma curva de calibração em triplicata, utilizando BSA 1% (*Bovine Serum Albumin*), proteína de soro bovino, com diferentes concentrações: 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL. A partir da curva foram calculados os valores por meio da equação de base. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.8 DOSAGEM DE HIDROPERÓXIDO DE LIPÍDIO (HL)

Para a dosagem de hidroperóxidos nas amostras de cérebro utilizou-se a técnica de Jiang, Woollard e Wolf (1991). Previamente preparou-se a mistura reativa, contendo metanol 90%, adicionado à alaranjado de xilenol 0,12 mM, BHT 445 mM, ácido sulfúrico 28 mM e sulfato ferroso amoniacal 0,28 mM. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz e preparada no dia em que realizou-se as análises.

Das amostras inicialmente homogeneizadas coletou-se o sobrenadante, o qual foi mantido no gelo. Em uma microplaca, foram adicionados 30 µL do sobrenadante e 270 µL da mistura reativa, os quais foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, lembrando que para o controle foram usadas as mesmas proporções, porém substituiu-se os sobrenadantes por tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Após o tempo de reação, realizaram-se as leituras das

amostras (Molecular Devices, Spectra Max M2, Sunnyvale, Estados Unidos) utilizando o comprimento de onda de 560 nm.

Os resultados foram convertidos para $\mu\text{mol/g}$ tecido utilizando o coeficiente de extinção molar ($4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Para tal, foi utilizada a equação (Eq. 7) abaixo:

$$\text{Concentração (mol/l)} = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times l} \times \text{dilução} \quad \text{Equação 7}$$

4.9 LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS)

Os produtos da peroxidação foram mensurados por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com Buege e Aust (1978) nas amostras de cérebro dos animais expostos. Em tubos de fundo cônico, foram incubados 400 μL de sobrenadante dos homogenatos das amostras e 800 μL de uma solução de TBA-TCA-HCl (ácido tiobarbitúrico 0,375%, ácido tricloroacético 15%, ácido clorídrico 0,25 M), em seguida foi feita agitação em vórtex (Fanem, modelo 251, São Paulo, Brasil). Esses tubos foram mantidos em banho fervente por 15 minutos sendo depois transferidos para banho de gelo onde permaneceram por mais 10 minutos. Após essa etapa as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 3.500 r.p.m. por 10 minutos, coletados os sobrenadantes e medidas as absorbâncias (abs) em microplacas em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max M2, Sunnyvale, Estados Unidos) a 535 nm. Foi realizada curva de calibração (Figura 2) da mesma forma que as amostras utilizando o malondialdeído (MDA), produto da reação, em diferentes concentrações (0,31; 0,156; 0,078; 0,039; 0,0195 mM) ao invés das amostras, com o intuito de padronizar a técnica e realizar a leitura da absorbância em microplaca. Para zerar o aparelho foi feito um controle 'branco' da mesma forma que as amostras, substituindo a amostra por 400 μL de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0).

Figura 2- Curva padrão de MDA (mM)

4.10 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES TOTAIS (SAT)

4.10.1. Técnica *DPPH'*

A atividade antioxidante total no cérebro dos ratos expostos foi observada por meio da técnica do *DPPH'*, Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) adaptada, que consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (*DPPH'*). Por ação de um antioxidante (AO), o *DPPH'* é reduzido provocando o decréscimo de sua absorbância. Dessa maneira foi mensurada a capacidade antioxidante do homogenato em reduzir o *DPPH'*. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

Na técnica usou-se 50 μ L do sobrenadante da amostra e 950 μ L do *DPPH'*, sendo sua concentração 0,1 mM, diluído em álcool etílico e preparado no dia da análise. Após isso, a solução foi incubada por 30 minutos em temperatura

ambiente ao abrigo da luz e logo em seguida foram lidas as absorbâncias a 517 nm (Perkin Elmer, Lambda 35 UV/Vis, Massachusetts, Estados Unidos).

Como referência, foi utilizada uma solução de trolox 10 µM submetida ao mesmo protocolo analítico. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox).

4.10.2. Técnica ABTS

Para determinar as substâncias antioxidantes totais, além da técnica DPPH[•] utilizou-se a técnica ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), Rice-Evans (2000), que também é um radical livre seqüestrador de elétrons, com a capacidade de reduzir o ABTS na presença de um AO, portanto foi analisada a capacidade antioxidante das amostras de cérebro.

Realizou-se uma curva padrão (Figura 3) utilizando o trolox como referência, inicialmente foi feita uma solução de ABTS com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) diluídos em 10 mL de água (1:100) e então manteve-se a solução ao abrigo da luz por 16 horas. Após esse período, 200 µL dessa solução foi diluído em 10 mL de PBS, sendo essa a solução utilizada. Para isso, 1 mL da solução deveria apresentar resultado de absorbância próximo de 0,6 após a leitura a 734 nm no espectrofotômetro (Perkin Elmer, Lambda 35 UV/Vis, Massachusetts, Estados Unidos) apresentou o *score* esperado. As concentrações da curva padrão com trolox (2mM) foram de 2,5, 5 e 10 µL de trolox em 1 mL da solução de ABTS incubados por 5 min ao abrigo da luz antes da leitura. A solução controle foi a de 1 mL da solução de ABTS. Portanto, foram avaliadas as atividades antioxidantes das amostras equivalentes a uma solução com a mesma concentração de trolox. A curva de calibração apresentou porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$, contemplando a exatidão do método.

As absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas utilizando-se 990 µL dessa solução e 10 µL dos sobrenadantes das amostras, sendo incubados por 5 min. ao abrigo da luz antes das leituras no espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox).

Figura 3 - Curva padrão de trolox (μM)

4.11 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A GSH foi mensurada como descrito por Hissin e Hilf (1973). O sobrenadante coletado das amostras foi diluído 100 vezes com tampão. Para as análises adicionou-se 1,8 mL de tampão fosfato de sódio com EDTA, 0,1 mL do sobrenadante já diluído e 0,1 mL de OPT (orto-ftalaldeído) diluído em metanol (1 mg OPT:1 mL metanol), pH 8,0 e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. A fluorescência (Molecular Devices, Spectra Max M2, Sunnyvale, Estados Unidos) foi determinada a 420 nm com excitação em 350 nm.

Foi estabelecida uma curva de calibração (Figura 4) utilizando diferentes concentrações de GSH (0,2-2 μM). Com os resultados em unidades relativas de fluorescência (RFU), fez-se os cálculos utilizando a equação da reta, obtendo então os resultados em μg GSH/mg de tecido, sendo que, estes foram posteriormente convertidos para nmol/mg de proteína. A curva de calibração apresentou porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$, contemplando a exatidão do método.

Figura 4 - Curva padrão de GSH (μM)

4.12 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A atividade de glutathione peroxidase no cérebro foi mensurada como descrito por Flohe e Gunzler (1984). A reação foi realizada contendo 300 μL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, 200 μL de glutathione reduzida (GSH) a 2 mmol/L, 100 μL de H_2O_2 1 mmol/L e 300 μL de sobrenadante das amostras, sendo então incubada a 37°C por 15 minutos. Essa reação foi paralisada pela adição de 500 μL de TCA 5%. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.758 r.p.m. por 5 minutos e o novo sobrenadante coletado. Para cada 100 μL de sobrenadante foram adicionados 200 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 700 μL de ácido 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (0,4 mg/mL). A absorbância foi lida a 420 nm no espectrofotômetro (Perkin Elmer, Lambda 35 UV/Vis, Massachusetts, Estados Unidos).

Uma curva de calibração foi construída (Figura 5) utilizando diferentes concentrações de GSH (0,25 - 2 mM). Para isso, alíquotas de 200 μL desses padrões foram submetidas ao procedimento analítico acima. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas. A partir da curva encontrou-se a equação da reta para o cálculo

da concentração de GSH remanescente em qualquer amostra e, dessa maneira, o consumo de GSH por minuto.

Figura 5 - Curva padrão de GSH (mM)

4.13 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Esta atividade nas amostras de cérebro foi mensurada utilizando a técnica de Beauchamp e Fridovich (1971). Neste método a atividade máxima da SOD foi determinada de acordo com a taxa de redução do azul de nitro tetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada por 3 minutos no espectrofotômetro (Lambda 35 UV/VIS, 'Perkin Elmer UV win Lab') a 550 nm.

O sistema xantina - xantina oxidase foi utilizado como fonte de ânion superóxido. A SOD presente na amostra compete pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do NBT. Adicionou-se ao meio de ensaio, cubeta de quartzo de 1 mL, as soluções 950 µL de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM e pH 7,8, 10 µL de xantina 5 mM, 10 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, 10 µL de NBT 10 mM (preparado no momento do uso), 10 µL da amostra (sobrenadante) e 10 µL de xantina oxidase, diluída 20 vezes no tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM e pH 7,8 e preparada no dia da análise. O equipamento foi zerado adicionando-se as soluções com exceção da amostra (sobrenadante) e da

xantina oxidase que foram substituídas por tampão. Após isso foram feitas as leituras da absorbância por 3 minutos a cada minuto para determinação do Δ abs/min.

Neste ensaio foi realizada a adequação da quantidade de xantina oxidase necessária para a redução do NBT em 0,030 unidades de absorbância por minuto, sendo que uma unidade de atividade de SOD corresponde a 50% deste valor. Assim, para a análise da técnica, utilizaram-se as equações (Eq. 8 e 9) a seguir, lembrando que 1U é igual à quantidade de enzima que causa 50% de inibição da reação a 25°C e pH 7,8. O resultado obtido (em unidades de SOD) é dividido pela concentração de proteínas, de forma a se obter o resultado final em unidades de SOD por mg de proteína (U/mg).

$$SOD \% \text{ de inibição} = \frac{\Delta abs / \text{min do controle} - \Delta abs / \text{min da amostra}}{\Delta abs / \text{min do controle}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

$$SOD U = \left(\frac{\% \text{ inibição} / 50}{\text{volume da amostra no ensaio (mL)}} \right) \times \text{diluição da amostra} \quad \text{Equação 9}$$

4.14 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A análise da CAT no tecido cerebral foi realizada a partir da técnica de Beers e Sizer (1952) em que preparou-se o tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 e a solução estoque de H_2O_2 20 mM, sendo 1,1 mL de H_2O_2 30% em 498,9 mL de água ultra pura. Essas duas soluções foram misturadas na proporção de 1/1 (200 mL de cada) e a concentração de H_2O_2 da solução/reagente mensurada por meio da equação (Eq. 10):

$$[H_2O_2] \text{ (mM)} = 21,81 \times (\text{Abs da solução/reagente}) - 0,36 \quad \text{Equação 10}$$

Realizou-se as leituras no espectrofotômetro (Lambda 35 UV/VIS, 'Perkin Elmer UV win Lab'), este foi zerado em 240 nm com água ultra pura utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mL. A concentração era de 10 mM e a absorbância de 0,469, ideais para o prosseguimento da técnica.

Foram adicionados 980 µL da solução/reagente e 20 µL do sobrenadante de cada amostra de cérebro na cubeta. Essa solução final foi agitada em vórtex, colocada no espectrofotômetro e incubou-se por 30 segundos. Após esse tempo foi realizada a leitura pelos 4 minutos subseqüentes com intervalos de 1 minuto, a 25°C.

Para a análise considerou-se o Δ , que é a diferença entre a primeira e a última leitura, levando-se em conta que as leituras intermediárias foram lineares. Assim, para a análise da técnica, utilizaram-se as equações (Eq. 11 e 12):

$$\frac{\Delta \text{ min} \times \text{cm} \times \text{volume da cubeta (mL)} \times \text{diluição da amostra}}{43,6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{tomada de amostra (mL)}} = \text{mmol / min / mL} \quad \text{Equação 11}$$

$$\frac{\text{mmol / min / mL}}{\text{proteína mg / mL}} = \text{mmol / min / mg proteína} \quad \text{Equação 12}$$

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, foi utilizado o *software* GraphPad Instat (versão 3.0 para Windows, GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA). Inicialmente foi checada 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, análise de CAT, TBARS, HL, GPx, GSH, SOD, SAT-DPPH' e SAT-ABTS no cérebro passaram no teste de normalidade e homogeneidade e foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA, para detectar diferença estatística, seguidos pelo teste de Tukey-Kramer, usado como *post hoc* de ANOVA, para comparações individuais.

Os resultados referentes à concentração de Pb^{2+} no sangue e no cérebro demonstraram que os dados passaram no teste de normalidade, mas não no de homogeneidade. Assim, foram analisados por ANOVA, após transformação

logarítmica e teste de Tukey-Kramer (*post hoc* para ANOVA) para comparações individuais.

Os dados referentes ao consumo de água dos animais não passaram no teste de normalidade, dessa maneira foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais.

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

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CONSUMO DE ÁGUA

Os valores médios e desvio padrão do consumo de água diário (mL) dos animais dos grupos controle e experimentais durante o período de seis semanas estão representados na tabela 1 e na figura 6. Para essa análise foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, por meio deles foi possível detectar diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (G1) e os grupos G2, G3 e G6. O grupo G4 também diferiu dos grupos G2, G3 e G6. Foi observado um aumento no consumo de água nos animais experimentais quando comparados ao grupo controle, com exceção do grupo dos animais expostos a 1,05 mM de acetato de chumbo. Ocorreu diferença significativa também entre o grupo G3 e o grupo G5, o que demonstrou que os animais expostos a 0,26 mM de acetato de chumbo associado com sulfato ferroso consumiram mais água que os animais expostos a 1,05 mM de acetato de chumbo associado com sulfato ferroso.

Os animais que consumiram mais água, em torno de 19 mL/dia, foram os dos grupos G2 e G3, que não diferiram significativamente entre si. Também foi observado que ocorreu uma diminuição na ingestão de água nos grupos que receberam maior concentração de Pb^{+2} , isso ocorreu tanto no grupo associado ao $FeSO_4$ quanto no grupo não associado (G4 e G5), quando comparados aos grupos que receberam menor concentração de Pb^{+2} .

Tabela 1. Consumo médio ($\pm$ dp, mL) diário de água dos animais dos grupos controle e experimentais expostos a água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.

Grupos	Média consumo de água mL/dia
G1 - Controle	16,57 $\pm$ 6,78 ^a
G2 – 0,26 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)	19,31 $\pm$ 8,14 ^{bc}
G3 – 0,26 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) + FeSO_4	19,30 $\pm$ 6,58 ^b
G4 – 1,05 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)	15,81 $\pm$ 4,86 ^a
G5 – 1,05 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) + FeSO_4	17,50 $\pm$ 6,99 ^{ac}
G6 – FeSO_4	17,40 $\pm$ 4,32 ^{bc}

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

Figura 6 - Média do consumo diário em mL da água de beber dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

5.2 PESO DOS ANIMAIS

A tabela 2 e a figura 7 demonstram a massa corporal média dos animais dos diferentes grupos, e seus respectivos desvios padrão. Os animais foram pesados a cada dois dias, sendo considerados, para esta análise, os dados do terceiro e último dias do experimento, correspondendo aos pesos inicial (23 dias de vida) e final dos animais (63 dias de vida), respectivamente. É possível observar que todos os grupos expostos apresentaram aumento de massa corporal durante o período experimental. Tanto para os pesos iniciais quanto para os finais não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $F=0,02939$ e $p=0,9995$; $F=0,4887$ e $p=0,7820$, respectivamente).

Tabela 2. Peso médio ($\pm dp$, g) inicial e final dos animais dos grupos controle e experimentais expostos a água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)
G1 – Controle	79 $\pm$ 30,20	236 $\pm$ 50,59
G2 – 0,26 mM (Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	83 $\pm$ 28,11	253 $\pm$ 42,69
G3 – 0,26 mM (Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂) + FeSO ₄	84 $\pm$ 29,17	263 $\pm$ 38,93
G4 – 1,05 mM (Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	81 $\pm$ 25,63	235 $\pm$ 50,94
G5 – 1,05 mM (Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂) + FeSO ₄	84 $\pm$ 33,56	267 $\pm$ 23,61
G6 - FeSO ₄	83 $\pm$ 28,33	255 $\pm$ 63

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p>0,05$, $n=6$)

Figura 7 - Peso médio inicial e final dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo administrados por meio da água de beber e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso administrado por meio de gavagem gástrica. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$)

5.3 ANÁLISE DE Pb^{2+} NO SANGUE TOTAL E NO CÉREBRO

A tabela 3 e as figuras 8 e 9, respectivamente, apresentam a concentração média de Pb^{2+} no sangue total ($\mu\text{g/dL}$) e no cérebro (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais. Em relação à concentração de Pb^{2+} no sangue total, foi observado um efeito dose-resposta e uma redução nas concentrações de Pb^{2+} no sangue nos grupos em que foi administrado concomitantemente o FeSO_4 . Os dados foram avaliados estatisticamente por ANOVA após transformação logarítmica e pelo teste de Tukey-Kramer, como *post hoc*, foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F=68,910$; $p<0,0001$). O grupo controle diferiu estatisticamente de todos os grupos expostos ao acetato de chumbo (G2, G3, G4 e G5), o mesmo foi observado no grupo associado com o FeSO_4 que também diferiu de todos os grupos expostos ao Pb^{2+} . Quando comparados os animais que receberam as diferentes concentrações de acetato de chumbo, houve diferença entre o grupo G2 e G4, G3 e G4, G3 e G5. As menores concentrações de Pb^{2+} no sangue foram observadas nos grupos G1 e G6, próximas de zero, valores intermediários foram encontrados nos grupos que receberam água contendo a concentração mais baixa de Pb^{2+} , G2 e G3, e as maiores concentrações observadas no sangue foram para os animais dos grupos que receberam a maior concentração de acetato de chumbo (1,05 mM).

Embora não apresentem diferença significativa, a administração concomitante do FeSO_4 ao $(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2)$ foi capaz de reduzir as concentrações sanguíneas de Pb^{2+} dos animais dos grupos que receberam água contendo $(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2)$ nas duas concentrações distintas, 0,26 mM e 1,05 mM quando se compara os grupos expostos ao acetato de chumbo e o os grupos que também receberam FeSO_4 (G2 e G3, G4 e G5). Os dois grupos com o FeSO_4 associado (G3 e G5) apresentaram diferença significativa entre si, o que pode reforçar a diminuição da concentração de Pb^{2+} nos grupos em que o FeSO_4 está associado.

Os valores médios e desvios padrão da concentração de Pb^{2+} no cérebro (ng/g) dos 6 animais de cada grupo, controle e experimentais, durante o período de exposição foram analisados por meio de ANOVA após transformação logarítmica, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Por meio deles foi possível detectar diferença significativa entre os grupos ($F=178,13$; $p<0,0001$). As menores concentrações de Pb^{2+} no cérebro foram observadas nos grupos G1 e G6 (1,55 e 15,28 ng/g ,

respectivamente). O grupo controle diferiu estatisticamente de todos os grupos. Valores intermediários foram encontrados nos grupos que receberam a mais baixa concentração de acetato de chumbo (G2: 42,67 e G3: 38,96). O grupo G2 apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos experimentais G4, G5 e G6. O mesmo perfil foi observado para o grupo G3, que também diferiu dos grupos G4, G5 e G6, entretanto, eles não diferiram entre si. Já para os animais que receberam alta concentração de acetato de chumbo (G4 e G5), não foram detectadas diferenças estatísticas entre eles, mas ambos apresentaram diferenças quando comparados aos animais que foram receber apenas FeSO_4 . A administração de FeSO_4 nos grupos que receberam as mesmas concentrações de Pb^{2+} (G2 e G3, G4 e G5) foi capaz de reduzir suas concentrações no cérebro, embora não tenham sido estatisticamente significativas entre seus respectivos pares.

Tabela 3. Concentração média ($\pm$ dp) de Pb^{2+} no sangue ($\mu\text{g/dL}$) e no cérebro (ng/g) dos animais dos grupos controle e experimentais expostos a água contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso.

Grupos	$[\text{Pb}^{2+}]$ sangue ($\mu\text{g/dL}$)	$[\text{Pb}^{2+}]$ cérebro (ng/g)
G1 - Controle	0,28 $\pm$ 0,18 ^a	1,55 $\pm$ 0,47 ^a
G2 – 0,26 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)	8,77 $\pm$ 5,96 ^{bd}	42,67 $\pm$ 19,89 ^b
G3 – 0,26 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) + FeSO_4	4,88 $\pm$ 1,48 ^b	38,95 $\pm$ 17,96 ^b
G4 –1,05 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)	38,80 $\pm$ 17,11 ^c	445 $\pm$ 86 ^c
G5 –1,05 mM ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) + FeSO_4	23,36 $\pm$ 4,68 ^{cd}	309 $\pm$ 50,57 ^c
G6 – FeSO_4	0,09 $\pm$ 0,05 ^a	15,28 $\pm$ 3,65 ^d

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

Figura 8 - Concentração média de Pb²⁺ no sangue (µg/dL) em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

Figura 9 - Concentração média de Pb²⁺ no cérebro (ng/g) em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou 20mg/kg de sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05)

5.4 DOSAGEM DE HL

Os valores da concentração de HL no cérebro estão exibidos na figura 10. Embora ANOVA tenha detectado diferenças significativas (ANOVA, $F=3,085$; $p=0,0230$), o teste de Tukey-Kramer não identificou entre quais grupos houve essa diferença. Os grupos G1, G3 e G5 apresentaram valores próximos entre eles e inferiores aos grupos G2, G4 e G6 os quais também apresentaram resultados parecidos, observou-se ainda que os grupos associados ao FeSO_4 demonstraram valores inferiores quando comparados aos seus pares (G3: 0,148 e G5: 0,143 $\mu\text{mol/g}$ tecido), embora os dados não mostrem diferença significativa.

Figura 10 - Concentração média de HL nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

5.5 DOSAGEM DE TBARS

As concentrações de TBARS obtidas para as amostras de cérebro (figura 11) foram bastante semelhantes em todos os grupos, dessa maneira a análise utilizada, ANOVA, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($F=0,8616$; $p=0,5193$). Os valores para as amostras oscilaram entre 1,07 e 1,23 $\mu\text{mol}/100\text{ mg tecido}$. A partir da figura, pode-se observar que os grupos não apresentaram discrepância entre os dados, mas G1 e G4 apresentaram os menores valores (1,088 e 1,07 $\mu\text{mol}/100\text{ mg tecido}$, respectivamente) e a maior concentração foi para o grupo G2 (1,235 $\mu\text{mol}/100\text{ mg tecido}$).

Figura 11 - Concentração média de TBARS nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol}/100\text{ mg tecido}$) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$)

5.6 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES TOTAIS (SAT)

5.6.1 Técnica *DPPH*^{*}

A atividade antioxidante total das amostras de cérebro foi demonstrada também por meio da técnica *DPPH*^{*} (figura 12). Os resultados foram analisados por ANOVA ($F=5,337$; $p=0,0018$), e por meio do teste Tukey-Kramer observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo com FeSO_4 (G6). Também houve diferença significativa entre o grupo G3 e G6, sendo que o grupo associado com o FeSO_4 apresentou menor valor (0,6 TEAC) entre todos os grupos. G1 e G3 apresentaram os maiores valores (1,48 e 1,5 TEAC, respectivamente). Em relação aos grupos associados ao FeSO_4 , G3 apresentou resultado maior que seu par (G2) com mesma dosagem de Pb^{2+} , já G5 apresentou resultados muito próximos a seu par (G4), porém tais resultados não foram estatisticamente significativos.

Figura 12 – Substâncias antioxidantes totais relativas ao trolox (TEAC) referentes à técnica SAT-*DPPH*^{*} nas amostras de cérebro dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

5.6.2 Técnica ABTS

Utilizou-se a técnica ABTS para observar a capacidade antioxidante total. A partir dela notou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos por meio do teste paramétrico ANOVA ($F=12,614$; $p<0,0001$) (figura 13). O teste Tukey-Kramer identificou que o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa dos grupos que receberam alta concentração de acetato de chumbo (G4 e G5), mas estes não diferiram entre si. O mesmo perfil foi observado para o grupo G3, que também diferiu significativamente dos grupos G4 e G5, os quais demonstraram os maiores valores (7,89 e 7,48 TEAC, respectivamente). Houve um aumento significativo dos grupos G4, G5 e G6 quando comparados ao grupo G2, sendo que este grupo apresentou o menor valor (5,56 TEAC). Os grupos associados com o FeSO_4 não demonstraram diferença significativa em relação a seus pares.

Figura 13 – Substâncias antioxidantes totais relativas ao trolox (TEAC) referentes à técnica SAT-ABTS nas amostras de cérebro dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

5.7. DOSAGEM DE GSH

Para a dosagem de GSH as amostras de cérebro (figura 14), passaram por análise estatística por meio do teste ANOVA e Tukey-Kramer, o qual demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F=14,293$; $p<0,0001$). Os valores variaram de 5,81 a 13,02 nmol GSH/mg proteína. O grupo que apresentou a maior concentração foi G5 (13,02 nmol GSH/mg proteína), o qual diferiu estatisticamente dos demais grupos. O grupo com menor concentração foi G3, que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos G1 e G5. No que se refere ao grupo controle, os grupos G2, G3, G4 e G6 mostraram-se com concentrações menores, mas apenas os grupos G3 e G4 foram estatisticamente significativos.

Figura 14 - Concentração média de GSH nas amostras de cérebro (nmol GSH/mg proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

5.8. DOSAGEM DE GPx

Na figura 15 estão reunidos os resultados de GPx das amostras de cérebro, as quais apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, $F=15,803$; $p<0,0001$). Os valores variaram de 2,42 a 2,85 $\mu\text{g GSH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína, sendo que o maior foi para o grupo controle e o menor para o grupo com FeSO_4 . Diferenças significativas foram observadas pelo teste Tukey-Kramer, os grupos G1 e G6 apresentaram diferença significativa entre si, G1 foi diferente estatisticamente dos demais grupos. O grupo G6 apresentou diferença estatística em relação aos animais que receberam 0,26 mM ou 1,05 mM de acetato de chumbo (G2 e G4), respectivamente. Notou-se que os grupos associados com o FeSO_4 (G3 e G5), quando comparados aos seus pares (G2 e G4) que receberam doses iguais de Pb^{2+} apresentaram resultados ligeiramente inferiores, muito embora não tenham demonstrado diferença estatística. Os grupos que receberam apenas Pb^{2+} , G2 e G4, apresentaram valores muito próximos entre si, assim como os grupos associados ao FeSO_4 , G3 e G5, ainda que tenham recebido doses diferentes de Pb^{2+} .

Figura 15 - Atividade de GPx nas amostras de cérebro ($\mu\text{g GSH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

5.9. DOSAGEM DE SOD

Notou-se diferença estatisticamente significativa entre os resultados de SOD nas amostras dos grupos experimentais (ANOVA, $F=3,911$, $p=0,0089$) (figura 16). Após o teste de Tukey-Kramer, observou-se maior atividade de SOD no grupo controle (17,98 U/mg proteína), diferindo estatisticamente dos grupos G3, G4 e G5. Apesar de não existir diferenças estatisticamente significativas, os grupos associados ao FeSO_4 em ambas as concentrações (0,26 mM e 1,05 mM de acetato de chumbo), apresentaram valores inferiores a seus pares, os quais receberam a mesma dosagem de Pb^{2+} . Além disso, os grupos não expostos ao acetato de chumbo (G1 e G6), demonstraram valores superiores aos grupos expostos a tal elemento.

Figura 16 - Atividade de SOD nas amostras de cérebro (U/mg proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)

5.10. DOSAGEM DE CAT

Na análise da atividade da catalase no cérebro (figura 17), os resultados entre os grupos expostos foram similares e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (ANOVA, $F=2,106$; $p=0,0921$). Os valores das amostras variaram entre 2,68 e 3,52 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína. Foi possível notar que os valores dos grupos expostos ao Pb^{2+} foram superiores a G1 e G6. No que se refere aos grupos associados ao FeSO_4 , G3 apresentou resultado superior a seu par (G2) que foi tratado com a mais baixa concentração de $(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2)$, em contrapartida G5 apresentou resultado inferior a seu par (G4) tratado com a mais alta concentração de $(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2)$.

Figura 17 - Atividade de CAT nas amostras de cérebro ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) dos animais em relação aos diferentes grupos expostos, controle e experimentais contendo diferentes concentrações de acetato de chumbo e/ou sulfato ferroso. Barras verticais representam desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$)

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O chumbo na forma metálica tem sido amplamente utilizado na indústria no processo de fabricação de diversos tipos de materiais, porém parte dele pode contaminar o solo, o ar, a água e consequentemente os organismos vivos serão expostos no próprio ambiente industrial ou fora dele (SILVA, 2000; MAINENTI, 2006; MOREIRA; NEVES, 2008). Esse elemento não apresenta nenhuma função fisiológica conhecida sobre o organismo de seres humanos e animais, mas pode induzir vários tipos de toxicidade (KOSNETT, 2010). A exposição ao chumbo é uma realidade, com situações de grande diversidade, que tem gerado uma permanente atenção por parte da comunidade científica.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhece que os níveis admissíveis de exposição se distinguem em vários países, no Brasil a norma regulamentadora do Ministério da Saúde (Portaria nº 777/GM 2004), estabelece conceitos para valor de referência de normalidade e o Índice Biológico Máximo Permitido, definidos, respectivamente como “o valor possível de ser encontrado em populações não expostas ocupacionalmente, e o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria da população exposta ocupacionalmente não corra o risco de dano à saúde”, sendo que os valores de chumbo no sangue são 40 µg/dL e 60 µg/dL, respectivamente. Porém sabe-se que valores de chumbo no sangue inferiores à 5 µg/dL são capazes de provocar danos irreversíveis principalmente em crianças (LANPHEAR et al., 2000; CANFIELD et al., 2003; AHAMED; SIDDIQUI, 2007; JUSKO et al., 2008; ADVISORY COMMITTEE ON CHILDHOOD LEAD POISONING PREVENTION, 2012; CDC, 2012). Durante o desenvolvimento de uma criança, o SNC pode ser afetado adversamente por valores de chumbo no sangue menores do que 5 µg/dL, assim como nos adultos o SNC também é afetado por concentrações abaixo 40 µg/dL (WANG, et al., 2007a).

O chumbo é caracterizado como um elemento que apresenta alta toxicidade para a população (ANDREWS, 2000; MOREIRA; MOREIRA, 2004). Por esse motivo há um interesse ainda maior em encontrar mecanismos que minimizem as alterações provocadas nas populações expostas. Para isso, no delineamento desse trabalho, foram utilizadas duas concentrações distintas de acetato de chumbo

buscando caracterizar nos animais exposições humanas subcrônicas encontradas na literatura.

Ainda nesse sentido, alguns pesquisadores tem trabalhado com alternativas de cuidados à exposição ao chumbo, como exemplo a administração de agentes com poder quelante, antioxidantes e mesmo íons como zinco (GURER; ERCAL, 2000; GAUTAM; FLORA, 2010). No entanto, alguns trabalhos da literatura destacam sobre os possíveis efeitos desses componentes utilizados para os cuidados de pacientes expostos ao chumbo (FLORA; PANDE; MEHTA, 2003; MOLINA et al., 2011). Especificamente sobre o efeito do zinco, os trabalhos relatam a diminuição de absorção do chumbo no trato gastrointestinal, como um efeito da administração do zinco (GURER; ERCAL, 2000). Ainda levando em consideração esse possível mecanismo outro ânion tem despertado o interesse dos pesquisadores: o ferro. Alguns autores consideraram que o ferro poderia atuar de maneira a beneficiar cérebros expostos, como por exemplo evitando o aumento de chumbo no sangue, protegendo a integridade da barreira hematoencefálica contra os efeitos adversos do elemento e até prevenindo contra a citotoxicidade e apoptose celular induzida (BRADMAN et al., 2001; WANG et al., 2007a; WANG et al., 2007b).

Entre os mecanismos de toxicidade do chumbo estão descritos a sua capacidade de interferir no funcionamento das membranas celulares e enzimas, sua alta afinidade com os grupos sulfidril (SH) das enzimas e formação de complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos $-SH$, $-H_2PO_3$, $-NH_2$, $-OH$), que funcionam como doadores de elétrons. As interações do chumbo com SH podem ocorrer em uma enzima, alterando sua atividade e provocando efeitos tóxicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A estabilidade dos complexos de chumbo aumenta com o número crescente de sítios ligantes, como no caso dos grupamentos sulfidrilas vicinais que estão relacionados com a ativação da proteína quinase C (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003). Essas ligações dos íons Pb com moléculas orgânicas são fortes, porém ainda não foram bem esclarecidas com respeito aos efeitos do chumbo. Existem citações dos efeitos neurotóxicos do chumbo: distúrbios no metabolismo do carboidrato, síntese anormal de nucleotídeos, inibição da respiração celular, bloqueio dos grupamentos SH- neuronais e mudanças nas concentrações de ácido neuramínico e RNA (SALVADOR; URANGA; GIUSTO, 2010; MOREIRA; MOREIRA, 2004; WELCH, et al., 2002; ANDREWS, 2000; ASTR,

1999), porém essas indicações precisam ser analisadas no caso da interação do chumbo com o ferro.

6.1 CONSUMO DE ÁGUA

Em relação à média do consumo de água diário (mL) dos animais, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os dois grupos experimentais que receberam 0,26 mM M de acetato de chumbo e o grupo que recebeu apenas sulfato ferroso apresentaram maior consumo médio diário de água que o grupo controle. Porém em relação aos dois grupos experimentais cuja concentração de acetato de chumbo foi maior, 1,05 mM, não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Portanto os resultados demonstraram uma inclinação no sentido de que os animais que receberam a menor dosagem de acetato de chumbo consumiram mais água. Essas diferenças no consumo de água em relação aos animais podem ocorrer 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 exposição, assim não apresentaram 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 tratou ratos *Wistar* com 0,5% (13,18 mM) de Pb^{2+} na água de beber por 3 semanas, em que não foram observadas mudanças na massa corporal dos animais.

6.3 CHUMBO NO SANGUE

Realizou-se a análise da concentração média de chumbo (Pb^{2+}) no sangue total ($\mu g/dL$) dos animais em todos os grupos, em tais resultados observou-se um perfil esperado dose-resposta, ou seja, quanto maiores as concentrações de Pb^{2+} ministradas maiores as concentrações de Pb^{2+} no sangue. Os grupos que

apresentaram os menores valores foram o controle ($0,28 \pm 0,18$) e o que recebeu apenas sulfato ferroso ($0,09 \pm 0,05$), eles também apresentaram diferença estatisticamente significativa dos demais. Em seguida, os dois grupos de 0,26 mM apresentaram valores medianos (G2 $8,77 \pm 5,96$ e G3 $4,88 \pm 1,48$). E por último os grupos os quais demonstraram os maiores valores de concentração de Pb^{2+} no sangue total foram os de 1,05 mM (G4 $38,80 \pm 17,11$ e G5 $23,36 \pm 4,68$). Tais resultados comprovam a eficácia do delineamento metodológico utilizado, o que demonstra a validade do estudo.

Em relação aos resultados dos grupos expostos ao acetato de chumbo e sulfato ferroso concomitantemente, pôde-se observar que os mesmos apresentaram valores inferiores a seus pares expostos à mesma concentração de Pb^{2+} , resultado esse semelhante aos descritos nos trabalhos em que foi usado um composto com o objetivo de reduzir os efeitos do chumbo, um desses efeitos é a diminuição do chumbo no sangue (GURER; ERCAL, 2000; GAUTAM; FLORA, 2010). Esses valores, porém, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Tais resultados demonstram uma tendência de que o sulfato ferroso pode diminuir as concentrações médias de Pb^{2+} no sangue total nas doses de 0,26 mM e 1,05 mM de acetato de chumbo.

6.4 CHUMBO NO CÉREBRO

Os quatro grupos expostos ao acetato de chumbo apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle e ao grupo experimental de sulfato ferroso, demonstrando maiores concentrações médias de Pb^{2+} no cérebro (ng/g).

Nessa análise também observou-se um perfil dose-resposta em que os animais que receberam maiores concentrações de Pb^{2+} apresentaram maiores concentrações de Pb^{2+} no cérebro (G4 445 ± 86 e G5 $309 \pm 50,57$), assim como os que receberam menores concentrações apresentaram menores concentrações de Pb^{2+} no cérebro (G2 $42,67 \pm 19,89$ e G3 $38,95 \pm 17,96$). Resultados esses semelhantes aos da literatura, em que outros autores encontraram um aumento na concentração de chumbo no cérebro dos animais expostos ao acetato de chumbo (BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012). Um detalhe encontrado recentemente por esses autores (BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012) que merece destaque é o fato de terem

dosado o chumbo em diferentes regiões anatômicas do cérebro, encontrando pequenas diferenças entre as regiões estudadas.

Os grupos que receberam o sulfato ferroso associado, comparados a seus pares que receberam igual concentração de acetato de chumbo sem associação, apresentaram resultados inferiores, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os pares ($p < 0,05$).

Esses resultados de chumbo no cérebro demonstram uma tendência de que o sulfato ferroso pode diminuir as concentrações médias de Pb^{2+} no cérebro nas doses de 0,26 mM e 1,05 mM de acetato de chumbo, o que corrobora com os resultados encontrados no sangue total como descrito anteriormente. Além disso, o sulfato ferroso parece influenciar ainda mais o grupo que recebeu a maior concentração de acetato chumbo, sendo que isso foi observado tanto na análise do sangue total quanto na análise do cérebro. Segundo os autores, esse efeito de diminuição do chumbo nos animais expostos ao sulfato ferroso pode ser devido a diminuição da absorção do chumbo na trato gastrointestinal (GURER; ERCAL, 2000).

6.5 TBARS e HL

Na análise de HL não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém pôde-se observar uma diminuição da concentração de HL nos grupos que receberam 0,26 mM e 1,05 mM de acetato de chumbo expostos ao sulfato ferroso, tais resultados foram inferiores aos grupos de 0,26 mM e 1,05 mM não associados com o sulfato ferroso e ao grupo controle. Mesmo sem diferença significativa ($p > 0,05$), nesse caso os resultados do Fe^{2+} tenderam a diminuir as concentrações de HL no cérebro dos animais expostos ao sulfato ferroso. É possível observar também que na ausência de um competidor iônico (Pb^{2+}), o íon ferro no grupo tratado apenas com sulfato ferroso demonstrou agir como um pró-oxidante, pois apresentou resultados de HL no cérebro superiores ao grupo controle e próximos aos grupos que receberam 0,26 mM e 1,05 mM de acetato de chumbo. Em um estudo de Jackie, Haleagrahara e Chakravarthi (2011) com ratos expostos a 500 ppm (1,318 mM) de acetato de chumbo por 14 dias, com análises feitas no soro, observou-se concentrações significativamente aumentados de HL, assim como tenderam os resultados do presente estudo.

A análise de TBARS não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos no presente estudo, o que corrobora com os resultados encontrados por Perotoni e colaboradores (2005) em um estudo sobre a atividade antioxidante neuroprotetora do composto chamado *Ebselen* (2-phenyl-1, 2-benzisoselenazol-3(2H)-one) em cérebros de ratos expostos ao acetato de chumbo (50 mg/Kg) e expostos a tal composto organocalcogênio (25 $\mu\text{mol/Kg}$), observaram que o acetato de chumbo não mudou a manifestação da lipoperoxidação (TBARS) no cérebro, assim como Willis (1965) que referiu que o Pb^{2+} não aumenta a lipoperoxidação. Em contrapartida outros trabalhos em cérebros de animais expostos ao Pb^{2+} encontraram resultados em que os níveis de lipoperoxidação aumentaram (NEHRU; KANWAR, 2004; ANTONIO-GARCÍA; MASSÓ-GONZALEZ, 2008; PRASANTHI et al., 2010).

Portanto os resultados de HL e de TBARS mesmo sem diferença estatisticamente significativa demonstraram relevância, pois o primeiro é um produto intermediário da peroxidação lipídica e o segundo é uma análise que demonstra o produto final da reação (MDA).

6.6 SAT-ABTS e SAT-DPPH'

As duas técnicas, SAT-ABTS e SAT-DPPH', analisaram as substâncias antioxidantes totais relativas ao trolox, na primeira o resultado obtido foi maior nos grupos em que foi administrada alta dose de acetato de chumbo e no grupo que recebeu apenas sulfato ferroso. Resultados contrários foram obtidos na segunda, em que os grupos com maior dosagem de chumbo foram inferiores ao controle, assim como no grupo que recebeu apenas sulfato ferroso.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo (SAT-DPPH') foram encontrados no trabalho recente de Jackie, Haleagrahara e Chakravarthi (2011) no qual os autores observaram concentrações significativamente diminuídos de antioxidantes totais no soro em relação ao controle em um estudo com ratos expostos a 500 ppm (1,318 mM) de acetato de chumbo por 14 dias.

6.7 GSH

A determinação da concentração média de GSH (nmol GSH/ mg proteína) nos cérebros mostrou que os grupos experimentais convergiram para menores concentrações de GSH que o grupo controle, com exceção do grupo de 1,05 mM de acetato de chumbo tratado com sulfato ferroso. Esse resultado está de acordo com os resultados encontrados no estudo de Xia e colaboradores (2010) que observaram concentrações de GSH inferiores em cérebros de animais expostos por meio de injeções intraperitoneais de acetato de chumbo (20 mg/kg) e suplementados com uma espécie de erva chinesa chamada *smilax gabra*, a qual foi capaz de levar as concentrações de GSH à normalidade. Os dados apresentados no trabalho de Gautam e Flora (2010) também demonstram uma diminuição nas concentrações de GSH em cérebros de ratos que receberam 0,5% (13,18 mM) de acetato de chumbo e foram suplementados com um tipo de flavonóide (*gossypin*), o qual foi capaz de aumentar as concentrações de GSH no cérebro, fato que não ocorreu no atual estudo em relação ao sulfato ferroso.

6.8 GPx

Os resultados da atividade da enzima antioxidante GPx ($\mu\text{g GSH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) nas amostras de cérebro demonstraram ser inferiores em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, confirmados pela diferença estatisticamente significativa.

Os valores de GPx nos grupos expostos ao acetato de chumbo associado ao sulfato ferroso indicaram disposição para resultados menores que seus pares os quais receberam igual concentração de chumbo, em vista disso há um sinal de que o sulfato ferroso nesse caso não agiria como redutor e sim como pró-oxidante. O grupo que recebeu apenas sulfato ferroso talvez pudesse confirmar isso, pois também apresentou menor atividade da enzima que o grupo controle. Tais resultados estão de acordo com a literatura como no estudo de Baranowska-Bosiacka e colaboradores (2012) em que foram analisados cérebros de ratos expostos ao chumbo que apresentavam concentrações de chumbo no cérebro abaixo de 10 ($\mu\text{g/g}$ de tecido) no período pré e neonatais, observou-se atividade de GPx significativamente rebaixada em relação ao controle. Em outro estudo de

Moneim, Dkhil e Al-Quraishy (2011) no qual foram analisados os cérebros de ratos expostos ao acetato de chumbo 20 mg/kg durante 5 dias por meio de injeção intraperitoneal (10 μ L), observou-se decréscimo significativo na atividade da GPx comparada ao controle.

6.9 SOD

A atividade da enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido (SOD) nas amostras de cérebro (U/mg proteína) foi aparentemente menor nos grupos experimentais que no grupo controle. Não foi possível observar nenhuma tendência entre os grupos que receberam acetato de chumbo associado ao sulfato ferroso e apenas acetato de chumbo, o que demonstra que talvez o sulfato ferroso não funcione como um redutor e sim como um agente oxidante. Isso poderia ser fortalecido pelo resultado do grupo que recebeu apenas o sulfato ferroso, o qual foi ligeiramente inferior que o controle.

O estudo de Prasanthi e colaboradores (2010) analisou a atividade da SOD e da CAT em córtex cerebrais expostos ao acetato de chumbo e suplementados por cálcio (Ca^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) e observou que o chumbo inibiu a atividade da SOD e da CAT no córtex cerebral, o abundante acúmulo de radicais livres induzido pelo chumbo foi revertido pelos suplementos, os quais apresentaram um efeito protetor atribuído à menor absorção do chumbo no trato gastrointestinal e à menor disponibilidade de sítios ligantes disponíveis para o chumbo. Afirmou ainda que a toxicidade do chumbo é influenciada pelo estado nutricional que requer alguns metais como zinco e ferro. Os resultados do presente estudo corroboram também com os resultados de Moneim, Dkhil e Al-Quraishy (2011), Xia e colaboradores (2010), Gautam e Flora (2010) e Nehru e Kanwar, (2004) nos quais foi encontrado decréscimo da atividade da SOD no cérebro em animais expostos ao acetato de chumbo em diferentes concentrações. Em contrapartida, Adonaylo e Oteiza (1999) registraram um aumento na atividade de SOD em cérebros de animais expostos ao chumbo. Num trabalho recente de Baranowska-Bosiacka e colaboradores (2012), os autores avaliaram a atividade das SOD1 e SOD2, além de outras enzimas. Nesse trabalho os autores encontraram uma redução da SOD2 em diferentes regiões do cérebro de ratos expostos ao chumbo, dados esses semelhantes aos do nosso trabalho. Um dado interessante encontrado por Baranowska-Bosiacka et al. (2012)

foi a diminuição das concentrações de selênio, zinco, cobre e manganês no cérebro. Segundo esses autores a diminuição dos cofatores de enzimas (especificamente o manganês para a SOD2) pode ser uma das causas da diminuição da atividade enzimática, ideia essa defendida anteriormente por Mylroie e colaboradores (1986). Mais um ponto do trabalho de Baranowska-Bosiacka et al. (2012) foi que os autores fizeram vários tipos de análises em diferentes regiões do cérebro e concluíram também que algumas regiões são mais sensíveis à exposição do chumbo.

6.10 CAT

Os resultados referentes à atividade da enzima CAT no cérebro ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) dos animais expostos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com valores similares nos grupos experimentais e no grupo controle. Houve apenas discreta propensão ao aumento da atividade nos grupos experimentais. Tais resultados não estão de acordo com a literatura (MONEIM; DKHIL; AL-QURAISHY, 2011; GAUTAM; FLORA, 2010; XIA et al., 2010; PRASANTHI et al., 2010; NEHRU; KANWAR, 2004), que encontraram atividade rebaixada da CAT em cérebros expostos ao Pb^{2+} . No entanto, num trabalho mais recente (BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012) os autores descreveram que a atividade da CAT não sofreu alterações significativas na maioria das regiões estudadas do cérebro. Em contrapartida, no mesmo trabalho, os autores descreveram um pequeno aumento na expressão da CAT (por RT-PCR e também Western Blot), ou seja, esse fato pode esclarecer a discreta tendência de aumento da atividade da CAT no presente trabalho. Seguindo as informações obtidas e citadas por Baranowska-Bosiacka e colaboradores (2012), a CAT é uma metaloenzima (apresenta um grupo heme), dessa maneira a associação com o sulfato ferroso pode ter garantido a função dessa metaloenzima, exibindo um efeito protetor contra o chumbo.

6.11 FERRO

O ferro está envolvido em diversos sistemas biológicos, é considerado fundamental em reações bioquímicas de oxidação, no entanto as mesmas propriedades físicas que permitem que o ferro atue como um cofator eficiente,

também possibilitam sua mediação em oxidações deletérias de biomoléculas, se não rigorosamente controlado. O ferro é essencial para a vida porque tem a capacidade de receber e transferir elétrons, participando como catalisador das reações redox que ocorrem nas células. Exatamente devido à alta reatividade, o ferro torna-se potencialmente tóxico, uma vez que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), transferindo um elétron para o oxigênio molecular (O_2), produzindo o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é o precursor do peróxido de hidrogênio. Esse reage com o Fe^{+2} gerando o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), por meio da reação de Fenton (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009; MILLS et al 2010). Tais espécies radicalares podem promover a oxidação de diversas moléculas e organelas promovendo danos celulares (PIERRE; FONTECAVE, 1999; ANDREWS, 2000). Para o oxigênio molecular reagir com uma biomolécula, ele precisa ser ativado enzimaticamente ou por redução de um elétron, reduzindo espécies como radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e o oxigênio molecular (REILLY; AUST, 2000)

No presente estudo, o ferro parece ter agido de maneira protetora em algumas situações, como a diminuição da concentração de chumbo no sangue e cérebro dos animais em comparação aos animais que não receberam o sulfato ferroso. Também permitiu uma maior atividade da CAT, talvez pela conservação da integridade do grupo heme presente na CAT. Por outro lado, o ferro parece ter agido como um pró-oxidante no cérebro dos animais expostos. Essa tendência foi observada em todas as análises no grupo em que foi ministrado apenas sulfato ferroso. As análises permitiram a observação de que o Fe^{2+} associado ao Pb^{2+} tende a provocar um efeito oxidante e não neutralizador. Dados esses semelhantes aos encontrados para outros compostos estudados com a finalidade de proteção à exposição ao chumbo (GURER; ERCAL, 2000; GAUTAM; FLORA, 2010), ou seja, alguns efeitos limitados ou indesejados. Por fim, o entendimento desses efeitos/mecanismos podem nortear demais pesquisas com o intuito de definir propostas para políticas de promoção de saúde.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A ingestão do acetato de chumbo pelos ratos, por meio da água de beber, aumenta concentração de Pb^{2+} no sangue e no cérebro, em geral de maneira dose-resposta. A administração do sulfato ferroso concomitante ao acetato de chumbo diminui a concentração de Pb^{2+} no sangue e no cérebro;

- Dessa maneira o Fe^{2+} é capaz de reduzir a concentração de Pb^{2+} nos dois tecidos: sangue e cérebro.

A administração de acetato de chumbo promove uma alteração nos marcadores de estresse oxidativo em cérebro de ratos, principalmente no sistema antioxidante enzimático, da seguinte maneira:

- Diminui a atividade da enzima GPx;
- Em altas concentrações altera SAT-ABTS, atividade da SOD e a concentração de GSH;
- Por outro lado, o Pb^{2+} não influencia SAT-DPPH^{*}, atividade da CAT, nem as concentrações de TBARS e HL;
- O Fe^{2+} quando associado ao Pb^{2+} alterou a atividade das enzimas SOD e GPx e a concentração de GSH.

Em vista do descrito acima, o Fe^{2+} é capaz de diminuir a concentração de Pb^{2+} nos dois tecidos, sangue e cérebro, porém o mesmo não produz efeito protetor à exposição ao Pb^{2+} nos antioxidantes em cérebro de ratos.

8 Referências

REFERÊNCIAS

Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 2001;306:1-17.

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;1093:95-104.

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. Available at http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_010412.pdf . Accessed May 18, 2012.

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

Ahamed M, Siddiqui MK. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta*. 2007;383:57-64.

Aimo L, Oteiza PI. Zinc deficiency increases the susceptibility of human neuroblastoma cells to lead-induced activator protein-1 activation. *Toxicol Sci*. 2006;91:184-91.

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 Jr F, Krug FJ, Cury JA, Souza MLR, Buzalaf MRA. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res*. 2007;104:337-345.

Alvarenga K F, Jacob LC, Martins CHF, Filho OAC, Coube CZV, Marquez JM. Emissões otoacústicas - produto de distorção em indivíduos expostos ao chumbo e ao ruído. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2003;69(5):681

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

Anderson D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species Rausing genetic and other damage. *Mutation Research*. 1996;350(1):103-108.

Andrews N. Iron Metabolism: Iron deficiency and Iron Overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:75-98.

Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett.* 2003;143(3):331-40.

Antonio-García MT, Massó-Gonzalez EL. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46:2089-95.

Athar M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp. Biol.* 2002;40:656-67.

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

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

Barber, AD, Harris, SR. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm.* 1994;34(9):26-35.

Barbosa Jr F, Rodrigues MHC, Buzalaf MR, 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):633-7.

Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VCO, Barbosa Junior F. 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.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971;44: 276-87.

Bechara EJH. Chumbo, intoxicação e violência. In: *Informativo Conselho Regional de Química – V Região*; 2004. 65, p. 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.

Beers RF, Jr., Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952 Mar;195(1):133-40.

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

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

- 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;109:1079-1084.
- Brand-Wiliams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology.* 1995;28:25-30.
- Buege, JA, Aust, SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick, SP, Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*; 1978. v. 52, p. 302-10.
- Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(4):341-6.
- Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 2003;348:1517-26.
- Cavaliere-Costa R, Stape CA, Suzuki I, Targa WHC, Bernabé AC, Miranda FG, Lage LA. Saturnismo causado por arma de fogo no quadril: relato de três casos. *Ver Bras Ortop* 1994;29(6):374-78.
- CDC. 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. Available at http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/cdc_response_lead_exposure_recs.pdf . Accessed May 18, 2012.
- Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys.* 2003;15;420(2):217-21.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3):527-605.
- Chen K, Thomas SR, Keaney Jr JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Rad Biol Med.* 2003;35(2):117-32.
- Choi JW, Kim SK. Association between blood lead concentration body iron status in children. *Arch Dis Child.* 2003;88:791-92.
- Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983;71:342-52.
- Daniel S, Limson JL, Dairam A, Watkins GM, Daya S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J Inorg Biochem.* 2004;98(2):266-75.
- 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.* 1997;26:235-46.

- Doi K, Sawada F, Toda G, Yamachika S, Seto S, Urata Y, et al. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res.* 2001; 34(3):251-61.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinate dehydratase. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2005;19:239-248.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Méd Ass Brasil* 1997;43:61-8.
- Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, Fenart L, Benaissa M, Spik G, Cecchelli R, Pierce A. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1999;274:7011-7017
- Flanagan PR, Chamberlain MJ, Valberg LS. The relation-ship between iron and lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1982;36:823-829.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
- Flora SJ, Pande M, Mehta A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact.* 2003;45(3):267-80.
- Freeman BA, Crapo JD. Byology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47:412-26.
- Frischer H, Ahmad T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. *J Lab Clin Med.* 1987;109:583-8.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biol and Endocrinology.* 2005;2(3):43.
- Gahyva, DLC; Crenitte, PAP; Caldana, ML; Hage, SRV. Caracterização da Linguagem em crianças com histórico de intoxicação por chumbo. *ProFono.* 2008;20:55-60.
- 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 HF, Mc Lean VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1990;63:69-172.
- 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;36:355-358.

-
- Godwin, HA The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5:223-7.
- Gomes VE, Souza MLR, Barbosa Jr F, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JÁ, Gerlach RF. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ.* 2004;320:25-35.
- Goyer RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ Health Perspect.* 1996;104:1050-54.
- Gulson BL, Pounds JG, Mushak P, Thomas BJ, Gray B, Korsch MJ. Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *J Lab Clin Med.* 1999;134:631-640.
- Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000;29:927-45.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biomed Sci.* 1990;15:129-135.
- Halliwell B, Aeschbach R, Lörlinger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology.* 1995;33(7):601-617.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4 ed. New York: Oxford; 2007.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews.* 1994;52(8):253-265.
- Hammad TA, Sexton M, Langenberg P. Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children. A cross-sectional study. *Ann. Epidemiol.* 1996;6:30-33.
- Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med.* 1986;107:401-4.
- Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJH. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica.* 1991;21:1085-90.
- Hershko C, Konijn AM, Moreb J, Link G, Grauer F, Weissenberg E. Iron depletion and blood lead levels in a population with endemic lead poisoning. *Isr J Med Sci.* 1984; 20:1039-1043.
- Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol* 1989;26:277-85.
- Hissin PJ, Hilf RA. A fluorometric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1973;74:214-26.
- Hsiang J, Díaz E. Lead and developmental neurotoxicity of the central nervous system. *Current Neurobiology.* 2011; 2(1):35-42.

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

Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:755-76.

Jackie T, Haleagrahara N, Chakravarthi S. Antioxidant effects of *Etlingera elatior* flower extract against lead acetate – induced perturbations in free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rats. *BMC Research Notes*. 2011;4:67.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids*. 1991;26:853-56.

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

Jorge MS, De-Vitto LPM, Lamonica DAC, Hage SRV. A exposição ao chumbo como fator de risco para alterações no desenvolvimento da linguagem. *Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia*. 2008;13:161-165.

Jusko TA, Henderson CR Jr, Lanphear BP, Cory-Slechta DA, Parsons PJ, Canfield RL. Blood lead concentrations < 10 µg/dL and child intelligence at 6 years of age. *Environ Health Perspect*. 2008;116:243–8.

Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2005; 227(2):133-9.

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

Keher JP. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23:21-48.

Kim HS, Lee SS, Hwangbo Y, Ahn KD, Lee BK. Cross-sectional study of blood lead effects on iron status in Korean lead workers. *Nutrition*. 2003;19:571-576.

Kim KA, Chakraborti T, Goldstein G, Johnston M, Bressler J. Exposure to lead elevates induction of zif268 and Arc mRNA in rats after electroconvulsive shock: the involvement of protein kinase C. *J Neurosci Res*. 2002;69:268-77.

Kim Y, Kim BH, Lee H, Jeon B, Lee YS, Kwon MJ, et al. Regulation of skin inflammation and angiogenesis by EC-SOD via HIF-1 α and NF- κ B pathways. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(11):1985-95.

Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw Hill; 2001. p. 1851-1875.

Kosnett MJ. Chelation for heavy metals (arsenic, lead, and mercury): protective or perilous? *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88(3):412-5.

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):521-9.

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;110:1774-83.

Li PJ, Sheng YZ, Wang QY, Gu LY, Wang YL. Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed Environ Sci.* 2000;13:85-89.

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

Lucas S, Sexton M, Langenberg P. Relationship between blood lead and nutritional factors in preschool children: a cross-sectional study. *Pediatrics.* 1996; 97:74-78.

Mahaffey K. Factors modifying susceptibility to lead toxicity. In: *Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects* (Mahaffey K, ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985; 373-419.

Mahaffey KR. Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention. *Environ Health Perspect.* 1990; 89:75-78.

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.

Markowitz ME, Rosen JF, Bijur PE. Effects of iron deficiency on lead excretion in children with moderate lead intoxication. *J Pediatr.* 1990;116:360-364.

Martins CHF, Vassoler, TMF, Bergonse GFR, Alvarenga KF, Costa Filho OA. Emissões Otoacústicas e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico em Trabalhadores expostos a ruído e ao chumbo. *Acta ORL.* 2007;25:293-298.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.

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

Ministério da Saúde. Portaria n.º 777/ GM, de 28 de abril de 2004. Dispõe sobre os procedimentos técnicos para a notificação compulsória de agravos à saúde do trabalhador em serviço sentinela específica, no Sistema Único de Saúde (SUS). *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, nº 81, 29 abr. 2004.1: 37-38.*

- Molina RM, Phattananarudee S, Kim J, Thompson K, Wessling-Resnick M, Maher TJ, Brain JD. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology*. 2011;32(4):413-22.
- Moneim AEA, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Effects of Flaxseed Oil on Lead Acetate-Induced Neurotoxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2011;144:904–13
- Monteiro HP, Bechara EJH, Abdalla DSP. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem*. 1991;103:73-83.
- Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Ver Panam Salud Publica*. 2004;15(2):119-129.
- Moreira GE, Rosa GJM, Barros SBM et al. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*. 2001;169:145–151.
- Moreira MFR, Neves EB. Uso do chumbo em urina como indicador de exposição e sua relação com chumbo no sangue. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2008; 24 (9): 2151-2159.
- Moss T, Rosengren NT, Skjorringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem*. 2007; 103: 1730-40.
- Myloie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986;82(3):512-20.
- Nava-Ruiz C, Mendez-Armenta M, Rios C. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. *J Mol Histol*. 2012; *In press*
- Nehru B, Kanwar SS. N-Acetylcysteine Exposure on Lead-Induced Lipid Peroxidative Damage and Oxidative Defense System in Brain Regions of Rats. *Biological Trace Element Research*. 2004;101 (3):257-64.
- 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):76-77.
- Olympio KPK, Gonçalves CG, Gunther WMR, Bechara EJH. Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in child-a review. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 2009;26:266-75.
- Olympio KPK. Exposição a chumbo e comportamento anti-social em adolescentes [tese]. São Paulo (Faculdade de Saúde Pública), Universidade de São Paulo; 2009.
- Orteiza KL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat tests. *J Nutr*. 1995;125:823-9.
- 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. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005;19:239–248.

Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry *BioMetals*. 1999;12:195-199.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63:1035-42.

Prasanthi RP, Devi CB, Basha DC, Reddy NS, Reddy GR. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *Int J Dev Neurosci*. 2010;28(2):161-167.

Press MF. Lead encephalopathy in neonatal Long-Evans rats: morphologic studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1977;36:169-193.

Rabinowitz MB. Relating Toth and blood lead levels in children. *Bull. Environ Contam Toxicol*. 1995;55:853-857.

Reilly CA, Aust SD. Biological oxidations catalyzed by iron released from ferritin. In:

Rhodes, CJ, ed. *Toxicology of the human environment. The critical role of free radicals*. London: Taylor and Francis;2000:155–90.

Rice-Evans CA. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radic Res*. 2000 Nov;33 Suppl:S59-66.

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.

Roberts JR, Roberts J, Reigart JR, Ebeling M, Husley TC. Time required for blood levels to decline in nonchelated children. *Clinical Toxicology*. 2001;39(2):153-160.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1):59-69.

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991:151-70.

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

Ruff HA, Markiwitz ME, Bijur PE, Rosen JF. Relationships among blood lead levels, iron deficiency, and cognitive development in two-year-old children. *Environ Health Perspect*. 1996;104:180-85.

- Salvador GA, Uranga RM, Giusto NM. Iron and mechanisms of neurotoxicity. *Int J Alzheimers Dis.* 2010;720658.
- Sandhir R, Julia D, Gill KD. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol.* 1994;74:66-71.
- Sanin LH, Cossio TG, Romieu I, Avila MH. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Publica Mex.* 1998;40:359-68.
- Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990;47(1):61-71.
- 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
- Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna BP, Hanumanth RS. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride.* 2001;34:108-13.
- Sie H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med,* 1991; 91: 31S-8.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. Review. *European Journal of Biochemistry,* 1993;215(2):213-19.
- Silva IFTM. Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2000.
- Skoczynska A, Smolik R, Jelen M. Lipid abnormalities in rats given small dose of lead. *Arch Toxicol.* 1993;67:200-204
- Smith RD, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. *Environ. Health Perspect.* 1996;104:60-6.
- Strömberg U, Lundh T, Skefving S. Yearly measurements of blood lead in Swedish children since 1978: the declining trend continues in the petrol-lead-free period 1995-2007. *Environ Res.* 2008;107:332-5.
- Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 1973, 32, 1870-1874.
- 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, Gomi K, Tsuruoka N. 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.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552: 335-44.
- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189:41-54.
- Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(10):2517-33.
- Vaca CE, Wilhem J, Harms-Ringdahl, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Res.* 1988; 195:137-49.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
- Verstraeten SV, Lucila A, Orteiza, PI. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol.* 2008;82:789-802.
- 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 Bul.* 2001;55:247-51.
- Villeda-Hernández J, Méndez-Armenta M, Barroso-Moguel R, Trejo-Solis, MC, Guevara J, Rios C. Morphometric analysis of brain lesions in rat fetuses prenatally exposed to low-level lead acetate: correlation with lipid peroxidation. *Histol Histopathol.* 2006;21(6):609-17.
- Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1):7-18.
- Wang J, Wu J, and Zhang Z. Oxidative stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg.* 2006;50(4):405-409.
- 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): 850-859.
- 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. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2007a; 219(1): 33-41.
- Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL. Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem.* 2006; 281(5):2497-2505.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 2004;44(4):381-6.

Watson WS, Morrison J, Bethel MI, Baldwin NM, Lyon DT, Dobson H, Moore MR, Hume R. Food iron and lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1986; 44: 248-256.

Welch KD, Davis TZ, Eden EVM, Aust TD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radical Biology & Medicine.* 2002;32(7):577–583

White LD, Cory-Slechta DA, Glibert ME, Tiffany-Castiglioni E, Zawia NH, Virgolini M, Rossi-George A, Lasley SM, Quian YC, Basha MR. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;225:1-27.

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;50:613-622.

Willis, ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochem.Biophys Acta.* 1965;98:238–251.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 3: Lead, United Kingdom. 1977.

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

Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am J Public Health.* 1999;89:1049-53.

Xia D, Yu X, Liao S, Shao Q, Mou H, Ma W. Protective effect of Smilax glabra extract against lead-induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010;130(2):414-20.

Yip R, Dallman PR. Developmental changes in erythrocyte protoporphyrin: the roles of iron deficiency and lead toxicity. *J Pediatr.* 1984; 104: 710-730.

Yip R, Norris TN, Anderson AS. Iron status of children with elevated blood lead concentrations. *J Pediatr.* 1981; 98: 922-925.

Yuan W, Holland SK, Cecil KM, Dietrich KN, Stephanie DW, Altaye M, et al. The impact of early childhood lead exposure on brain organization: a functional magnetic resonance Imaging study of language function. *Pediatrics.* 2006;118:971-77.

Zangar RC, Bollinger N, Weber TJ, Tan RM, Markillie LM, Karin NJ. Reactive oxygen species alter autocrine and paracrine signaling. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(11):2041-7.

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

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

9 Anexos

ANEXO 1 – 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 2 – 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, 01 de junho de 2010.

Senhora Professora,

Autorizamos a inclusão das alunas Fernanda Zucki e Maria Cecília de Freitas Ferreira, conforme solicitação de Vossa Senhoria, no do projeto de pesquisa ***“Potencial evocado auditivo relacionado a eventos e análise proteômica e morfológica em córtex auditivo de ratos submetidos tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com Ferro”*** de autoria de Josilene Luciene Duarte, sob sua orientação, considerando não haver impedimentos éticos.

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