

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO TRATAMENTO COM  
CHUMBO E/OU ZINCO EM RATOS DURANTE O SEGUNDO ESTÁGIO DE  
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL RÁPIDO PÓS-NATAL**

Eduardo Comeli Goulart

Florianópolis, 2001

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO TRATAMENTO COM  
CHUMBO E/OU ZINCO EM RATOS DURANTE O SEGUNDO ESTÁGIO DE  
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL RÁPIDO PÓS-NATAL**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para obtenção  
do grau de Mestre em Neurociências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia S Rodrigues

Florianópolis, 2001

**“EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO TRATAMENTO COM CHUMBO E/OU ZINCO EM RATOS DURANTE O SEGUNDO ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO CEREBRAL RÁPIDO PÓS-NATAL”.**

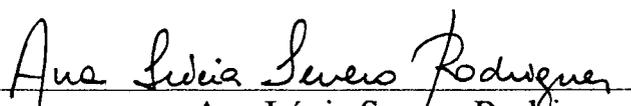
**EDUARDO COMELI GOULART**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

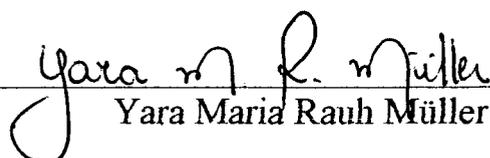
**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora

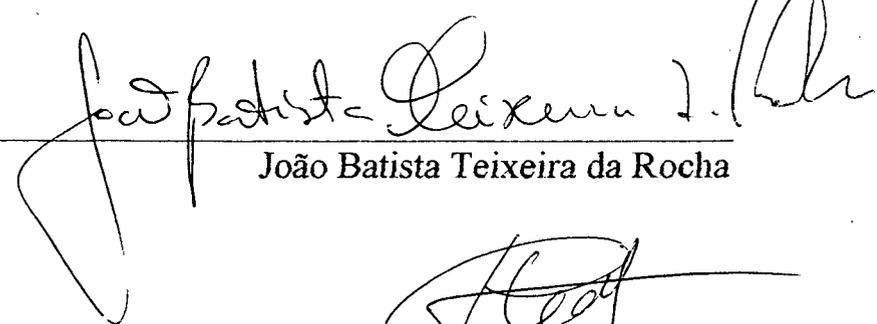
  
\_\_\_\_\_  
Ana Lúcia Severo Rodrigues

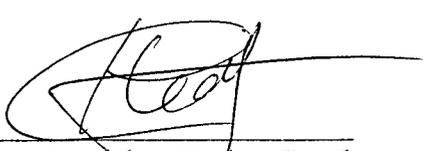
Coordenadora do Curso

  
\_\_\_\_\_  
Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Ana Lúcia Severo Rodrigues (Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
João Batista Teixeira da Rocha

  
\_\_\_\_\_  
Rodrigo Baimy Leal

## AGRADECIMENTOS

À professora e amiga Ana Lúcia Severo Rodrigues pela dedicação e empenho dispensado na orientação deste trabalho.

À Universidade do sul de Santa Catarina – UNISUL pelo apoio necessário à execução dos trabalhos experimentais.

Aos colegas de turma pelo companherismo e amizade.

Aos bolsistas do Laboratório de Neurotoxicologia (BQA/UFSC) pelo coleguismo.

Aos amigos de trabalho da UNISUL pela compreensão e colaboração para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Nivaldo, secretário da pós-graduação, por ser sempre atencioso e prestativo.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC.

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	iv
<b>Lista de figuras</b> .....	vi
<b>Lista de tabelas</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	x
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. O Chumbo .....	1
1.2. Crescimento cerebral e intoxicação por chumbo .....	6
1.3. Toxicidade renal causada pelo chumbo .....	8
1.4. Ações do chumbo sobre a enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) .....	9
1.4.1. Histórico e função .....	9
1.5. Efeito do ditioneitol sobre a ALA-D .....	15
1.6. Ações do chumbo sobre sistema nervoso central .....	16
1.6.1. Alterações funcionais .....	16
1.6.2. Alvos moleculares de ação do chumbo .....	19
1.7. O zinco .....	24
1.7.1. O zinco e a ALA-D .....	26
1.7.2. O zinco e o receptor glutamatérgico do sub-tipo NMDA .....	27
1.8. Modelos animais para estudo das alterações comportamentais causadas pelo chumbo .....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	31
2.1. Geral .....	31
2.2. Específicos .....	31
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	32

3.1. Materiais.....	32
3.1.1. Reagentes.....	32
3.1.2. Equipamentos .....	33
3.2. Animais e tratamento .....	34
3.3. Dosagem de chumbo .....	35
3.3.1. Dissecção do cérebro anterior dos animais.....	35
3.3.2. Determinação de chumbo .....	35
3.4. Determinação da atividade da enzima enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) no cérebro, rim e sangue.....	36
3.5. Determinação do Hematócrito.....	37
3.6. Dosagem de Proteínas.....	37
3.7. Testes comportamentais .....	38
3.7.1. Comportamento reflexo de geotactismo negativo .....	38
3.7.2. Teste do limiar convulsivo para convulsão induzida por NMDA....	38
3.7.3. Teste no campo aberto .....	39
3.7.4. Teste de condicionamento operante .....	39
3.7.5. Teste de alternância espontânea.....	41
<b>4. Análise Estatística .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>43</b>
5.1. Controle de peso corporal, dos órgãos isolados e hematócrito dos ratos jovens tratados com acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco.....	45
5.2. Dosagem de chumbo .....	47
5.3. Determinação da atividade da enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase e índice de reativação com ditiotreitól (DTT).....	48
5.4. Testes comportamentais .....	52
5.4.1. Geotactismo negativo .....	52
5.4.2. Limiar convulsivo.....	53
5.4.3. Habituação ao campo aberto .....	54
5.4.4. Teste de condicionamento operante.....	60

5.4.5. Teste de alternção espontnea .....	62
<b>6. Discussão</b> .....	<b>63</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>92</b>
<b>8. Referências bibliográficas</b> .....	<b>94</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALA -	Ácido delta aminolevulínico, ácido 5-aminolevulínico ou delta-aminolevulinato
ALA-D -	Enzima delta-aminolevulinato desidratase, porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidro-liase
AMPA -	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA -	Análise de variância
CDC -	Centro de Controle de Doenças ("Center for Disease Control")
DTT -	DL- Ditioneitol
FATMA -	Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente
FESSC -	Fundação Educacional do Sul de Santa Catarina
GABA -	Ácido gama aminobutírico
INPH -	Instituto Nacional de Pesquisas Hidroviárias
i.p. -	Intraperitoneal
LTB -	Limite de tolerância biológico
LTP -	Potenciação a longo prazo ("Long term potentiation")
MT -	Metalotioneínas
NMDA -	N-metil D-aspartato
NMDAR-	Receptor N-metil D-aspartato
PBG -	Porfobilinogênio
ppm -	Parte por milhão

PKA -	Proteína quinase A
PKC -	Proteína quinase C
QI -	Quociente de inteligência
KA -	Ácido cáínico
Sal. -	Salina
s.c. -	Subcutânea
SNC -	Sistema nervoso central
SOD -	Superóxido dismutase
TCA -	Ácido tricloroacético
UNISUL -	Universidade do Sul de Santa Catarina
ZnT -	Transportador de zinco
WHO -	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

1.1.	Figura 1 – Reação catalisada pela ALA-D .....	10
1.2.	Figura 2 – Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos .....	12
1.3.	Figura 3 – Representação esquemática do receptor NMDA.....	23
1.4.	Figura 4A – Atividade específica da ALA-D em cérebro .....	48
1.5.	Figura 4B – Índice de reativação com DTT em cérebro.....	48
1.6.	Figura 5A – Atividade específica da ALA-D em rins .....	49
1.7.	Figura 5B – Índice de reativação com DTT em rins .....	49
1.8.	Figura 6A – Atividade específica da ALA-D em sangue.....	50
1.9.	Figura 6B – Índice de reativação com DTT em sangue .....	50
1.10.	Figura 7 – Grau das convulsões produzidas pela administração sistêmica de NMDA .....	53
1.11.	Figura 8 – Respostas de orientação no campo aberto .....	54
1.12.	Figura 9 – Respostas de cruzamento no campo aberto .....	55
1.13.	Figura 10 – Número de bolos fecais no campo aberto .....	56
1.14.	Figura 11 – Respostas de auto-limpeza no campo aberto.....	57
1.15.	Figura 12 – Latência para sair do primeiro quadrado no campo aberto.....	58
1.16.	Figura 13A – Latência do teste de condicionamento operante .....	60
1.17.	Figura 13B – Número de respostas no teste de condicionamento operante.....	60

## LISTA DE TABELAS

- 1.18. Tabela 1 – Peso corporal do 13º ao 21º dia de idade dos ratos expostos à acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco. .... 44
- 1.19. Tabela 2 – Peso dos órgãos isolados aos 13 e 21 dias de idades dos ratos expostos à acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco ..... 45
- 1.20. Tabela 3 – Hematócrito aos 13 dias de idades dos ratos expostos à acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco..... 45
- 1.21. Tabela 4 – Conteúdo de chumbo no sangue e cérebro dos ratos de 21 dias de idade expostos à acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco do 8º ao 13º dia de idade ..... 46
- 1.22. Tabela 5 – Resposta de geotactismo negativo ..... 51
- 1.23. Tabela 6 – Latência para alternância e número da prova alternada na tarefa de alternância espontânea ..... 61

## RESUMO

O chumbo apresenta elevada toxicidade ao organismo humano atuando sobre vários alvos bioquímicos, sendo o sistema nervoso central especialmente sensível aos danos causados por este metal. As crianças tem sido motivo de preocupação por serem mais susceptíveis aos efeitos do chumbo, apresentando principalmente comprometimento cognitivo. O zinco tem sido proposto como um possível protetor dos danos causado pelo chumbo.

Este trabalho teve como objetivo avaliar alguns efeitos bioquímicos e comportamentais do tratamento de ratos jovens expostos ao chumbo 8 mg/Kg e/ou zinco 2 mg/Kg, i.p., durante a segunda fase de desenvolvimento cerebral pós-natal rápido: 8º ao 12º dia de idade. Os estudos bioquímicos (atividade da enzima ALA-D), a sensibilidade a convulsão por NMDA (20 mg/kg, i.p.) e a determinação do hematócrito foram realizados no 13º dia de idade. A tarefa de geotactismo negativo foi realizada ao longo do tratamento (9º ao 13º dia de idade) e os estudos comportamentais e dosagem de chumbo aos 21 dias de idade (desmame).

Não houve alteração do peso renal, cerebral e corporal aos 13 e 21 dias de idade. Os grupos tratados com chumbo e chumbo + zinco apresentaram uma redução do hematócrito e um acúmulo de chumbo no cérebro e no sangue (3,7 e 9,0 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente). A atividade específica da ALA-D em sangue, cérebro e rim não foi afetada pelo tratamento, porém o índice de reativação com DTT foi superior nos grupos tratados com chumbo e chumbo + zinco, indicando uma inibição da enzima nestes grupos.

No comportamento reflexo de geotactismo negativo e na sensibilidade a convulsões por NMDA, os animais tratados com chumbo e/ou zinco não apresentaram alterações significativas. Entretanto, apenas o grupo tratado somente com chumbo apresentou déficit de memória de habituação no campo aberto quando comparado ao grupo controle. Nenhum dos tratamentos alterou significativamente as respostas emocionais dos animais (defecação, respostas de auto-limpeza e latência para sair do primeiro quadrado) e na locomoção. Na tarefa de condicionamento operante (CO) e no teste de alternância espontânea (AE) somente o grupo tratado apenas com chumbo apresentou déficit de desempenho: score menor de execução da tarefa e aumento na latência para realizar a tarefa no CO e, aumentos na prova alternada e na latência para realizar para alternância na AE. O grupo tratado apenas com zinco não apresentou alteração significativa nos parâmetros bioquímicos e comportamentais avaliados.

O maior índice de reativação com DTT sobre a atividade da ALA-D e o acúmulo de chumbo em sangue e cérebro evidenciam um quadro de intoxicação leve por este metal. Os resultados obtidos nos teste de comportamentais parecem não terem sido influenciados por aspectos locomotores, uma vez que não foram observadas alterações significativas do tratamento na locomoção em campo aberto e no comportamento reflexo de geotactismo negativo. Por outro lado, os resultados obtidos no campo aberto, condicionamento operante e alternância espontânea indicam que os animais tratados com chumbo durante uma fase crítica de desenvolvimento cerebral apresentaram déficits cognitivos, os quais foram prevenidos pelo zinco. Estes resultados sugerem um efeito neuroprotetor

do zinco nos déficits cognitivos causado pelo chumbo. Contudo, uma investigação futura para a compreensão dos mecanismos envolvidos se faz necessária.

## ABSTRACT

Lead has a high toxicity, acting on several molecular targets, with the central nervous system particularly sensitive to its effects. Much of the attention on lead toxicity has been focused on children, since they are more susceptible than adults to lead effects, such as cognitive impairment. Zinc has been recently proposed as a likely neuroprotective agent against lead effects.

The present study aimed to evaluate some biochemical and neurobehavioral effects of lead acetate (8 mg/Kg, ip) and/or zinc chloride (2 mg/Kg, postnatal day). The determination of ALA-D activity, the sensitivity to NMDA-induced convulsions and the hematocrit determination were performed on postnatal day 13. The negative geotaxis test was carried out during the treatment (9 – 13 postnatal day). The behavioral tests used to assess cognitive performance as well as the lead determinations in blood and brain were done at weaning (21 day-old rats).

No effects of treatments on kidney, brain and body weights were observed (13 and 21 day-old rats). The groups treated with lead or lead + zinc had a reduction in the hematocrit value and a higher lead content in the brain and blood (about 3,7 and 9,0 fold as compared to control group, respectively). ALA-D specific activity in blood, brain and kidney was not significantly affected by the treatments. On the other hand, the reactivation index with DL-dithiothreitol (DTT) was higher in the groups treated with lead or lead + zinc, indicating that an inhibition of ALA-D may have occurred in lead and lead + zinc exposed groups.

Rats treated with lead and/or zinc did not show any significant alteration in the negative geotaxis behavior as well as in the sensitivity to convulsions elicited by NMDA. However, the lead-treated group had a deficit of memory of habituation in the open field as compared to the control group, whilst this effect was not observed in the lead + zinc-treated group. The treatments did not significantly alter locomotion and emotional responses in the open-field (defecation, grooming and latency to leave the first square). In the operant conditioning task (OCT) and in the spontaneous alternation test (SAT), only the group treated with lead exhibited a deficit of performance: lower responses and longer latency to perform the task in the OCT and a higher number of the alternated proof and longer latency to perform the task in the SAT, as compared to the control group.

The higher reactivation index with DTT and the lead content obtained in blood and brain indicate a subtle lead intoxication. The behavioral results seem not to be affected by any locomotor effect, since locomotion in the open field and the performance in the negative geotaxis behavior were not affected by lead. Moreover, the results obtained in the open-field, operant conditioning and spontaneous alternation tests indicate that rats exposed to lead during a critical stage of postnatal brain growth had cognitive impairments, which were prevented by the simultaneous treatment with zinc. These results suggest a neuroprotective effect of zinc against the cognitive deficits elicited by lead in young rats. Further investigation is necessary in order to elucidate the mechanisms underlying such an effect.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Chumbo

A contaminação ambiental com substâncias tóxicas é um dos grandes problemas contemporâneos, pelos graves efeitos que causa ao meio ambiente.

Os metais pesados são poluentes ambientais acumulados pelos seres vivos e que possuem uma durabilidade muito grande. Entre estes, o chumbo destaca-se por ser um metal cuja exposição parece ter aumentado 100 a 1000 vezes em comparação com os níveis existentes antes do advento da poluição. Em muitos países desenvolvidos a exposição ao chumbo tem diminuído, tendo em vista a adoção de políticas governamentais seriamente preocupadas com o problema (Grandjean, 1993), como por exemplo a proibição da adição de chumbo na gasolina, nos Estados Unidos e Europa, e a diminuição do uso do metal na composição de tintas (Goyer, 1996; Holmes et al., 1997). No entanto, estima-se que a contaminação ambiental pelo chumbo tem se agravado em países subdesenvolvidos.

O chumbo é um dos metais mais antigos conhecidos pela espécie humana, conforme fica evidenciado pela descoberta de artefatos egípcios feitos de chumbo datados de 4000 A.C. A partir da era Romana, há 2000 anos atrás, seu uso atingiu proporções industriais. Os problemas de saúde mais extensos relacionados à exposição ao chumbo ocorreram na história moderna, advindos do uso deste metal em tintas, na gasolina e em baterias. Seu amplo uso resultou na sua incorporação ubíqua nos solos, alimentos, poeiras, águas e ar (Al-Saleh, 1994; Cory-Slechta, 1995).

Os exemplos mais conhecidos dos compostos orgânicos de chumbo são o chumbo tetraetila e o chumbo tetrametila, os quais são usados como aditivos antidetonante da gasolina (Al-Saleh, 1994).

O chumbo possui forte afinidade por ligantes tais como fosfatos, resíduos de cisteína e histidina em proteínas, purinas, pteridinas e porfirinas. Desta forma, ele pode agir em um grande número de alvos bioquímicos: em várias enzimas que possuem grupos funcionais sulfidrílicos, ácidos nucléicos e na fosforilação oxidativa (Vallee & Ulmer, 1972).

As principais vias de absorção do chumbo são o trato gastrointestinal e o sistema respiratório. Em adultos com exposição ocupacional, a inalação é a forma predominante de absorção, enquanto que em crianças a absorção pelo trato gastrointestinal é primária (Henretig et al., 1998). A absorção intestinal do chumbo varia com a idade, pois o adulto absorve aproximadamente 10% do chumbo ingerido, enquanto que a criança absorve até 40% (Klaassen, 1996). Jejum e dietas com baixo cálcio e zinco (Bodgen et al., 1992; Locey et al., 1998), bem como a deficiência de ferro, podem aumentar a absorção intestinal de chumbo. Estes fatores são freqüentes em crianças pequenas (Henretig et al., 1998; Locey et al., 1998).

O chumbo distribui-se inicialmente no sangue e nos tecidos periféricos, particularmente no rim e no fígado. Alguns trabalhos sustentam que a principal proteína a qual chumbo se liga no sangue é a hemoglobina (Al-Saleh, 1994; Philip & Gerson, 1994; Klaassen, 1996), porém outros trabalhos sugerem que a enzima  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALA-D) é a principal proteína alvo da ligação pelo chumbo no sangue (Bergdahl et al., 1997). Com o tempo, o metal acumula-se no

osso, dentes e cabelo. Uma fração do chumbo acumula-se no cérebro, onde exerce efeitos tóxicos (Bressler & Goldstein, 1991; Silbergeld, 1992). Em adultos cerca de 95% do chumbo fica estocado nos ossos, enquanto em crianças somente 70% (Henretig et al., 1998).

Em animais experimentais, o chumbo é excretado na bile, nas fezes e na urina. Em humanos, a principal via de excreção do chumbo é através da urina, aproximadamente 65% (Henretig et al., 1998). A excreção do chumbo, no entanto, é lenta (Klaassen, 1996). A retenção de chumbo em crianças é na ordem de 33%, enquanto em adultos é de 1 – 4% (Henretig et al., 1998).

O chumbo pode ser medido no sangue total, plasma, saliva, urina, cabelo, dentes e tecido ósseo. Atualmente, a determinação da concentração sanguínea de chumbo é considerado o indicador mais útil da exposição recente a este metal (Al-Saleh, 1994; Philip & Gerson, 1994).

O chumbo atravessa a barreira placentária (Henretig et al., 1998) e é especialmente tóxico para o sistema nervoso central (SNC), tanto para humanos como para animais, sendo as crianças particularmente mais vulneráveis à exposição a este metal (Jonhston & Goldstein, 1998). Isto pode estar associado principalmente pelo hábito da criança em levar as mãos à boca, sua baixa capacidade de excretar o chumbo e sua alta capacidade de absorvê-lo comparado aos adultos e também devido sua menor proporção de tecido ósseo denso do que os adultos, com a conseqüente incapacidade de transferir tanto chumbo para o osso. A quantidade não captada pelos ossos tende a permanecer nos tecidos moles, onde produz efeitos tóxicos nos sistemas nervoso, hematopoiético e renal (Al-Saleh, 1994). O aumento da sensibilidade do SNC ao

chumbo durante o desenvolvimento pode ser atribuída também à imaturidade da barreira hematoencefálica (Lin-Fu, 1973).

Atualmente tem sido dada uma atenção especial à exposição de crianças a baixos níveis de chumbo. Em 1985 o Centro de Controle de Doenças ("Center for Disease Control") (CDC) nos Estados Unidos, estabeleceu como limite de segurança 25  $\mu\text{g}$  de chumbo/dl sangue em crianças, sendo esse valor alterado para 10  $\mu\text{g}$  de chumbo/dl sangue em 1991. Para a população adulta a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconizou como valor de segurança 20  $\mu\text{g}$  de chumbo/dl sangue (WHO, 1987). O mais recente estudo do CDC demonstrou que a população de crianças de 1 – 5 anos de idade nos Estados Unidos com valores acima de 10  $\mu\text{g}$  de chumbo/dl sangue é estimada em 8,9% (CDC, 1991).

No Brasil os limites de tolerância biológicos (LTB) são regulamentados pela Secretaria de Segurança e Medicina do trabalho através da Portaria nº 12, de 06/06/83, e citados a seguir: (Larini et al., 1997).

Índice biológico de exposição (IBE)	Valor de referência	LTB
Chumbo no sangue (Pb-S)	Até 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$	60 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Chumbo na urina	Até 65 $\mu\text{g}/\text{dL}$	150 $\mu\text{g}/\text{dL}$
$\delta$ -ALAD no sangue	30-60 U/L	10 U/L
$\delta$ -ALAD na urina (ALA-U)	Até 4,5 mg/g	10 mg/g
	de creatinina	de creatinina

Obs: U/L = micromoles de ALA utilizado/minuto/L de eritrócitos.

A intoxicação humana no Brasil com metais pesados, como o chumbo, tem sido motivo de muitas investigações, principalmente pelo fato desses metais serem contaminantes em alimentos e água e estarem presentes em atividades ocupacionais. Cordeiro et al. (1996) realizaram um estudo de distúrbios neurológicos em trabalhadores brasileiros com baixos níveis de chumbo no sangue e de ALA-U (média de 49,44  $\mu\text{g/dL}$  e 3,83 mg/L, respectivamente), onde encontraram sinais de comprometimento da memória, humor e coordenação motora fina. Esses resultados apontam contra a validação dos LTB estabelecidos no Brasil para a Pb-S e ALA-U.

A região sul do Estado de Santa Catarina é um das regiões mais afetadas pela contaminação ambiental por metais pesados. Esta região do estado tem como uma das suas características econômicas a indústria de extração mineral, bem como a produção de energia a partir da combustão de carvão através de termoelétricas. O perfil econômico do sul do estado se caracteriza ainda pela indústria de produtos químicos, tais como de tintas e de cerâmicas, que também são sabidamente conhecidas como potenciais fontes ocupacionais de exposição ao chumbo (Larini et al., 1997).

A bacia hidrográfica da região sul do estado apresenta pontos de drenagem da mineração logo após suas nascentes, onde ocorrem extensas áreas de depósitos de rejeitos do beneficiamento do carvão.

Estudos feitos, embora de circulação restrita, através de convênios com a Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente (FATMA)/Fundação Educacional do Sul de Santa Catarina(FESSC),1984; Instituto Nacional de Pesquisas Hidroviárias (INPH)/Universidade do Sul de Santa Catarina

(UNISUL), 1994; além de dezenas de ações isoladas de grupos organizados ou não, vem demonstrando que a qualidade das águas encontra-se comprometida, pois a região apresenta sérios focos de degradação ambiental. Descargas de efluentes industriais em águas naturais têm introduzido níveis inaceitáveis de substâncias químicas poluidoras nestes ambientes, tais como metais pesados como o chumbo (Giacomelli et al., 2000); muitas destas substâncias são hidrofóbicas. Assim, quando descartadas no corpo aquático, elas tendem a se adsorver na fração orgânica da matéria coloidal e particulada em suspensão e, eventualmente a se incorporar ao leito de sedimentos (Thibodeaux, 1996). Estas espécies são geralmente liberadas do leito de sedimentos podendo contaminar a água vizinha e, através deste fluido, outros sistemas ambientais podem ser atingidos por muito tempo, mesmo após as fontes ativas de poluição terem sido eliminadas. Em consequência, a contaminação de sedimentos é um grande problema de poluição ambiental em todo o mundo (Giacomelli et al., 2000). Portanto esta água, representa um perigo significativo para o ambiente, podendo ocasionalmente contaminar o lençol freático e/ou os recursos hídricos, tornando-se uma ameaça aos organismos vivos. O trabalho de Giacomelli et al. (2000) demonstrou níveis elevados de chumbo no sedimento do Rio Tubarão.

## **1.2. Crescimento cerebral e intoxicação por chumbo**

O cérebro não é um órgão homogêneo. Ele é composto por várias regiões, cada uma com diferentes tipos de células que controlam diversas funções. No rato a multiplicação neuronal acontece principalmente durante a última semana de gestação, mas nas primeiras semanas de vida pós-natal ocorre um

crescimento rápido do cérebro, caracterizado por uma intensa sinaptogênese e mielinização (Gottlieb et al., 1977; Bayer et al., 1993). A neurogênese pós-natal é pequena na maioria das estruturas cerebrais, mas é particularmente conspícua no cerebelo e no hipocampo ( Vitello & Gombos, 1987; Bayer et al., 1993). Sendo assim, durante os períodos de gestação e lactação os ratos são particularmente vulneráveis a qualquer espécie de agressão externa, como por exemplo a exposição a agentes neurotóxicos como o chumbo (Kostial et al., 1978; Rocha et al., 1995). O chumbo é um metal ubíquo no ambiente, sendo que a exposição a este metal em humanos pode ocorrer antes, durante e após a gestação (Gottlieb et al., 1977; Silbergeld, 1986; Rocha et al., 1993).

O cerebelo e o hipocampo tem sido propostos como estruturas cerebrais que são alvo para a ação neurotóxica do chumbo (Alfano & Petit, 1981; Lorton & Anderson, 1986; Hasan et al., 1989; Stoltenburg-Didinger, 1994; Adhami et al., 1996). O hipocampo e, também o cerebelo estão envolvidos em processos cognitivos (Akhondzadeh, 1999) e sofrem alterações estruturais em resposta a agentes neurotóxicos, talvez em função de seu desenvolvimento ontogenético (Walker et al., 1989).

A primeira descrição de encefalopatia experimental causada pela exposição ao chumbo foi apresentada em 1966, por Pentschew & Garro. A encefalopatia aguda provocada pelo chumbo resulta em edema e hemorragias cerebrais, principalmente no cerebelo e nos gânglios basais. Ela está sempre associada á exposição a doses elevadas de chumbo e ocorre no cérebro imaturo, e só raramente no cérebro de animais adultos (Lorton & Anderson, 1986).

Em casos de encefalopatia causadas pela administração de doses elevadas de chumbo, o teor deste metal no cérebro chega a atingir em torno de 2 a 4 ppm (Sandhir & Gill, 1994; Singh, 1995). No entanto, em se tratando de exposição de animais experimentais a baixas doses de chumbo, sua concentração no cérebro situa-se na faixa de 0,08 a 1,0 ppm (Altmann et al., 1994; Guilarte, et al., 1995). Nesta condição são verificadas alterações como comprometimento cognitivo e na atividade locomotora. A concentração de chumbo no cérebro de humanos com encefalopatia é na ordem de 1 – 2 ppm (Henretig et al., 1998).

Alguns trabalhos indicam que o chumbo acumula-se em algumas estruturas cerebrais: hipocampo, cerebelo, cortex cerebral e medula, enquanto que Widzowski & Cory-Slechta (1992) realizaram estudos que indicam que não há acúmulo de chumbo em estruturas cerebrais específicas.

### **1.3. Toxicidade renal causada pelo chumbo**

Está bem estabelecido que o chumbo pode causar sérios efeitos sobre as funções renais. O acúmulo inicial do chumbo absorvido ocorre primariamente nos rins, principalmente através de filtração glomerular e subsequente reabsorção e em menor escala através da absorção direta do sangue. A nefropatia aguda causada pelo chumbo caracteriza-se por disfunção proximal tubular com fosfatúria, glicosúria, aminoacidúria (Nolan & Shaikh, 1992; Henretig et al., 1998), proteinúria, hematúria e cilindrúria (Goyer, 1996), alterações na estrutura mitocondrial e pelo desenvolvimento de corpúsculos de inclusão nucleares e citosólicos (Nolan & Shaikh, 1992; Henretig et al., 1998). A nefropatia após exposição crônica ao chumbo é irreversível e é geralmente caracterizada por uma

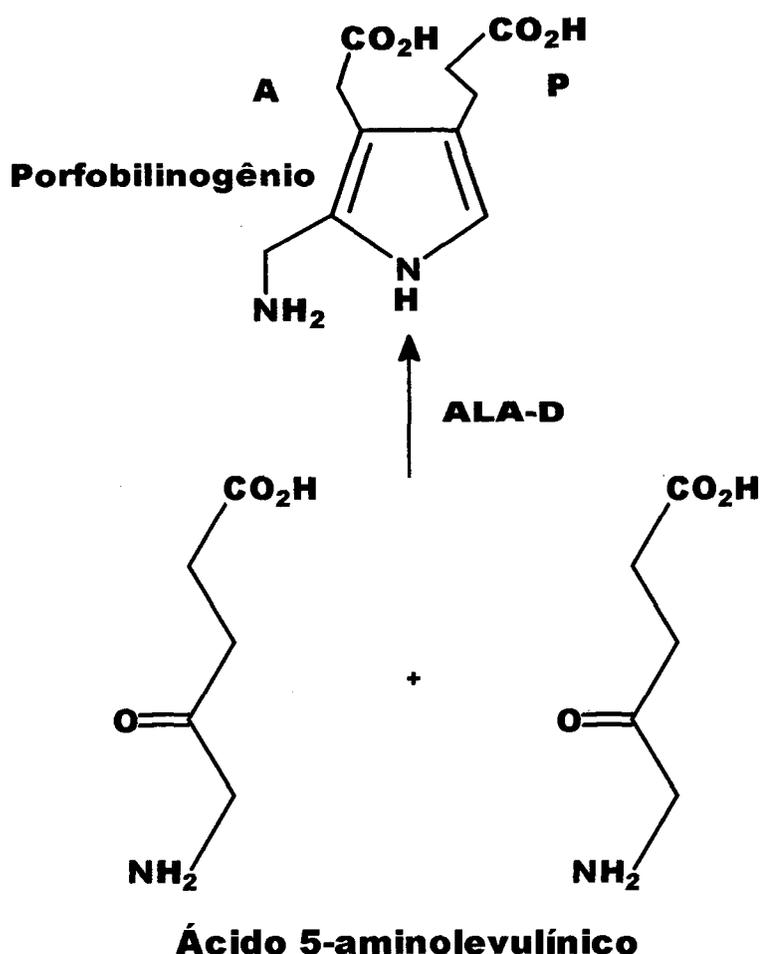
lenta e progressiva degeneração do tecido renal com a simultânea diminuição da função renal. Ela está acompanhada por fibrose, hiperplasia e atrofia dos túbulos renais, glomerulonefrite e falha renal, sendo que em ratos foi observado a ocorrência de neoplasia ou adenocarcinoma (Nolan & Shaikh, 1992; Henretig et al., 1998). O chumbo intracelular parece estar associado com proteínas ligadoras do metal. Duas proteínas com pesos moleculares aparentes de 11.500 e 63.000 foram identificadas em extratos renais de ratos. Ambas as proteínas têm uma alta afinidade, mas uma baixa capacidade de ligar chumbo e podem participar precocemente na ligação do metal nas células tubulares renais (Oskarsson et al., 1982; Mistry et al., 1985). Tem sido sugerido que as proteínas ligadoras do chumbo estão envolvidas na detoxificação do chumbo por insolubilizar o metal e, conseqüentemente, impedir a sua interação com alguns componentes celulares, mantendo uma concentração de chumbo citoplasmática relativamente baixa (Nolan & Shaikh, 1992).

#### **1.4. Ações do chumbo sobre a enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase(ALA-D)**

##### **1.4.1 Histórico e função**

A enzima citosólica delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (Dresel & Falk, 1953; Gibson et al., 1955).

Esta enzima catalisa a condensação de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico, com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 1).



**Figura 1 – Reação de formação de porfobilinogênio catalisada pela ALA-D**

A reação catalisada pela ALA-D faz parte da via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) (Figura 2). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), reações de transformação de xenobióticos (citocromo P<sub>450</sub>) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases). Existem evidências de que a ALA-D

poderia ser a etapa limitante na via de biossíntese do heme (Borralho et al., 1989; Borralho, 1990). Em mamíferos os tecidos que apresentam maior atividade enzimática são fígado, rim e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955).



Uma importante característica da ALA-D, independentemente da fonte estudada, é a essencialidade dos grupos sulfidríla para sua ação catalítica (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980). Desta forma, a enzima é inibida por bloqueadores de grupos -SH, tais como paracloromercuribenzoato, N-etilmaleimida, monoiodoacetamida e ácido 5-5'ditiobis (2-nitrobenzóico) (Batlle et al., 1967; Wilson et al., 1972; Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977). Ela também é inibida por íons metálicos que possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidríla, tais como chumbo, cobre, cádmio e mercúrio (Gibson et al., 1955; Wilson et al., 1972; Hutton, 1983; Rodrigues et al., 1989, 1996; Rocha et al., 1993, 1995; Campagna et al., 1999; El Missiry, 2000) e é oxidada quando submetida a atmosfera de oxigênio puro (Tsukamoto et al., 1979). Tsukamoto et al. (1980) e Hasnain et al. (1985) demonstraram que os resíduos de aminoácidos críticos no sítio catalítico são dois resíduos de cisteína, dois grupos imidazólicos da histidina e um grupo lisina.

Dentre os metais inibidores da ALA-D de várias origens, o chumbo destaca-se por ser o metal mais estudado quanto à inibição da enzima e por ser um metal que apresenta uma grande eficiência inibitória (Hinmarsh, 1986; Simons, 1995). A ALA-D é a enzima mais sensível da via de biossíntese do heme à inibição pelo chumbo (Goering, 1993). A inibição desta enzima pelo chumbo tem sido implicada na patogênese da intoxicação por este metal, uma vez que vários processos celulares críticos são afetados por uma concentração reduzida de heme. O heme serve como grupo prostético para vários citocromos, os quais estão envolvidos no metabolismo mitocondrial (Goering, 1993) e na metabolização de substâncias endógenas e xenobióticos (Larini et al., 1997). O heme é grupo prostético para

hemoglobina e mioglobina (Dow et al, 1996). Além disto, tem sido proposto que o substrato da enzima, o ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), o qual acumula-se na intoxicação por chumbo, seja responsável, pelo menos em parte, pela neurotoxicidade deste metal por gerar espécies ativas de oxigênio (Bechara et al., 1993; Afonso et al, 1997) e/ou por causar dano mitocondrial (Hermes-Lima et al., 1992). Também foi demonstrado que o ALA compete com receptores neuronais para ácido gama-aminobutírico (GABA) (Brennan et al., 1980).

Vários estudos sobre a inibição da ALA-D pelo chumbo têm sido conduzidos, especialmente em eritrócitos de diversas espécies animais (Granick et al., 1973; Mitchell et al., 1977; Rodrigues et al., 1989; Gonzáiez & Tejedor, 1992; Murase et al., 1993; Simmonds et al., 1995; Campagna et al., 1999; El Missiry, 2000). A atividade da ALA-D em sangue humano pode ser correlacionada com a concentração de chumbo sangüíneo, podendo, desta forma, auxiliar no diagnóstico da intoxicação aguda e crônica por este metal (Granick et al., 1973; Mitchell et al., 1977; Amitai, et al. 1999).

A inibição da ALA-D por chumbo parece ser devido ao fato de o chumbo formar uma ponte com dois grupos sulfidríla vizinhos ao centro ativo da enzima (Goering, 1993). A inibição é, na maioria das fontes enzimáticas estudadas, do tipo não competitiva (Wilson et al., 1972; Sakai et al., 1983; Rodrigues et al., 1989).

Além do papel da ALA-D na biossíntese do heme, uma outra função tem sido atribuída a esta enzima. Achados sugerem que a ALA-D poderia ter uma importância adicional, uma vez que essa enzima é idêntica ao inibidor de proteosoma, o qual atua na degradação de proteínas anormais, fatores de

transcrição, oncoproteínas, ciclinas, bem como no processamento de antígenos (Guo et al., 1994).

### **1.5. Efeito do ditioneitol sobre a ALA-D**

O DL-ditioneitol (DTT) ou reagente de Cleland é um agente redutor capaz de reduzir dissulfetos quantitativamente e de manter grupos tiólicos no estado reduzido (Cleland, 1963). Ele também funciona como um eficiente quelante de metais. O  $Pb^{2+}$  forma vários complexos com DTT. Está demonstrado que 1mM de DTT liga até 99 partes em 100 de  $Pb^{2+}$  em solução, em pH 7,0 (Gnonlonfoun et al., 1991).

Granick et al., (1973) utilizaram o quociente entre a atividade da ALA-D reativada por DTT e a atividade não reativada em sangue humano para a avaliação do nível de inibição desta enzima por chumbo. Sakai et al., (1980) usaram o inverso deste quociente. Em ambos os casos, foram obtido índices de correlação ainda superiores ao observado entre a concentração sangüínea de chumbo e a atividade da enzima como tal. Portanto, o uso do DTT no ensaio enzimático da ALA-D em indivíduos expostos ao chumbo parece ser um parâmetro eficiente e sensível para avaliar o grau de inibição da ALA-D pelo chumbo, pelo menos no que diz respeito à enzima de fonte sangüínea. A partir destes relatos, o DTT tem sido usado por alguns investigadores para ativar a ALA-D incubada na ausência de metais inibidores ou inibida por chumbo (Sassa, 1982; Murase et al., 1993; Gupta et al., 1995; Rodrigues et al., 1996a).

## **1.6. Ações do chumbo sobre o sistema nervoso central**

### **1.6.1. Alterações funcionais**

O chumbo é um metal pesado já bem estabelecido na literatura como agente tóxico ambiental, sendo responsável principalmente por alterações de ordem cognitiva e motora.

Muitos trabalhos têm demonstrado as implicações do chumbo em comprometimentos funcionais de adultos, crianças e animais experimentais.

Danos funcionais em indivíduos adultos com uma concentração de chumbo de 30  $\mu\text{g/dL}$  de sangue não são evidenciados, porém nesta situação há a diminuição da atividade da ALA-D e aumento da protoporfirina eritrocitária. Numa concentração de chumbo de 75  $\mu\text{g/dL}$  de sangue os sintomas são evidentes e caracterizados por distúrbios psicomotores, comprometimento da capacidade intelectual e alterações emocionais (Hanninen, 1982).

A neuropatia periférica é caracterizada pela destruição das células de Schwann com desmielinização e degeneração axonal, podendo ser encontrada em níveis de chumbo no sangue menores do que 40  $\mu\text{g/dL}$  (Henretig, 1998).

Nos últimos anos vêm aumentando a preocupação na comunidade científica quanto aos efeitos do chumbo sobre as crianças. Estudos epidemiológicos em crianças têm demonstrado uma relação entre os níveis de chumbo no sangue e o desenvolvimento cognitivo (Bressier et al., 1999). Estudos revelam que as crianças expostas ao chumbo apresentam perda de capacidade motora e de fala, distúrbios da coordenação das mãos e olhos, falta de percepção sensorial, déficit

no tempo de reação, que acabam resultando em prejuízos na aprendizagem (Klassen, 1996; Locey et al., 1998).

Nos Estados Unidos há trabalhos demonstrando déficit de quociente de inteligência (QI) em crianças expostas ao chumbo. Estudos mostram que o aumento do nível de chumbo corporal em crianças está associado com comprometimento na organização espacial e aumento da distrabilidade. Também há relatos de déficit de aprendizagem em macacos e ratos com níveis de chumbo  $\geq 10 \mu\text{g/dl}$  de sangue, de forma similar a humanos (Bressler, 1999). Foi observado comprometimento no desempenho escolar em crianças com valores acima de  $10 \mu\text{g/dL}$  de chumbo no sangue (Davis et al., 1993).

Após o nascimento o cérebro desenvolve um complexo circuito neuronal que o capacita a processar informações e responder a estímulos ambientais. O circuito a desenvolver-se é dependente de experiências pós-natais (Bressler, 1999). A aprendizagem de novas tarefas é dessa forma dependente do desenvolvimento de novos circuitos, que é a seleção e perda de sinapses. O déficit de aprendizagem ocorrido em animais expostos ao chumbo, pode ser devido ao fato do metal estar interferindo no remodelamento das sinapses (Bliss & Collingridge, 1993). No rato a multiplicação neuronal acontece principalmente durante a última semana de gestação, mas nas três primeiras semanas de vida pós-natal ocorre um crescimento rápido de cérebro, caracterizado por uma intensa sinaptogênese e mielinização (Gottlieb et. al., 1977; Bayer et al., 1993). Segundo Gottlieb et. al., 1977 as três fases de desenvolvimento pós-natal são: Primeira fase: 0 ao 6º dia; Segunda fase: do 8º ao 12º dia; Terceira fase: 17º ao

23º dia de idade, como dito anteriormente período no qual o animal é extremamente susceptível a agressões por agentes ambientais.

Uma das formas de se avaliar danos no SNC é o estudo através de tarefas utilizadas na avaliação da aprendizagem e memória em animais expostos ao chumbo como: campo aberto, esquiva ativa (Rodrigues et al., 1996b) e esquiva passiva (Altmann et al., 1993), condicionamento operante (Cory-Slechta et al., 1998), comportamento de alternar espontâneo (Barret e Livesey, 1985), aprendizado latente em labirinto (Rodrigues et al., 1993) e labirinto aquático de Morris (David et al., 1996; David et al., 1997).

Um dos possíveis mecanismos de ação do chumbo no sentido de causar déficit de aprendizado/memória é através do bloqueio da potenciação a longo prazo ("Long term potentiation")(LTP) (Altmann et al., 1991; Hori et al., 1993; Malenka & Nicoll, 1999). A LTP é uma propriedade fundamental da maioria das sinapses excitatórias no cérebro de mamíferos para os processos de memória e aprendizagem (Malenka & Nicoll, 1999). A LTP no hipocampo é o principal modelo experimental usado no estudo do papel das sinapses no processo de memória e aprendizagem (Akhondzaeh, 1999). O hipocampo inclusive, parece ser um dos alvos da ação do chumbo (Alfano & Petit, 1981).

A exposição crônica de ratos ao chumbo prejudica a indução da LTP nas regiões do giro dentado e CA1 do hipocampo (Bressler, 1999). A exposição ao chumbo inibe a formação e a manutenção da LTP em fatias de hipocampo de ratos expostos ao metal no período perinatal (Altmann et al, 1993).

Também são evidenciadas alterações locomotoras em animais expostos ao chumbo. Alguns pesquisadores relatam que o comportamento de orientação em

campo aberto dos animais pode ser comprometido devido ao fato de que os tratamentos utilizados possam alterar a atividade locomotora dos animais, principalmente em decorrência da hiperatividade ocasionada (Rodrigues et al., 1996b). A tarefa de geotaxia negativa é utilizada com objetivo de analisar alterações na atividade psicomotora de animais. A exposição ao chumbo pode alterar a coordenação motora em animais e humanos (Mello et al., 1998; Locey et al., 1998).

Alguns resultados registraram melhora no desempenho na tarefa geotactismo negativo em ratos tratados com chumbo (Mello et al., 1998). Porém Rocha et al. (1993) registraram um aumento na latência para completar a resposta de geotactismo negativo em animais expostos ao mercúrio durante o segundo estágio de desenvolvimento rápido do cérebro. O chumbo e mercúrio são metais pesados que apresentam ações orgânicas similares. Mesmo com diferentes resultados obtidos nos trabalhos, parece que a exposição ao chumbo realmente de uma forma ou de outra, altera a resposta desta tarefa.

Apesar da grande quantidade de trabalhos que estudam os efeitos do chumbo durante o desenvolvimento do SNC, há poucos relatos do efeito deste metal na segunda fase de desenvolvimento do SNC de animais.

### **1.6.2. Alvos moleculares de ação do chumbo**

O chumbo possui múltiplos alvos moleculares de ação, entre os quais podemos citar alterações na atividade de enzimas, tais como: adenilato ciclase, óxido nítrico sintase e proteína quinase C (PKC) (Rodrigues et al., 1999; Quinn & Harris, 1995; Sun X. et al., 1999).

Uma outra enzima que tem sua atividade afetada pelo chumbo é ALA-D, conforme mencionado anteriormente neste trabalho.

Segundo Goering (1993) há uma carência de estudos que examinam os efeitos do chumbo sobre a biossíntese de heme no cérebro de mamíferos. Os dados da literatura sobre a atividade específica da ALA-D em animais expostos ao chumbo são principalmente em sangue, rim e fígado. Poucos estudos têm investigado a atividade da ALA-D cerebral, sendo que os resultados revelam uma insensibilidade da enzima cerebral à ação do chumbo (Rocha et al., 1995) ou uma sensibilidade da enzima cerebral no caso de exposição crônica ao metal (Rodrigues, et al., 1996a).

Alguns estudos têm indicado que provavelmente a insensibilidade da ALA-D de cérebro e rim em casos de exposição de animais experimentais ao chumbo seja devido à presença de uma proteína ligadora de chumbo no cérebro e no rim de animais intoxicados (Goering et al., 1993), o que reduziria a disponibilidade de chumbo intracelular.

Outros estudos suportam também que o chumbo exerça parte dos seus efeitos por intervir em mecanismos dependentes de cálcio. Dietas deficientes em cálcio resultam em elevados níveis de chumbo em crianças e também em animais experimentais que receberam chumbo, provavelmente pelo bloqueio na absorção de chumbo no intestino pelo cálcio. O chumbo é um potente bloqueador de canais de cálcio em tecidos excitáveis (Kiss & Osipenko, 1994). Cálcio e chumbo competem pelo mesmo sítio de ligação na família de proteínas a qual pertence a calmodulina. Assim sendo, o déficit de aprendizagem causado pelo chumbo pode

ser explicado em parte pelo efeito do metal sobre proteínas dependentes de calmodulina (Bressler et al., 1999).

Tem sido relatado que o chumbo afeta vários sistemas de neurotransmissores, tais como: colinérgico, noradrenérgico, gabaérgico, dopaminérgico (Goyer, 1996) e glutamatérgico (Johnson & Goldstein, 1998).

A abundância das vias glutamatérgicas e a ampla distribuição dos receptores de glutamato no sistema nervoso central é indicativo do papel crítico do glutamato nas funções cerebrais (Cartmell & Schoepp, 2000).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso de mamíferos. Quando os terminais glutamatérgicos são despolarizados, o glutamato vesicular é liberado na fenda sináptica de forma cálcio dependente (Obrenovitch & Urenjak, 1997). Há duas categorias de receptores de glutamato, os que medeiam abertura de canais iônicos ou receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos, os quais estão associados a proteína G ligada à ativação da fosfolipase C ou inibição de adenilato ciclase. Os receptores ionotrópicos são subdivididos em três populações: aqueles que são ativados pelo N-metil D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido kaínico (KA), e aqueles sensíveis ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) (Michaelis, 1998).

O subtipo de receptor mais claramente implicado no desenvolvimento e plasticidade neural é o receptor ionotrópico NMDA (Figura 3), através do qual ocorre o influxo de cálcio e sódio. O receptor de NMDA é especial porque ele requer a estimulação do glutamato e glicina (co-agonista), bem como a despolarização da membrana para abertura do canal. Isto permite o receptor

funcionar com um “coincidence detector” que somente opera quando múltiplos estímulos sinápticos são dados ao neurônio ao mesmo tempo. Esta característica é importante para a LTP, um processo pelo qual a forte estimulação excitatória causa potenciação do estímulo subsequente ao longo da mesma via. Esta parece ser uma das bases fundamentais envolvidas no processo de aprendizagem. Drogas que bloqueiam receptores NMDA, bloqueiam aprendizagem e memória. (Akhondzadeh, 1999).

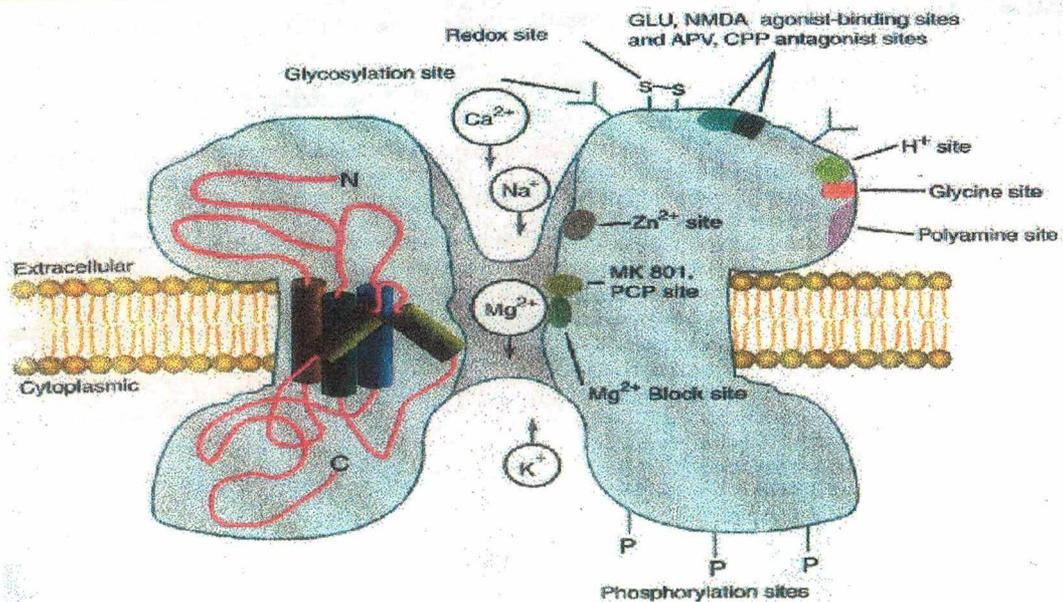
Os cátions divalentes como zinco e magnésio têm papéis importantes na regulação da atividade do receptor NMDA. O zinco é liberado juntamente com o glutamato nas sinapses do hipocampo e tem um efeito inibidor ao se ligar no seu sítio específico de ligação no receptor de NMDA. Dentro do canal no receptor de NMDA também há um sítio de ligação para magnésio, o qual bloqueia a entrada de cálcio no estado de repouso, mas é liberado quando a membrana é despolarizada (Akhondzadeh, 1999).

A identificação de múltiplas subunidades do receptor NMDA através de clonagem, mostram diferentes distribuições, propriedades e regulação, sugerindo que esses receptores são heterogêneos em suas propriedades farmacológicas, e que suas funções dependem da região e do estágio de desenvolvimento cerebral (Yamukura & Shimoji, 1999).

Tem sido demonstrado através de estudos comportamentais e neuroquímicos que o chumbo bloqueia os receptores NMDA e também altera a expressão de subunidades de receptores NMDAR-2A em hipocampo de ratos (Jonhston & Goldstein, 1998; Guilarte & Nihei, 1999). O complexo receptor NMDA além dos sítios alostéricos para zinco e glicina, também apresentam sítios de

ligação para poliaminas e fenciclidina, os quais estão intimamente associados com o canal do receptor (Akhondzaeh, 1999).

Foi proposto que o sítio do receptor de NMDA no qual o chumbo interage é o sítio modulatório que liga zinco (Guilarte et al., 1995). No entanto, um estudo recente indica que o chumbo inibe o receptor NMDA ligando em um sítio diferente do sítio alostérico do zinco (Lasley & Gilbert, 1999). Desta forma, é interessante estudar o efeito do chumbo e do zinco *per se*, bem como da co-administração de chumbo e zinco durante uma fase crítica de desenvolvimento do SNC sobre tarefas que avaliam a memória espacial, bem como a funcionalidade do receptor de NMDA, através do estudo da sensibilidade à convulsão provocada pelo tratamento com administração sistêmica de NMDA



**Figura 3 – Representação esquemática do receptor NMDA**

## 1.7. O zinco

O zinco (Zn) depois do ferro é o microelemento de maior abundância no corpo humano. Ele é necessário à função de inúmeras proteínas, sendo que dietas deficitárias em zinco podem resultar em alterações por exemplo, na maturação sexual, crescimento, funções imunológicas e funções neurológicas de animais e humanos (Choi e Koh, 1998). O zinco é cofator para uma série de enzimas vitais à homeostasia no organismo humano, incluindo a ALA-D e também tem um papel estrutural em um grande número de proteínas e fatores de transcrição (Vazák & Haster, 2000). O zinco é essencial para a síntese de coenzimas que medeiam a síntese e metabolismo de aminas biogênicas (Sandstead et. al., 2000).

Muitos estudos têm sugerido que o zinco seja um possível sinalizador intercelular. Há evidências de que o zinco é liberado sinapticamente, mais exatamente co-liberado em sinapses excitatórias glutamatérgicas. A co-liberação de zinco parece modular injúrias excitotóxicas nas sinapses excitatórias glutamatérgicas e portanto, pode estar envolvida na patogênese de algumas doenças. Há uma estimativa que a concentração de zinco intracelular é na ordem de 150  $\mu\text{M}$  (dependendo do local), sendo sua maior concentração encontrada nas fibras musgosas do hipocampo (Choi e Koh, 1998). A concentração deste metal varia entre distintas regiões cerebrais (Frederickson, 1989).

A deficiência aguda de zinco compromete as funções cerebrais de animais experimentais e humanos. Animais experimentais com deficiência de zinco durante o período inicial do desenvolvimento cerebral apresentaram má

formações, onde foram relatadas anormalidades microscópicas e subsequente comprometimento funcional do cérebro. Um limitado número de trabalhos sugere que um fenômeno similar possa ocorrer em humanos (Sandstead et. al., 2000).

Uns dos principais alvos do zinco são as proteínas chamadas de metalotioneínas (MT) que têm um papel de detoxificação de metais e parecem estar envolvidas em processos biológicos diferentes como apoptose e regulação de desenvolvimento neuronal (Vazák & Haster, 2000). Estas proteínas têm sua síntese induzida pelo zinco e outros metais como cádmio e cobre (Baeuerle, 1995). A homeostase de zinco nos eritrócitos é mantido pela sua ligação com a proteína metalotioneína e outro estudo demonstra a existência de um transportador de zinco (ZnT<sub>1</sub>).

Flora et al. (1994) demonstraram em seus estudos que o zinco foi capaz de aumentar a remoção de chumbo do sangue e de tecidos moles, aumentando a excreção urinária do chumbo.

O zinco esta associado á morte de células gliais e neuronais. Doenças neurodegenerativas são relacionadas ao aumento da concentração de zinco, o qual apresenta propriedades epileptogênicas, possivelmente por aumentar a concentração de potássio. Vários estudos *in vitro* são relatados na literatura, demonstrando alterações morfológicas, necrose e apoptose de células expostas a altas concentrações de zinco. Este metal pode ingressar nos neurônios através de três vias: 1º - canais de cálcio voltagem dependente; 2º - canais do receptor de NMDA; 3º - sub-tipos de receptores AMPA (possivelmente também cainato).

Algumas doenças são associadas à morte neural mediada por zinco. A isquemia global esta relacionada `a depleção de zinco nas fibras musgosas,

juntamente com o aparecimento de zinco na degeneração de neurônios da região CA3. A translocação do zinco pré-sináptico para o corpo celular dos neurônios parece ser prioritário para que ocorra morte celular (Koh et al. 1996)

Doenças neurodegenerativas estão associadas aos baixos níveis de zinco no cérebro, os quais seriam responsáveis por apoptose, sendo que alguma evidências o associam a doenças como Alzheimer, Parkinson e demência (Choi e Koh 1998).

Vários estudos têm relatado que chumbo interage com alvos moleculares nos quais o ligande endógeno é zinco, e isso poderia em parte explicar os efeitos tóxicos no chumbo.

### **1.7.1. O zinco e a ALA-D**

O zinco parece ter o papel de evitar a autooxidação dos grupos –SH da ALA-D e/ou estabilizar a conformação ativa da enzima, (Tsukamoto et al. 1979; Hasmain et al. 1985), além de participar da atividade catalítica da mesma (Spencer & Jordan, 1994). Estudos com injeções intraperitoneais de cloreto de zinco em camundongos resultou no aumento da atividade da ALA-D sangüínea e esplénica (Sakaguchi et al. 1997).

Chumbo e zinco parecem competir pelo mesmo sítio de ligação na ALA-D e metalotioneína, sendo que o chumbo é mais potente nesta competição do que o zinco na ligação à ALA-D (Bressier et al. 1999).

Estudos da estrutura da ALA-D revelaram que a substituição do zinco pelo chumbo inativou a enzima (Warren, et al. 1998). A ligação do íon chumbo ( $Pb^{2+}$ ) ao grupo sulfidríla ao qual normalmente liga íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) evita a ligação da

segunda molécula do substrato ácido delta aminolevulínico (ALA) (Goering, 1993). Alguns estudos demonstram que o zinco pode conferir uma proteção em relação à toxicidade pelo chumbo, pois o zinco seria capaz de restaurar a atividade da enzima ALA-D no sangue inibida pelo chumbo (Satija & Vij, 1995).

### **1.7.2. O zinco e o receptor glutamatérgico do sub-tipo NMDA**

O zinco é liberado das vesículas das terminações pré-sinápticas de neurônios glutamatérgicos que modulam receptores NMDA pós-sinápticos (Sandstead et al. 2000), sendo esta dependente de cálcio durante a atividade neural (Yamukura & Shimoji, 1999). O aumento extracelular de zinco está relacionado com alterações no comportamento de receptores e canais na membrana, como a atividade de canais de sódio e potássio (Choi & Koh, 1998).

O zinco atenua a atividade dos receptores NMDA e também reduz a resposta dos receptores GABA<sub>A</sub>. O significado funcional da liberação do zinco sináptico é de servir como mensageiro transsináptico em LTP, entrando pós sinápticamente e ativando PKC (Choi & Koh, 1998).

Efeitos contraditórios do zinco são relatados na literatura, como o seu efeito convulsivante que é atribuído à inibição da glutamato descarboxilase ácida ou da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e anticonvulsivante por inibição de receptor NMDA (Choi & Koh, 1998).

Como já mencionado anteriormente o chumbo bloqueia os receptores NMDA (Alkondon et al., 1990; Guilarte et al., 1994; Cory-Slechta et al., 1997). O sítio modulatório de zinco no receptor NMDA parece ser o alvo da interação do chumbo com esse receptor (Guilarte et al., 1995). Essa interação poderia ser

responsável em parte pelo comprometimento principalmente cognitivo em animais e humanos.

### **1.8. Modelos animais para estudo das alterações comportamentais causadas pelo chumbo**

Existe uma variedade de modelos experimentais utilizados para o estudo dos processos cognitivos, mais especificamente aprendizagem e memória. Alguns modelos são aplicados na tentativa de estudar os efeitos de compostos neurotóxicos, como por exemplo o chumbo. Os modelos existentes são aplicados a várias espécies de animais, sendo os ratos e macacos os principais alvos desses estudos.

Uma das tarefas comportamentais utilizadas para estudo de aspectos como aprendizagem e memória em ratos é a habituação em campo aberto, tarefa essa que permite uma expressão natural do comportamento em um ambiente novo, presumivelmente não aversivo. A habituação a um ambiente se expressa pela redução de tais atividades sob exposição repetida ao mesmo ambiente (O'Keefe & Nadel, 1978; Dutra et al., 1991).

Aprendizado e memória são parâmetros utilizados freqüentemente como manifestações da atividade do SNC (McGaugh, 1988, Izquierdo & Medina, 1993).

Luthman et al. (1992) demonstraram que animais expostos ao chumbo no início do período pósnatal, com doses que se aproximavam daquelas observadas em crianças, apresentaram déficit no comportamento exploratório e na atividade motora. Fergunson & Bowman (1990) demonstraram déficit de habituação em

macacos tratados com chumbo no campo aberto. Outros estudos demonstraram este efeito em ratos expostos ao chumbo (Rodrigues et al., 1996b).

O comprometimento no desenvolvimento cognitivo pode ser evidenciado através do déficit de aprendizagem.

O condicionamento operante representa modelos de aprendizagem nos quais o padrão de respostas, geralmente em forma de pressionar uma barra, são estudados em relação ao programa de reforço controlado pelo experimentador. Cada programa é baseado no número de respostas requeridas para o reforço ou a relação temporal entre a entrega do reforço. A aprendizagem controle programada pode ser um teste de aplicação na toxicologia comportamental. Através da análise da relação das propriedades temporais e seriais do comportamento, pode-se avaliar as conseqüências de uma exposição química (Bubacher & Grant, 2000).

A aprendizagem é um processo no qual capacita humanos e animais adaptar-se a seus ambientes usando experiências para ajustar seus comportamentos (Warren et al. 1998). A aprendizagem espacial é resultado de toda a formação de memórias que permite posteriormente a discriminação do lugar por referências circunvizinhas e discriminação de posições como definida pela orientação relativa do indivíduo (Bitterman, 1996).

A alternância espontânea tem sido utilizada para avaliar a integridade hipocampal (Yadin et al., 1991). O hipocampo está envolvido em processos responsáveis pela memória espacial e parece ser um dos alvos da ação do chumbo no SNC. Esta tarefa é baseada na tendência natural dos animais em

explorar sucessivamente novos espaços (Yadin et al., 1991; Einat & Szechtman, 1995).

Alguns resultados de testes utilizados no estudo dos processos cognitivos podem ser atribuídos a alterações periféricas, como por exemplo na coordenação motora dos animais. Um dos modelos aplicados com o objetivo de se estudar possíveis alterações motoras em animais expostos a agente tóxicos é o de comportamento reflexo de geotactismo negativo, pois grande parte dos animais com quatro a cinco dias de vida já apresentam esse comportamento. Sendo assim, o estudo do comportamento reflexo de geotactismo negativo é útil para se observar possíveis alterações por agentes tóxicos sobre coordenação motora dos animais numa fase inicial de vida pós natal. Há relatos indicando que o chumbo pode comprometer a coordenação motora fina em humanos (Henretig, 1998).

Na literatura há vários relatos que demonstram o receptor NMDA como um dos possíveis alvos moleculares de ação do chumbo (Alkondon et al. 1990, Guilarte et al. 1995, Cory – Slechta et al. 1997, Guiarte & Nihei 1999). O envolvimento do receptor NMDA pode ser realizado através de estudos eletrofisiológicos, de neuroquímica (binding) ou ainda por manipulação farmacológica através do tratamento dos animais com agonistas do receptor, por exemplo administração sistêmica de NMDA com posterior análise comportamental.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem por objetivo investigar a ocorrência de alterações bioquímicas e comportamentais decorrentes da administração aguda de chumbo na presença ou na ausência de zinco em ratos durante o segundo estágio de desenvolvimento cerebral rápido pós-natal.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliação do peso corporal, bem como dos órgãos isolados em função do tratamento com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.
- Determinar a concentração de chumbo no sangue e cérebro de ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.
- Estudar a atividade específica da enzima ALA-D e a sua reativação com ditiotreitol em sangue, rim e cérebro de ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.
- Investigar alterações na atividade e coordenação motora de ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.
- Investigar a sensibilidade a convulsões induzidas por NMDA em ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.
- Investigar alterações no processo de aprendizagem e memória em ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Reagentes

- Acetato de chumbo II, p.a. (Sigma)
- Ácido acético glacial (Synth)
- Ácido  $\delta$ -aminolevulínico (Sigma)
- Ácido clorídrico, p.a. (Merck)
- Ácido nítrico, p.a. (Merck)
- Ácido perclórico (Synth)
- Ácido tricloroacético, p.a. (Merck)
- Albumina de soro bovino (Sigma)
- Carbonato de sódio (Reagen)
- Cloreto de mercúrio II, p.a. (Sigma)
- Cloreto de zinco II, p.a. (Merck)
- DL-Ditiotreitol (Sigma)
- Fosfato de sódio monobásico, p.a. (Fisher)
- Fosfato de sódio dibásico, p.a. (Fisher)
- Heparina (Roche)
- Hidróxido de sódio, p.a. (Vetec)
- p-dimetilaminobenzaldeído (Vetec)
- Peróxido de hidrogênio (Merck)

- Reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma)
- Sulfato de cobre II, p.a. (Chemco)
- Tartarato de sódio e potássio (Chemco)
- Triton X-100 (Sigma)

### **3.1.2. Equipamentos**

- Agitador de tubos PHOENIX AP-56
- Balança analítica OHAUS Explorer
- Banho Maria FANEM 100
- Centrifuga Ependorff Centrifuge 5415 C
- Centrifuga microhematócrito FANEM 207-N
- Espectrofotômetro de ultravioleta UV-VIS (HITACHI) U-2010
- Homogenizador OMINI 6LH
- Material cirúrgico
- Multitimer PHOENIX TP-120
- Pipetas Finnpipette
- Condicionador Modelo ELT 02 Marca ACE
- Espectrofotômetro de absorção atômica Spectra Zeemam 220 – Varian
- Microondas para digestão DGT 100

### 3.2. Animais e tratamento

Ratos Wistar de ambos os sexos foram tratados com salina (grupo controle), acetato de chumbo (8 mg/kg), cloreto de zinco (2 mg/kg) e associação acetato de chumbo (8 mg/kg) + cloreto de zinco (2 mg/kg) através de injeções intraperitoneais (i.p.) diárias no período compreendido entre o 8º e o 12º dia de vida, conforme Rocha et al. (1995). A dose de chumbo foi baseada em estudos prévios nos quais os ratos foram expostos a 7 mg/kg, sc no mesmo período acima referido (Rocha et al. 1995). A dose de zinco foi selecionada baseado em um estudo que revelou que o zinco foi capaz de proteger a ALA-D dos efeitos do chumbo numa dose 4 vezes menor a do chumbo (Satija & Vij, 1995). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em uma sala com temperatura controlada entre 22 e 24°C. Foram utilizados ratos machos e fêmeas, os quais foram igualmente distribuídos entre as ninhadas. As tarefas comportamentais e análise do conteúdo de chumbo foram realizadas no 20º e/ou 21º dia de idade nos ratos previamente tratados. Do 8º ao 13º dia de idade, foi realizada a tarefa de comportamento reflexo de geotactismo negativo e no 13º dia de idade foram realizadas as determinações enzimáticas e a observação das convulsões induzidas por NMDA nos ratos previamente tratados. O ganho de peso corporal dos animais foi observado ao longo do tratamento e no 21º dia de idade.

### **3.3. Dosagem de chumbo**

#### **3.3.1. Dissecção do cérebro anterior dos animais**

Os ratos foram devidamente anestesiados e decapitados com guilhotina 24 horas após o término do tratamento, e logo após a pele da cabeça foi rebatida e um corte foi feito entre os forames oculares. O encéfalo foi exposto cortando-se medialmente o osso na sutura parieto-frontal até atingir o corte entre os forames oculares. O crânio foi aberto e o encéfalo removido com o auxílio de uma espátula. Este foi colocado sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo picado, a qual era revestida com papel filtro umedecido com solução fisiológica. O cerebelo, o tronco cerebral e o bulbo olfatório foram removidos. O cérebro anterior (isento de cerebelo, tronco cerebral e bulbo olfatório) foi imediatamente pesado em balança analítica digital. A coleta de sangue foi por decapitação, sendo o mesmo acondicionado em tubos de eppendorf devidamente identificados e heparinizados.

#### **3.3.2. Determinação de chumbo**

As dosagens de chumbo foram realizadas no Centro Tecnológico da UNISUL. Amostras de tecidos e sangue que estavam congeladas foram descongeladas lentamente até temperatura ambiente. As amostras de tecido foram então submetidas à digestão com 3ml de HNO<sub>3</sub> p.a, 2 mL HCl p.a e 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e em seguida levadas ao microondas DGT 100. Ao final da digestão o volume final das amostras foi elevado até 25 ml para posterior leitura. O teor de chumbo das amostras foi registrado em um espectrofotômetro de absorção

atômica. As amostras de sangue foram tratadas com Triton X-100 10% e TCA 0,25% e também analisadas por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite. Os resultados de chumbo no sangue foram expressos em  $\mu\text{g Pb/dl}$  de sangue total e o teor de Pb nos tecidos foi expresso em ppm, ou seja,  $\mu\text{g Pb/g}$  de peso de úmido da amostra.

### **3.4. Determinação da atividade da enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase no cérebro, rim e sangue.**

O cérebro total e rins foram dissecados e homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjem na proporção de 1:5 e 1:10 em salina (NaCl 150 mM), respectivamente. O material foi centrifugado a 5.000 g durante 15 minutos a 4°C em uma centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram coletados e usados nos ensaios enzimáticos. O sangue foi coletado em tubo heparinizado e diluído com salina na proporção de 1:5. A atividade da enzima ALA-D foi determinada de acordo com o método de Sassa (1982), com as modificações realizadas por Rodrigues et al. (1996a). A técnica avalia a formação do porfobilinogênio (PBG). As condições de incubação foram: temperatura de incubação de 37°C durante 60 min para o sangue e temperatura de incubação de 39°C durante 90 min e 180 min, para o rim e cérebro, respectivamente. A reação foi finalizada através da adição de TCA 10% contendo 0,05 M de  $\text{HgCl}_2$ .

Os ensaios foram realizados sob velocidade constante e havia uma relação linear entre o conteúdo de proteína e a formação do produto (PBG). A leitura da absorbância foi realizada a 555 nm. O coeficiente de absorção molar do produto da reação do PBG com o reagente de Ehrlich modificado é  $6,2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

(Mauzerall & Granick, 1956). A atividade enzimática foi expressa como nmol PBG/h/mg proteína para a ALA-D de rim e cérebro e como nmol PBG/h/ml eritrócito para a ALA-D de sangue.

Ensaio utilizando 15 mM de ditioneitol (DTT): paralelamente ao ensaio padrão foi realizado um ensaio com DTT, nas mesmas condições de incubação, exceto que 15,0 mM de DTT era adicionado ao meio de incubação. O objetivo da adição do mesmo foi obter o índice de reativação. Este índice indica a extensão da reativação da ALA-D com DTT e é obtido da seguinte forma:

$$\frac{(\text{Atividade da ALA-D com DTT} - \text{Atividade da ALA-D sem DTT})}{\text{Atividade da ALA-D com DTT}} \times 100\%$$

### **3.5. Determinação do hematócrito**

O sangue foi recolhido em duplicata em tubos capilares e a determinação do hematócrito foi realizada em centrífuga de microhematócrito.

### **3.6. Dosagem de proteína**

O conteúdo de proteínas no material enzimático (homogenatos de rim e cérebro) foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

### **3.7. Teste comportamentais**

#### **3.7.1. Comportamento Reflexo de Geotactismo Negativo**

O filhote foi colocado com a cabeça voltada para baixo em um plano inclinado de 30 graus. A resposta consistiu em mudar de posição de forma que a cabeça fique voltada para cima. O tempo em segundos (latência) necessário para o animal efetuar a referida tarefa foi cronometrado. A prova foi realizada do 9º ao 13º dia de vida dos animais, sendo que diariamente foram realizadas três sessões com intervalo médio de 30 (trinta) minutos entre cada sessão, das quais foi obtida a latência média para cada dia de tratamento, conforme descrito por Rocha et al. (1993). Se animal não realizasse essa tarefa dentro de 60 segundos a sessão era interrompida.

#### **3.7.2. Teste do limiar convulsivo para convulsões induzidas por NMDA**

Esta tarefa foi realizada em ratos de 13 dias de idade, 24 horas após o final dos tratamentos. Os animais receberam injeção intraperitoneal de NMDA 20 mg/kg e as convulsões foram observadas em cada grupo experimental durante 90 minutos, com intervalo de 5 minutos entre cada observação. As convulsões foram categorizadas conforme a seguinte escala, segundo descrito por Petit et al. (1992): 1- ereção da cauda ; 2- sacudidelas tipo cachorro molhado, tremores; 3- corrida, mordidas do corpo, ataques intermitentes; 4- convulsão tônica; 5- morte.

### **3.7.3. Teste do Campo Aberto**

Esta tarefa foi realizada conforme descrito por Rodrigues et.al. (1996b), através da utilização de uma caixa de madeira com frente de vidro, que mede 40x60x50cm de altura e tem o chão dividido em quadrados iguais. Os animais foram submetidos a duas sessões, com intervalo de 24 horas entre as mesmas. Nesta tarefa foram registrados o número de respostas de orientação ("rearings" - elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco do rato), o número de respostas de cruzamento realizadas pelo animal, o número de bolos fecais eliminados pelo rato durante a tarefa e o total de respostas de auto limpeza ("groomings"). Também foi avaliado a latência para sair do primeiro quadrado. Uma diminuição no número de respostas de orientação ao longo das sessões foi considerada como medida de memória de habituação e o número de respostas de cruzamento foi utilizado com parâmetro para avaliar a atividade locomotora. Os demais parâmetros foram utilizados como medida da emocionalidade.

### **3.7.4. Teste de condicionamento operante**

O condicionamento operante representa modelos de aprendizagem nos quais o padrão de respostas, geralmente em forma de pressionar uma barra, é estudado em relação ao programa de reforço controlado pelo experimentador. Cada programa é baseado no número de respostas requeridas para o reforço ou a relação temporal entre a entrega do reforço. A aprendizagem controle programada pode ser um teste de aplicação na toxicologia comportamental. Através da análise da relação das propriedades temporal e serial do

comportamento, pode-se reavaliar as conseqüências de uma exposição química (Burbacher & Grant, 2000).

O condicionamento operante é um paradigma de aprendizagem associativa, sendo envolvido nesta tarefa um comportamento específico com um subseqüente evento de reforço (Kandel et al., 1995).

A resposta de condicionamento operante foi analisada aos 21 dias de idade, em uma gaiola de alumínio, medindo 24 cm de altura, 26 cm de comprimento e 21 cm de largura, com piso de grades paralelas e contendo um bebedor. A parte frontal da gaiola é de vidro. A unidade controladora contém uma chave comutadora, a qual dispara um ruído no momento do acionamento do bebedouro (automático/manual).

O rato foi privado de água por 24 horas e no final desse período colocado na gaiola 10 minutos antes do início do teste para exploração e habituação à caixa. Ao final deste período foi acionado o bebedor juntamente com um estímulo sonoro, o qual o animal deve associar a liberação de água. Foi medida a latência que o mesmo levava para encontrar o bebedouro cada vez que o mesmo era acionado, bem como o número de vezes que o rato executava essa operação. Durante um período de tempo de 20 minutos de observação.

O aumento no número de vezes na procura ao bebedor, bem como a redução na latência despendida na tarefa dentro do período de observação, em relação ao grupo controle, são considerados como aprendizagem associativa.

### **3.7.5. Teste de alternância espontânea**

A resposta de alternar espontâneo foi analisada aos 21 dias de idade, em uma caixa de madeira no formato de um T, medindo os braços menores 20 cm e o braço maior 34 cm de comprimento. Ambos os braços medem 8 cm de largura e 20 cm de altura. O espaço comum entre os braços contém 8 x 8 cm. O rato foi colocado na extremidade do braço maior e foi registrada a latência que o mesmo levava para entrar em um dos braços menores. O rato era retirado da caixa e, após um intervalo de 15 segundos, colocado novamente na extremidade do braço maior, registrando-se novamente o tempo que o mesmo levava para entrar em um dos outros braços. Tal procedimento foi repetido por, no máximo 5 vezes e suspenso assim que o animal tivesse alternado o braço escolhido. Desta forma, foi registrada a prova em que o rato alternou o braço do labirinto e o tempo total necessário para o mesmo.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ninhada foi considerada a unidade experimental em todos testes comportamentais. Foi empregada a análise de variância de uma via na avaliação do peso corporal, dos órgãos isolados, nos testes comportamentais de condicionamento operante, alternância espontânea e dosagem de chumbo, seguido do teste "post-hoc" de Newman Keuls, quando apropriado. Na determinação da atividade da enzima ALA-D e no teste de limiar convulsivo foi utilizado análise de variância de uma via seguido de teste "post-hoc" de Duncan, quando apropriado. A análise de variância de duas vias com medida repetida foi aplicada no teste de campo aberto e de geotactismo negativo, seguido de teste "post-hoc" de Duncan, quando apropriado. Foi considerado estatisticamente significativo o nível de significância de  $p < 0,05$  (Sokal & Rohlf, 1981).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Controle de peso corporal, dos órgãos isolados e hematócrito dos ratos jovens tratados com acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco.

A fim de verificar se os tratamentos impostos aos ratos resultaram em alterações do peso corporal, este foi monitorado durante o período de tratamento e durante o período de testes, conforme descrito em Material e Métodos. O peso dos órgãos isolados (rim e cérebro) também foi avaliado no 13º e 21º dia de idade, correspondente aos períodos dos testes bioquímicos e comportamentais. Os resultados estão representados respectivamente na Tabela 1 e Tabela 2. No período de tratamento os animais receberam uma injeções intraperitoneal (i.p.) diária de salina (sal.), acetato de chumbo 8 mg/Kg e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, compreendido entre o 8º e o 12º dia de idade do animal. Os resultados demonstram não haver alterações significativas no peso corporal dos animais, entre os diferentes grupos de tratamento [ $F(3,42) = 0,15$ ,  $p = 0,93$ ], sugerindo portanto que, o tratamento com acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco não comprometeu a aquisição de peso corporal (Tabela 1). A ANOVA de uma via do peso do rim e do cérebro também demonstrou não haver alterações significativas entre os diferentes grupos de tratamento no 13º dia de idade, [ $F(3,36) = 2,10$ ,  $p = 0,12$ ] e [ $F(3,36) = 0,91$ ,  $p = 0,45$ ] e no 21º de idade, [ $F(3,33) = 0,50$ ,  $p = 0,68$ ] e [ $F(3,33) = 0,53$ ,  $p = 0,66$ ], respectivamente (Tabela 2). A avaliação do hematócrito foi realizado no 13º de dia de idade do animal, 24 horas após o final do tratamento. Os resultados obtidos demonstram uma alteração significativa entre os grupos tratados, [ $F(3,42) = 6,38$ ,  $p < 0,01$ ]. Os grupos tratados acetato de

chumbo e acetato de chumbo chumbo + cloreto de zinco apresentaram reduções significativas no hematócrito em relação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 1.** Ganho de peso corporal de ratos tratados com acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. durante a Segunda Fase de Crescimento Cerebral Rápido Pós-Natal.

Tratamento	PESO (g)										
	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 20	Dia 21			
Salina	16,6 ± 1,07	18,7 ± 1,13	20,3 ± 1,17	22,3 ± 1,21	24,3 ± 1,17	25,9 ± 1,21	38,5 ± 1,74	41,5 ± 1,9 **			
Pb <sup>2+</sup>	17,0 ± 0,91	19,1 ± 0,97	20,9 ± 0,94	22,9 ± 1,00	24,9 ± 0,98	26,4 ± 1,01	38,3 ± 1,61	41,4 ± 1,71**			
Zn <sup>2+</sup>	16,7 ± 0,94	18,6 ± 0,96	20,6 ± 0,95	22,1 ± 1,01	23,8 ± 0,96	25,5 ± 0,96	37,8 ± 1,59	40,9 ± 1,70**			
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	17,0 ± 0,83	19,0 ± 0,78	20,9 ± 0,83	22,8 ± 0,87	24,8 ± 0,83	26,3 ± 0,86	38,5 ± 1,40	42,0 ± 1,55**			

Os resultados são expressos com a média ± erro padrão da média de 11 – 12 animais provenientes de ninhadas distintas.

\*\* p < 0,01 comparando o peso dos animais do 8º dia de idade com animais do 21º dia de idade, dentro do mesmo grupo.

**Tabela 2.** Avaliação do peso dos órgãos isolados de ratos tratados com acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. durante a Segunda Fase de Crescimento Cerebral Rápido Pós-Natal.

Tratamento	PESO (g)			
	13º dia		21º dia	
	Rim	Cérebro	Rim	Cérebro
Salina	0,248 ± 0,016	0,624 ± 0,013	0,572 ± 0,019	0,848 ± 0,024
Pb <sup>2+</sup>	0,268 ± 0,013	0,625 ± 0,016	0,604 ± 0,024	0,864 ± 0,016
Zn <sup>2+</sup>	0,246 ± 0,015	0,627 ± 0,022	0,615 ± 0,033	0,847 ± 0,014
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	0,294 ± 0,017	0,618 ± 0,013	0,603 ± 0,024	0,834 ± 0,014

Os resultados são expressos com a média ± erro padrão da média de 8 – 11 animais provenientes de ninhadas distintas.

Não há diferença significativa entre os grupos, dentro do mesmo dia.

**Tabela 3.** Avaliação do Hematócrito de ratos tratados com acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido pós-natal.

Tratamento	Hematócrito %
	13º dia
Salina	31,3 ± 0,89
Pb <sup>2+</sup> 8 mg/kg	28,9 ± 0,61*
Zn <sup>2+</sup> 2 mg/kg	30,6 ± 0,78
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	27,2 ± 0,54**

Os resultados são expressos com a média ± erro padrão da média de 8 – 11 animais provenientes de ninhadas distintas.

\*p < 0,05 \*\*p < 0,01 em relação ao grupo salina (controle)

## 5.2. Dosagem de chumbo

A tabela 4 apresenta as quantidades de chumbo presentes no sangue e cérebro dos animais tratados durante a segunda fase de desenvolvimento cerebral pós-natal com salina, acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco. A ANOVA de uma via revelou um aumento significativo no acúmulo de chumbo nos animais tratados com acetato de chumbo e acetato de chumbo + cloreto de zinco no sangue [ $F(3,16) = 17,87, p < 0,01$ ] e no cérebro [ $F(3,14) = 7,83, p < 0,05$ ].

**Tabela 4** – Conteúdo de chumbo no cérebro e sangue de ratos de 21 dias de idade, tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p.

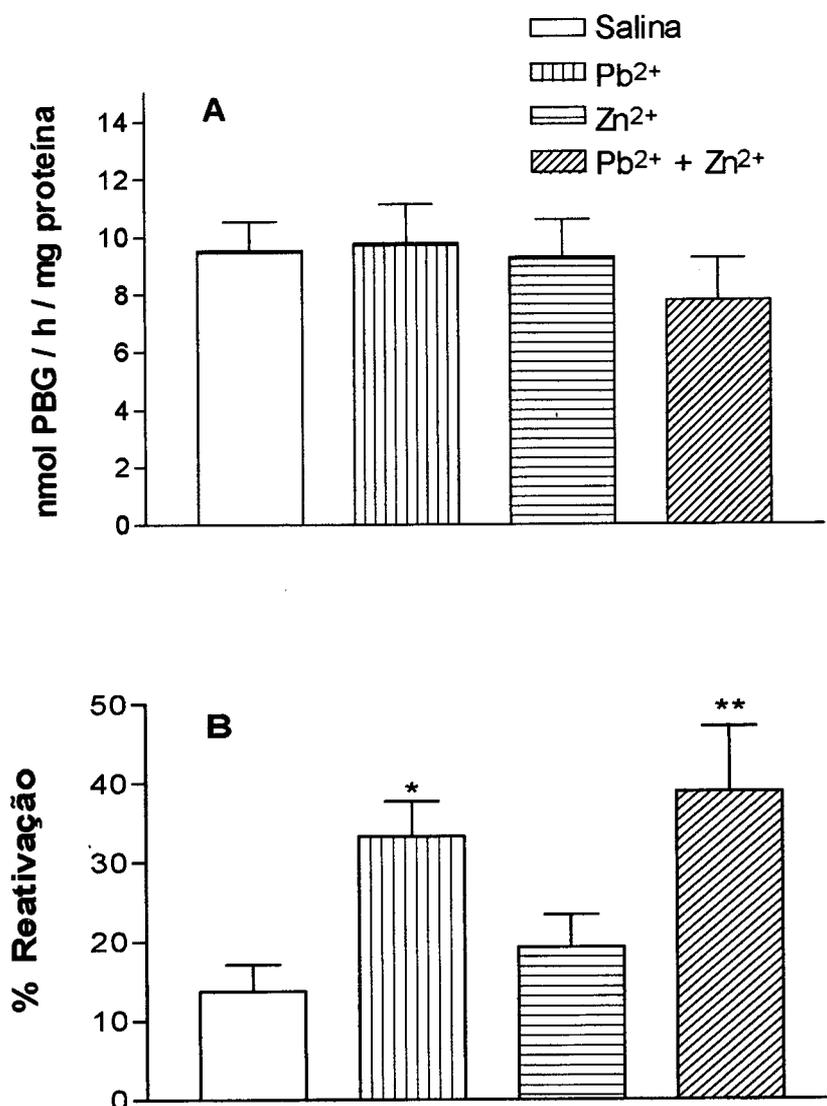
	SANGUE	CÉREBRO
Salina	1,58 ± 0,46	0,028 ± 0,002
Pb <sup>2+</sup>	15,74 ± 3,25**	0,104 ± 0,017**
Zn <sup>2+</sup>	0,88 ± 0,27	0,033 ± 0,004
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	12,87 ± 1,48**	0,094 ± 0,011**

Os resultados são representados como a média ± erro padrão da média de 5 animais. A concentração de chumbo no sangue está expressa em µg/dL e no cérebro em µg/g peso úmido.

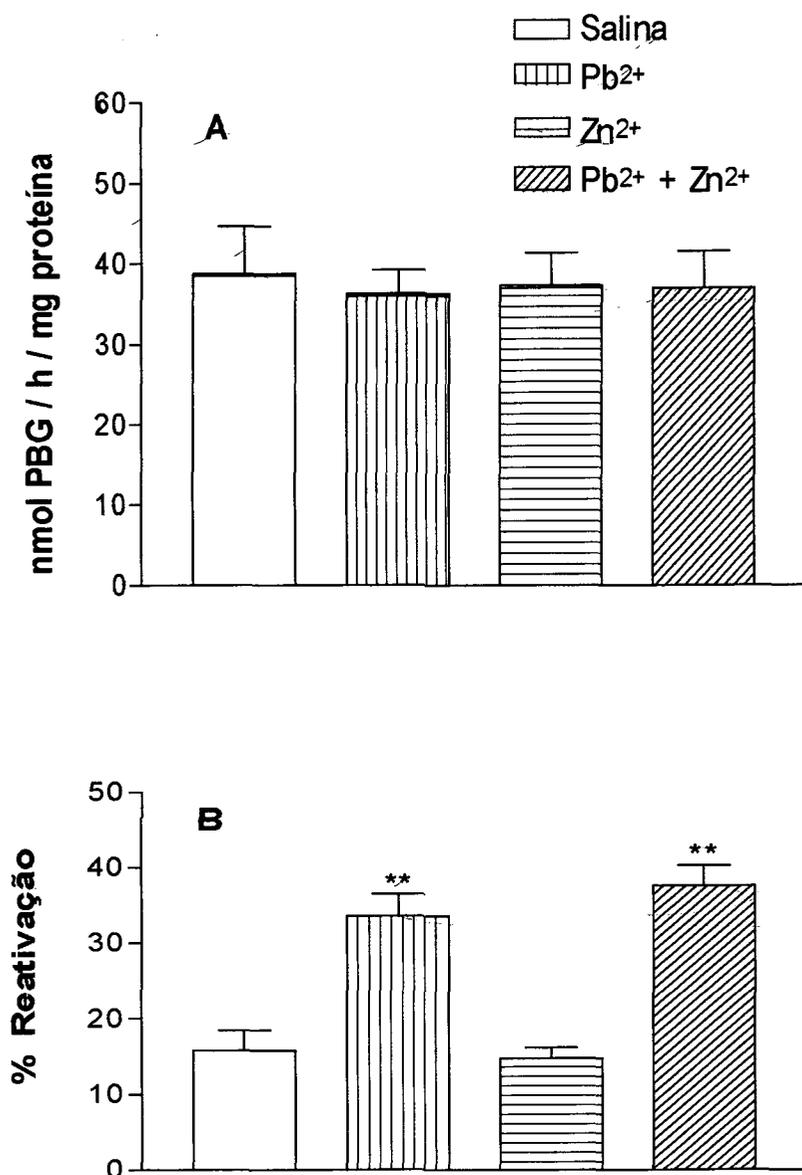
\*\*p < 0,01 em relação ao grupo salina (controle).

### 5.3. Determinação da atividade da enzima $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) e índice de reativação com ditioneitol (DTT)

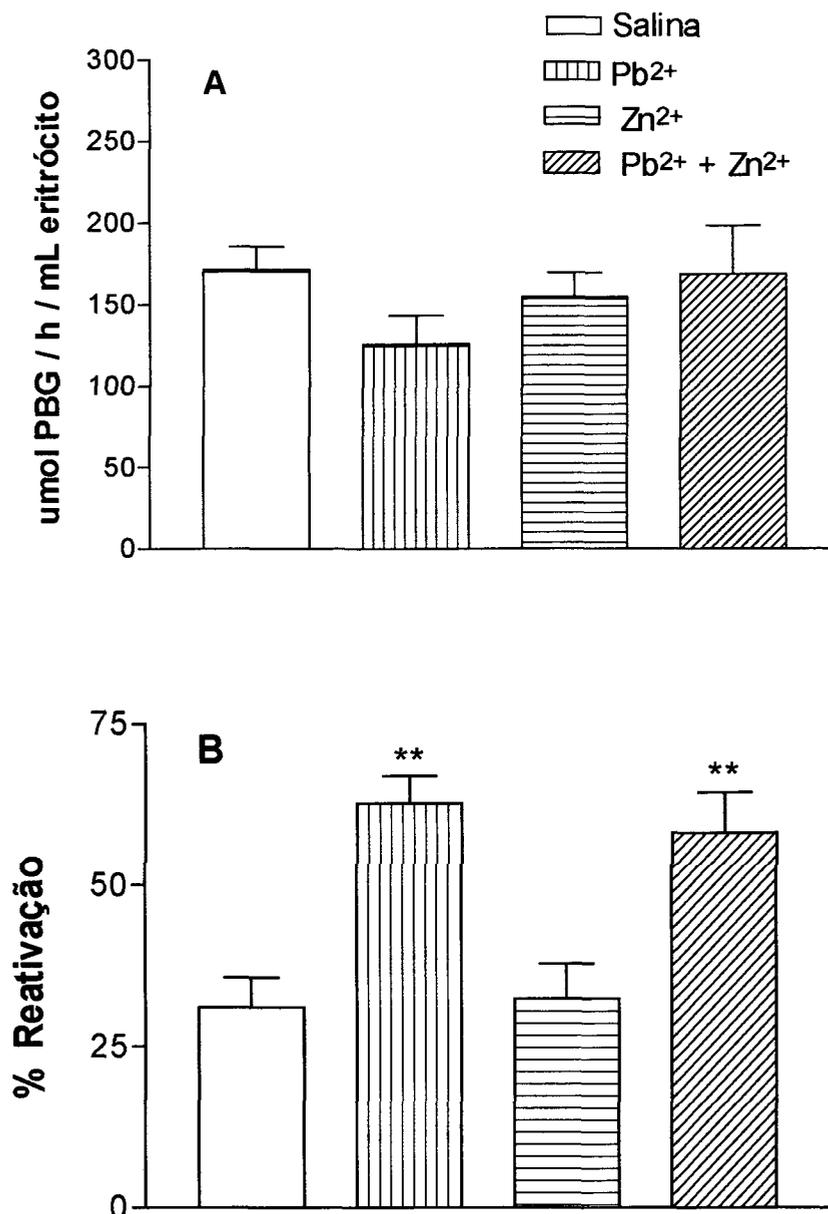
A ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D no cérebro, rim e sangue: [F(3,36) = 0,37, p = 0,78], [F(3,38) = 0,093, p = 0,96] e [F(3,38) = 0,73, p = 0,54], respectivamente (Figuras 4A, 5A e 6A, respectivamente). Entretanto, houve efeito significativo no índice de reativação com DTT no cérebro, rim e sangue, : [F(3, 36) = 5,44, p<0,01], [F(3,38) = 16,61, p<0,01] e [F(3,37) = 8,53, p <0,01], respectivamente. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que houve diferença significativa nos percentuais de reativação com DTT nos grupos chumbo e chumbo e zinco, os quais apresentaram valores superiores ao percentual de reativação do grupo controle (Figuras 4B, 5B e 6B, respectivamente).



**Figura 4** - Atividade específica da enzima ALA-D em cérebro (A) e % de reativação com DTT (B) em ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média ( N = 9 - 11). \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 em relação ao grupo salina (controle)



**Figura 5** - Atividade da enzima ALA-D em rins (A) e % de reativação com DTT (B) em ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média ( N =10 - 11). \*\*p < 0,01 em relação ao grupo salina (controle).



**Figura 6** - Atividade da enzima ALA-D em sangue (A) e % de reativação com DTT (B) em ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média ( N = 9 – 11 ). \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo salina (controle).

## 5.4. Testes comportamentais

### 5.4.1. Geotaxia negativa

Os resultados da resposta de geotaxia negativa realizada do 9º ao 13º dia de idade dos animais estão mostrados na Tabela 6. A ANOVA para medida repetida indicou que houve diferença significativa entre os dias [ $F(4,176) = 21,93$ ,  $p < 0,01$ ]. Porém não houve alteração significativa do tratamento na resposta de geotaxia negativa [ $F(3,44) = 0,03$ ,  $p = 0,99$ ], bem como não houve interação significativa entre tratamento e sessão [ $F(12,176) = 0,58$ ,  $p = 0,86$ ].

**Tabela 5.** Avaliação da resposta de geotactismo negativo dos ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg e/ou cloreto de zinco 2mg/Kg do 8º ao 12º dia de idade.

Tratamento	Latência (s)				
	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13
Salina	18,6 ± 2,3	15,5 ± 2,1	15,2 ± 1,9	15,4 ± 2,4	11,3 ± 1,1**
Pb <sup>2+</sup>	22,3 ± 2,7	14,5 ± 1,9	14,2 ± 1,7	14,6 ± 1,7	12,0 ± 1,4**
Zn <sup>2+</sup>	20,6 ± 2,6	16,7 ± 2,4	13,8 ± 1,3	13,6 ± 1,5	11,2 ± 1,0**
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	21,8 ± 2,5	16,7 ± 1,8	14,9 ± 1,5	13,5 ± 1,2	11,4 ± 1,0**

Resultado da média ± erro padrão da média (n = 8 - 12 ninhadas).

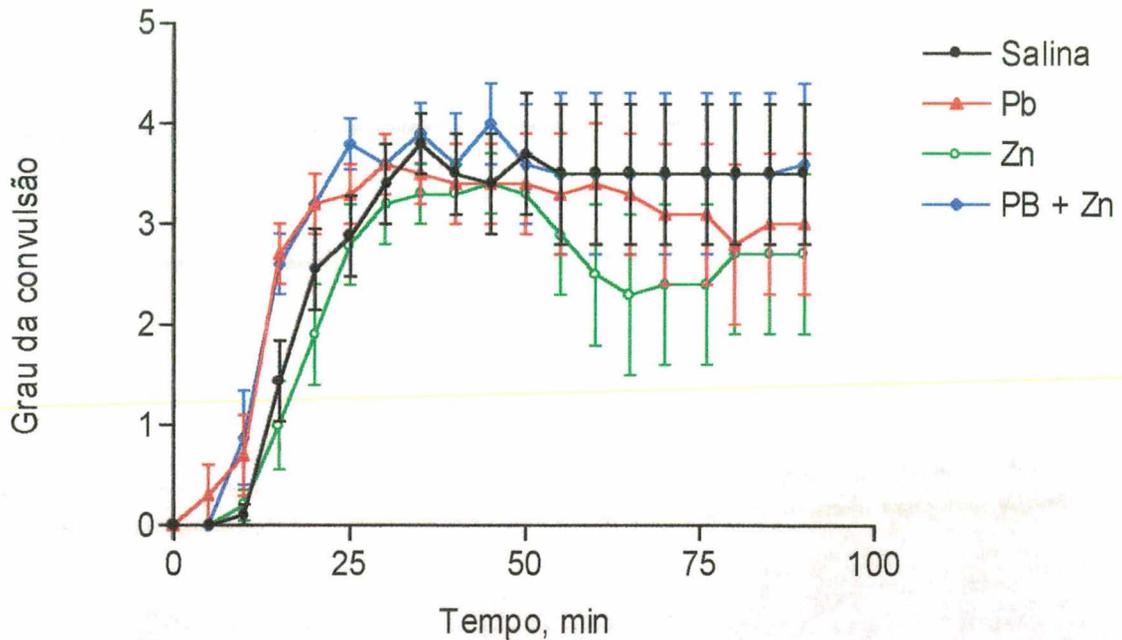
Não houve diferença significativa do tratamento.

\*\*  $p < 0,01$  comparado o tempo de latência dos animais do 13º dia de idade com animais do 9º dia de idade, dentro do mesmo grupo

#### **5.4.2. Limiar convulsivo**

O objetivo foi verificar se o tratamento com chumbo e/ou zinco durante a segunda fase de desenvolvimento cerebral pós-natal rápido de ratos, alterava a sensibilidade à convulsão provocada pela administração intraperitoneal de 20 mg/Kg de NMDA, no décimo terceiro dia de idade do animal.

A ANOVA com medida repetida mostrou que não houve efeito significativo do tratamento [ $F(3,32) = 0,48, p = 0,70$ ] e da interação entre tratamento e tempo de observação [ $F(51,544) = 0,83, p = 0,80$ ]. Apenas houve um efeito significativo do tempo de observação [ $F(17,544) = 38,21, p < 0,01$ ], pois houve um aumento significativo do grau da convulsão em todos os grupos: salina, chumbo, zinco e associação chumbo + zinco ao longo do tempo (Figura 7).

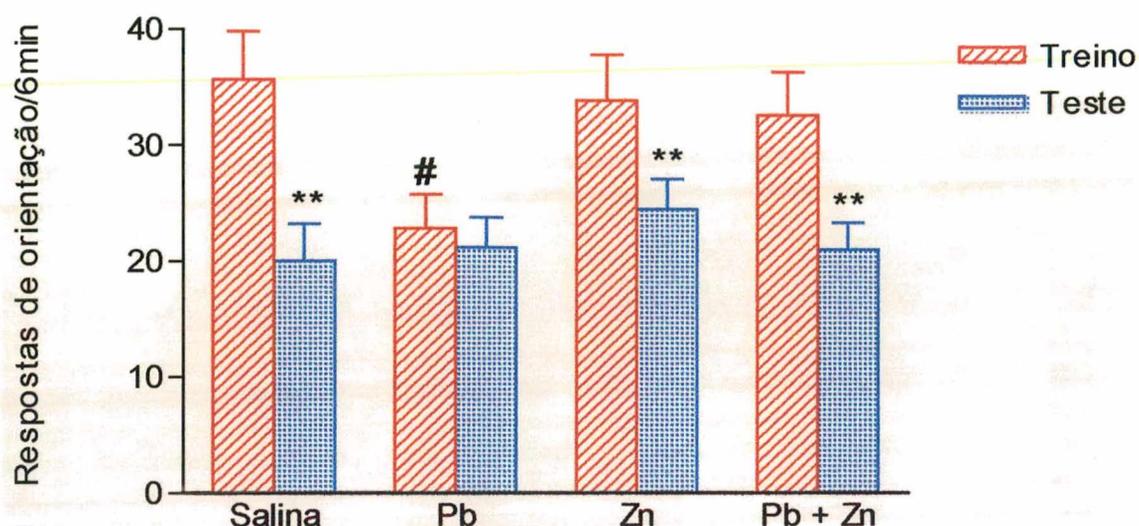


**Figura 7** - Grau das convulsões produzidas pela administração sistêmica de NMDA 20 mg/kg, i.p., em ratos de 13 dias de idade previamente tratados do 8º ao 12º dia com acetato de chumbo 8mg/Kg, i. p. e/ou cloreto de zinco 2mg/Kg i.p., conforme descrito em detalhes no Material e métodos. Resultado da média  $\pm$  erro padrão da média (n = 9 – 11 animais por grupo provenientes de ninhadas diferentes). Não houve efeito significativo do tratamento

#### 5.4.3. Habituação ao Campo Aberto

A ANOVA de duas vias com medida repetida das respostas de orientação (“rearing”) no campo aberto (Figura 8), mostrou um efeito significativo da sessão [ $F(1,34) = 45,7$   $p < 0,01$ ], bem como demonstrou que houve um efeito significativo da interação entre tratamento e sessão [ $F(3,34) = 4,52$ ,  $p < 0,01$ ]. Não houve efeito significativo do tratamento no número de respostas de orientação [ $F(3,34) = 1,2$ ,  $p = 0,33$ ]. Todos os tratamentos, exceto acetato de chumbo 8 mg/Kg,

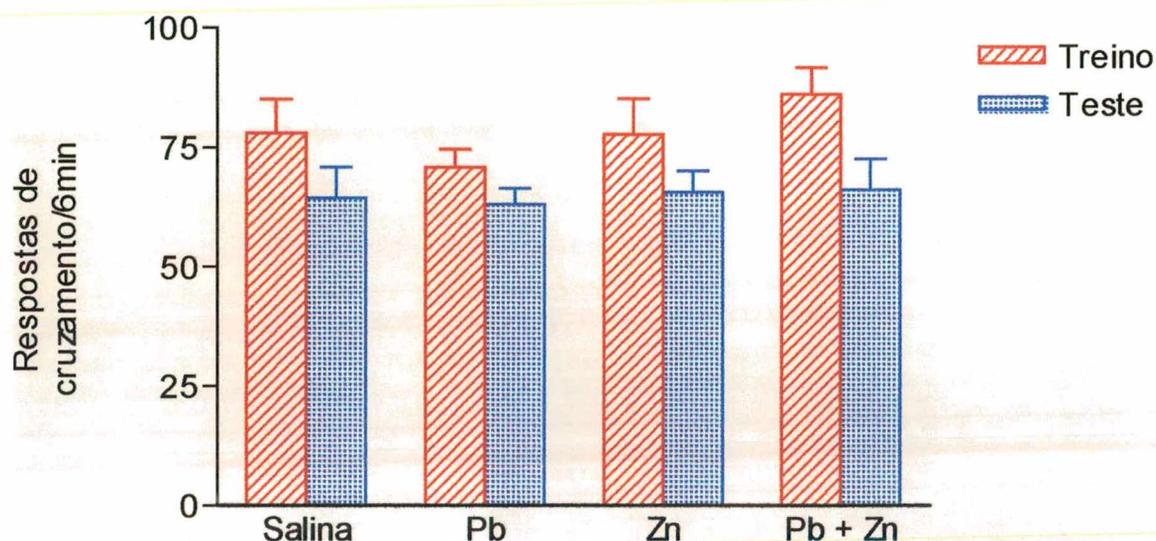
sessão teste (21º dia) em relação à sessão treino (20º dia). Este resultado indica que nesses grupos os animais têm memória de habituação, e que o grupo que recebeu acetato de chumbo 8 mg/Kg + cloreto de zinco 2 mg/Kg também tem esse perfil, sugerindo uma possível ação protetora do zinco.



**Figura 8.** Respostas de orientação no campo aberto dos ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2mg/Kg, i.p. durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido pós-natal. Os resultados são expressos como a média + erro padrão (n= 8 – 12 ninhadas).

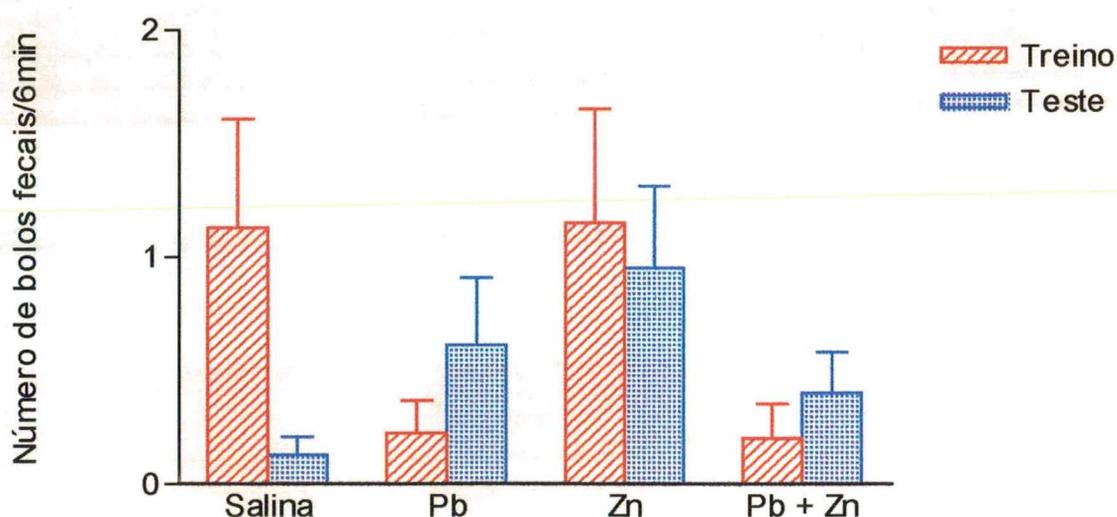
\*\*  $p < 0,01$  após comparação das respostas na sessão teste com as respostas na sessão treino, dentro do mesmo grupo. #  $p < 0,01$  quando comparado o resultado da sessão com o grupo controle da respectiva sessão.

A análise das respostas de cruzamento (Figura 9) mostrou efeito significativo da sessão [  $F(1,34) = 28,02, p < 0,01$  ], pois houve uma redução global nos escores de cruzamento durante a sessão teste em relação à sessão treino. Não houve diferença significativa do tratamento [  $F(3,34) = 0,50, p = 0,68$  ] e da interação sessão e tratamento [  $F(3,34) = 1,00, p = 0,40$  ].



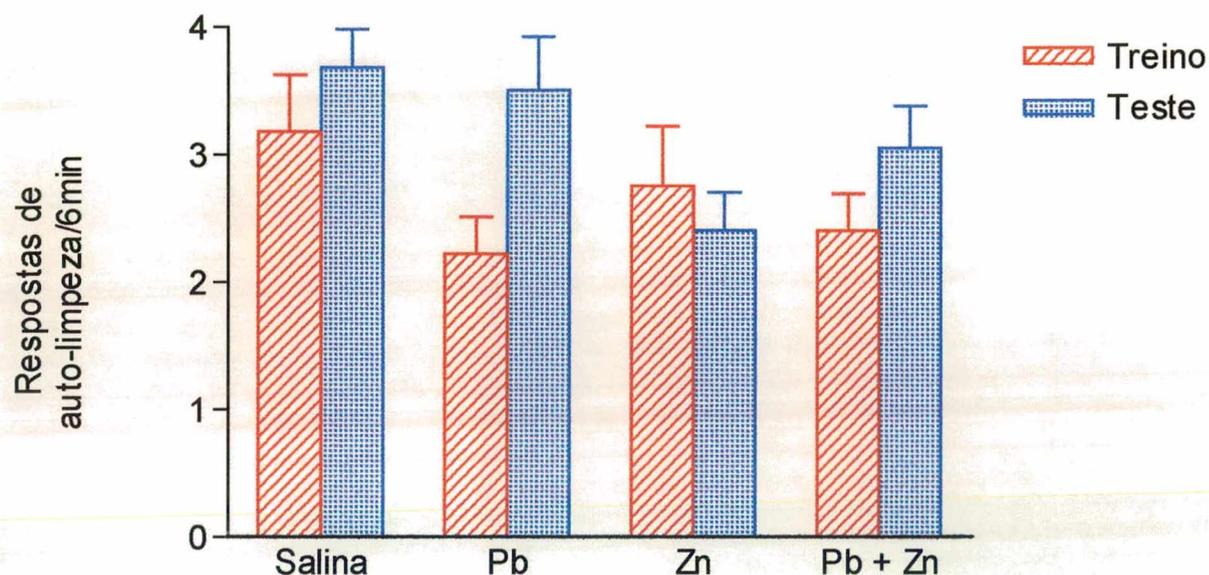
**Figura 9.** Respostas de cruzamento no campo aberto dos ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2mg/Kg, i.p. durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido pós-natal. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média (n= 8 – 12 ninhadas).

Os resultados de defecação no campo aberto foram transformados em raiz quadrada para serem analisados estatisticamente. No entanto, com a finalidade de facilitar a visualização dos dados eles estão representados em valores não transformados na Figura 10. A ANOVA de duas vias com medida repetida dos dados transformados mostrou que não houve diferenças significativas do tratamento [  $F(3,33) = 1,52$ ,  $p = 0,23$  ] ou da sessão [  $F(1,33) = 0,09$ ,  $p = 0,77$  ]. Houve uma tendência a interação entre sessão e tratamento [  $F(3,33) = 2,61$ ,  $p = 0,068$  ], uma vez que somente o grupo salina teve uma redução acentuada no nº de bolos fecais na sessão teste em relação à sessão treino.



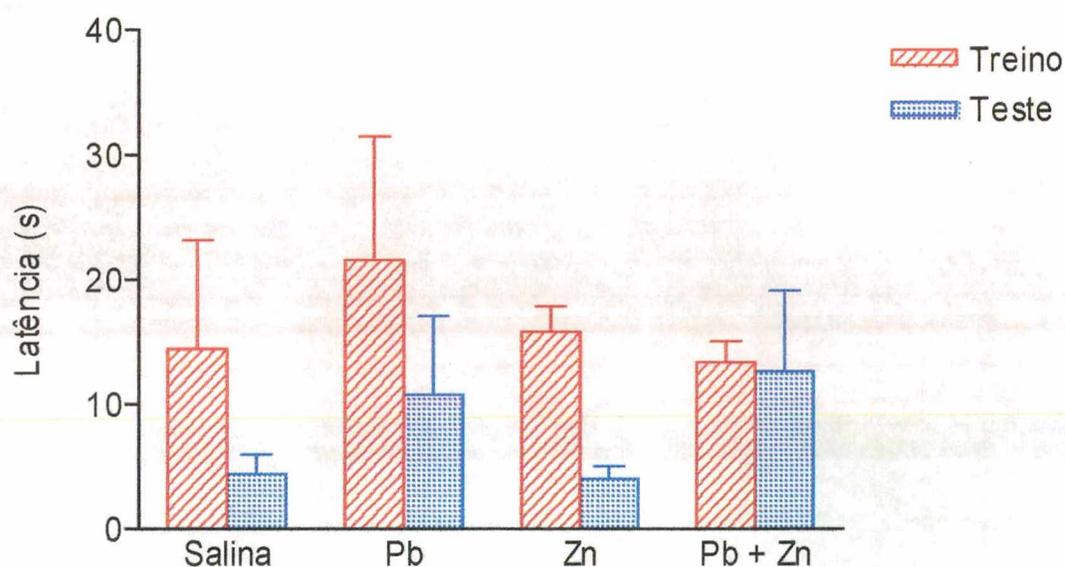
**Figura 10.** Número de bolos fecais de ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2mg/kg, i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média (8 – 12 ninhadas).

A ANOVA de duas vias com medida repetida das respostas de auto-limpeza (“grooming”) no campo aberto (Figura 11), mostrou um efeito significativo da sessão [ $F(1,33) = 6,20, p < 0,05$ ]. A análise demonstrou não haver efeito significativo do tratamento [ $F(3,33) = 1,50, p = 0,23$ ]. Houve uma tendência a significância na interação tratamento e sessão [ $F(3,33) = 2,70, p = 0,062$ ].



**Figura 11.** Representa as respostas de auto-limpeza dos ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg, i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média (8 – 12 ninhadas).

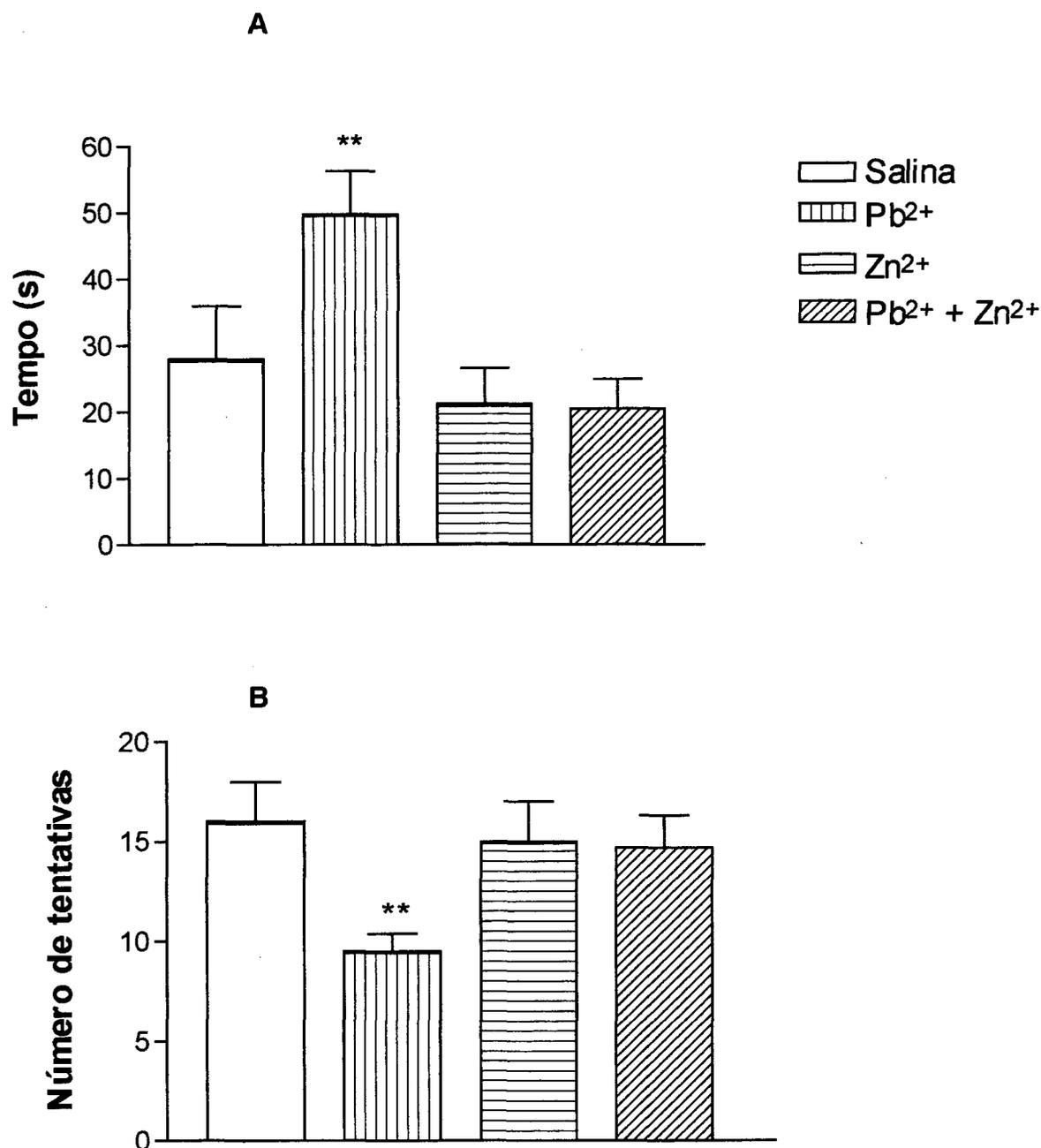
A figura 12 mostra os resultados da latência para sair do 1º quadrado dos diferentes grupos de tratamento. Após ANOVA de duas vias com medida repetida, verifica-se que houve efeito significativo da sessão [ $F(1,32) = 5,38, p < 0,05$ ], pois houve uma redução de forma geral na latência para sair do 1º quadrado na sessão teste em relação a sessão treino, nos diferentes tratamentos. Não houve diferença significativa do tratamento [ $F(3,32) = 0,50, p = 0,68$ ] e da interação sessão e tratamento. [ $F(3,32) = 0,72, p = 0,55$ ].



**Figura 12.** Latência para sair do primeiro quadrado no campo aberto dos animais tratados com salina, acetato de chumbo 8 mg/Kg e/ou cloreto de zinco 2mg/kg, i.p. Respostas de latência para sair do primeiro quadrado. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média (8 – 12 ninhadas).

#### 5.4.4. Teste de condicionamento operante

O resultado da ANOVA de uma via revelou que houve efeito significativo do tratamento na latência [ $F(3,39) = 4,54, p < 0,01$ ] e no número de respostas [ $F(3,33) = 3,09, p < 0,05$ ] dos animais privado de água, na tarefa de condicionamento operante na caixa de Skinner, representados na figura 13A e B, respectivamente. Os resultados demonstram que o grupo tratado com acetato de chumbo apresentou maior latência para responder ao estímulo sonoro para a procura d'água. O grupo exposto ao acetato de chumbo também apresentou menor número de vezes na execução da operação condicionada, dentro de um período de 20 minutos em relação ao grupo salina (controle). Porém o grupo tratado com acetato de chumbo + cloreto de zinco apresentou escores que não diferiram do controle e do grupo que recebeu apenas cloreto de zinco, sugerindo que o zinco proteja a resposta de condicionamento operante comprometida pelo chumbo.



**Figura 13.** - Latência (A) e número de respostas de condicionamento operante (B) de ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2mg/Kg, i.p. Os resultados são expressos como a média + erro padrão da média (7 – 10 animais provenientes de ninhadas diferentes).

\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo salina (controle).

#### 5.4.5. Teste de alternção espontnea

O resultado da ANOVA de uma via revelou que houve efeito significativo do tratamento no nmero da prova alternada [ $F(3,44) = 4,37$ ,  $p = 0,008$ ] e na latncia para alternar o braço do labirinto [ $F(3,44) = 3,51$ ,  $p = 0,023$ ]. Os resultados esto mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Latncia para a alternção e nmero da prova alternada na tarefa de alternção espontnea de ratos tratados com salina, acetato de chumbo 8mg/Kg, i.p. e/ou cloreto de zinco 2 mg/Kg i.p. Os resultados so expressos como a mdia  $\pm$  erro padro da mdia (8 – 9 animais provenientes de ninhadas diferentes).

Tratamento	Latncia (s)	Prova alternada
Salina	50,1 $\pm$ 8,8	2,36 $\pm$ 0,14
Pb <sup>2+</sup>	86,5 $\pm$ 16,5**	2,56 $\pm$ 0,24*
Zn <sup>2+</sup>	43,2 $\pm$ 7,5	2,23 $\pm$ 0,17
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	44,7 $\pm$ 8,0	2,09 $\pm$ 0,09

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$  em relao ao grupo salina (controle)

## 6. DISCUSSÃO

Considerando que o chumbo parece exercer parte de seus efeitos por interagir com sítios moleculares nos quais o zinco é o ligante endógeno (Goering, 1993; Guilarte et al., 1995) e que existem alguns relatos na literatura de que o zinco pode exercer um efeito protetor em relação à toxicidade por chumbo (Flora et al., 1991; Satija & Vij, 1995; Vasák & Hasler, 2000), este estudo teve por objetivo investigar a interação entre chumbo e zinco em ratos jovens, expostos ao metal em uma fase crítica do desenvolvimento cerebral sobre alvos moleculares nos quais o zinco é um ligante endógeno ou seja, a ALA-D e o receptor NMDA.

A elucidação de alterações bioquímicas e comportamentais associadas a doses subtóxicas de um poluente em animais experimentais fornece os fundamentos para o monitoramento de estágios subclínicos da intoxicação a este poluente em humanos. No caso do chumbo isto é particularmente importante, tendo em vista a relevância deste poluente como causador de alterações comportamentais sutis. Além disto, o estudo da interação do chumbo com o zinco tem particular importância para contribuir na avaliação do mecanismo de ação do chumbo, bem como avaliar a eventual possibilidade do zinco agir como agente neuroprotetor em relação à toxicidade causada pelo chumbo.

A proposta do nosso trabalho foi avaliar possíveis alterações em alguns parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos expostos ao chumbo e/ou zinco durante o segundo estágio de desenvolvimento cerebral rápido pós-natal, compreendido entre o oitavo e o décimo segundo dia de idade, correspondente a

um período pós-natal de intensa sinaptogênese, no qual os animais são especialmente sensíveis a agentes neurotóxicos (Gottlieb et al., 1977).

A maioria dos estudos relacionados aos efeitos tóxicos do chumbo são realizados em roedores que geralmente foram expostos ao metal durante os períodos gestacional e/ou de amamentação. Há poucos estudos na literatura relacionados aos efeitos do chumbo em estágios específicos de desenvolvimento cerebral pós-natal.

Nosso trabalho avaliou parâmetros físicos de controle de peso corporal e dos órgãos isolados, tendo em vista que o prejuízo no ganho de peso dos animais durante a fase experimental poderia resultar em alterações nas medidas bioquímicas e comportamentais, não em função da exposição ao chumbo e/ou zinco, mas sim por um estado de desnutrição. A desnutrição compromete a maturação cerebral, afetando o desenvolvimento coordenado de vários tipos celulares e podendo comprometer a formação dos circuitos neurais e a iniciação da atividade dos sistemas de neurotransmissores. Várias disfunções em processos de atenção e interação do organismo com o ambiente são observados em animais desnutridos, podendo levar a comprometimento da aprendizagem (Morgane et al., 1993).

A avaliação dos pesos em nosso trabalho mostrou que o peso corporal dos animais, observados durante o tratamento e nos dias dos testes, não foram alterados pelo tratamento (Tabela 1). O tratamento com acetato de chumbo e/ou cloreto de zinco também não tiveram efeitos sobre o peso do cérebro e dos rins nos animais de 13 dias e 21 dias de idade, períodos correspondentes aos testes

bioquímicos e comportamentais, respectivamente (Tabela 2). A ausência de efeitos nos pesos corporais e dos órgãos isolados nos ratos tratados com chumbo e/ou zinco está em concordância com os resultados previamente relatados em ratos expostos a 3,5 e 7,0 mg/Kg, s.c., de acetato de chumbo durante o segundo estágio de desenvolvimento rápido do cérebro (Rocha et al., 1995). Esses achados indicam que nosso regime de exposição ao chumbo e/ou zinco não produziu graves alterações físicas nos ratos.

A análise dos hematócritos dos ratos expostos ao tratamento com chumbo e/ou zinco, demonstrou uma redução nos valores do hematócrito nos grupos tratados com chumbo e chumbo + zinco em relação ao grupo controle (Tabela 3). Uma redução no valor do hematócrito foi previamente relatado em ratos adultos expostos cronicamente ao chumbo (Rodrigues et al., 1996a) e de hemoglobina em animais expostos a acetato de chumbo 10 mg/Kg durante 7 dias (El Missiry, 2000). Em um outro estudo foi relatado a redução do hematócrito e hemoglobina em ratos tratados com acetato de chumbo 9 mg/kg durante as três primeiras semanas de vida pós-natal (Sobotka et al., 1975), porém não é de nosso conhecimento ter sido relatado alterações no hematócrito de ratos jovens expostos ao chumbo durante um estágio específico de desenvolvimento, os quais correspondem a um período de intenso desenvolvimento tecidual.

Há relatos de que o chumbo diminui o tempo de sobrevivência dos eritrócitos (Al-Saleh, 1994). A inibição da enzima ALA-D pelo chumbo modifica a formação de compostos tetrapirrólicos, incluindo heme e vitamina B12 (Warren et al., 1998). Desta forma, a redução do hematócrito nos grupos expostos ao chumbo poderia

em parte ser atribuída ao fato de que a inibição da ALA-D parece aumentar a formação de espécies ativas de oxigênio devido ao acúmulo de ALA (Bechara et al., 1993). A formação de espécies ativas de oxigênio está associada à lipoperoxidação que resulta na alteração da permeabilidade celular, podendo culminar em morte celular. Foi relatado que ratos adultos expostos a 10 mg/Kg de chumbo durante sete dias, apresentaram redução na hemoglobina com elevação da peroxidação lipídica hepática e redução das enzimas antioxidantes, tais como glutathione redutase e catalase, bem como nos antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione. Esses resultados foram ainda acompanhados por deficiência de zinco e cobre (El Missiry, 2000). A redução da atividade de glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase foi diminuída em sangue humano incubado com cloreto de chumbo (Hunaiti & Soud, 2000).

A redução no hematócrito de ratos expostos ao chumbo nesse período inicial de desenvolvimento parece ser um indicador sensível de exposição ao chumbo, por outro lado o zinco não alterou o efeito do chumbo no nosso protocolo.

O objetivo primário da análise do conteúdo de chumbo no cérebro e no sangue dos animais expostos ao tratamento com chumbo e/ou zinco durante a segunda fase de desenvolvimento cerebral pós-natal rápido é verificar se há a ocorrência de acúmulo do metal nestes compartimentos. Enquanto o sangue nos permite avaliar a distribuição sistêmica do chumbo, o cérebro nos dá condições de avaliar o acúmulo deste metal e correlacionar com possíveis danos no SNC. Também é importante avaliar se zinco interfere de alguma forma na distribuição e acúmulo do chumbo nos compartimentos estudados neste trabalho. O zinco tem

danos no SNC. Também é importante avaliar se zinco interfere de alguma forma na distribuição e acúmulo do chumbo nos compartimentos estudados neste trabalho. O zinco tem sido identificado como componente de muitas enzimas e exerce um papel estrutural em um grande número de fatores de transcrição e proteínas, tais como as metalotioneínas (MT) que têm um papel de detoxificação de metais (Vasák & Hasler, 2000). É relatado ainda que dietas com baixas concentrações de cálcio e zinco podem aumentar a absorção intestinal de chumbo (Bodgen et al., 1992; Locey et al., 1998). A análise dos conteúdos de chumbo no sangue e no cérebro nos ratos jovens tratados demonstrou que os animais que receberam chumbo e chumbo + zinco apresentaram um conteúdo de chumbo no cérebro e no sangue estatisticamente maior do que os demais grupos, mais não diferente entre si (Tabela 4). Os resultados demonstraram que no cérebro dos ratos tratados com chumbo ou chumbo + zinco foi encontrado um conteúdo deste metal aproximadamente 3,7 vezes maior do que no grupo controle. Da mesma forma, os resultados obtidos com os conteúdos de chumbo no sangue dos ratos expostos aos mesmos tratamentos, demonstraram que o grupo exposto ao chumbo ou chumbo + zinco apresentaram um conteúdo de chumbo aproximadamente 9 vezes maior do que o grupo controle. Os níveis de chumbo observados em ratos de 21 dias de idade em nosso trabalho, são valores que estão associados com déficits comportamentais em crianças (Davis et al., 1990). Os resultados comprovam o acúmulo do metal e sugerem que as alterações bioquímicas e comportamentais observadas neste estudo podem ser

A enzima ALA-D é sensível aos efeitos do chumbo, sendo sua atividade um importante parâmetro de estudo, como índice de exposição biológica, para animais e humanos expostos a esse metal numa forma experimental, ambiental ou ocupacional. O potencial de inibição da ALA-D pelo chumbo pode ter efeitos neurotóxicos, especialmente em recém nascidos, os quais apresentam alto nível de neurogênese (Campagna et al., 1999).

Neste trabalho a determinação da atividade da ALA-D foi utilizada com o objetivo de monitorar a intoxicação pelo chumbo. Adicionalmente desejava-se verificar o efeito protetor do zinco sobre uma eventual inibição da ALA-D causada pelo chumbo.

Tem sido demonstrado que o zinco, bem como o DL-ditioneitol (DTT) *in vitro* são capazes de restaurar a atividade da ALA-D inibida em sangue de ratos e humanos (Tsukamoto et al., 1979; Kajimoto et al., 1983 Al-Saleh, 1994; Rodrigues et al., 1996a). Além disso, um efeito antagonista do zinco na inibição da ALA-D pelo chumbo tem sido relatado (Haeger-Aronson & Schutz, 1976; Satija & Vij, 1995), bem como ausência do efeito antagonista (Chiba & Kikuchi 1984). Contudo, há poucos relatos dos efeitos da administração de zinco, sozinho ou combinado com chumbo em estágios específicos do desenvolvimento cerebral pós natal rápido sobre este parâmetro.

O estudo da atividade específica da ALA-D em cérebro, rim e sangue (Figuras 4A, 5A e 6A), não indicou efeito significativo do tratamento com chumbo e/ou zinco nesse estágio específico do desenvolvimento. Os resultados em cérebro e rim estão em concordância com a ausência de um efeito da exposição

ao chumbo sobre a atividade da ALA-D cerebral e renal, relatado por Rocha et al. (1995). Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com zinco não alterou a atividade da ALA-D em todos os tecidos examinados, em contraste com a ativação da ALA-D renal relatada em ratos adultos pré-tratados com zinco, nos quais havia aumento da síntese de metalotioneína (Zn-tioneína) (Goering & Fowler, 1987).

A atividade da ALA-D no sangue foi levemente reduzida no grupo exposto ao chumbo quando comparado ao grupo controle, embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa. Este resultado contrasta com o aumento da atividade da ALA-D no sangue em ratos expostos a acetato de chumbo durante a segunda fase de desenvolvimento rápido do cérebro (Rocha et al., 1995). Na verdade, ambos, redução (Satija & Vij, 1995; El Missiry, 2000) e aumento da atividade da ALA-D em roedores expostos ao chumbo têm sido relatadas (Kajimoto et al., 1983; Fujita & Sano, 1991). Os estudos que relatam um aumento da ALA-D no sangue provocado pela exposição ao chumbo, tem atribuído este fato ao aumento da síntese de ALA-D (Kajimoto et al., 1983; Fujita et al., 1991). O grupo exposto ao chumbo + zinco, não apresentou nenhuma redução na atividade da ALA-D no sangue. Entretanto, considerando a ausência de um efeito significativo do chumbo sozinho na atividade da enzima, não podemos concluir que o zinco tenha apresentado um efeito antagonista. A habilidade do zinco de prevenir a inibição da ALA-D por chumbo, tem sido motivo de grandes estudos, e resultados contraditórios foram relatados (Sakai et al., 1980, Satija & Vij, 1995).

que o zinco tenha apresentado um efeito antagonista. A habilidade do zinco de prevenir a inibição da ALA-D por chumbo, tem sido motivo de grandes estudos, e resultados contraditórios foram relatados (Sakai et al., 1980, Satija & Vij, 1995).

O tratamento com chumbo reduziu a atividade da ALA-D e superóxido dismutase (SOD) nos testículos de ratos, sendo que o zinco preveniu esta redução (Batra et al., 1998). Outros resultados indicam que a deficiência de zinco pode comprometer o sistema de defesa antioxidante (Kim & Keen, 1999), sugerindo que o zinco possa desempenhar um papel importante na exposição ao chumbo, pois parte dos efeitos tóxicos deste metal tem sido atribuída ao fato de que essa inibição da ALA-D resulta no acúmulo do substrato ALA e isto parece estar associado à formação de espécies ativas de oxigênio (Bechara et al., 1993), que são responsáveis pela oxidação dos grupos –SH da ALA-D.

As metalotioneínas compõem uma classe de isoproteínas altamente conservadas, encontradas em diferentes organismos tão diferentes quanto o fungo e o homem. As metalotioneínas de mamíferos geralmente contém 61 aminoácidos, 20 dos quais são cisteínas. Todas as cisteínas estão envolvidas na ligação de íons de metais de transição bivalentes, os quais na maioria das células são predominantemente o zinco, o cobre e o cádmio. O cádmio é altamente tóxico e apresenta uma afeição à metalotioneína na ordem de 10 vezes maior que o zinco, de acordo com o possível papel desta proteína na detoxificação de metais pesados (Baeuerle, 1995). Estudos têm sugerido que a metalotioneína tem um papel neuroprotetor no cérebro de ratos pelo seu potencial seqüestrador de radicais superóxidos. Experimentos *in vitro* demonstraram que a metalotioneína

tem um potencial seqüestrador de radicais superóxidos superior quando comparado com outras moléculas sulfidrílicas, tais como a cisteína, N-acetilcisteína e até mesmo a glutatona (Hussain et al., 1996).

Considerando que o zinco pode induzir a síntese de metalotioneína, proteína quelante de metais, é possível que um pré-tratamento com zinco seria mais eficiente para prevenir os efeitos da administração de chumbo, na atividade da ALA-D (Goering & Fowler, 1987). De fato, chumbo e zinco parecem competir pelo mesmo sítio de ligação na enzima ALA-D e na metalotioneína. O chumbo parece ser mais potente (afinidade) que o zinco, visto que, a ALA-D é ativada por zinco com um Km de 1,6 pM, enquanto que é inibida por chumbo com um Ki de 0,07 pM (Simons, 1995).

O índice de reativação com DTT na atividade da ALA-D em cérebro, rins e sangue foi significativamente maior nos grupos expostos ao chumbo e chumbo + zinco quando comparados com o grupo controle (Figuras 4B, 5B e 6B). Este é um resultado interessante que contrasta com a ausência de efeitos do chumbo e chumbo + zinco na atividade específica da ALA-D. A reativação da enzima pode ser obtida pela adição de DTT *in vitro*, agente redutor e quelante de metais, cuja função é recuperar as enzimas que possivelmente sofreram oxidação dos grupos -SH, bem como reativar a enzima devido à quelação do metal inibidor (Tsukamoto et al., 1979). O índice de reativação da ALA-D com DTT determina de uma forma indireta a atividade da enzima que foi inibida pelo chumbo, fornecendo uma correlação melhor entre o nível tecidual de chumbo e o comprometimento da atividade da enzima, do que a determinação da atividade específica da enzima.

Um resultado semelhante a este foi previamente relatado na literatura, em ALA-D de sangue humano, no que diz respeito a maior eficiência com DTT para avaliação da intoxicação com chumbo (Granick et al., 1973; Sakai et al., 1980). O índice de reativação da ALA-D com DTT foi alto em cérebro anterior, cerebelo e rim de ratos tratados cronicamente com chumbo quando comparados ao controle (Rodrigues et al., 1996a).

Uma possibilidade que explicaria o alto índice de reativação com DTT em ratos expostos ao chumbo, bem como a ausência de efeitos na atividade específica da ALA-D, é que o tratamento com chumbo possa ter produzido um efeito duplo sobre a ALA-D: uma inibição da enzima associada com um acréscimo na sua síntese como um mecanismo compensatório. As doses de acetato de chumbo que são capazes de inibir a atividade da ALA-D em ratos de 13 dias de idade foram mostradas previamente: a  $IC_{50}$  para inibição da ALA-D pelo chumbo é 3.9  $\mu$ M, 4.4  $\mu$ M e 0.8  $\mu$ M para cérebro, rim e sangue, respectivamente (Rocha et al., 1995). A concentração de chumbo nos ratos de 13 dias de idade não foi efetuada. Contudo, nossos resultados com animais de 21 dias de idade expostos ao acetato de chumbo 8 mg/Kg durante a segunda fase de desenvolvimento cerebral rápido pós-natal mostram que a concentração de chumbo é de aproximadamente de 0,51  $\mu$ M e 0,76  $\mu$ M para o cérebro e sangue, respectivamente. Os níveis de chumbo alcançados no cérebro dos animais expostos ao chumbo e ao chumbo + zinco não representam valores que significariam uma inibição da enzima, ao contrário dos níveis encontrados no sangue. Porém, existe a possibilidade de acúmulo de chumbo em microambientes

celulares específicos, relacionado a sua afinidade por determinados alvos moleculares, como por exemplo a enzima ALA-D. Diferentes compartimentos intracelulares podem possuir diferentes pH ou estados redox, os quais influenciam a especiação do metal e a ligação com certos alvos moleculares (Goering, 1993). Alternativamente, sabe-se também que o zinco é capaz de induzir a síntese de metalotioneína, sendo que desta forma o chumbo livre poderia liga-se à ALA-D, qual parece apresentar uma afinidade maior pelo chumbo do que ao zinco (Simons, 1995). Desta forma esses eventos também poderiam contribuir em parte pelo comprometimento da atividade da ALA-D.

Estudos demonstram também a existência de proteínas ligadoras de chumbo no sangue; como no caso da transferrina para o ferro e da metalotioneína para cádmio e zinco; e que nos tecidos alvos parecem estar envolvidos na mediação da biodisponibilidade e potencial tóxico do chumbo. Tem sido relatado em estudos a identificação de proteínas ligadoras de chumbo também no cérebro de ratos e no cérebro e rim de humanos, macacos e fígado de peixe. Essas proteínas são de baixo peso molecular, semelhantes às metalotioneínas, apresentam massas moleculares diferentes de acordo com os órgãos alvos e com as espécies onde são encontradas, porém com características químicas similares (Fowler, 1998). Pesquisas mostram que essas proteínas ligadoras de chumbo em ratos foram capazes de promover a atenuação dos efeitos do chumbo na ALA-D e mediar o movimento intranuclear e a ligação à cromatina do chumbo no núcleo de células alvos de rim (Fowler, 1998), sendo este último efeito possivelmente envolvido no câncer renal induzido pelo chumbo (Fowler et al., 1994). Um estudo

subseqüente com essas proteínas do rim, revelou a capacidade dessas proteínas de também atenuar o efeito inibitório do chumbo sobre a atividade da ALA-D, por mecanismos que envolvem a quelação de chumbo e a doação de zinco para esta enzima (Fowler, 1998). Estudos *in vitro* sugerem que a ligação do chumbo a essas proteínas é altamente estável e representa um importante “pool” de chumbo no compartimento citosólico. Desta forma elas parecem ser importantes fatores para a regulação da biodisponibilidade de chumbo para processos moleculares sensíveis, tal como a atividade da ALA-D no rim e cérebro, ou seja, exercendo um papel de mediação do potencial tóxico do chumbo (Fowler, 1998). Apesar do importante papel desta proteínas ligadoras de chumbo, a sua presença (indução e atividade) parece estar relacionada à uma exposição a altos níveis de chumbo (Lolin & O'Gorman, 1988), o que não é o caso do nosso protocolo de trabalho.

De qualquer forma, independentemente do mecanismo envolvido no comprometimento da atividade da ALA-D no cérebro, rim e sangue dos animais expostos ao chumbo, o zinco não parece ser capaz de proteger contra os efeitos do chumbo na ALA-D, neste protocolo de trabalho.

Desta maneira, verificamos que nosso protocolo de exposição ao chumbo e/ou zinco, não afetou a atividade específica da ALA-D. Entretanto, o índice de reativação com DTT, foi um parâmetro muito sensível para indicar um efeito na enzima, que nós propomos seja correntemente usado para monitorar efeitos do chumbo sobre a ALA-D. Na verdade, se tivéssemos medido apenas a atividade da ALA-D, como em muitos estudos existentes na literatura, nós teríamos

concluído, que o(s) tratamento(s) não tiveram efeitos sobre a enzima, que parece não ser o caso. A determinação da atividade da enzima ALA-D na presença de DTT em sangue, rim e cérebro dos ratos expostos ao chumbo e/ou zinco, bem como os resultados apresentados pela absorção atômica, nesta fase de crescimento cerebral rápido, foi importante para confirmar que os animais estavam intoxicados. Nossos resultados sustentam os dados da literatura que utilizam a ALA-D como indicador biológico de exposição ao chumbo.

Os aspectos comportamentais abordados em nosso trabalho foram a coordenação motora, limiar convulsivo, memória de habituação, condicionamento operante e a alternância espontânea.

Exposições a pequenos níveis de chumbo no período pré natal e perinatal tem sido associadas a alterações comportamentais (Davis, 1990, Rothenberg et al. 1995, Brockel & Cory Slechta, 1999). Os maiores depósitos de chumbo são observados na placenta e nas membranas coriônicas (Mestek, 1998). A exposição de humanos ao chumbo, especialmente crianças em fase de desenvolvimento, parece ser preocupante não somente a altos níveis como também à baixos níveis de exposição ao chumbo.

Estudos demonstram que ratos tratados com chumbo durante o período de desenvolvimento apresentam alterações comportamentais em tarefas tais como aprendizagem reversa (Hilson & Strupp, 1997), discriminação de drogas (Cohn & Cory-Slechta, 1992), aprendizagem espacial (David et al., 1997; Kuhlmann et al., 1997), bem como alteração de atividade locomotora e déficit de habituação (Rodrigues et al., 1996b). No entanto, poucos estudos avaliam o comportamento

Macacos de 4, 5 e 6 anos de idade, tratados com chumbo durante o primeiro ano de vida pós natal, exibiram aumento na latência para entrar no campo aberto, aumento no comportamento exploratório e diminuição na inatividade no campo aberto (Ferguson et al., 1990, Ferguson & Bowman, 1992, Ferguson et al., 1993).

Estima-se que nos Estados Unidos 1,7 milhões de crianças entre 1 e 5 anos de idade têm níveis de chumbo no sangue igual ou superior a 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Brody et al., 1994). Déficits cognitivos em crianças expostas ao chumbo têm sido demonstrados pela redução dos escores do quociente de inteligência (QI), (Bellinger & Stiles, 1993, Dietrich et al., 1993) indicativo de comprometimento cognitivo geral (Brockel & Cory-Slechta, 1998).

Nosso trabalho avaliou o desempenho de ratos expostos ao chumbo e/ou zinco durante o segundo estágio de desenvolvimento cerebral no teste de geotaxia negativa (durante a fase de tratamento). Esta tarefa é sensível à detecção precoce de efeitos nocivos de agentes tóxicos sobre a coordenação motora (Rocha et al., 1993). Humanos expostos ao metilmercúrio no período pré-natal, apresentam efeitos deletérios na função psicomotora infantil (Marsh et al., 1977). A exposição de ratos ao metilmercúrio durante o segundo estágio de desenvolvimento rápido do cérebro causou um aumento na latência para completar a resposta de geotactismo negativo (Rocha et al., 1993). Este efeito parece estar relacionado com um prejuízo na função motora de ratos jovens expostos ao metal. Além disso, é importante detectar um eventual efeito do chumbo e/ou zinco sobre a coordenação motora de animais jovens tratados em uma fase específica do desenvolvimento cerebral. Também é importante

expostos ao metal. Além disso, é importante detectar um eventual efeito do chumbo e/ou zinco sobre a coordenação motora de animais jovens tratados em uma fase específica do desenvolvimento cerebral. Também é importante considerar que qualquer alteração na coordenação motora dos ratos poderia comprometer qualquer uma das avaliações cognitivas realizadas em nossos estudos. Por se tratar o chumbo de um metal pesado que possui alguns efeitos comportamentais semelhantes ao mercúrio, é importante avaliar as repostas de geotactismo negativo dos animais expostos ao chumbo e ao zinco. Entretanto, os nossos resultados da geotaxia negativa não demonstraram alterações significativas entre os diferentes tratamentos (Tabela 5), ao contrário de uma maior latência para completar a tarefa de geotactismo negativo em ratos jovens expostos a 8,0 mg/kg de acetato de chumbo durante 20 dias. Além disso, parece que essa deficiência persiste após o término da exposição (Luthman et al., 1992). Por outro lado, Mello et al. (1998) não relataram comprometimento na latência para execução desta tarefa em ratos expostos ao chumbo, assim como o tratamento com chumbo desde da gestação até o dia do teste (84º), não alterou a coordenação motora de ratos (Ma et al., 1999).

Nossos resultados mostraram que o tratamento dos animais com chumbo e/ou zinco durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido não causou prejuízo na tarefa de geotactismo negativo. Desta forma, eventuais comprometimentos cognitivos a serem apresentados por estes animais não seriam devido a uma alteração na coordenação motora destes animais.

Com o objetivo de estudar o envolvimento do receptor NMDA nos danos causados pelo chumbo, foi realizado o estudo da sensibilidade do deste receptor através da convulsão induzida por NMDA. Não foram observadas alterações significativas na sensibilidade a convulsões em nenhum dos grupos tratados (Figura 7).

Tem sido relatado que o receptor de NMDA é inibido pelo chumbo, sendo que a sensibilidade do mesmo à ação do metal é maior em animais jovens em relação aos animais adultos. Nos estudos ontogenéticos de Ujihara & Albuquerque (1992a) realizados em culturas celulares hipocâmpais de 1 a 30 dias, foram observadas diferenças nas amplitudes de ativação celular, sendo que o pico da amplitude na corrente pela ativação por NMDA mais glicina foi registrado em células de 20 dias. O zinco também demonstrou bloqueio do receptor NMDA dependente da maturação celular (efeito atenuado ao longo da maturação). Tem sido demonstrado a presença de subtipo de receptor NMDA preferencialmente em células imaturas, os quais são inibidos pelo chumbo (Ujihara & Albuquerque, 1992b). Esses resultados sustentam os relatos de que ratos jovens são mais sensíveis à ação do chumbo do que ratos adultos. A maior sensibilidade do receptor NMDA aos efeitos do chumbo em animais jovens, tem sido proposto como uma das causas de déficits cognitivos causados por este metal serem mais prevalentes em animais jovens e em crianças do que em adultos. A dependência da idade para os efeitos inibitórios do chumbo pode representar diferentes sensibilidades ao chumbo dos diferentes subtipos de receptores NMDA expressos nas diferentes fases do desenvolvimento (Ujihara &

Albuquerque, 1992b). Alterações na ligação do receptor NMDA na formação hipocampal e áreas corticais, induzidas pelo chumbo podem ter um papel na neurotoxicidade induzida por este metal (Ma et al., 1998).

No entanto, a ausência de efeitos significativos do chumbo e/ou zinco administrados durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido sobre a sensibilidade a convulsões pelo NMDA sugere a seguinte possibilidade: mesmo ocorrendo acúmulo de chumbo no cérebro, o receptor de NMDA não foi afetado de forma a alterar a sua resposta ao NMDA administrado para causar convulsões ou ainda, apenas tarefas comportamentais mais sensíveis poderiam revelar uma alteração funcional no receptor NMDA.

Uma das tarefas comportamentais escolhidas para avaliar os efeitos do chumbo e/ou zinco durante a segunda fase de crescimento cerebral rápido em ratos foi a habituação em campo aberto (após o desmame). A tarefa do campo aberto permite uma expressão natural do comportamento em um ambiente novo, presumivelmente não aversivo. Nesta tarefa os ratos apresentam um comportamento exploratório que consiste em atividade locomotora (ambulação), respostas de orientação e defecação. A habituação a um ambiente se expressa pela redução de tais atividades sob exposição repetida ao mesmo ambiente (O'Keefe & Nadel, 1978; Dutra et al., 1991). A habituação a um novo ambiente é considerada por alguns pesquisadores como sendo bastante adequada para avaliar déficit cognitivos sutis, por envolver um aprendizado não essencial em uma tarefa não aversiva (Strupp et al, 1984, Dutra et al, 1991). As respostas de orientação parecem ser um melhor parâmetro para avaliar a atividade

exploratória, uma vez que esta parece ser menos confundida com outras expressões comportamentais (Frankova & Barnes, 1968; Netto et al., 1986; Rotta et al., 1988). Os nossos resultados de resposta de orientação (Figura 8) mostram que todos os tratamentos, exceto o grupo que recebeu apenas acetato de chumbo, apresentaram uma redução nos escores de resposta de orientação na sessão teste em relação à sessão treino, sugerindo memória de habituação para estes grupos e um déficit de habituação para o grupo exposto somente ao chumbo. Porém, o grupo tratado somente com chumbo apresentou escores menores de respostas de orientação na sessão treino em relação aos outros grupos nesta mesma sessão. O resultado das respostas de orientação obtido com o grupo exposto apenas ao chumbo poderia ser devido ao fato do chumbo causar déficit de atenção. Needleman (1993) relatou que um aumento nos níveis de chumbo no sangue está associado com o aumento da distrabilidade e escores de atitudes impulsivas. O comportamento de perseverança associado ao chumbo tem sido relatado em crianças (Stiles & Bellinger, 1993), o que leva à especulação de que o prejuízo cognitivo induzido pelo chumbo poderia estar relacionado a déficit de atenção (Brockel & Cory-Slechta, 1998). Por outro lado os resultados obtidos em nosso trabalho com o grupo tratado com acetato de chumbo + cloreto de zinco, sugerem que o zinco tenha uma ação protetora no eventual déficit de atenção causado pelo chumbo, preservando a memória de habituação dos animais.

Este resultado sugere que o zinco possa ter uma ação protetora frente ao chumbo em áreas cerebrais envolvidas com a memória. O papel do zinco em

acrescentar que alguns estudos demonstram que o zinco pode conferir uma proteção em relação à toxicidade pelo chumbo, pois o zinco seria capaz de restaurar a atividade da enzima ALA-D inibida pelo chumbo (Satija & Vij, 1995). Além disso, tem sido proposto que zinco parece prevenir a neurotoxicidade do chumbo. Winneke (1996) relatou que crianças vizinhas a uma fundição de chumbo e zinco apresentaram déficit de inteligência muito menores do que os observados em crianças de algumas cidades do interior expostas somente ao chumbo. Contudo, tem sido demonstrado que o zinco, dependendo das condições experimentais e da concentração cerebral atingida, pode ter ação neurotóxica ou neuroprotetora (Cuajungco & Lees, 1998). De qualquer forma, é importante ressaltar que no protocolo experimental utilizado o zinco *per se* não provocou déficits comportamentais.

Um dos possíveis mecanismos de ação do chumbo no sentido de causar déficit de aprendizado/memória, seria bloqueando a potenciação a longo prazo (Altmann et al., 1991; Hori et al., 1993, Gilbert et al., 1999). A esta é atribuído um papel importante no processo de aprendizado e memória, especialmente no hipocampo. Esta estrutura cerebral inclusive, parece ser um dos alvos da ação do chumbo (Alfano & Petit, 1981; Jonhston & Goldstein, 1998). A potenciação a longo prazo estudada na região CA1 no hipocampo de ratos de 28 dias de idade foi atenuada quando esses animais foram expostos ao chumbo. A associação entre a exposição ao chumbo e o comprometimento da LTP em ratos jovens parece ser, em pequena parte, um resultado da interação entre o metal e a PKC (Zaiser & Miletic, 2000). Baixos níveis de chumbo são capazes de ativar

diretamente PKC (Markovac & Goldstein, 1988), e o chumbo exibe afinidade por esta enzima maior que o cálcio, seu ativador fisiológico. Estudos têm proposto que o chumbo module a atividade da PKC por interagir com múltiplos sítios dentro da enzima (Sun X. et al. 1999).

O processo de potenciação a longo prazo tem sido associado a receptores NMDA de transmissões sinápticas excitatórias, um potente substrato neurobiológico de processos de aprendizagem e memória (Laroche et al., 1989, Skelton et al., 1987; Capaldi et al., 1999). Tem sido demonstrado que a memória de habituação no campo aberto é processado pelo hipocampo (Izquierdo, 1994), o qual acredita-se ser o alvo para a neurotoxicidade do chumbo (Stoltenburg-Didinger, 1994; Jonhston & Goldstein, 1998). O resultados obtidos com chumbo em nosso trabalho são similares àqueles observados em animais com lesão hipocampal (O'Keefe & Nadel, 1978).

A importância da atividade do receptor NMDA (NMDAR) para processos de aprendizagem tem sido levantada de estudos que mostram que a administração de antagonistas NMDA não competitivos tais como MK-801, prejudica uma variedade de tarefas de aprendizagem, incluindo mudança na aquisição de respostas repetidas (Cohn & Cory-Slechta, 1992) e tarefas de memória espacial, como labirinto radial (Butelman, 1989), aprendizagem no labirinto aquático (Kant et al., 1991), e alternância espacial (Walker & Gold, 1991). O NMDAR tem sido identificado como um dos principais alvos para neurotoxicidade induzida por  $Pb^{2+}$ . O perfil de desenvolvimento da subunidade da proteína NMDA-2R no hipocampo é especialmente alterado pela exposição crônica ao  $Pb^{2+}$  (Nihei & Guilarte, 1999).

identificado como um dos principais alvos para neurotoxicidade induzida por  $Pb^{2+}$ . O perfil de desenvolvimento da subunidade da proteína NMDA-2R no hipocampo é especialmente alterado pela exposição crônica ao  $Pb^{2+}$  (Nihei & Guilarte, 1999). Existe a possibilidade de que o déficit de habituação demonstrado no grupo exposto somente ao chumbo seja devido, pelo menos em parte, a um efeito do chumbo sobre os receptores NMDA, mas tal hipótese necessita confirmação com experimentos neuroquímicos. Contudo, não foram observadas alterações na sensibilidade a convulsões produzidas por NMDA nos ratos de 13 dias de idade previamente tratados com chumbo (8° ao 12° dia de vida) (Figura 7). Não podemos excluir a possibilidade de que estes resultados aparentemente contraditórios sejam devido à idade na qual as tarefas foram realizadas.

O zinco modula a atividade do receptor NMDA, pois atua em um sítio inibitório específico no receptor (Peters et al., 1987; Choi & Koh, 1998). Entretanto, o grupo que recebeu apenas cloreto de zinco apresentou escores de respostas de orientação semelhantes ao grupo controle, indicando que o zinco na concentração utilizada não afeta a memória de habituação.

Alguns trabalhos relatam que o comportamento de orientação dos animais pode ser comprometido devido ao fato de que os tratamentos utilizados possam alterar a atividade locomotora dos animais, principalmente em decorrência da hiperatividade ocasionada (Rodrigues et al., 1996b). Contudo, nosso resultado mostrou que os grupos tratados com chumbo e/ou zinco não apresentaram alterações significativas na atividade locomotora dos animais da sessão treino em relação à sessão teste, em relação ao grupo controle (Figura 9). Isto sugere que

os escores de respostas de orientação não estão sobre efeito da atividade locomotora alterada. O resultado obtido com o grupo exposto ao chumbo concorda com os resultados encontrados por Sobotka e Cook (1974), que relataram que em ratos jovens expostos ao chumbo (24-28 dias de idade) não houve diferença significativa na atividade locomotora em relação ao grupo controle. Outros trabalhos também relatam ausência de efeito do chumbo sobre atividade locomotora (Jason & Kelog, 1981; Munoz et al., 1989). Além disso, o resultado na tarefa de geotactismo negativo sugere que as alterações comportamentais verificadas na tarefa de campo aberto não podem ser atribuídas a déficit de coordenação motora dos animais.

A autolimpeza ("grooming"), defecação e latência para sair do primeiro quadrado (timidez) são respostas atribuídas ao perfil emocional dos animais (Archer, 1973).

A defecação foi proposta como o principal parâmetro da emocionalidade no teste do campo aberto (Whimbey & Demenberg, 1967). No nosso estudo a análise estatística dos bolos fecais não mostrou diferenças significativas em relação a sessão e tratamento, mas apenas uma tendência à interação entre sessão e tratamento, uma vez que observou-se um aumento nos escores de bolos fecais dos grupos que receberam chumbo e chumbo + zinco, na sessão teste em relação à sessão treino (Figura 10).

O comportamento de autolimpeza parece estar associado a situações de conflitos ou frustrações em diferentes espécies. Ele pode estar aumentado em resposta ao medo ou diminuído diante de uma extrema excitação (Hinde, 1970;

Fentress, 1986). O resultado da resposta de autolimpeza obtido em nosso trabalho, mostra que parece haver uma tendência de interação entre sessão e tratamento, uma vez que houve um aumento nos escores de autolimpeza no grupo que recebeu apenas chumbo (Figura 11). Roeling et al. (1993) consideram o hipotálamo como uma "área de autolimpeza" específica. Outras áreas cerebrais como septo, os núcleos amigdalóides e substância cinzenta periaquidutal, quando estimuladas, podem provocar esse comportamento, uma vez que possuem vias aferentes e eferentes com o hipotálamo (Van Erp et al., 1993). Muitas estruturas cerebrais, como hipocampo e a amígdala participam de ambos os fenômenos, ansiedade e memória, o que foi verificado por Beuzen & Belzung, (1995). Dados que relacionam aprendizado ou memória explícita com níveis de ansiedade foram relatados por Ribeiro et al., (1999). A autolimpeza se trata, na realidade de um grupo de respostas somáticas, autonômicas e endócrinas, associadas com comportamento adaptativo, os quais asseguram a sobrevivência do animal (Celis & Torre, 1993).

Os resultados obtidos na latência para sair do primeiro quadrado no campo aberto também demonstraram não haver alterações significativas nos diferentes grupos de tratamento (Figura 12). Testes realizados com macacos de 4,5 a 6 anos de idade, tratados com chumbo durante o primeiro ano de vida pós-natal, mostram um aumento na latência para entrar no campo aberto nos animais expostos ao metal (Ferguson et al., 1993).

Conforme mencionado anteriormente, a autolimpeza, a defecação e a latência para sair do primeiro quadrado são atribuídos ao perfil emocional do

animal, sendo, portanto, dependentes da amígdala, enquanto que a memória de habituação ao campo aberto, segundo Izquierdo et al. (1993) é dependente apenas da integridade hipocampal. Nossos resultados sugerem que o zinco é capaz de exercer um efeito neuroprotetor em relação ao efeito do chumbo, presumivelmente no hipocampo, uma vez que o grupo tratado com chumbo + zinco manteve a memória de habituação. Por outro lado, aparentemente o zinco não parece apresentar o mesmo efeito neuroprotetor em relação a um possível efeito de chumbo no perfil emocional dos animais, talvez devido ao fato do envolvimento de diferentes regiões cerebrais e substratos neuronais na expressão destes parâmetros emocionais.

Frederickson (1989) demonstrou haver uma maior concentração de zinco nas fibras musgosas do hipocampo, em relação às células brancas e cinzentas do córtex cerebral. Tal resultado sugere a existência de diferentes concentrações de zinco entre as estruturas cerebrais (Choi & Kohl, 1998).

Os dados da literatura sugerem que os déficits de atenção, os quais são as bases para o comprometimento cognitivo associado ao chumbo são aparentemente dicotômicos (Brockel & Cory-Slechta, 1998). Observações de crianças na sala de aula tem indicado aumento no tempo de engajamento em comportamento de "off-task", que são dependentes da dose relatadas de chumbo no sangue (Needleman, 1993), sugerindo que um dos efeitos do chumbo é sob a forma de comportamento perseverante. Por outro lado, o aumento de chumbo no sangue está associado com o aumento de distrabilidade e nos escores de comportamento impulsivo (Needleman, 1993). Comportamentos impulsivos e de

perseverança relacionados ao chumbo são distintamente dicotômicos e dificultam a compreensão de como poderiam ser simultaneamente operacionalizados (Brockel & Cory-Slechta, 1998).

Alguns modelos de tarefas são descritos na literatura, principalmente em caixa de Skinner, na tentativa de estudar condicionamento operante, que é uma das formas mais básicas de aprendizagem que afeta virtualmente todas as formas do comportamento humano. O condicionamento operante tem sido uma ferramenta de pesquisa dos efeitos do chumbo sobre os processos cognitivos. O tratamento crônico com chumbo aumentou a relação fixa e reduziu o tempo de espera na tarefa estudada por Brockel & Cory Slechta (1999). O termo operante foi adotado para referir ao fato de que os animais devam executar ou manipular uma parte específica do seu ambiente para receber um reforço. Uma consideração mais contemporânea do termo operante descreve que todo teste de aprendizagem requer alguma operação a ser realizada no ambiente (Burbacher & Grant, 2000).

O modelo de condicionamento operante aplicado em nossos estudos demonstrou que os animais tratados somente com chumbo apresentaram um escore menor no número de vezes de execução da tarefa de procura do bebedouro, bem como uma maior latência no tempo despendido na procura ao bebedouro em relação aos outros grupos (Figura 13A,B). Os resultados sugerem que esses animais apresentam déficit de aprendizagem no condicionamento operante, o qual pode estar relacionado a uma menor capacidade associativa nesta tarefa. Esses achados poderiam ser resultado do aumento da distrabilidade

nos outros grupos (dados não mostrados). Essa atividade pode explicar em parte a redução no número de vezes que o animal procurou o bebedor. O grupo que recebeu a associação chumbo + zinco demonstrou escores semelhantes ao observado no grupo salina (controle). Esses resultados sugerem que o zinco seja capaz de exercer um efeito neuroprotetor em relação ao efeito do chumbo na tarefa de condicionamento operante.

A alternância espontânea se refere a uma tendência natural que muitas espécies de animais apresentam em explorar sucessivamente novos espaços (Yadin et al., 1991; Einat & Szechtman, 1995). Ela consiste numa situação de escolha, na qual, em certas condições, como por exemplo tratamento com drogas, pode resultar numa escolha perseverativa. Um déficit neste paradigma é visto como aumento na tendência a repetir a mesma escolha. A tarefa de alternância espontânea tem sido utilizada para avaliar a integridade hipocampal (Yadin et al., 1991). Animais de 17 dias de idade expostos ao chumbo apresentaram comprometimento na tarefa de alternância espontânea (Mello et al., 1998). Foi documentado que macacos expostos ao chumbo e submetidos a testes idênticos a alternância espacial, apresentaram déficits no desempenho desta tarefa (Burbacher & Grant, 2000). Os nossos resultados mostram que o grupo tratado com chumbo apresentou alterações estatisticamente significativas na resposta de alternância (latência para alternar e número da prova alternada) em relação ao grupo controle (Tabela 6). Por outro lado os animais tratados com chumbo + zinco não apresentaram alterações neste teste, sugerindo que há um

relação ao grupo controle (Tabela 6). Por outro lado os animais tratados com chumbo + zinco não apresentaram alterações neste teste, sugerindo que há um efeito do zinco no sentido de prevenir os danos causados pelo chumbo neste modelo de estudo da memória.

Trabalhos sugerem que o chumbo produza, pelo menos parte de seus efeitos, por atuar no receptor NMDA inibindo sua atividade, sendo que o zinco sabidamente possui um sítio inibitório específico de ligação neste receptor. A grande maioria dos trabalhos que demonstram atuação do chumbo sobre o receptor NMDA, são estudos eletrofisiológicos que medem a LTP principalmente na região do hipocampo. A estimulação tetânica com 50 Hz para produzir LTP na região CA1 do hipocampo de ratos de 28 dias de idade foi atenuada nos animais expostos ao chumbo (Zaiser & Miletic, 2000). Trabalhos de aspectos neuroquímicos também relatam uma possível ligação do chumbo ao receptor NMDA, através de estudos de "binding" de MK-801, antagonista específico de receptor NMDA. A ligação do MK-801 ao receptor NMDA hipocampal de ratos adultos foi reduzida pela presença do chumbo. As alterações de ligação ao receptor NMDA no hipocampo parece ter um papel na neurotoxicidade induzida pelo chumbo (Ma, et. al., 1998). Da mesma forma é observada a alteração na indução da LTP pelo chumbo nesta mesma região. Uma das proposições é de que o chumbo atue sobre o receptor NMDA justamente por se ligar no sítio do zinco no receptor. Entretanto, estudos sugerem que o chumbo parece inibir o receptor NMDA por interagir com um sítio distinto do sítio alostérico do zinco. Estes resultados indicam que as propriedades inibitórias de  $Pb^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  livres,

sobre o receptor NMDA são similares, mas que ocorrem por vias que têm sítios alostéricos de ligação independentes (Lasley & Gilbert, 1999). O sítio da glicina no receptor NMDA parece ter um importante papel na regulação da neurotransmissão glutamatérgica por cátions de relevância fisiológica e toxicológica. Os cátions  $Pb^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ , potentes inibidores do receptor NMDA, antagonizam a potenciação desse receptor promovida pelo  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  e parecem envolver diferentes regulações na função desse receptor pela modulação do sítio de glicina (Hashemzadeh-Gargari & Guilarte, 1999). Porém os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram que o zinco nesse protocolo de exposição apresenta uma eficiência em proteger o SNC dos danos causados pelo chumbo, sendo revelado fundamentalmente pelos testes de memória de habituação, condicionamento operante e alternância espontânea, que segundo a sustentação literária envolvem processos cognitivos de memória e aprendizagem. Apesar do estudo na sensibilidade dos ratos a convulsões por NMDA não ter demonstrado que a ação dos íons zinco e chumbo seja no mesmo sítio, um suposto efeito protetor do zinco foi demonstrado nos eventos comportamentais comprometidos pelo chumbo.

Ao final deste estudo, analisando os resultados obtidos, observamos que a atividade da ALA-D, bem como o acúmulo de chumbo no sangue e cérebro dos animais expostos a este metal, sugerem um quadro de intoxicação por este metal. O zinco parece não alterar ou influenciar significativamente sobre estes aspectos. Os resultados obtidos nos testes comportamentais parecem não sofrer alterações devido à atividade e coordenação motora, uma vez que não foram observadas

alterações significativas do tratamento na locomoção em campo aberto e na geotaxia negativa em nenhum dos grupos tratados. Por outro lado, os resultados obtidos no campo aberto, no condicionamento operante e na alternância espontânea, demonstraram que os animais tratados com chumbo durante a segunda fase crítica de desenvolvimento cerebral, compreendida entre o oitavo e décimo terceiro dia de idade, apresentaram déficit na habituação, no condicionamento e na memória espacial respectivamente, os quais foram prevenidos pela administração concomitante de zinco, sugerindo uma possível proteção dos zinco nos danos cognitivos causados pelo chumbo.

## 7. CONCLUSÕES

1. A avaliação do peso corporal, bem como dos órgãos isolados dos ratos expostos ao tratamento com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco não mostrou alterações significativas, sugerindo que esse protocolo não provoca alterações físicas grosseiras nos animais.
2. Na determinação da concentração de chumbo no sangue e cérebro, foi verificado que os animais expostos ao chumbo e associação chumbo + zinco, apresentaram um acúmulo de chumbo no cérebro e sangue em relação aos grupos salina ou zinco, indicando que os efeitos observados neste trabalho podem ser atribuídos ao acúmulo deste metal no organismo. Por outro lado, o zinco parece não evitar o acúmulo de chumbo.
3. A atividade específica da enzima ALA-D em sangue, rim e cérebro de ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco não diferiu em relação ao grupo salina (controle), por outro lado, a reativação com ditiotreitol demonstrou que os grupos tratados com chumbo e chumbo + zinco apresentaram um índice de reativação significativamente maior no sangue, rim e cérebro, sugerindo que a enzima ALA-D estava inibida pelo tratamento, sendo o zinco incapaz de protegê-la.
4. Nos estudos da atividade e coordenação motora de ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco, através da avaliação da locomoção dos animais no campo aberto e na tarefa de geotactismo negativo não foi evidenciada nenhuma alteração. Estes resultados sugerem que os déficits

cognitivos observados parecem não ser devido a alterações na atividade e coordenação motora dos animais.

5. A sensibilidade a convulsões induzidas por NMDA em ratos jovens tratados com chumbo, zinco e associação chumbo + zinco, não foi afetada pelo chumbo e/ou zinco. Estes resultados sugerem que o receptor não tenha sido afetado de forma a alterar a sua resposta ao NMDA administrado para causar convulsões.

6. Na investigação de alterações no processo de aprendizagem e memória, através dos ensaios comportamentais no campo aberto, de condicionamento operante e de alternância espontânea, os resultados sugerem que os ratos jovens tratados com chumbo apresentam um déficit de aprendizagem e memória. Por outro lado a associação chumbo + zinco não apresentou o mesmo resultado, sugerindo que o zinco parece ser eficiente na proteção dos danos causados pelo chumbo nestas tarefas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHAMI, M., HUSAIN, R., HUSAIN, R. & SETH, P.K. Influence of iron and lead treatment on behavior and cerebellar and hippocampal polyamine levels in neonatal rats. **Neurochemical Research** 21(8): 915-922, 1996.
- AFONSO, S. G., DE SALAMANCA, R. E. & BATLLE, A. Folding and unfolding of delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase induced by uro-and protoporphyrin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 29 (3): 493-503, 1997.
- ALFANO, D. P. & PETIT, T. L. Behavioral effects of postnatal lead exposure: Possible relationship to hippocampal dysfunction. **Behavioral and Neural Biology** 32: 319-333, 1981.
- ALKONDON, M., COSTA, A. C. S., RADHAKRISHMAN, V., ARONSTAM, R. S. & ALBUQUERQUE, E. X. Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. **FEBS Letters** 261: 124-130, 1990.
- AL-SALEH, I. A. S. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. **Medical Research Review** 14: 415-486, 1994.
- ALTMANN, L., SVEINSSON, K. & WIEGAND, H. Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. **Neuroscience Letters** 128: 109-112, 1991.
- ALTMANN, L., WEINBERG, F., SVEINSSON, K., LILIENTHAL, H., WIEGAND, H. & WINNEKE, G. Impairment of long-term potentiation and learning following chronic lead exposure. **Toxicology Letters** 66: 105-112, 1993.

- ALTMANN, L., GUTOWISK, M. & WIEGAND, H. Effects of maternal lead exposure on functional plasticity in the visual cortex and hippocampus of immature rats. **Developmental Brain Reserch** 81: 50-56, 1994.
- AMITAI, Y., KOIFMAN, M., ORENBAYEV, T., ALMOG, S., TEPFERBEG, M., DIMITRIEV, A & VAKHLIS, L. Prenatal lead exposure in a highly polluted area en Kazakhstan: Effect on mental development. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**. 37(3): 402, 1999.
- AKHONDZADEH, S. Hippocampal synaptic plasticity and cognition. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**. 24: 241-248, 1999.
- ARCHER, B. Tests for emotionality in rats and mile: A review. **Animal Behavior** 21: 205-235, 1973.
- BAEUERLE P. A. Inducible Gene Expression – Environmental Stress and Nutrients. Volume 1, Birkhäuser 1995.
- BARRET, J & LIVESEY, P. J. Low level lead effects on activity under varying stress conditions in the developing rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 22: 107-118, 1985.
- BARNARD, F. G., ITOH, HOHBERGER, L. H. & SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase - Possible role of essencial thiol groups. **Journal of Biological Chemistry** 252: 8965-8974, 1977.
- BATLLE, A. M. del C. & STELLA, A. M. Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. **International Journal of Biochemistry** 9: 861-864, 1978.

- BATRA N., NEHRU, B. & BANSAL, M. P. Effects of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. **Reproductive Toxicology** 12(5): 535-540, 1998.
- BAYER, S. A., ALTMAN, J., RUSO, R. J. & ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology** 14: 83-144, 1993.
- BECHARA, E. J. H., MEDEIROS, M. H. G., MONTEIRO, H. P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C. A., ABDALLA, D. S. P., ONUKI, J., WENDEL, C. M. A. & MASCIIO, P. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova** 16: 385-392, 1993.
- BELLINGER, D., LEVITON, A., ALLRED, E. & RABINOWITZ, M. Pre- and postnatal lead exposure and behaviour problems in school-aged children. **Environmental Research** 66: 12-34, 1994.
- BERGDAHL, I. A., GRUBB, A. & SCHÜTZ, A. et al. Lead binding to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. **Pharmacology & Toxicology** 81: 153-158, 1997.
- BEVAN, D. R., BODYLAENDER, P. & SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of  $Zn^{2+}$  for enzyme activity. **The Journal of Biological Chemistry** 255 (5): 2030-2035, 1980.
- BITTERMAN, M. E. Comparative analysis of learning in honeybees. **Animal Learning and Memory** 24: 123-141, 1996.
- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature** 361: 31-39, 1993.

- BODGEN, J. D., GERTNER, S. B., CHRISTAKOS, S., KEMP, F. W., YANG, Z., KATZ, S. & CHU, C. Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. **Journal of Nutrition** 122: 1351-1360, 1992.
- BORRALHO, L. M., MALAMUD, D. R., PANEK, A. D., TENAN, M. N., OLIVEIRA, D. E. & MATTOON, J. R. Parallel changes in catabolite repression of heme biosynthesis and cytochromes in repression-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology** 135: 1217-1227, 1989.
- BORRALHO, L. M. **Ácido delta-aminolevulínico desidratase de *Saccharomyces cerevisiae*: tópicos sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e regulatórias.** Rio de Janeiro, 1990. Tese de Doutorado - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, UFRJ.
- BRENNAN, M. J. W., CANTRIL, R. C. & KRAMER, S. Effects of delta-aminolevulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membrane. **International Journal of Biochemistry** 12: 833-835, 1980.
- BRESSLER, J. R. & GOLDSTEIN, G. W. Mechanism of lead neurotoxicity. **Biochemical Pharmacology** 41: 479-484, 1991.
- BRESSLER, J., KIM, K., CHAKRABORTI, T. & GOLDSTEIN, G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. **Neurochemical Research**. 4: 595-600, 1999.
- BROCKEL, B. J. & CORY-SLECHTA, D.A. Lead , attention, and impulsive behavior: Changes in a fixed-ratio waiting-for-reward paradigm. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 60: 545-552, 1998.
- BROCKEL, B. J. & CORY-SLECHTA, D.A. The effects of postweaning low-level exposure on sustained attention: a study of target densities, stimulus

presentation rate and stimulus predictability. **Neurotoxicology** 63:3 423-424, 1999.

BURBACHER T. M. & GRANT K. S. Methods for studying nohuman primates in neurobehavioral toxicology and teratology. **Neurotoxicology and Teratology** 22: 475-486, 2000.

BURGER, J. & GOCHFELD M. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. **Journal Toxicology and Environmental Health B Crit Rev** 3: 2, 59-78, 2000.

BUTELMAN, E.R. A novel NMDA antagonist, MK-801, impairs performance in a hippocampal-dependent spatial learning task. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 34: 13-16, 1989.

BUZEN, A. & BELZUNG, C. Link between emotional memory and anxiety states a study by principal component analysis. **Physiology and Behavior** 58: 111-118, 1995.

CAMPAGNA, D., HUEL, G., GIRARD, F., SAHUQUILLO, J. & BLOT, P. Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. **Toxicology** 134: 2-3 143-52, 1999.

CAPALDI, E. A., ROBINSON, G. E. & FAHRBACH, S. E. Neuroethology of spatial learning: The birds and the Bees. **Annual Review of Psychology** 50: 651-682, 1999.

CARTMELL, J. & SCHOEPP, D. D. Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. **Journal of Neurochemistry** 75: 889-907, 2000.

- CDC – (CENTERS FOR DISEASE CONTROL). Preventing lead poisoning in young children. A statement by the Centers for Disease Control. Atlanta, GA. 1991.
- CELIS, M. E. & TORRE, E. Measurement of grooming behavior. **Methods in Neuroscience** 14, 378-388, 1993.
- CHIBA, M & KIKUCHI M. The *in vivo* effects of zinc and manganese on delta aminolevulinic-acid dehydratase EC-4.2.1.24 activity inhibited by lead. **Toxicology Letters** 20(2): 143-148, 1984.
- CHOI, D.W. & KOH, J.R. Zinc and Brain injury. **Annual Review of Neuroscience** 21, 347-375, 1998.
- CLELAND, W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. **Biochemistry** 3: 480-482, 1963.
- COHN, J., & CORY-SLECHTA, D. A. Differential effects of MK-801, NMDA, and scopolamine on rats learning a four-member repeated acquisition paradigm. **Behavioral Pharmacology** 3: 403-413, 1992.
- CORDEIRO, R., FILHO, E. C. L., SALGADO, P. E. T., SANTOS, C. O., CONSTANTINO, L. & MALATESTA, M. L. L. S. Neurological disturbances in workers with low levels of lead in the blood. II-Neuropsychological disorders. **Revista de Saúde Pública** 30(4): 358-363, 1996.
- CORY-SLECHTA, D. Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 35: 391-415, 1995.

- CORY-SLECHTA, D. A, GARCIA-OSUNA, M. & GREENAMYRE J. T. Lead-induced changes in NMDA receptor complex binding: correlations with learning accuracy and with sensitivity to learning impairments caused by MK 801 and NMDA administration. **Behavioural Brain Research**, 85: 161-174, 1997.
- CUAJUNGCO, M. P. & GORDON, J. L. Diverse effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity of zinc in the hippocampus. **Brain Research** 799: 97-107, 1998.
- DAVID A. J., KUHLMANN, A. C., FARMER, S. J. Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 57: 271-279, 1997.
- DAVID A. J., KUHLMANN, A. C. & GUILARTE, T. R. Intrahippocampal administration of lead (Pb) impairs performance of rats in the Morris water maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 57: 263-269, 1996.
- DAVIS, J. M., OTTO, D. A., WEIL, D. E. & GRANT, L. D. The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. **Neurotoxicology and Teratology** 12: 215-229, 1990.
- DAVIS, M., ELIAS, R. & GRANT, L.D. Current issues in human lead exposure and regulation of lead. **Neurotoxicology** 14: 15-28, 1993.
- DIETRICH, K. N., BERGER, O. G. & SUCCOP, P. A. Lead exposure and the motor developmental status of urban six-year-old children in the Cincinnati prospective study. **Pediatrics** 91: 301-307, 1993.
- DRESEL, E. I. B. & FALK, J. E. Conversion of delta-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. **Nature** 172: 1185, 1953.

DOW, J. LINDSAY, G. & MORRISON, J. **Biochemistry** – Molecules, Cells and the Body. Wokingham: Addison-Wesley, 1996. 592 p. Cap. 10, p. 293-328: Metabolism of nitrogen – containing molecules.

DUTRA, J.C., WAGNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WANNMACHER, L.E., PIRES, R.F. & ROSA-JURHUR, A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behaviour. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 24: 595-605, 1991.

EINAT, H. & SZECHTMAN, H. Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alteration task in rats sensitized to the dopamine agonist quipirilone. **Physiology and Behavior** 57: 55-59, 1995.

EL MISSIRY, M. A. Prophylactic effect of melatonin on lead-induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology** 14: 1, 57-62, 2000.

FENTRESS, J. C Expressive contexts, fine structure and central mediation of rodent grooming, **Annals New York Academy of Science** 525: 18-26, 1988.

FERGUNSON, S. A. & BOWMAN, R. E. Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. **Neurotoxicology and Teratology** 12: 91-97, 1990.

FERGUNSON, S. A. & BOWMAN, R. E. Effects of arecoline and scopolamine on open field behavior of adult monkeys treated with lead during the first year postpartum **Neurotoxicology and Teratology** 14: 73-80, 1992.

FERGUNSON, S. A., MEDINA, R.O., & BOWMAN, R.E. Home cage behavior and lead treatment in rhesus monkeys: A comparison with open-field behavior. **Neurotoxicology and Teratology** 15: 145-149, 1993.

- FLORA, S. J. S., BHATTACHARYA & SACHAN S. R. S. Dose-dependent Effects of zinc supplementation during chelation of lead in rats. **Pharmacology & Toxicology** 74: 330-333, 1994.
- FOWLER, B. A., KAHNG M. W. & SMITH D. R. Role of lead binding proteins in renal cancer. **Environmental Health Perspectives** 102: 115-116, 1994.
- FOWLER, B. A. Roles of lead-Binding Proteins in mediating lead bioavailability. **Environmental Health Perspectives** 106: 1585-1587, 1998.
- FRANKOVA, S. & BARNES, R. H. Influence of malnutrition in early life on exploratory behavior of rats. **Journal of Nutrition** 96: 477-484, 1968.
- FREDERICKSON, C.J. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. **International Review of Neurobiology** 131, 145-238, 1989.
- FUJITA, H. ORII, Y. & SANO, S. Evidence of increased synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. **Biochemical et Biophysica Acta** 678: 39-50, 1991.
- GIACOMELLI, M. B. O., LIMA, M. C., BORTOLUZZI, I. P., KLUG, M. & STUPP, V. Determinação de metais pesados em sedimento do Rio Tubarão – SC. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental/ABS**. In Press
- GIBSON, K. D., NEUBERGER, A., & SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemical Journal** 61: 618-629, 1955.
- GILBERT, M. E., MACK C. M. & LASLEY, S. M. Chronic developmental lead exposure and hippocampal long-term potentiation: biphasic dose-response relationship. **Neurotoxicology** 20:1 71-82, 1999.

- GNONLONFOUN, N., FILELLA, M., & BERTHON, G. Lead(II)-dithiothreitol equilibria and their potential influence on lead inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase in *in vitro* assays. **Journal of Inorganic Biochemistry** 42: 207-215, 1991.
- GOERING, P. L. & FOWLER, B. A. Metal constitution of metallothionein influences inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase) by lead. **Biochemical Journal** 245: 239-345, 1987.
- GOERING, P. L, MISTRY, P. & FOWLER, B. A. A low molecular weight lead binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta aminolevulinic acid dehydratase: comparison with a renal lead-binding protein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 237: 220-225, 1992.
- GOERING, P. L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology** 14: 45-60, 1993.
- GONZALEZ, M. TEJEDOR, M. C. 5-ALA-D activity variations in red blood cells in response to lead accumulation in rock doves (*Columba livia*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 49: 527-534, 1992.
- GOTTLIEB, A., KEYDAR, I. & EPSTEIN, H. T. Rodent brain growth stages: an analytical review. **Biology of the Neonate** 32: 166-176, 1977.
- GOYER, R. A. In KLASSEN, C. D., AMDUR, M. O. & DOULL, J. **Casarett and Doll's Toxicology: The bases science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1.111 p. Cap. 23, p. 691-712: Toxic effects of metals.
- GRANDJEAN, P. International perspectives of lead exposure and lead toxicity. **Neurotoxicology** 14: 9-14, 1993.

- GRANICK, J., SASSA, S., GRANICKS, S., LEVERE, R. D. & KAPPAS, A. Studies in lead poisoning II. Correlation between the ratio of activated to inactivated  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. **Biochemical Medicine** 8: 149-159, 1973.
- GUILARTE, T. R. MICELI, R. C. & JETT, D. A. Neurochemical aspects of hippocampal and cortical  $Pb^{2+}$  neurotoxicity. **Neurotoxicology** 15: 459-466, 1994.
- GUILARTE, T. R., MECALI, R. C. & JETT, D. A. Biochemical evidence of an interaction of lead and zinc allosteric sites of the NMDA receptor complex: effects of neuronal development. **Neurotoxicology** 16: 63-72, 1995.
- GUILARTE, T. R. & NIHEI, M. K. NMDAR-2R subunit protein expression is reduced in the hippocampus of rats exposed to  $Pb^{2+}$  during development. **Molecular Brain Research** 66: 42-9, 1999.
- GUO, G. G., GU, M. & ETLINGER, J. D. 240-Kda Proteasome inhibitor (CF-2) is identical to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. **The Journal of Biological Chemistry** 269: 12399- 12402, 1994.
- GUPTA, G. S., SINGH, J. & PARKASH, P. Renal toxicity after oral administration of lead acetate during pre- and post-implantation periods: effects on trace mental composition, metallo-enzymes and glutathione. **Pharmacology & Toxicology** 76: 206-211, 1995.
- HAEGER-ARONSON, B. & SCHUTZ A. M. Antagonistic effect in vivo of zinc on inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead. **Archives of Environmental Health** 31: 215-220, 1976.
- HÄNNINEN, H. Behavioral effects of occupational exposure to mercury and lead. **Acta Neurologica Scandinavica**, Suppl. 92 (66): 167-175, 1982.

- HASAN, F., COOKMAN, G. R., KEANE, G. J., BANNIGAN, J. G., KING, W. B. & REGAN, C. M. The effect of low level lead exposure on the postnatal structuring of the rat cerebellum. **Neurotoxicology and Teratology** 11: 433-440, 1989.
- HASHEMZADEH-GARGARI H, GUILARTE TR. Divalent cations modulate N-methyl-D-aspartate receptor function at the glycine site. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 290: 1356-62, 1999.
- HASNAIN, S. S., WARDELL, E. M., GARNER, C. D., SCHLOSSER, M. & BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemical Journal** 230: 625-633, 1985.
- HENRETIG, F. M., GOLDFRANK'S, R., GOLDFRANK'S, I. R., FLOMCNBAUEM, N. E., LEWIN, N. E. A., WEISMAM, R. S., HOWLAND, M. A. & HOFFMANN, R. S. In **Goldfrank's Toxicology Emergences**. 6. ed. Townford Connecticut: Appleton & Lange, 1998. Cap 79, p 1277-1302: Lead.
- HERMES-LIMA, S. S., CASTILHO, R. F., VALLE, V. G. R., BECHARA, E. J. H. & VERCESI, A. E. Calcium dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. **Biochimica et Biophysica Acta** 1180: 201-206, 1992.
- HILSON, J. A. & STRUPP, B. J. Analyses of response patterns clarify lead effects in olfactory reversal and extradimensional shift tasks: assessment of inhibitory control, associative ability and memory. **Behavior and Neuroscience** 111: 532-542, 1997.
- HINDE, R.A. A Synthesis of ethology and comparative psychology. In **Animal Behavior**. 2nd. Ed. McGraw-Hill, 1970.

- HINDMARSH, J. T. The porphyrias: recent advances. **Clinical Chemistry** 32: 1255-1263, 1986.
- HOLMES, S. E., DRUTZ, J. E., & BUFFONE, G. J. et al. Blood lead levels in a continuity clinic population. **Clinical Toxicology** 35(2): 181-186, 1997.
- HORI, N., BUSSELBERG, D., MATTHEWS, M.R., PARSONS, P.J. & CARPENTER, D. O. Lead blocks LTP by an action not at NMDA receptors. **Experimental Neurology** 119: 192-197, 1993
- HUMAITI, A. A. & SOUD, M. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. **Science and Total Environment** 248:145-50, 2000.
- HUSSAIN, S., SLIKKER, W. J. & ALI, S. F. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. **Neurochemistry International** 29:2145-2152, 1996.
- HUTTON, M. The effects of environmental lead exposure and in vitro zinc on tissue delta-aminolevulinic acid dehydratase in urban pigeons. **Comparative Biochemistry and Physiology** 74: 441-446, 1983.
- IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB Journal** 8: 1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Role of amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 26: 573-589, 1993.

- JASON, K. M. & KELOG, C. K. Neonatal lead exposure: effects on development of behavior and striatal dopamine neurons. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** 15: 641-649, 1981.
- JOHNSTON M. V & GOLDSTEIN G. W. Selective vulnerability of the developing brain to lead. **Current Opinion in Neurology** 11: 689-693, 1998.
- JORDAN, P. M. GORE, M. G. & CHAUDHRY, A. G. Subunit modification of 5-aminolevulinate dehydratase involving cysteine residues. **Biochemical Society Transactions** 4: 762-763, 1976.
- JORDAN, P. M. & GIBBS, P. N. B. Mechanism of action of 5-aminolevulinate dehydratase from human erythrocytes. **Biochemical Journal** 227: 1015-1020, 1985.
- KAJIMOTO, M. M., KONDON, M., NIWA, M. SUZUKI, T., KIMURA, H. SASAKI, A. & URATA, G. Increase of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in rat erythrocytes in lead poisoning. **Archives of Toxicology** 52: 1-11, 1983.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. **Essentials of science and behavior** cap35, p 661, 3<sup>o</sup> ed, Library of Congress, 1995.
- KANT, G .J., WRIGTH, W. L., ROBINSON, T. N., & D'ANGELO, C. P. Effects of MK-801 on learning and memory as assessed using a novel water maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 39: 479-485, 1991.
- KHAN, S., KHAN, M. A., BHATNAGAR, D. YADAV, P. & SARKAR, S. Zinc protection against lipid peroxidation from cadmium. **Indian Journal of Experimental Biology** 29: 823-825, 1991.
- KIM S. H. & KEEN C. L. Influence of dietary carbohydrate on zinc-deficiency-induced changes in oxidative defense mechanisms and tissue oxidative damage in rats. **Biological Trace Element Research** 70: (1) 81-96, 1999.

KISS T. & OSIPENKO, O. N. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. **Pharmacological Reviews** 46: 245-267, 1994.

KLAASSEN, C. D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Orgs. HARDMAN, J. G., GILMAN A. G. & LIMBIRD, L. E. p. 1649-1671. McGraw-Hill, New York, 1996.

KOH et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272: 1013-1016, 1996.

KOSTIAL, K., KELLO, D., JUGO, S., RABAR, I. & MALJKOVIC, T. Influence of age on metal metabolism and toxicity. **Environmental Health Perspectives** 25: 81-86, 1978.

KUHLMANN, A. C., McGLOTHAN, J. L. & GUILARTE, T. R. Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. **Neuroscience Letters** 233: 101-104, 1997.

LARINI, L., SALGADO, P. E. T. & LEPERA, J. S. In LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1997. 301p. Cap 5, p. 121-143: Metais

LAROCHE, S., DOYERE, V. & BLOCH, V. Linear relation between the magnitude of long-term potentiation in the dentate gyrus and associative learning in the rat. A demonstration using commissural inhibition and local infusion of an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. **Neuroscience** 28: 375-386, 1989.

LASLEY, S. M. & GILBERT M. E. Lead inhibits the rat N-methyl D-aspartate receptor channel by binding to a site distinct from the zinc allosteric site. **Toxicology and Applied Pharmacology** 159: 224-233, 1999.

- LIN-FU, J. S. Vulnerability of children to lead exposure and toxicity. **New England Journal of Medicine** 289: 1229-1233, 1973.
- LOCEY, B. J., FURST, A. & RADDING, S. B. In WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic, 1998. 2v. 614: 230-233: Lead
- LOLIN, Y. & O'GORMAN, P. An intra-erythrocytic low molecular weight lead-binding protein in acute and chronic lead exposure and its possible protective role in lead toxicity. **Annual Clinical Biochemistry** 25: 688-697, 1988.
- LORTON, D. & ANDERSON, W. J. The effects of postnatal lead toxicity on the development of cerebellum in rats. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology** 8: 51-59, 1986.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193: 265-275, 1951.
- LUTHMAN, J., OSKARSSON, A., OLSON, L & HOFFER, B. Postnatal lead exposure affects motor skills and exploratory behavior in rats. **Environmental Research** 58: 236-252, 1992.
- MA, T., CHEN, H. H., LIM, D. K., HUME, A. K. & HO, I. K. Excitatory amino acids and lead-induced neurotoxicity. **Journal of Toxicology Science** 23 -2: 181-183, 1998.
- MA, T., CHEN, H. H. & HO, I. K. Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. **Toxicology Letters** 105:2, 111-121, 1999.
- MALENKA, R. C. & NICOLL, R. A. Long-Term Potentiation-A Decade of Progress? **Science** 258(5435): 1870-1874, 1999.

- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G. W. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. **Nature** 334: 71-73, 1988.
- MARSH, D.O., MYERS, G.J., CLARKSON, T.W., AMIN-ZAK, L. & TIKRITI, S. **Transactions of The American Neurology Association** 102: 69-71, 1977.
- MAUZERALL, D. & GRANICK, S. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid porphobilinogen in urine. **The Journal of Biological Chemistry** 219: 435-446, 1956.
- MCGAUGH, J.L. Modulation of memory storage processes. In: **Perspectives on Memory Research**, pp. 33-64 Eds Solomon, P.R., Goethals, G.R., Kelley, C.M. & Stephens, B.R., NY, Springer-Verlag, 1988.
- MELLO, C. F., KRAEMER, C. K., FILIPPIN, A., MORSCH, V. M., RODRIGUES, A. L. S. & RUBIN M. A. Effect of lead on neurobehavioral development of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 31: 943-950, 1998.
- MESTEK, O., DEYL, Z., MIKSIK, I., NOVOTNÁ, J., PFEIFER, I. & HERGET, J. Accumulation of lead in tissue after its administration in drinking water to laboratory rats. **Physiology Research** 47:3 197-202, 1998.
- MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in Neurobiology** 54: 369-415, 1998.
- MISTRY, P., LUCIER, G. W. & FOWLER, B. A. High-affinity lead binding proteins in rat kidney cytosol mediate cell-free nuclear translocation of lead. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 232: 462-469, 1985.

- MITCHELL, R. A., DRAKE, J. E., WITTLIN, L. A. & REJENT, T. A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolevulinate dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. **Clinical Chemistry** 23: 105-111, 1977.
- MORGANE, P.J., AUSTIN-LAFRANCE R, BRONZINO J, TONKISS J, DIAZ-CINTRA S, CINTRA L, KEMPER T & GALLER J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Biobehavioral Review** 17: 91-128, 1993.
- MUNOZ, C. GARBE, K., LILIENTHAL, H. & WINNEKE, G. Neuronal depletion of the amygdala resembles the learning deficits induced by low lead exposure in rats. **Neurotoxicology and Teratology** 11: 257-264, 1989.
- MURASE, T., HORIBA, N., GOTO, I., YAMOTO, O., IKEDA, T. & SATO, K. Erythrocyte ALA-D activity in experimentally lead-poisoned ducks and its change during treatment with disodium calcium EDTA. **Research in Veterinary Science** 55: 252-257, 1993.
- NEEDLEMAN, H.L. The current status of childhood low level lead toxicity. **Neurotoxicology**. 14: 161-166, 1993.
- NETTO, C.A., DIAS, R.D. e IZQUIERDO, I. Training in an open-field: Simultaneous learning of habituation and of a water finding task, and differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock on the retention of both tasks. **Psychoneuroendocrinology** 11: 437-446, 1996.
- NIHE, M. K. & GUILARTE, T. R. NMDA – 2A subunit expression is reduced in the hippocampus of rats exposed to Pb<sup>+2</sup> during development. **Molecular Brain Research** 66: 42-49, 1999.

- NOLAN, C. V. & SHAIKH, Z. A. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. **Toxicology** 73: 127-146, 1992.
- OBRENOVITCH, T. P. & URENJAK J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: From high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Progress in Neurobiology**. 51: 39-87, 1997.
- O'KEEFE, J., NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford University Press**, Oxford, 570pp, 1978.
- OSKARSSON, A., SQUIBB, K. S. & FOWLER, B. A. Intracellular binding of lead in the kidney: The partial isolation and characterization of postmitochondrial lead binding components. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 104: 290-298, 1982.
- PETERS, S., KOHL, I., CHOI, D.W., Selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. **Science** 236: 589-93, 1987.
- PETIT, T. L., LEBOTILLIER, J. C. & BROOKS, W. J. Altered sensitivity to NMDA following developmental lead exposure in rats. **Physiology and Behavior** 52: 687-693, 1992.
- PHILIP, A. T. & GERSON, B. Lead poisoning – Part II. Effects and assay. **Clinics in Laboratory Medicine** 14: 651-670, 1994.
- QUINN, M. R. & HARRIS, C. L. Lead inhibits Ca<sup>2+</sup>-stimulated nitric oxide synthase activity from rat cerebellum. **Neuroscience Letters** 196: 65-68, 1995.
- RIBEIRO, R.L., ANDREATINI, R., WOLFMAN, C., VOLA, H., MEDINA, J.H. & DA CUNHA, C. The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituação. **Neurobiology. of Grooming. and Memory**. 72: (2) 78-94, 1999.

- ROCHA, J. B. T., FREITAS, A. J., MARQUES, M. B., PEREIRA, M. E., EMAMNUELLI, T. & SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 26: 1077-1083, 1993.
- ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E., EMAMNUELLI, T., CHRISTOFARI, R. S. & SOUZA, D. O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology** 100: 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A. L., BELLINASSO, M. L. & DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology** 94: 65-69, 1989.
- RODRIGUES, A. L. S., RUBIN, M. A., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Lead exposure and latent learning ability of adult female rats. **Behavioral and Neural Biology** 60: 274-279, 1993.
- RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E. & SOUZA, D. O.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 57: 45-53, 1996a.
- RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., MELLO, C. F. & SOUZA, D. O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology & Toxicology** 79: 150-156, 1996b.

- RODRIGUES, A. L. S., REGNER A., RUBIN, M. A. & SOUZA, D. O. Effects of lead on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortex. **Neurochemical Research** 24: 1039-1044, 1999.
- ROSEN, J. F. Effects of low levels of lead exposure. **Science** 256: 294, 1992.
- ROTHENBERG, S. J., CANSINO, S., SEPKOSKI, C., TORRES, L. M., MEDINA, S., SCHNAAS, L., POBLANO, A. & KARCHMER, S. Prenatal and perinatal lead exposures alter acoustic cry parameters of neonate. **Neurotoxicology and Teratology** 17: 151-160, 1995.
- ROTTA, F.T., MELLO, C.F., ROCHA, J.B.T. & SOUZA, D.O.G. Undernutrition blocks the effect of naltrexone on rat exploratory behavior. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 21, 305-312, 1988.
- SAKAGUCHI, T., SAKAGUCHI, S., TANAKA, T., AMINAKA, M. & KUDO, Y. Changes in prophyrin metabolism of mice given berillium and/or zinc. **Sangyo Eiseigaku Zasshi** 39(3): 79-85, 1997.
- SAKAI, T., YANAGIHARA, S. & USHIO, K. Restoration of lead-inhibited 5-aminolevulinate dehydratase activity in whole blood by heat, zinc ion, and (or) dithiothreitol. **Clinical Chemistry** 26: 625-628, 1980.
- SAKAI, T., YANAGIHARA, S., KUNUGI, Y. & USHIO, K. Mechanisms of ALA-D inhibition by lead and of its restoration by zinc and dithiothreitol. **British Journal of Industrial Medicine** 40: 61-66. 1983.
- SANDHIR, R. & GILL, K. D. Lead perturbs calmodulin dependent cyclic AMP metabolism in rat central nervous system. **Biochemistry and Molecular Biology International** 33: 729-742, 1994.

- SANDSTEAD, H. H., FREDERICKSON, C. J. & PENLAND J. G. History of zinc as related to brain function. **Journal of Nutrition**. 130:2S 496-502, 2000.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme** 28: 133-145, 1982.
- SATIJA, N. K. & VIJ, A. G. Preventive action of zinc against lead toxicity. **Indian Journal of Physiological Pharmacology**. 39: 377-382, 1995.
- SILBERGELD, E. K. Mechanism of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. **FASEB Journal** 6: 3201-3206, 1992.
- SIMONS, T. J. B. The affinity of human erythrocytic porphobilinogen synthase for  $Zn^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ . **European Journal of Biochemistry** 234: 178-183, 1995.
- SIMMONDS, P. L., LUCKHURST, C. L. & WOODS, J. S. Quantitative evaluation of heme biosynthetic pathway parameters as biomarkers of low-level lead exposure in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health** 44: 351-367, 1995.
- SINGH, A. K. Neurotoxicity in rats chronically exposed to lead ingestion: measurement of intracellular concentrations of free calcium and lead ions in resting or depolarized brain slice. **Neurotoxicology** 16: 133-138, 1995.
- SKELTON, R. W., SCARTH, A. S., WIKIE, D. M., MILLER, J. J. & PHILLIPS, A. G. Long-term increases in dentate granule cell responsivity accompanying operant conditioning. **Journal of Neuroscience** 7: 3081-3087, 1987.
- SOBOTKA, T.J. & COOK, M.P. Postnatal lead acetate exposure in rats: possible relationship to minimal brain disfunction. **American Journal of Mental Deficiency** 79: 5-9, 1974.

- SOBOTKA, T. J., BRODIE, R. E. & COOK, M. P. Psychophysiologic effects of early lead exposure. **Toxicology** 5: 175-191, 1975.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. **Biometry**, 2nd Ed., W.H. Freeman and Comp., New York., 1981.
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Purification and characterization of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. **Biochemical Journal** 290: 79-287, 1993.
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochemical Journal** 305: 151-158, 1995.
- STILES, K.M. & BELLINGER, D.C. Neuropsychological correlates of low-level lead exposure in school-age children: A prospective study. **Neurotoxicology and Teratology** 15: 27-35, 1993.
- STOLTENBURG-DIDINGER, G. Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. **Neurotoxicology** 15: 445-450, 1994.
- STRUPP, B. J., LEVITSKY, D.R. & BLUMSTEIN, L. PKU, learning and models of mental retardation. **Developmental Psychobiology** 17: 109-120, 1984.
- SUN, X., TIAN, X., TONSIG, J. L. & SUSZKIW, J. Analysis of Differential Effects of  $Pb^{2+}$  on Protein Kinase C Isozymes. **Toxicology and Applied Pharmacology** 156: 40-45, 1999.
- THIBODEAUX, L. S. **Environmental Chemodynamics**. 2<sup>o</sup> ed. New York. Wiley-Interscience, 1996.

- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T. & SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochemica et Biophysica Acta** 570: 167-178, 1979.
- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T. & SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. **International Journal of Biochemistry** 12: 751-756, 1980.
- UJIRAJA H. & ALBUQUERQUE E. X. Ontogeny of N-Methyl-D-Aspartate-induced current in cultured hippocampal neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 263: 859-867, 1992a.
- UJIRAJA H. & ALBUQUERQUE E. X. Developmental change of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 263: 868-875, 1992b.
- VALLEE, B. & ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. **Annual Review of Biochemistry** 41: 91-128, 1972.
- VAN ERP, A.M.M., KRUK, M.R., MEELIS, W. & VEEMING, J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming. Induced electrically. **Behavioral Brain Research** 59: 95-101, 1993.
- VASÁK M. & HASTER D. W. Metallothioneins: new functional and structural insights. **Current Opinion in Chemical Biology**. 4: 177-183, 2000.
- VITIELLO, F. & GOMBOS, G. Cerebellar development and nutrition. Current Topics in Nutrition and Disease. 16: 99-130. In: **Basic and Clinical Aspects of Nutrition and Brain Development**. Ed. D. K. Rossin, B. Haber e B. Durjan, Alan R. Liss, Inc. New York, 1987.

- WARREN, M. J., COOPER, J. B., WOOD, S. P. & SHOOLINGIN-JORDAN. Lead poisoning haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. **Biochemical Sciences**. 23(6): 217-221, 1998.
- WALKER, R. F., GUERREIRO, F. J., TOSCANO, T. V. & WEIDEMAN, C. A. Relative cerebellar weight: a potential indicator of developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology** 11: 251-255, 1989.
- WALKER, D.L. & GOLD, P.E. Effects of the novel NMDA antagonist, NPC 12626, on long-term potentiation, learning and memory. **Brain Research** 549: 213-221, 1991.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) **Regional office for Europe**: Air quality guidelines for Europe. Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series number 23, part III, 1987, 242-261: Lead.
- WIDZOWSKI, D. V. & CORY-SLECHTA, D. A. Homogeneity of regional brain lead concentrations. **Neurotoxicology** 15: 295-308, 1994.
- WILSON, E. L., BURGER, P. E. & DOWDLE, E. B. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase – Purification and properties. **European Journal of Biochemmistry** 29: 563-571, 1972.
- WIMBLEY, A .E. & DENEMBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative Physiology** 63: 500-504, 1967.
- WINNEKE, G. M. D. Zinc to prevent lead poisoning. **Canadian Medical Association** 154(1): 1622 – 1623, 1996.
- YAMAKURA, T. & SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Progress in Neurobiology** 59: 279-298, 1999.

YADIN, E., FRIEDMAN, E. & BRIDGER, W. H. Spontaneous alternation behavior: an model for obsessive-compulsive disorder? **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 40: 311-315, 1991.

ZAISER, A. E. & MILETIC, V. Differential effects of inorganic lead on hippocampal long-term potentiation in young rats *in vivo*. **Brain Research** 876: (1-2) 201-204, 2000.