



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**INGESTÃO DIÁRIA DE CHUMBO EM RATAS WISTAR:  
EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E METABÓLICOS**

---

Londrina  
2015



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

---

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**INGESTÃO DIÁRIA DE CHUMBO EM RATAS WISTAR:  
EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E METABÓLICOS**

---

LONDRINA  
2015

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**INGESTÃO DIÁRIA DE CHUMBO EM RATAS WISTAR:  
EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E METABÓLICOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N244i Nascimento, Cássia Regina Bruno.

Ingestão diária de chumbo em ratas wistar : efeitos bioquímicos, genotóxicos e metabólicos / Cássia Regina Bruno Nascimento. – Londrina, 2015.

131 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Chumbo – Efeito fisiológico – Teses. 2. Chumbo – Bioacumulação – Teses. 3. Chumbo – Metabolismo – Teses. 4. Toxicologia genética – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612:615.9

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**INGESTÃO DIÁRIA DE CHUMBO EM RATAS WISTAR:  
EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E METABÓLICOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis  
Martinez  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Profa. Dra. Marta Marques de Souza  
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

---

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 17 de setembro de 2015.

## Dedicatória

---

À minha mãe, que esteve presente em todos os meus ciclos de estudos, mas não no maior deles. Pelos teus ensinamentos, esta conquista também é tua.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

## AGRADECIMENTOS

---

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Especial agradecimento à Profa Dra **Claudia** que acreditou no meu trabalho, investindo nele. Acolheu-me em seu laboratório para que eu pudesse realizar um sonho: fazer doutorado. Foram anos de orientação, dedicação e carinho, que me fizeram crescer como pessoa e profissional. “Abrir a porta” de um laboratório requer confiança, e ela demonstrou segurança quando permitiu que eu entrasse por aquela porta.

Profa **Claudia**, não existem palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer o que fez por mim. Sua ajuda e sua orientação foram de valor inestimável, Deus ilumine sempre sua vida. Todo meu respeito e admiração.

À Profa Dra **Marta**, pessoa iluminada, que um dia passou por minha vida e deixou muita luz. Saiba que você é uma pessoa que admiro muito, alguém realmente especial. Sou privilegiada de um dia ter sido sua orientanda.

Ao meu marido, **Mário**, que sacrificou sua vida por mim. Mudou seus planos por mim. Os meus sonhos ficaram a frente de seus sonhos. Temos muito tempo para seguir juntos.

À minhas filhas, **Thamy** e **Marcela**, que enchem meus dias de alegria. Estiveram sempre do meu lado, compreendendo a ausência da mãe quando precisavam dela. Pelo enorme amor que sinto por vocês, posso dizer que realmente sou uma pessoa muito feliz!

Ao meu pai **Francisco**, que muito de seus ensinamentos, eu pude trazer para dentro do laboratório: responsabilidade e dedicação ao que faz.

Às minhas primas, **Silmara** e **Dóris**, que são irmãs de coração, me acolheram em Londrina e é com elas que dou as melhores risadas!

À **Lindalva**, que descobri a verdadeira amizade e que sempre existirá, já que parecemos nos conhecer a anos! É bom saber que temos alguém em quem podemos confiar, rir, desabafar e viajar!

À feia mais linda do mundo! **Déia**, você é uma daquelas pessoas raras com um objetivo único de dar alegria para as pessoas que lhe cercam. Sempre está pronta para ajudar! É meu lado moreno que eu sinto muita falta!

São pequenas atitudes que mudam a vida de uma pessoa e um dia duas pessoas especiais cruzaram a minha vida na hora certa: **Juliana** e **Dalita**. Este trabalho só foi possível porque vocês têm bondade no coração, porque tiveram atitude de me ajudar! Obrigada aos meus dois “anjos da guarda”.

Ao **Carlos** e **Luciana** que são dois gênios! Me socorreram em contas, protocolos, computador.... Nunca disseram: agora não posso! Deixam de fazer suas coisas para atender a todos. Estarão sempre no meu coração.

Ao **Wagner**, pela amizade e a competência de operar o espectrofotômetro de absorção atômica, me forneceu dados para escrever um capítulo desta tese.

À **Silvia Ponzoni** por sempre ter me dado força desde o mestrado, acreditando que um dia eu chegaria aonde cheguei.

À **Silvia Sofia**, por sempre ser prestativa quando precisei de material de seu laboratório e pelas maravilhosas recepções nos momentos de descontração.

Aos estagiários da Iniciação Científica Junior, **Sara, Andressa, Noel e Joice**, que me deram uma ajuda preciosa com os animais, os tratando com carinho, respeito e responsabilidade.

Ao Prof. **Paulo Mathias** da Universidade Estadual de Maringá - UEM e seus alunos de doutorado por ter realizado a dosagem de insulina. Ao **Jorge** da Fazenda Escola da UEL e ao **Fernando** da Zootecnia que forneceram o triturador para que a ração do experimento fosse confeccionada. Ao Prof. **Paulo Meletti** por nos auxiliar nos equipamentos do laboratório. À **Gisele** por ter fornecido os produtos para a realização da ordenha dos animais.

Ao Prof. **Juliane** do Biotério Central, à Profa **Cássia Thaís** e à Profa **Helenir** por ter me ajudado prontamente com informações sobre os animais. Ao **Biotério Central** por ter fornecido os animais para a realização do experimento.

Ao LEFA, que durante estes 6 anos pude conviver com pessoas especiais e que ficarão sempre em minha vida: **Angélica, Carol, Cylene, Débora, Eveline, Fernanda, Francine, Hellen, Kelly, Laura, Matheus, Milena, Nadjha, Natara, Thaís, Thiego, Bruna**, e se esqueci de alguém não é por não ser especial, mas porque são anos que muitos entram e saem, mas deixam saudade.

Aos amigos de Congressos: **Alexandre, Ozahyr, Hiviny e Claudinha**. Foram viagens maravilhosas!

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** pela oportunidade de frequentar algumas das melhores Universidades do país.

À **banca da Qualificação** Profa Renata, Profa Helenir e Profa Cássia Thaís pelas valiosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

À **banca examinadora** Profa Dra Helena Cristina, Profa Dra Marta, Profa Dra Cássia Thaís, e ao Prof Dr Francemilson por ter aceitado para participar da banca.

Aos órgãos financiadores **CAPES, CNPq, Fundação Araucária e INCT-TA/CNPq** pela concessão de bolsa e apoio financeiro que viabilizaram a execução deste projeto.

**AOS ANIMAIS** que desempenharam um papel decisivo para a realização deste trabalho.

# Sumário

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	iii
<b>Capítulo I</b> .....	1
<b>Introdução geral</b> .....	1
I.1 Normas alimentares e exposição ao Pb por meio da alimentação .....	4
I.2 Bioacumulação e metalotioneína .....	7
I.3 Parâmetros hematológicos .....	8
I.4 Parâmetros metabólicos .....	10
I.5 Parâmetros bioquímicos.....	12
I.6 Danos genotóxicos .....	17
I.7 Interferência do Pb no sistema nervoso .....	19
I.8 Justificativa .....	19
I.9 Referências bibliográficas.....	20
<b>Capítulo II</b> .....	27
<b>Objetivos</b> .....	27
II.1 Objetivo geral .....	28
II.2 Objetivos específicos .....	28
<b>Capítulo III</b> .....	29
<b>Desenho experimental</b> .....	29
III.1 Animais .....	30
III.2 Experimentos.....	31
III.3 Confeção da ração .....	34
III.4 Amostragem .....	34
III.5 Ordenha de leite .....	35
III.6 Referência Bibliográfica .....	36
<b>Capítulo IV</b> .....	37
<b>Acúmulo de chumbo e conteúdo de metalotioneína em órgãos de ratas, de diferentes idades e gerações, que ingeriram diariamente ração suplementada com o metal</b> .....	37
IV.1 Introdução .....	38
IV.2 Material e métodos.....	39
IV.2.1 <i>Animais</i> .....	39
IV.2.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	40

IV.2.3 Amostragem .....	40
IV.2.4 Ordenha de leite .....	41
IV.2.5 Determinação de chumbo na ração e em órgãos e leite das ratas .....	41
IV.2.6 Determinação das proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT) em fígado e rim .....	41
IV.2.7 Análise estatística .....	42
IV.3 Resultados .....	42
IV.4 Discussão .....	47
IV.5 Referências bibliográficas .....	51
<b>Capítulo V</b> .....	<b>56</b>
<b>Ingestão diária de chumbo em ratas Wistar de diferentes idades: efeitos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos</b> .....	<b>56</b>
V.1 Introdução .....	57
V.2 Material e métodos .....	58
V.2.1 Animais .....	58
V.2.2 Delineamento experimental .....	59
V.2.3 Amostragem .....	59
V.2.4 Análises plasmáticas .....	59
V.2.5 Análises hematológicas .....	60
V.2.6 Análises bioquímicas no cérebro .....	60
V.2.7 Análises bioquímicas no fígado .....	60
V.2.8 Ensaio do Cometa em linfócitos .....	62
V.2.9 Análise estatística .....	62
V.3 Resultados .....	63
V.3.1 Ganho de peso, consumo de ração e curva de crescimento .....	63
V.3.2 Glicose, insulina e cortisol plasmático .....	66
V.3.3 Conteúdo de glicogênio no fígado .....	68
V.3.4 Htc, Hb e RBC .....	68
V.3.5 Atividade da enzima AChE no cérebro .....	70
V.3.6 Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado .....	70
V.3.7 Danos no DNA de linfócitos .....	74
V.4 Discussão .....	74
V.5 Referências bibliográficas .....	79
<b>Capítulo VI</b> .....	<b>85</b>

<b>Efeitos fisiológicos da ingestão diária de chumbo em ratas Wistar e na sua prole de diferentes idades</b> .....	85
VI.1 Introdução .....	86
VI.2 Material e métodos .....	87
VI.2.1 <i>Animais</i> .....	87
VI.2.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	88
VI.2.3 <i>Amostragem</i> .....	88
VI.2.4 <i>Análises plasmáticas</i> .....	88
VI.2.5 <i>Análise bioquímica no fígado</i> .....	89
VI.2.6 <i>Análises hematológicas</i> .....	89
VI.2.7 <i>Análise bioquímica no cérebro</i> .....	89
VI.2.8 <i>Análise estatística</i> .....	90
VI.3 Resultados .....	90
VI.3.1 <i>Ganho de peso e consumo de ração</i> .....	90
VI.3.2 <i>Glicose, insulina e cortisol plasmáticos</i> .....	92
VI.3.3 <i>Conteúdo de glicogênio no fígado</i> .....	94
VI.3.4 <i>Htc, Hb e RBC</i> .....	94
VI.3.5 <i>Atividade da AChE no cérebro</i> .....	96
VI.4 Discussão .....	96
VI.5 Referências bibliográficas.....	100
<b>Capítulo VII</b> .....	105
<b>Efeitos da ingestão diária de chumbo em ratas Wistar e na sua prole: danos genotóxicos e estresse oxidativo</b> .....	105
VII.1 Introdução.....	106
VII.2 Material e métodos .....	107
VII.2.1 <i>Animais</i> .....	107
VII.2.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	108
VII.2.3 <i>Amostragem</i> .....	108
VII.2.4 <i>Análises bioquímicas no fígado e rim</i> .....	108
VII.2.5 <i>Ensaio do Cometa em linfócitos</i> .....	110
VII.2.6 <i>Análise estatística</i> .....	110
VII.3 Resultados.....	111
VII.3.1 <i>Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de GSH no fígado</i> .....	111
VII.3.2 <i>Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de GSH no rim</i> .....	114
VII.3.3 <i>Peroxidação lipídica no fígado e rim</i> .....	117

VII.3.4 <i>Proteínas carboniladas no fígado e rim</i> .....	118
VII.3.5 <i>Danos no DNA de linfócitos</i> .....	119
VII.4 Discussão .....	119
VII.5 Referências bibliográficas .....	123
<b>Capítulo VIII</b> .....	128
<b>Considerações finais</b> .....	128

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos do chumbo (Pb) e sua bioacumulação em animais submetidos a ingestão diária do metal, e verificar se estes efeitos variam em diferentes idades e gerações. Foram utilizadas duas gerações de ratas Wistar, que desde o desmame se alimentaram diariamente com ração contendo 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, sendo a primeira geração até completarem 45 (45d), 90 (90d) e 140 (140d) dias de vida, e a segunda geração de filhas dos animais de 140 dias, até completarem 45 (P45d) e 90 (P90d) dias de vida. Foi verificado o ganho de peso e consumo de ração. O sangue total foi utilizado para a determinação de hematócrito, hemoglobina e número de células vermelhas, e o plasma para dosagem de glicose e dos hormônios insulina e cortisol. No cérebro foi avaliada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). O fígado e o rim foram utilizados para avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas: glutathione, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase, assim como, para verificar a ocorrência de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. Também no fígado foi avaliado o conteúdo de glicogênio e de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT). Nos linfócitos foi avaliada a ocorrência de danos no DNA. A concentração de Pb foi determinada no leite materno e no intestino, células sanguíneas, fígado, cérebro, ovário, rim, osso e músculo. Quanto ao peso corporal e consumo de ração, não foi possível definir um padrão de variação resultante da exposição ao Pb. Por outro lado, o Pb promoveu aumento da glicemia nas ratas de todas as idades e gerações, acompanhado pela redução do glicogênio hepático na maioria dos grupos. Já os níveis de insulina aumentaram em alguns grupos (45d e P90d) e diminuíram em outros (90d, 140d e P45d). Houve diminuição de hemoglobina apenas nas ratas 90d e aumento dos eritrócitos circulantes na prole, provavelmente como um mecanismo compensatório para manter os valores de hemoglobina. A AChE apresentou aumento apenas no cérebro das ratas P90d, que também foram as únicas nas quais foi detectado Pb no cérebro. A ingestão de Pb resultou em estresse oxidativo, com a ocorrência de peroxidação lipídica no fígado (45d, 90d, P45d e P90d) e no rim (P90d), e oxidação de proteínas no fígado (140d) e no rim (140d). Assim, o aumento das PSMT verificado no fígado das ratas de 90 e 140 dias não foi suficiente para impedir os danos oxidativos. Já no rim, o aumento das PSMT no grupo P45d parece ter protegido este órgão dos efeitos oxidativos do Pb. Os efeitos genotóxicos do Pb foram constatados em todos os animais, independentemente da idade ou geração, com o aumento de ocorrência de danos no DNA de linfócitos nas ratas que ingeriram ração contaminada. O Pb se acumulou nos órgãos de acordo com o seguinte padrão: osso > fígado > rim > intestino > células sanguíneas > músculo > cérebro > ovário, e as ratas de 140d apresentaram o metal em seu leite. Este acúmulo do metal nos órgãos foi dependente da idade e da exposição pré-natal. Em conjunto estes resultados mostram que a ingestão diária de Pb, na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, promove alterações metabólicas, hematológicas, estresse oxidativo e danos genotóxicos em ratas de diferentes idades e que a segunda geração destas ratas está mais susceptível à toxicidade do Pb.

**Palavras-chave:** acetilcolinesterase, defesas antioxidantes, danos no DNA, danos oxidativos, glicemia, insulina, metalotioneína.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the physiological, biochemical and genotoxic effects of lead (Pb) and its bioaccumulation in animals subjected to daily intake of this metal, administered with the feed, and verify whether these effects vary in different ages and generations. Two generations of Wistar female rats were used, which were daily fed with feed containing  $2.0 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ , the first generation until they turn 45 (45d), 90 (90d) and 140 (140d) days of life and the second generation, offspring of the 140 days old rats, until they are 45 (Of45d) and 90 (Of90d) days of life. Weight gain and feed intake were determined. Whole blood was used for the measurement of hematocrit, hemoglobin and red blood cells count, and plasma for determination of glucose, insulin and cortisol. The activity of acetylcholinesterase (AChE) was measured in the brain. The liver and kidney were used to evaluate the antioxidant defenses: glutathione content and the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase, as well as the occurrence of lipid peroxidation and protein oxidation. Also in the liver the content of glycogen and metallothionein-like proteins (MT-like) were measured. DNA damage were evaluated in lymphocytes. The concentration of Pb was determined in the milk from the mothers (140d) and in intestine, blood cells, liver, brain, ovary, kidney, bone and muscle. For the body weight and feed intake, it was not possible to set a pattern of change resulting from exposure to Pb. On the other hand, Pb promoted an increase in blood glucose in rats of all ages and generations, followed by a reduction of hepatic glycogen in most groups. Insulin levels increased in some groups (45d and Of90d) and decreased in others (90d, 140d and Of45d). There was a decrease in hemoglobin only in rats 90d and an increase in the red blood cells count in the offsprings (both Of45 and Of90d), probably as a compensatory mechanism to maintain hemoglobin values. AChE showed increased only in the brain of rats Of90d, which were also the only animals in which Pb was detected in the brain. Pb intake resulted in oxidative stress, with the occurrence of lipid peroxidation in liver (45d, 90d, and Of45d, Of90d) and kidney (Of90d), and protein oxidation in the liver (140d) and kidney (140d). Thus, the increase in MT-like found in the liver of rats 90d and 140d was not enough to prevent oxidative damage. In contrast, in the kidney the increase of MT-like in Of45d appears to have protected this organ from the oxidative effects of Pb. The genotoxic effects of Pb were found in all animals, regardless age or generation, with increased DNA damage in lymphocytes of rats fed with the contaminated food. Pb was accumulated in the tissues according to the following pattern: bone > liver > kidney > blood cells > brain > intestine > muscle, and rats 140d had metal in their milk. The metal accumulation in tissues was dependent on age and prenatal exposure. Taking together these results show that daily intake of Pb, at a concentration of  $2.0 \text{ mg kg}^{-1}$ , promotes metabolic and hematological alterations, oxidative stress and genotoxic damage in rats of different ages and the second generation of these rats are more susceptible the toxicity of Pb.

**Key words:** acetylcholinesterase, antioxidant defenses, DNA damage, oxidative damage, blood glucose, blood insulin, metallothionein.

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado ao longo dos últimos quatro anos, durante o curso de doutorado, com início no ano de 2011, e foi concebido em razão da problemática que envolve a ingestão de alimentos contaminados com chumbo e os consequentes danos à saúde. Assim, foi proposto avaliar os efeitos da ingestão diária de chumbo e se estes efeitos variam de acordo com a idade e em decorrência da exposição pré-natal. Partiu-se da hipótese de que a contaminação de alimento por chumbo é inevitável, assim, a ingestão diária de pequenas concentrações do metal, pode causar danos oxidativos, alterações no metabolismo e alterações funcionais nas células sanguíneas, responsáveis pela oxigenação e imunidade do organismo.

Esta tese está estruturada em oito capítulos. O capítulo I abrange a natureza e a importância do tema, destacando a fundamentação teórica dos diferentes tópicos, com base na literatura. No capítulo II estão apresentados os objetivos da tese. No capítulo III está descrito o planejamento experimental utilizado para a obtenção dos dados que estão apresentados e analisados nos capítulos IV a VII. Estes capítulos foram elaborados no formato de artigo científico, apresentando cada um deles os itens introdução, material e métodos, resultados, discussão e conclusão. O capítulo VIII recapitula sinteticamente todos os resultados apresentados nos diferentes capítulos, e faz uma análise integrada destes resultados para responder aos objetivos centrais da tese.

# Capítulo I

## Introdução geral

---

O chumbo (Pb) é um elemento químico utilizado pelo homem há pelo menos 6000 anos e o envenenamento por este metal já era conhecido na História Antiga. Na idade média o Pb era amplamente utilizado tanto para fins industriais, como medicinais e domésticos. Embora os registros literários sobre o Pb nesse período sejam escassos, epidemias graves de envenenamento ocorreram pelo uso do acetato de chumbo como adoçante de vinho e cidra. Em alguns países germânicos o problema era tão grave que a pena de morte foi prescrita, pela primeira vez em 1498 e depois em 1577, para aqueles que utilizassem o produto para este fim (Hernberg 2000).

Na indústria, o Pb e seus compostos ganhou força no início da História Moderna, sendo utilizado para fabricação de janelas, cerâmicas, tubulações, construção naval, indústria de armas, pigmentos e mais tarde, para impressão de livros. Porém, a intoxicação por Pb tornou-se um problema na Europa e posteriormente nos Estados Unidos. Relatos sobre a intoxicação pelo Pb já são encontrados na literatura do século XVI, quando o médico Paracelsus faz a descrição do que chamou de “doença dos mineiros”. Já no início do século XVIII Ramazzini escreveu que os ceramistas que trabalhavam com chumbo tornavam-se paralíticos, letárgicos, caquéticos, sem dentes e com o rosto que ele descreve, “da cor de chumbo”. Um pouco mais tarde, em 1767, Sir George Baker fez uma observação importante sobre a cólica “Devonshire” que havia assolado esta região da Grã-Bretanha por um século, atribuindo a doença à contaminação da cidra pelo Pb, proveniente dos pesos utilizados para esmagar as maçãs. Embora Sir George tenha feito um trabalho pioneiro, apenas no século XIX houve avanços significativos na compreensão da intoxicação por Pb, com descrição de quadros clínicos na literatura (Hernberg 2000).

Apesar do conhecimento sobre sua toxicidade, o Pb se tornou amplamente disperso por todo o ambiente, em grande parte, como resultado da atividade humana, tais como: mineração, fundição, processamento e reciclagem informal, solda, cerâmica, fabricação de vidro, lixo eletrônico, tubulações de água e seu uso na gasolina. A maior exposição humana ao Pb decorre de sua utilização como aditivo na gasolina, o que resultou na dispersão generalizada em todo o ambiente, e também pela sua utilização como pigmento em tintas. Embora o uso de Pb como aditivo na gasolina esteja proibido em diversos países, inclusive no Brasil, e sua utilização em tintas restrita, a exposição ao Pb continua, já que ele não pode ser degradado. Antes da Segunda Guerra Mundial, o Pb foi amplamente utilizado como composto em pesticidas, especialmente em pomares, e como é fortemente absorvido pelo solo, ele ainda persiste nestes locais. Desde que a

proibição da utilização na gasolina entrou em vigor, as emissões de Pb para a atmosfera tem diminuído significativamente (ATSDR, 2007).

Outras fontes de Pb no ambiente incluem atividades naturais, como atividade vulcânica, intemperismo geoquímico e projeção de sedimentos e água de áreas de mineração. Uma vez que o Pb é liberado no meio ambiente, ele persiste, e por causa de sua persistência e de seu potencial transporte atmosférico, as emissões atmosféricas afetam até mesmo as regiões mais remotas do mundo (WHO, 2010).

Apesar de intervenções para a remoção do Pb terem sido implementadas em todo o mundo, seus efeitos tóxicos ainda são sentidos por toda parte, visto que, muitos problemas de saúde têm sido atribuídos a este metal, alguns dos quais constatados mesmo quando expostos a baixas concentrações do metal (Fewtrell, 2003). Em 2004 a exposição ao Pb foi responsável por 143 mil mortes e 0,6% do total de doenças no mundo, algumas delas incluem, retardo mental em crianças, aumento da pressão arterial e doença cardiovascular (WHO, 2010).

Embora a extração global de Pb tenha reduzido ligeiramente de 3,4 milhões de toneladas em 1970 para 3,1 milhões de toneladas em 2000, durante este mesmo período, o consumo mundial aumentou de 4,5 para 6,5 milhões de toneladas. Isto ocorreu por causa do aumento da produção secundária, ou seja, da reciclagem de Pb a partir de produtos como a bateria. A taxa de produção secundária foi maior em países industrializados, por exemplo, na América do Norte o processamento de Pb a partir de sucatas respondeu por mais de 70% na produção deste metal. Na Europa Ocidental, a produção secundária correspondeu a 60% da produção total, na África a 50%, na América Latina um pouco menos que 50% e na Ásia, menos que 30% (UNEP, 2003).

Mais de uma década depois, esses números ainda são preocupantes. Durante os últimos anos, a extração de Pb em minas aumentou por causa das exportações deste metal para uso em baterias, reduzindo a quantidade de Pb proveniente de sucata da fundição secundária. Durante os primeiros meses de 2014, 22,4 milhões de baterias automotivas foram exportadas por produtores Norte-Americanos, o que corresponde a 220 mil toneladas de Pb exportados pelos Estados Unidos, com ligeiro aumento em comparação ao ano de 2013. Quanto à produção mundial de Pb em minas, para 2014 era esperado cerca de 5,5 milhões de toneladas, pois houve aumento de produção na Austrália, China e Estados Unidos. Porém, este número foi ainda maior (11,3 milhões de toneladas), impulsionado principalmente pelo aumento de produção na Austrália, Bélgica, China, Índia, Itália e República da Coreia (USGS, 2015).

Sem dúvida, da Antiguidade ao século XXI, a intoxicação por Pb persiste, chegando ao ponto de tornar-se um problema de saúde pública nos dias atuais, pois sem atuar diretamente com o metal, o homem pode se contaminar através da inalação por partículas no ar, da água e da ingestão de alimentos contaminados. Infelizmente, estas fontes de exposições são muitas vezes de alto custo para remediação e a política em torno desta questão é complexa (Godwin, 2001). Assim, o problema de intoxicação por Pb poderá continuar a afligir a humanidade ainda por muitas décadas.

### **I.1 Normas alimentares e exposição ao Pb por meio da alimentação**

---

A exposição humana ao Pb ocorre principalmente pela da ingestão de água e do alimento. Em média, na Europa, a exposição alimentar ao Pb por adultos é de  $0,50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia, em bebês e crianças é de  $1,32$  e  $1,03 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia respectivamente (EFSA, 2012). Sua absorção a partir do trato-gastrointestinal é fortemente influenciada pela idade (recém-nascidos e crianças absorvem mais que adultos), estado nutricional (jejum há maior absorção), e o tipo de nutrição (ingestão de altas calorias, fósforo, cobre, zinco, ferro e cálcio diminuem a absorção). Após a absorção o Pb é rapidamente distribuído a partir do plasma, a tecidos moles e ossos. A meia-vida de chumbo no sangue e tecidos moles é de 20 a 30 dias em seres humanos adultos, e de 3 a 5 dias em ratos. Após a ingestão, o Pb que não foi absorvido é eliminado nas fezes, e o que foi absorvido é eliminado pela urina e fezes, e a excreção através do suor é de pouca importância (IARC, 2006).

Há evidências que a absorção de Pb que ocorre no duodeno seja por meio de transportador de metal divalente 1 (DMT1) encontrado nas vilosidades do intestino em concentrações muito elevadas. Além do Pb, o DMT1 transporta outros sete metais, principalmente o  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta proteína é relevante em estudos moleculares para fornecer uma explicação para a relação entre baixos níveis de ferro na dieta e aumento do transporte de outros metais, incluindo o Pb (Bannon et al, 2002). Embora possa ser absorvido por outros mecanismos desconhecidos, há outra proteína de membrana relacionada com a toxicidade do Pb. Sabe-se que a ingestão aumentada de cálcio diminui a absorção de Pb e a natureza da relação  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  está relacionada com a CaBP – proteína ligante de cálcio da membrana luminal (Fullmer, 1991).

A ingestão de alimentos contaminados por Pb pode trazer consequências graves à saúde. Assim, a contaminação ambiental por Pb é uma preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS), já que pode levar à contaminação de seres humanos através da cadeia trófica. A contaminação do ambiente aquático ocorre quando o Pb é lançado diretamente pelas indústrias ou indiretamente pela atmosfera e solos contaminados. A queima a céu aberto de produtos ou resíduos que contenham Pb em alguns países em desenvolvimento também pode ser uma importante fonte deste metal no sistema aquático (UNEP, 2011). Dentre os sistemas aquáticos, os rios representam meios de transportes para o Pb em escala nacional e regional. Em escala mundial, são os oceanos que transportam o Pb, nos quais o tempo de permanência do metal pode variar de 100 a 1.000 anos. (UNEP, 2008).

Devido à sua persistência, a tendência do Pb acumular-se na água e sedimentos resulta na contaminação dos animais que ali vivem. Os peixes, que representam os animais aquáticos mais consumidos pelos seres humanos (FAO, 2014), podem acumular contaminantes através da pele e brânquias, da ingestão de partículas em suspensão e alimentos contaminados (Van der Oost et al., 2003). Há estudos que mostram a contaminação na carne de peixes do mundo todo. Em peixes enlatados, avaliados na Nigéria, foram detectadas concentrações de Pb de até 2,98 mg Kg<sup>-1</sup> em sardinha (Iwegbue, 2015). Na carne de tilápias do capturadas no delta do rio *Pearl*, na China, foram detectadas concentrações de Pb de até 8,62 mg Pb Kg<sup>-1</sup> (Leung et al., 2014). Em músculo do peixe *Corica soborna* do rio *Bangshi* em Bangladesh, foi encontrada a concentração de 10,27 mg Pb Kg<sup>-1</sup> de peixe (Rahman et al., 2012). No Brasil, peixes coletados do rio Paraíba do Sul, o qual recebe muitos efluentes orgânicos e industriais, apresentaram Pb na carne, em concentrações que variaram entre 0,01 a 7,98 mg Pb Kg<sup>-1</sup> (Terra et al., 2008).

Esses dados são preocupantes, já que o consumo de peixe no mundo está aumentando. A produção aquícola mundial atingiu o recorde histórico de 90,4 milhões de toneladas em 2012, incluindo 66,6 milhões de toneladas de peixes de rios e aquiculturas e 23,8 milhões de toneladas de peixes de pesca marinha. Só a China produziu 43,5 milhões de toneladas de peixe em aquiculturas. Apesar do aumento no consumo anual *per capita* de peixe nas regiões em desenvolvimento (de 5,2 Kg em 1961 para 17,8 em 2010) e nos países de baixa renda e com *déficit* de alimentos (de 4,9 para 10,9 kg), as regiões em desenvolvimento ainda são as que detêm o maior consumo,

porém, de peixes importados (FAO, 2014), o que impulsiona ainda mais a produção mundial e a distribuição de peixes de regiões contaminadas.

No Brasil, o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) incentiva o consumo e a produção pesqueira, contando atualmente com quase 1 milhão de pescadores. É na aquicultura que o país acredita ter a capacidade para desenvolver a sua produção, com o objetivo de tornar-se um dos mais importantes produtores mundiais. Em 2013, o MPA ofertou 900 hectares de lâmina d'água em represas e no litoral para a produção de pescados. Acredita que esses novos parques aquícolas, implantados em 13 estados, produzam mais de 210 mil toneladas de pescado por ano. Mais de 92% das áreas são “não onerosas” (sem pagamento pelo uso) e beneficiam aquicultores familiares ou moradores de comunidades tradicionais e ribeirinhas (MPA, 2013).

Porém, para a regulamentação e controle do comércio internacional de alimentos existem órgãos internacionais que estabelecem limites máximos de contaminantes em alimentos, visando a segurança alimentar. O Codex Alimentarius, ou o código alimentar, tornou-se o ponto de referência global para consumidores, produtores e processadores de alimentos, agências nacionais de controle de alimentos e para o comércio internacional de alimentos (Codex Alimentarius, 2006). Este órgão contribui para a segurança, qualidade e equidade no comércio internacional de alimentos por meio de normas, diretrizes e códigos de práticas internacionais de alimentos. As normas do Codex se baseiam na informação científica disponível e em consultas especiais organizadas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), pela OMS e por organizações de avaliação de riscos internacionais independentes. O comitê do Codex Alimentarius é formado por 186 membros, sendo, 185 países membros e uma Organização (União Europeia) e 230 observadores, sendo 52 organizações intergovernamentais, 162 ONGs e 16 da ONU. O Brasil é membro desde 1968 (Codex Alimentarius, 2015).

Um comitê misto denominado JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), formado por peritos em aditivos alimentares, fornece as bases científicas para o Codex Alimentarius estabelecer os limites de aditivos e contaminantes químicos nos alimentos. Em 1997, o limite estabelecido como a concentração máxima de Pb permitida na carne de pescado era de  $0,5 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  (Codex Alimentarius Commission, 1997). Em 2001 esse limite foi revisto e diminuiu para  $0,2 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  (Codex Alimentarius Commission, 2001). Entretanto, em 2010 esta concentração limite

foi novamente alterada e passou a ser  $0,3 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , valor que permanece até os dias de hoje (Codex Standard 193-1995, 2010).

No Brasil em 1994, quando o grupo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) instituiu uma Comissão de Defesa do Consumidor, é que foram estabelecidos os níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos. Porém, até a aprovação de um regulamento comum no MERCOSUL, cada país ficou responsável em aplicar seus próprios regulamentos técnicos. Em 1998, o Ministério da Saúde através da Portaria nº 685, estabeleceu o limite máximo de Pb em peixes e produtos de pesca, a concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  (ANVISA, 1998). Entretanto, em 2010 o Brasil deixou de ter seu próprio Regulamento interno e passou a adotar o Regulamento do MERCOSUL, que estabeleceu o limite máximo para Pb em carne de peixe a  $0,3 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  (Consulta Pública nº 101, de 27 de outubro de 2010). Contudo, apenas em agosto de 2013 este valor entrou em vigor quando a Portaria nº 685/98 foi parcialmente revogada pela Resolução – RDC n. 42 (Resolução – RDC n. 42).

### **I.2 Bioacumulação e metalotioneína**

---

No ambiente aquático, o Pb pode ocorrer na forma iônica, em complexos orgânicos com materiais húmicos dissolvidos, ligados a partículas coloidais, tais como óxido de ferro, ou ligado a partículas sólidas de argila ou restos de organismos mortos (EFSA, 2010). Os peixes podem bioacumular este metal, principalmente nas brânquias, fígado, rim e osso (EFSA, 2010). Porém, dependendo do tempo de exposição e da concentração de Pb no ambiente, o metal pode se acumular no músculo dos peixes, que é o tecido mais comumente consumido na alimentação humana. Vários estudos já mostraram a ocorrência de Pb no músculo de diferentes espécies de peixes, em concentrações acima do limite permitido para ingestão do pescado (Castro-González and Méndez-Armenta, 2008; Santos et al., 2013; Dhanakumar et al., 2015).

Ao ingerir o peixe contaminado, o Pb é transferido para o homem e acumulado através de mecanismos de transportes, resultando na biomagnificação. A maior parte do Pb no sangue está ligado aos eritrócitos, mas é a partir do plasma que o Pb está disponível para atravessar as membranas celulares dos tecidos (CDC, 2010).

No homem adulto cerca de 94% do total de Pb no organismo está contido nos ossos e dentes, já em crianças, cerca de 73% é armazenado nos ossos. Uma vez distribuído

pelos órgãos, o Pb que não está armazenado nos ossos deixa o corpo pela urina e fezes. Cerca de 99% do Pb que entra no organismo de um adulto deixa seu corpo em algumas semanas, entretanto, apenas 32% do Pb presente no corpo de uma criança vai sair de seu organismo. Todavia, se a exposição for contínua, nem todo o Pb que entra vai ser eliminado, resultando em uma maior acumulação nos tecidos, especialmente nos ossos (ATSDR, 2005).

As alterações adaptativas celulares em resposta à exposição a produtos químicos exigem mecanismos de defesa contra a toxicidade. Entretanto, apesar dos metais serem conhecidos por alterar a atividade de enzimas microssomais, há pouca evidência de que elas estejam envolvidas na desintoxicação de metais não essenciais, tais como o cádmio, chumbo e mercúrio. Uma vez que metais livres no ambiente intracelular são tóxicos, ligando-se firmemente a uma dada proteína estes metais já não estarão mais livres para atacar várias enzimas e proteínas importantes para as funções celulares. A metalotioneína (MT) é uma proteína citoplasmática que desempenha um papel importante na ligação deste metal dentro das células (Cherian e Nordberg, 1983).

A MT tem peso molecular de 6800 kDa, e depois da ferritina, é a proteína com o mais alto teor de metais conhecido. Essa proteína também apresenta um elevado teor de resíduos de cisteína (33%) e em sua composição os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) estão totalmente ausentes, tornando a MT uma proteína incomum (Kojima e Kagi, 1978).

Os metais preferencialmente indutores da MT são o Cd, Hg, Zn e Cu, no entanto, *in vitro*, uma variedade de outros metais como Fe e Pb também são indutores de MT (Johnson, 1998). Mas quando se comprara o conteúdo de MT no fígado e rim de ratos expostos ao Pb, Hg e Cd, verifica-se que o Pb é um fraco indutor em comparação ao Hg (Agrawal et al, 2014) e ao Cd (Salinska e Włostowski, 2012). A MT é utilizada como biomarcador de exposição ao Pb em vários modelos animais como ratos (Skoczynska et al., 2015), camundongos (Gonick, 2011) e peixes (Monteiro et al., 2011). Mas há poucas informações disponíveis sobre o mecanismo que promovem a indução da MT frente a exposição ao Pb (Dai et al., 2013).

### **I.3 Parâmetros hematológicos**

---

O Pb presente no sangue pode atravessar a membrana dos eritrócitos. Embora estes mecanismos não estejam totalmente esclarecidos, pelo menos dois deles já foram

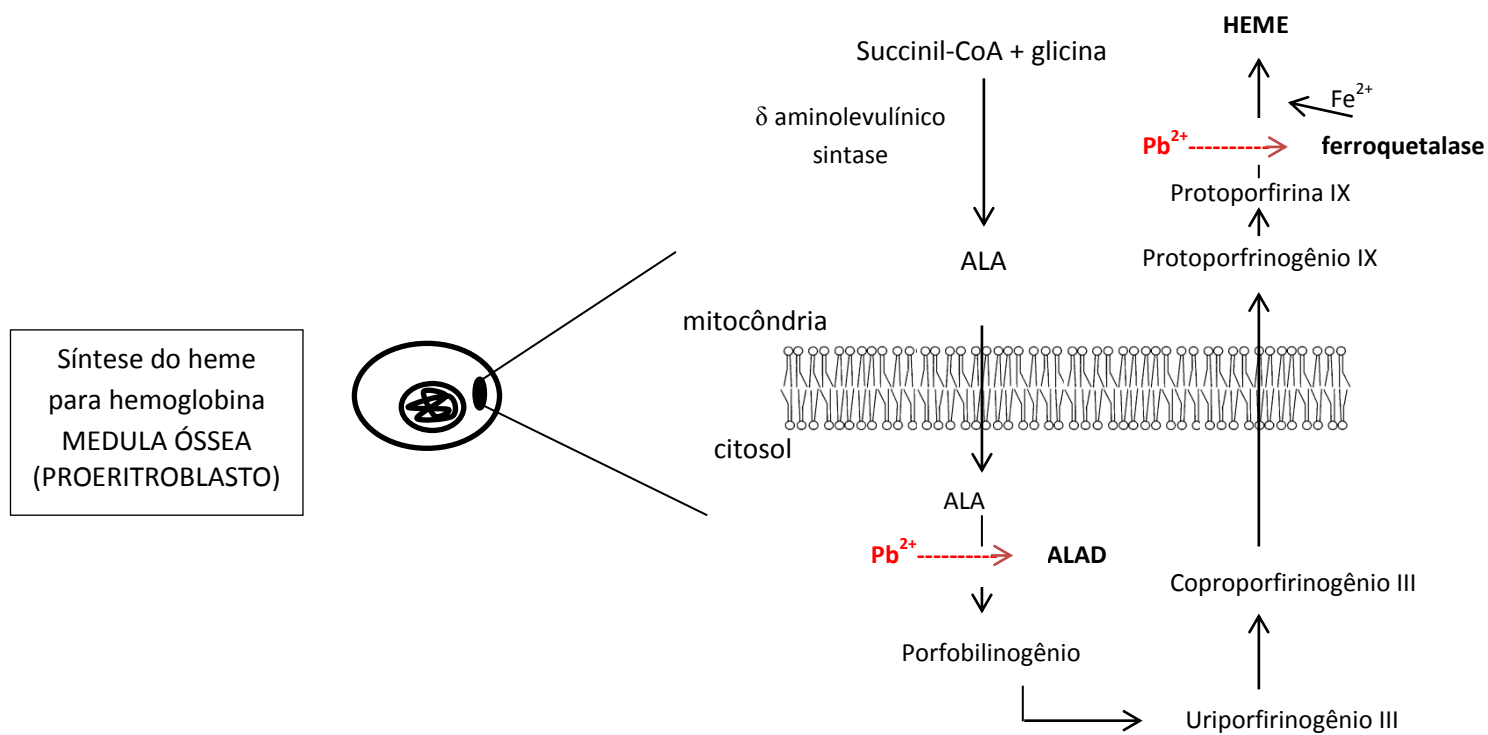
propostos (ATSDR, 2007). Um deles estaria associado ao trocador aniônico, dependente de  $\text{HCO}_3^-$ . Já foi demonstrado que a taxa de tomada de  $\text{Pb}^{2+}$  é proporcional às concentrações externas de  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , sugerindo que o transporte de  $\text{Pb}^{2+}$  depende da formação de um ou mais complexos  $\text{Pb}^{2+}\text{-HCO}_3^-$  (Simons, 1993). Outro mecanismo estaria associado a uma via comum, compartilhada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e pelo  $\text{Pb}^{2+}$ , provavelmente um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (ATSDR, 2007). O fluxo de  $\text{Pb}^{2+}$  através do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  é pelo menos dez vezes maior do que observado para o  $\text{Ca}^{2+}$  (Bridges e Zalups, 2005).

Dentro do eritrócito o Pb pode se ligar a proteínas com grupos sulfidrilas, ou indiretamente, promover estresse oxidativo (Ercal et al., 2001), por reduzir a formação de NADPH ao inibir a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (Patra et al., 2011).

Já é bem estabelecido que o Pb pode promover anemia. Essa anemia induzida por Pb decorre principalmente da inibição da síntese de heme (Matovic et al., 2015), ou pela diminuição do tempo de vida dos eritrócitos (Mrugesh et al., 2011). Porém, a anemia também pode ocorrer por deficiência de ferro, já que há uma relação entre níveis elevados de Pb no sangue com a diminuição da absorção de ferro pelo intestino. Isto pode ser observado em mulheres grávidas que tem uma necessidade aumentada da ingestão de ferro (CDC, 2010).

Duas enzimas importantes na síntese de heme são sensíveis à inibição por Pb. São elas, a ALAD (ácido  $\delta$  aminolevulínico desidratase) e ferroquelatase (Fig. I.1). A inibição da ALAD resulta na elevação do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), detectável em plasma e urina. A enzima citozólica ALAD, é responsável pela desidratação de duas moléculas de ALA para formar porfobilinogênio, que se condensa para formar uroporfirinogênio III, que por sua vez é convertido em heme com a introdução de  $\text{Fe}^{2+}$  na protoporfirina IX pela enzima ferroquelatase (Ahamed e Siddiqui, 2007). A ALAD contém zinco em sua estrutura, e o fato do Pb ligar-se preferencialmente nos resíduos de cisteína (3 resíduos ligados ao zinco), o Pb desloca o zinco e se liga fortemente a estes sítios de ligação (Godwin, 2001). A consequência do aumento das concentrações de ALA é a sua oxidação que resulta, como produto final, espécies reativas de oxigênio (ERO). Além das consequências nos parâmetros hematológicos, há uma consequência indireta da inibição da ALAD por Pb, que é verificada no Sistema Nervoso Central. A ALA é um agonista fraco do ácido gama aminibutírico (GABA), promovendo a diminuição da liberação de GABA por inibição pré-sináptica. O aumento na circulação

sanguínea de ALA pode ser responsável por alguns dos distúrbios comportamentais observados por intoxicação por Pb (Needleman, 2002).

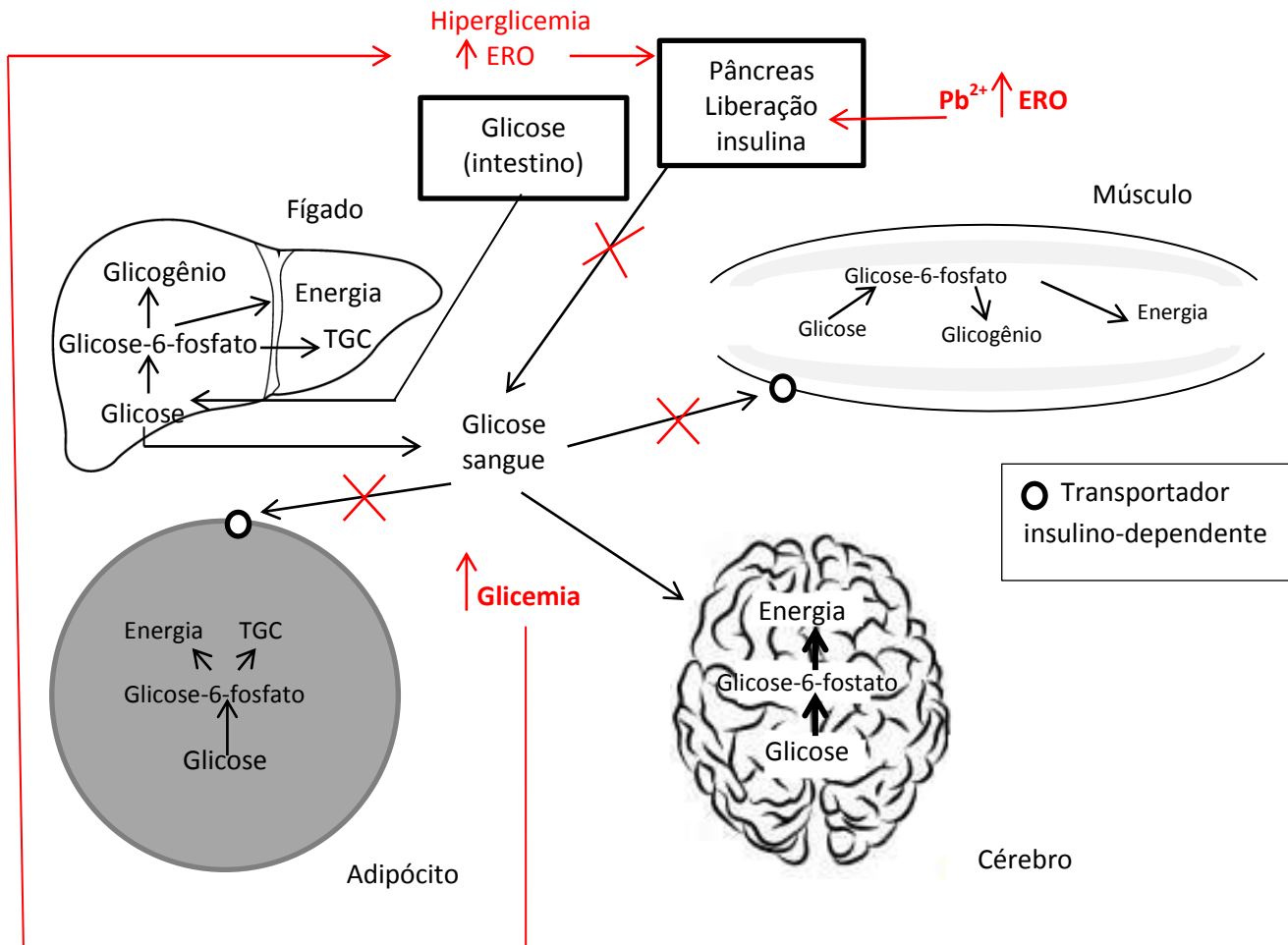


**Figura I.1** Esquema representando a síntese do heme na medula óssea destacando dois locais de atuação do Pb na inibição de enzimas chaves: ferroquelatase e ALAD. ALA = ácido δ aminolevulínico, ALAD = ácido δ aminolevulínico desidratase. Fonte: a autora.

#### I.4 Parâmetros metabólicos

O Pb parece alterar a absorção de glicose nos tecidos periféricos, por suprimir a liberação de insulina pelo pâncreas, tendo como consequência, aumento da glicemia e diminuição do conteúdo de glicogênio hepático, já que o organismo entra no estado de jejum promovido pela ineficácia da insulina. Há estudos que mostram que o Pb pode atuar no pâncreas e promover peroxidação lipídica, como consequência do estresse oxidativo (Ambali et al., 2011). Por outro lado, o Pb pode promover hiperglicemia (Feldman et al., 2011), por aumentar o AMPc (3', 5'-adenosina monofosfato) intracelular, e por estimular a atividade de enzimas da gliconeogênese, piruvato

carboxilase, fosfoenolpiruvato-carboxiquinase e frutose-1, 6- difosfato (Nolan e Shaikh, 1992), e a hiperglicemia promover aumento de ERO no pâncreas (Sakai et al., 2003) (Fig. I.2).

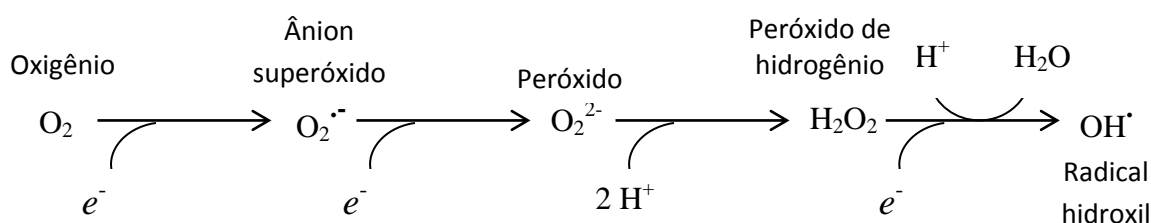


**Figura I.2** Esquema representando a distribuição de glicose pelos tecidos no estado absorvivo. As letras e setas vermelhas representam a atuação do Pb na supressão de insulina pelo pâncreas. TGC = triglicerídeo. Figura adaptada de Devlin (2011).

O Pb parece atuar também no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal promovendo diminuição da concentração de cortisol no sangue de trabalhadores (Gustafson et al., 1989), em mulheres grávidas (Braun et al., 2014), e em crianças (Gump et al., 2008) expostas ao Pb. Contudo, o mecanismo de atuação do Pb nesta via merece uma atenção especial, pois ainda é desconhecido.

### I.5 Parâmetros bioquímicos

A estrutura eletrônica do  $O_2$  favorece sua redução por adição de um elétron de cada vez, levando a geração espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar danos celulares. Essas ERO podem ser formadas como subprodutos do metabolismo aeróbico e através de reações com drogas e contaminantes ambientais e são elas: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (Fig. I.3). Baixos níveis de ERO são indispensáveis para muitos processos bioquímicos, incluindo sinalização celular, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos. Em contraste, altas concentrações de ERO e/ou sua remoção inadequada podem resultar em estresse oxidativo, que pode causar problemas metabólicos graves e danos em macromoléculas (Matés et al., 1999).



**Figura I.3** Esquema representando a formação de reativos de oxigênio. Figura adaptada de Hermes-Lima (2004).

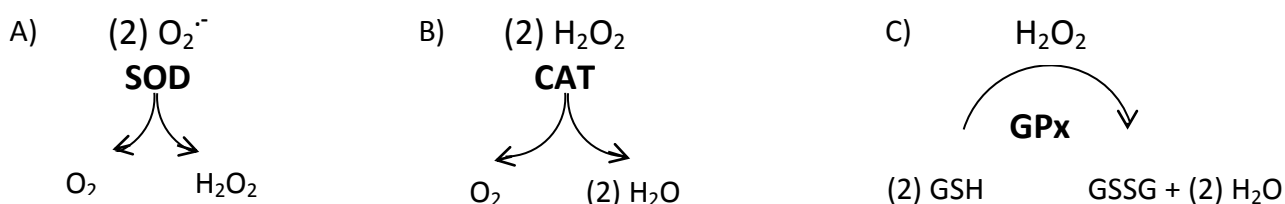
O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade do sistema biológico em neutralizar prontamente estes intermediários reativos (Flora et al., 2012). O sistema biológico atua na neutralização das ERO através

de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. As defesas enzimáticas são representadas principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Enquanto um dos principais antioxidantes não enzimáticos é a glutathione (GSH, L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine), um tripeptídeo, contendo cisteína que representa o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos (Sies, 1997). Além da GSH outras defesas não enzimáticas incluem vitamina C, flavonoides, carotenoides entre outros (Flora et al., 2012).

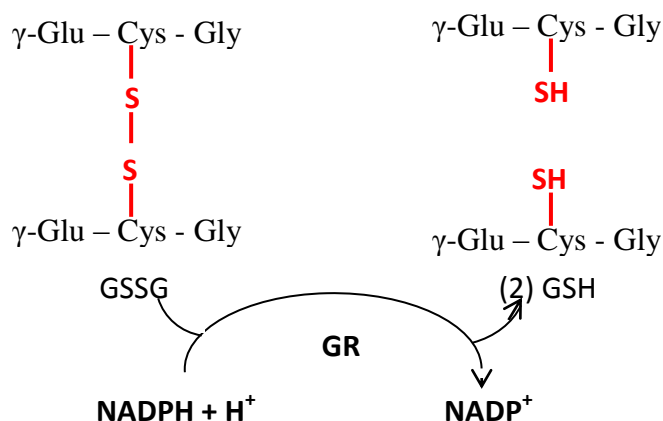
A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Fig. I.4A). Mamíferos têm três formas de SOD: citosólica Cu/Zn-SOD, mitocondrial Mn-SOD e uma extra-celular EC-SOD. Acredita-se que a SOD citosólica é a que desempenha o papel mais importante na primeira linha de defesa antioxidante. A EC-SOD tem elevada afinidade para determinados glicosaminoglicanos (macromoléculas presente em tecidos animais, como cartilagem, superfícies celulares, entre outros). Foi encontrada nos espaços intersticiais de tecidos e em fluidos extracelulares, mas sua maior atividade é no plasma, linfa e líquido sinovial, e sua regulação ocorre principalmente de modo coordenado por citosinas (Matés et al., 1999).

A CAT atua na conversão do peróxido de hidrogênio à oxigênio e água (Fig. I.4B). Esta enzima contém heme em sua estrutura, e sua concentração mais alta encontra-se nos peroxissomos, e em menor escala na mitocôndria e no citosol. Embora a CAT não seja essencial para alguns tipos de células em condições normais, ela desempenha um papel importante na resposta adaptativa das células ao estresse oxidativo.

A GPx contém selênio e utiliza os grupos sulfidríla, presentes nos resíduos de cisteína da GSH, como doador de hidrogênio com formação da forma oxidada ou dissulfeto da glutathione (GSSG) (Fig. I.4C). É um dos mecanismos mais importantes antioxidativos, existindo cinco isoenzimas GPx, que variam dependendo do tipo de tecido. A GPx1 e GPx4 são encontradas na maioria dos tecidos, e a GPx4 está localizada tanto no citosol como na fração de membrana, porém a GPx1 é mais presente em eritrócitos, rim e fígado, e a GPx4 é altamente expressa em células epiteliais renais e testículos. Outras como GPx2 (citosólica), GPx-G1 e GPx3 (extracelular), são fracamente detectadas na maioria dos tecidos, com maior expressão no trato gastrointestinal e renal, respectivamente. A GR converte a forma GSSG de volta à forma GSH usando NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Matés et al., 1999) (Fig. I.5).



**Figura I.4** Esquema representando a inativação de ânion superóxido pela superóxido dismutase – SOD (A), e a inativação do peróxido de hidrogênio pela catalase – CAT (B) e glutatiuona peroxidase – GPx (C). GSH = glutationa, GSSG = glutationa oxidada. Fonte: a autora.



**Figura I.5** Esquema representando a regeneração da forma reduzida da glutaciona que é obtida por reação com NADPH. GSSG = glutaciona oxidada, GSH = glutaciona, GR = glutaciona reduzida, -SH = grupo sulfidril,  $\gamma\text{-Glu} - \text{Cys} - \text{Gly}$  = glutaciona. Figura adaptada de Marzzoco (2007).

A GST é uma enzima que não está ligada primariamente com as defesas antioxidantes, mas sabe-se que muitos substratos de GST endógenos são formados como consequência da modificação de macromoléculas por ERO, e as transferases são, portanto, consideradas como antioxidantes. Classicamente, a GST tem sido considerada

uma enzima que desempenha um papel importante na fase II do metabolismo de xenobióticos, onde contribui para a sobrevivência celular por desintoxicação de compostos exógenos. Neste papel, a ação da GST após os xenobióticos passarem pela fase I do metabolismo, é dependente de citocromo P450 (CYP). Porém, nem todos os substratos para GST necessitam ser ativados pela CYP, é provável que alguns sejam ativados por ciclooxigenases – COX, como produto do ácido araquidônico, as prostaglandinas – PGs (para produção de mediadores inflamatórios) (Hayes et al., 2005), ou por interação com radicais livres durante o estresse oxidativo. Um destes substratos pode ser o hidroperóxido de lipídio, que são produtos primários da peroxidação lipídica, a GST catalisa a redução destes compostos contendo peróxido (Fig. I.6). Esta reação não é dependente de selênio, mas exige a GSH, em uma reação com dois passos. O primeiro passo é a redução enzimática do peróxido para um álcool, com a concomitante produção de glutathiona hidroxilada (GSOH). O segundo passo envolve a reação espontânea de GSOH com uma molécula de GSH para produzir a glutathiona oxidada – GSSG (Sherrat e Hayes, 2001).

O mecanismo do estresse oxidativo induzido por Pb envolve um desequilíbrio entre a produção e remoção de ERO podendo causar lesões na membrana celular, no DNA e em proteínas. O Pb pode atuar promovendo uma diminuição das defesas antioxidantes ou aumentando a produção de ERO (Fig. I.6). Na diminuição das defesas antioxidantes, o Pb pode atuar diretamente formando um complexo com o selênio e diminuindo a atividade da GPx. Pode atuar também na atividade da CAT, que contém em sua estrutura o heme, e o Pb é conhecido por inibir a síntese do heme (Flora et al., 2008). A GSH, GPx e GR contem resíduos de cisteína e o Pb é conhecido por ligar-se a este resíduo (Patra et al., 2011), podendo inativar a GPx e também, impedir a redução a GSSG a GSH pela inativação da GR. A participação de radicais livres provocado por Pb pode acontecer com a inibição da ALAD (necessária para a síntese do heme), que pode ocorrer em todos tecidos, menos em eritrócitos maduros. Inibindo a ALAD, seu substrato ALA em excesso segue para a corrente sanguínea, mas pode ser rapidamente oxidada no interior da célula e gerar ERO, principalmente o radical hidroxil (Patrick, 2006).

Espécies reativas de oxigênio, produtos do estresse oxidativo, podem combinar os seus elétrons não emparelhados para formar um par de elétrons partilhado. No entanto, a maioria das moléculas biológicas não são radicais livres. Quando um radical dá um elétron para, leva um elétron a partir de, ou simplesmente adiciona a um não radical,

que não sendo radical, torna-se radical. Assim, uma característica da reação de radicais livres com não radicais, é que procedem em reação de cadeia: um radical cria o outro. O átomo de hidrogênio tem um próton e um único elétron, assim, a remoção de um átomo de hidrogênio de uma molécula biológica, deixa para trás um elétron não pareado, sendo este, o mecanismo inicial da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que ocorre nos ácidos graxos insaturados das membranas biológicas (Halliwell e Chirico, 1993). Este mecanismo pode ocorrer em proteínas, DNA, membrana mitocondrial ou celular, e há estudos que mostram a atuação do Pb causando danos a membrana celular de vários tecidos como rim e fígado (Wang et al., 20012) ou pâncreas (Ambali et al., 2011).

## I.6 Danos genotóxicos

---

A exposição ao Pb também está associada com danos no DNA, por exemplo, em trabalhadores de fábrica de bateria que tiveram níveis elevados de quebras no DNA em linfócitos. Os autores encontraram correlação entre quebra de DNA e aumento de ERO em linfócitos, acompanhado de diminuição de GSH (Fracasso et al., 2002). Os linfócitos T representam 65 a 75% dos linfócitos no sangue. A proliferação de linfócitos é altamente regulada, envolvendo eventos múltiplos com origem na medula óssea, onde ocorre o rearranjo para gerar receptores de antígeno, penetram no sangue e são retidos no timo onde se proliferam e se diferenciam em linfócitos T. A ativação das células T conduz à mudanças no metabolismo celular para proteger contra patógenos ou para estimular outras células do sistema imunológico (Maclver et al., 2013).

O mecanismo que envolve o Pb causando danos genotóxicos nos linfócitos, podem estar envolvidos com a geração de ERO e consequente formação de radicais livres atacando o DNA (Fig. I.6). O Pb pode afetar a expressão do antígeno CD4 presente na superfície dos linfócitos (Mishra, 2009), assim como, *in vitro* na presença de Pb, a RNA polimerase se torna menos precisa, podendo promover a síntese de RNA a ser iniciado em locais impróprios em moldes de DNA (Johnson, 1998).

Outra consequência indireta da exposição ao Pb é referente à inibição da síntese do heme. Como resultado, os níveis elevados de ALA são encontrados tanto no sangue quanto na urina, e estes níveis elevados de ALA gera peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e podendo gerar radical hidroxil (Patrick, 2006). Como ALA é ainda mais oxidável, torna-se ácido 4,5-dioxovalérico, que é um agente alquilante eficaz das porções de guanina dentro do DNA, como em nucleosídeos de DNA isolado. Ratos tratados com ALA tiveram níveis aumentados do produto da oxidação de DNA, o 8-oxo-7, 8-dihidroxido-2'-desoxiguanosina e 5-hidroxil-21-desoxicitidina (Patra et al., 2011). A geração de ácido 4,5-dioxovalérico, potencialmente genotóxico, é um mecanismo para o possível câncer provocado pelo Pb (Patrick, 2006).



## **I.7 Interferência do Pb no sistema nervoso**

---

A AChE é uma enzima com funções no sistema nervoso central e periférico que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina (Quinn, 1987). É considerada uma enzima chave para o correto funcionamento do SNC, e bastante utilizada como marcador dos possíveis efeitos neurológicos produzidos pela exposição ao Pb (Antonio et al., 2003; Antonio-García e Massó-Gonzalez, 2008; Akande et al., 2014). É de interesse frente à exposição ao Pb por afetar a atividade da AChE em áreas do cérebro que controla a aprendizagem e o comportamento cognitivo, principalmente quando o SNC está em desenvolvimento (Reddy et al., 2003). O Pb pode promover sua inibição (Antonio et al. 2003), e sua inativação conduz ao acúmulo de acetilcolina, hiperestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos, resultando na hiperestimulação das células pós-sinápticas (Colovic et al., 2013). Porém, a ação inibidora do Pb sobre a atividade da AChE parece ser dose-dependente, e algumas regiões do cérebro mostram maior sensibilidade para o metal (Reddy et al., 2003). Esta pode ser a razão para que as alterações na AChE é mais observada na região do hipocampo, em comparação com o córtex e cerebelo (Saritha et al., 2014).

## **I.8 Justificativa**

---

Diante da multiplicidade de sintomas associados com a toxicidade ao Pb pesquisas devem ser realizadas continuamente, pois as alterações encontradas parecem ser dependentes de concentração, tempo, idade e condições fisiológicas do organismo. Por isso, julgamos importante averiguar, em animais de laboratório, os efeitos da ingestão diária de alimento contendo  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  e se esses efeitos variam em função da idade e da exposição pré-natal ao metal. Desta forma, este trabalho buscou avaliar o padrão de acúmulo de Pb em diferentes órgãos e se o Pb promove danos oxidativos, danos genotóxicos, alterações hematológicas e no perfil glicêmico, assim como, comparar esses possíveis efeitos em animais, com diferentes idades e de diferentes gerações.

## I.9 Referências bibliográficas

---

- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57-64.
- Agrawal, S., Flora, G., Bhatnagar, P., Flora, F.J.S., 2014. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell. Mol. Biol.* 60, 13-21.
- Akande, M.G., Aliu, Y.O., Ambali, S.F., Ayo, J.O., 2014. Taurine mitigates cognitive impairment induced by chronic co-exposure of male Wistar rats to chlorpyrifos and lead acetate. *Environ. Toxicol. Fhar.* 37, 315-325.
- Ambali, S.F., Shuaib, K., Edeh, R., Orijei, B.C., Shittu, M., Akande, M., 2011. Hyperglycemia induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and lead in Wistar rats: Role of pancreatic lipoperoxidation and alleviating effect of vitamin C. *Biol. Med.* 3, 6-14.
- Antonio-García, MT., Massó-Gonzalez, E.L., 2008. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2089-2095.
- Antonio, M.T., Corredor, L., Leret, M.L., 2003. Study of the activity of several brains enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol. Lett.* 143, 331-340.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2005. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- Bannon, D.I., Portnoy, M.E., Olivi, L., Lees, P.S.J., Culotta, V.C., Bressler, J. P., 2002. Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 295, 978-984.

- Braun, J.M., Wright, R.J., Just, A.C., Power, M.C., Ortiz, M.T., Schnaas, L., Hu, H., Wright, R.O., Tellez-Rojo, M.M., 2014. Environ. Relationships between lead biomarkers and diurnal salivary cortisol indices in pregnant women from Mexico City: a cross-sectional study *Health*. 13, 1-50.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimivry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Apl. Pharm.* 204, 274-308.
- Castro-González, M.I., Méndez-Armenta, M., 2008. Heavy metals: implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Phar.* 26, 263-271.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2010. Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.
- Cherian, M.G., Nordberg, M., 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*. 28, 1-15.
- Codex Alimentarius Commission, 1997. Report of the twenty-ninth session of the codex committee on food additives and contaminants.
- Codex Alimentarius Commission, 2001. Report of the 33<sup>rd</sup> session of the codex committee on food additives and contaminants.
- Codex Alimentarius, 2006. Understanding the Codex Alimentarius. Third edition. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Codex Standard 193-1995, 2010. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed.
- <[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/CXS\\_193e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_193e.pdf)>
- Codex Alimentarius, 2015. Disponível em < <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>> Acesso em 06/07//2015.
- Consulta Pública nº 101, de 27 de outubro de 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U de 28/10/2010.
- <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f5dd598047458b0294a7d43fbc4c6735/C P+N%C2%BA+101+GGALI.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 06/07/2015.
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Pasti, T.D.L., Bondzic, A.M., Vasic, V.M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 315-335.
- Dai,S., Yin, C., Yuan, G., Lu, H., Jia, R., Xu, J., Song, X., Li, L., Shu, Y., Liang, X., He, C., Lv, C., Zhang, W., 2013. Quantification of metallothionein on the liver and

- kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environ. Toxicol. Phar.* 36, 1207-1216.
- Devlin, T.M., 2011. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 7ª ed. São Paulo: Blucher.
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R., 2015. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotox. Environ. Safe.* 113, 145-151.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J.* 8, 1570.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10, 2831.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529-539.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014. *The state of world fisheries and aquaculture - Opportunities and challenges*. Rome.
- Feldman, G., Chain, S., Soria, N., Bautista, N., Riera, N.M., 2011. Presença de síndrome metabólica em ratas inducido por distintas concentraciones de plomo. *Insuf. Card.* 3, 112-116.
- Fewtrell, L., Kaufmann, R., Prüss-Üstün, A., 2003. Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Geneva, World Health Organization (WHO). *Environmental Burden of Disease Series*, No. 2.
- Flora, G., Gupta, A., Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 47-58.
- Flora, S.J.S., Mirtal, M., Mehta, A., 2008, Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501-523.
- Fracasso, M.E., Perbellini, L., Solda, S., Talamini, G., Franceschetti, P., 2002. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat. Res.* 515, 159-169.
- Fullmer, C.S., 1991. Intestinal calcium and lead absorption, effects of dietary lead and calcium. *Eviron. Res.* 54, 159-169.
- Godwin, H.A., 2001. The biological chemistry of lead. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 5, 223-227.
- Gonick, H.C., 2011. Lead-binding proteins: a review. *J. Toxicol.* 1-10.

- Gump, B.B., Stewart, P., Reihman, J., Lonky, E., Darvill, T., Parsons, P.J., Granger, D.A., 2008. Low-level prenatal and postnatal blood lead exposure and adrenocortical responses to acute stress in children. *Environ. Health Persp.* 116, 249-255.
- Gustafson, A., Hedner, P., Schlitz, A., Skerfving, S., 1989. Occupational lead exposure and pituitary function. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 61, 277-281.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (suppl), 715-725.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.) *Funcional metabolism: regulation and adaptation*. New York, Jon Wiley & Sons, Inc., pp. 319-368.
- Hernberg, S., 2000. Lead poisoning in a historical perspective. *Am. J. Ind. Med.* 38, 244-254.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- IARC (Internacioanl Agency for Research on Cancer), 2006. **WORLD HEALTH ORGANIZATION: Summaries & evaluations: Inorganic and organic lead compounds**. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans), Vol. 87.
- Iwegbue, C.M.A., 2015. Metal concentrations in selected brands of canned fish in Nigeria: estimation of dietary intakes and target hazard quotients. *Environ. Monit. Assess.* 187, 85.
- Johnson, F.M., 1998. The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res.* 410, 123-140.
- Kojima, Y., Kagi, J.H.R., 1978. Metallothionein. *TBS.* 90-92.
- Leung, H.M., Leung, A.O.W., Wang, H.S., Ma, K.K., Liang, Y., Ho, K.C., Cheung, K.C., Tohidi, F., Yung, K.K.L., 2014. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 235-245.
- Maclver, N.J., Michalek, R.D., Rathmell, J.C., 2013. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 259-283.
- Marzzoco, A., Torres, B.B. *Bioquímica básica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Matés, J.M., Péres-Gómes, C., Castro, I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
- Matovic, V., Buha, A., Đukic-Cosic, D., Bulat, Z., 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.* 78, 130-140.
- Mishra, K.P., 2009. Lead exposure and its impact on immune system: A review. *Toxicology in Vitro.* 23, 969-972.
- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura), 2013. Cartilha balanço 2013, pesca e aquicultura. Brasil.
- Mrugesh, T., Dipa, I., Manishika, G., 2011. Effect of lead on human erythrocytes: an in vitro study. *Act Pol. Pharm.* 68, 653-656.
- Needleman, H., 2002. Lead poisoning. *Annu. Rev. Med.* 55, 209-22.
- Nolan, C.V., Shaikh, Z.A., 1992. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology* 73, 127-146.
- Patra R. C., Rautray Amiya K., Swarup, D., 2011. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Inter.* 2011, 9.
- Patrick, L., 2006. Lead Toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Med. Rev.* 11, 114-127.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87. 955-979.
- Rahman, M.S., Molla, A.H., Saha, N., Rahman, A., 2012. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chem.* 134, 1847-1854.
- Reddy, G.R., Basha, M.R., Devi, C.B., Suresh, A., Baker, J.L., Shafeek, A., Heinz, J.; Chetty, C.S., 2003. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 347-352.
- Resolução – RDC n. 42, de 29 de agosto de 2013 no que dispõe sobre o “Regulamento Técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Nº 168, sexta-feira, 30 de agosto de 2013 Nº 168, sexta-feira, 30 de agosto de 2013.
- Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefuji, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirotani, T., Ichinose, K., Brownlee, M., Araki, E., 2003.

- Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 216–222.
- Salinska, A., Włostowski, T., 2012. Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. *Ecotoxicology* 21, 2235-2243.
- Santos, L.F.P., Trigueiro, I.N.S., Lemos, V.A., Furtunato, D.M.N., Cardoso, R.C.V., 2013. Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. *Food Control* 33, 193-199.
- Saritha, S., Kumar, K.P., Reddy, P.S., Tripathy, N.K., Reddy, G.R., 2014. Developmental arsenic and lead exposure: behavioral and neurochemical perturbations of albino rats. *Indo American J. Pharm. Research.* 4, 1707-1716.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.G., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291-298.
- Sherrat, P.J., Hayes, J.D., 2001. Glutathione S-transferase. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics.* 320-352.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291-295.
- Simons, T.J., 1993. Lead transport and binding by human erythrocytes *in vitro*. *Pfluegers Arch.* 423, 307-313.
- Skoczynska, A., Wojakowska, A., Nowacki, D., Bobak, L., Turczyn, B., Smyk, B., Szuba, A., Trziszka, T., 2015. Unsaturated fatty acids supplementation reduces blood lead level in rats. *BioMed Research International.* Vol. 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/189190>.
- Terra, B.F., Araújo, F.G., Calza, C.F., Lopes, R.T., Teixeira, T.P., 2008. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. *Water Air Soil Poll.* 187, 275-284.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2003. Lead review. Nordic Council of Ministers.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2008. Draft final review of scientific information on lead. Geneva, United Nations Environment Programme Chemicals Branch.

- UNEP (United Nations Environment Programme), 2011. Estimating Long-Run Geological Stocks of Metals. UNEP International Panel on Sustainable Resource Management. Working Group on Geological Stocks of Metals.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxic. Phar.* 13, 57-149.
- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z., Liu, X., 2012. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 46, 354-359.
- WHO (World Health Organization), 2010. Exposure to lead: a major public health concern. Geneva, World Health Organization, Department of Public Health and Environment.
- USGS (U.S. Geological Survey), 2015. Lead. U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries.

## **Capítulo II**

### **Objetivos**

---

## II.1 Objetivo geral

---

Avaliar os efeitos bioquímicos, genotóxicos e metabólicos da ingestão diária de Pb e a bioacumulação deste metal em ratas de diferentes idades (45, 90 e 140 dias) assim como na prole, com 45 e 90 dias, nascida de ratas que foram alimentadas diariamente com ração contendo Pb.

## II.2 Objetivos específicos

---

- Avaliar os efeitos da ingestão diária de alimento contaminado por chumbo, sobre os eritrócitos, analisando mudanças no conteúdo de hemoglobina, e no número e percentual de células vermelhas circulantes;
- Relacionar a ingestão diária de Pb com o perfil glicêmico e a resposta hormonal (insulina e cortisol), e se esta resposta afeta o conteúdo de glicogênio hepático;
- Avaliar o efeito do Pb na atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro;
- Verificar a ocorrência de danos oxidativos, como peroxidação de membranas e oxidação de proteínas, no fígado e rim de ratas alimentadas diariamente com chumbo;
- Averiguar se o Pb promove danos no DNA dos linfócitos quando ingerido diariamente;
- Analisar o padrão de acúmulo de Pb em diferentes órgãos de ratas alimentadas diariamente com o metal e se há relação entre o acúmulo de Pb no rim e no fígado com o conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneína nestes órgãos;
- Examinar se o Pb está presente no leite materno de ratas alimentadas diariamente com o metal;
- Avaliar se os efeitos causados pelo Pb nos animais estudados é dependente da geração e da idade.

## **Capítulo III**

### **Desenho experimental**

---

### III.1 Animais

---

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Fig. III.1.A). Logo após ocorrer o desmame (22 dias), animais pesando  $37 \pm 5,58$  g ( $n=80$ ) foram transferidos para o biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram alojados individualmente em gaiolas (Fig. III.1.B) e mantidos a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h/12h durante diferentes períodos. As ratas foram alimentadas com ração comercial, sem adição de chumbo (grupos controle) ou com adição de chumbo (grupos Pb). Tanto a ração, quanto a água, foi ofertada *ad libitum*. Os animais eram pesados e o consumo de ração verificado 3 vezes na semana. O cálculo para obter os valores da ração consumida foi feito pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e o resto de ração que permanecia na gaiola, incluindo os resíduos de ração na bandeja abaixo da gaiola.

A)



B)



**Figura III.1** Ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (A). Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde os animais foram mantidos, em gaiolas individuais (B).  
Fonte: a autora.

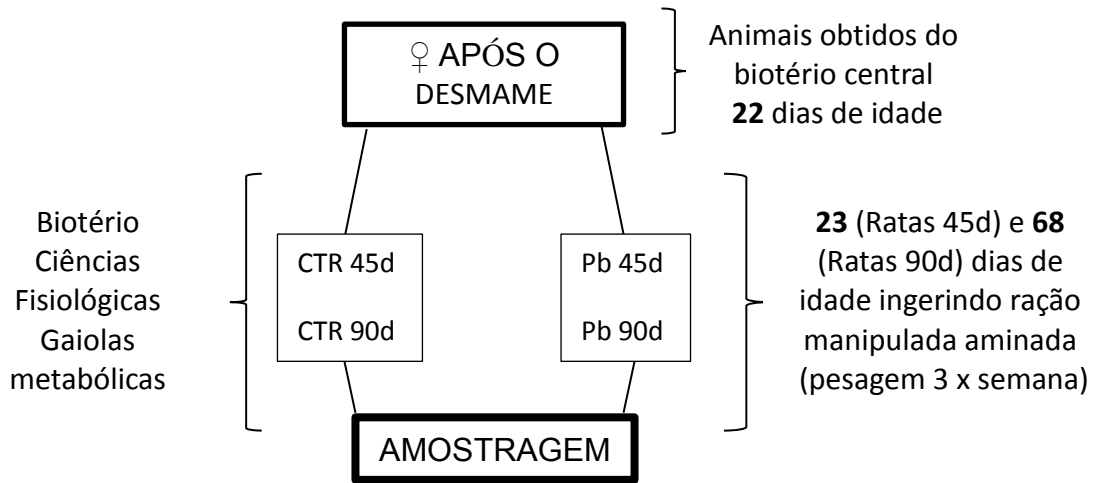
Dois grupos de ratas, com 79 dias de idade, foram submetidos ao acasalamento e mantidos durante a prenhez até a amamentação dos filhotes. Para que o acasalamento ocorresse, ratos machos Wistar (provenientes do Biotério Central da UEL) foram colocados em gaiolas junto com as fêmeas na proporção 1:3 ou 1:4 (macho:fêmeas). A pesagem e verificação do consumo de ração foi interrompida durante o tempo que os animais foram mantidos para acasalar. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Animais Experimentais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL – Processo: 34715.2011.16).

## III.2 Experimentos

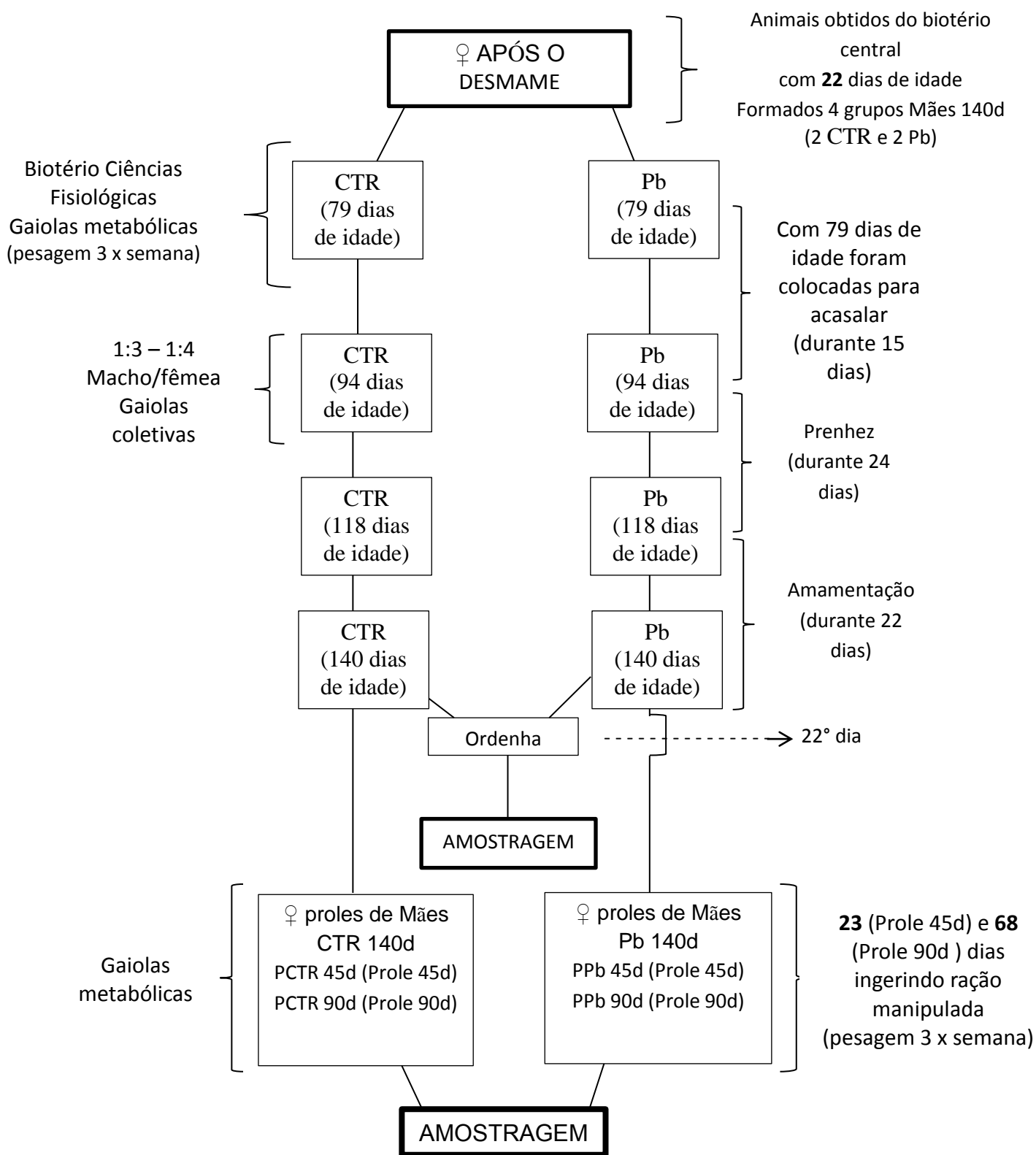
---

No total, foram utilizados 12 grupos de ratas (n = 9-10 em cada) dentre os quais 2 grupos de ratas com 45 dias de idade (**Ratas 45d**): CTR 45d e Pb 45d; 2 grupos de ratas com 90 dias (**Ratas 90d**): CTR 90d e Pb 90d e 4 grupos de ratas com 140 dias de idade, que ficaram prenhes e amamentaram (**Mães 140d**): 2 grupos CTR 140d e 2 grupos Pb 140d. Da prole das ratas dos grupos Mães 140d foram selecionadas fêmeas de 2 grupos CTR 140d para formar os grupos prole controle de 45 dias (PCTR 45d) e de 90 dias (PCTR 90d) e de 2 grupos Pb140d para formar os grupos prole chumbo de 45 dias (PPb 45d) e de 90 dias (PPb 90d).

Os grupos Ratas 45d, Ratas 90d e Mães 140d, iniciaram a ingestão da ração manipulada logo após ocorrer o desmame, com 22 dias de idade. Os animais foram alimentados com a ração manipulada até completarem 45, 90 ou 140 dias de idade. As ratas do grupo Mães 140d também foram alimentadas com ração manipulada durante o período de prenhez e amamentação. Os animais do grupo Prole 45d e Prole 90d, após o desmame, permaneceram ingerindo ração por 45 e 90 dias respectivamente. O grupo controle (CTR) ingeriu a ração sem a adição de Pb, e o grupo chumbo (Pb) ingeriu a ração contaminada com Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Fig. III.2 e III.3). Para ratas, a idade de 45 dias corresponde ao período da puberdade, enquanto as idades de 90 e 140 dias correspondem à idade adulta, quando já pode ocorrer o acasalamento (Anderson et al., 2004).



**Figura III.2** Esquema representando o delineamento experimental dos grupos Ratas 45d e Ratas 90d que ingeriram ração contaminada logo após o desmame e permaneceram ingerindo até completarem 45 e 90 dias respectivamente (n = 40).



**Figura III.3** Esquema representando o delineamento experimental dos grupos Mães 140d, que ingeriram ração contaminada por chumbo logo após o desmame até completarem 140 dias de vida, e os grupos Prole 45d e Prole 90d, constituídos por ratas que foram geradas pelas mães 140d e, após o desmame, iniciaram a ingestão de ração contaminada até completarem 45 e 90 dias de vida respectivamente (n = 80).

### III.3 Confeção da ração

---

A ração comercial para ratos Nuvilab® foi triturada e foi acrescido o Pb na forma de nitrato de chumbo, na proporção de 2,0 mg de Pb por Kg de ração (dissolvido em 800 mL de água). Novos *pellets* foram formados e levados à estufa a 60° C por 24 horas (Fig. III.4). A ração do grupo controle sofreu o mesmo processo de manipulação, mas sem a adição do Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. A concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup> foi definida com base na concentração máxima de Pb para a carne de pescado estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil (ANVISA, 1998)



**Figura III.4** Novos *pellets* de ração comercial para ratos Nuvilab® produzidos após a contaminação com 2,0 mg de Pb por Kg e secados na estufa a 60° C por 24 horas. Fonte: a autora.

### III.4 Amostragem

---

Após os diferentes tratamentos experimentais, as ratas foram pesadas e a eutanásia ocorreu através de exsanguinação com o animal sob efeito de anestesia geral (40 mg.Kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico), sem jejum prévio. O sangue foi coletado, a partir da veia cava

inferior. Uma alíquota de sangue foi utilizada para análise dos parâmetros hematológicos e para a realização do ensaio alcalino do cometa. O restante do sangue foi centrifugado (1870 g, 15 min, centrífuga Hsiangtai, modelo MCD-2000), as células sanguíneas foram utilizadas para a análise de acúmulo de Pb e o plasma para a determinação das concentrações de glicose e insulina. O cérebro dos animais foi retirado e utilizado para análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e de acúmulo de chumbo. Uma parte do lobo lateral esquerdo do fígado e o rim direito foram retirados para análise do conteúdo de glutathiona (GSH) e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST), para a verificação da ocorrência de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (PCO), assim como para a determinação de glicogênio. Uma outra pequena parte do lobo lateral esquerdo do fígado e o rim esquerdo foram retirados para análise de acúmulo de chumbo. Foi retirado o intestino (1 cm da primeira porção do duodeno), cérebro, ovários, osso tíbia da perna esquerda, músculo da perna esquerda para análise de acúmulo de chumbo. Todo material coletado para análise de acúmulo de chumbo foi armazenado em tubos criogênicos previamente lavados com ácido nítrico para descontaminação dos metais. Uma parte do lobo lateral esquerdo do fígado foi retirada para a determinação das proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT).

#### **III.5 Ordenha de leite**

---

Os filhotes foram separados das mães uma hora antes de ocorrer a ordenha. As ratas receberam injeção intraperitoneal de anestésico Quetamina – 60 mg/kg peso (Vetnil) + Xilazina 2% – 10 mg/kg peso (Hertape Calier), e após anestesiadas foi injetado ocitocina - 125UI = 0,125ml – (Vetnil) via intraperitoneal. O leite foi retirado por ordenha manual das mamas com a ajuda de micropipetador de volume máximo 100 µL (Fig. III.5) e armazenado em tubos criogênicos previamente lavados com ácido nítrico para a análise do acúmulo de Pb.



**Figura III.5** Leite retirado por ordenha manual das mamas de ratas com a ajuda de micropipetador de volume máximo 100  $\mu$ L. Fonte: a autora.

### III.6 Referência Bibliográfica

---

Anderson, M.L., D'Almeida, V., KO, G.M., Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S., 2004. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil.

## **Capítulo IV**

**Acúmulo de chumbo e conteúdo de metalotioneína em órgãos de ratas, de diferentes idades e gerações, que ingeriram diariamente ração suplementada com o metal**

---

## IV.1 Introdução

---

A intoxicação por chumbo (Pb) permanece como um sério risco para a saúde pública, em particular nos países em desenvolvimento, por produzir vários efeitos deletérios sobre a função renal, hematopoiética, reprodutiva e ao sistema nervoso central (Flora et al., 2012; Beier et al., 2015). O Pb um metal que está presente no solo, na água e na atmosfera, principalmente como resultado da ação antropogênica e pode contaminar os seres humanos por diversas vias, como por exemplo a ingestão de água ou alimentos contaminados. Os níveis de Pb encontrados hoje no organismo humano são muito elevados e resultam em efeitos adversos para a saúde (ATSDR, 2012).

A poluição por metais, como o Pb, no ambiente aquático é uma preocupação mundial, não só por causa da ameaça aos ecossistemas aquáticos e sua biota, mas também devido aos riscos para a saúde humana associados com o consumo de peixe (Liu et al., 2015). A proteína de peixe representa uma fonte nutricional crucial em alguns países onde os níveis de consumo de proteína podem ser baixos. Em 2010 os peixes foram responsáveis por 16,7% da ingestão de proteína animal na população global e por 6,5% de toda proteína consumida (FAO, 2014). A proporção da produção pesqueira utilizada diretamente para o consumo humano aumentou de 71% em 1980, para mais de 86% (136 milhões de toneladas) em 2012. O fato é que a carne de peixe é uma fonte saudável de nutrientes, porém a sua contaminação por Pb está evidenciada em vários estudos (Dural et al., 2007; Leung et al., 2014; Dhanakumar et al., 2015).

O chumbo provavelmente é um dos metais mais estudados e seu acúmulo no organismo pode levar a efeitos prejudiciais ao longo do tempo (Flora et al., 2012). Sua absorção ocorre a partir do trato gastrointestinal e após absorvido o Pb passa do sangue para outros órgãos, como fígado, rins, pulmões, cérebro, baço, coração, músculo e ossos; estes últimos contem cerca de 94% da quantidade total do Pb no organismo adulto e na criança, cerca de 73% (ATSDR, 2007). Os organismos jovens tendem a acumular mais chumbo do que adultos, devido ao fato de que as membranas mucosas de animais jovens têm maior permeabilidade e suas defesas ainda não são totalmente efetivas (Horiguchi et al., 2004; Winiarska-Mieczan e Kwiecień, 2015).

O Pb acumulado nos ossos pode ser liberado gradualmente para o sangue, especialmente durante períodos fisiológicos ou patológicos de desmineralização óssea, tais como gravidez, lactação e osteoporose, mesmo que a exposição ao Pb seja cessada (EFSA, 2012). Assim, a exposição pré-natal ao Pb pode prejudicar a saúde materna e o desenvolvimento do feto e do lactente, mesmo em baixos níveis de exposição materna.

Além disso, como os ossos constituem o principal reservatório de Pb por décadas, as mulheres e seus bebês podem estar em risco de exposição contínua por muito tempo após o término da exposição (CDC, 2010).

Metalotioneínas (MT) são proteínas intracelulares de baixo peso molecular, ricas em resíduos de cisteína e com alta afinidade por metais essenciais e não essenciais (Park et al., 2001). Essas proteínas, além de colaborarem para a homeostase de alguns metais essenciais, também atuam como um mecanismo de proteção contra a toxicidade de alguns metais (Klaassen et al., 1999). Apesar de alguns trabalhos mostrarem o papel das MT na detoxificação do Pb, as informações disponíveis sobre os mecanismos de indução de MT por Pb ainda são escassas (Dai et al., 2013).

Em vista do exposto, este trabalho foi desenvolvido para verificar como a idade e a transferência materna influenciam o acúmulo de chumbo em diferentes órgãos. A ingestão de ração contendo Pb foi utilizada como forma de exposição ao metal, já que a exposição via alimento é a forma que mais se aproxima da realidade, considerando-se que a ingestão de carne de pescado contendo Pb contribui de forma significativa para a contaminação do homem por esse metal (El-Moselhy et al., 2014). Além disso, foi avaliada a relação entre o conteúdo de metalotioneína e o acúmulo de chumbo em rim e fígado. Para atingir esses objetivos ratas Wistar, de diferentes idades e gerações, alimentadas diariamente, desde o desmame, com ração contendo 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, foram utilizadas para avaliar o acúmulo de Pb em diferentes órgãos e no leite materno e o conteúdo de metalotioneína, no fígado e no rim.

## IV.2 Material e métodos

---

### IV.2.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Logo após ocorrer o desmame (22 dias), animais pesando  $37 \pm 5,58$  g (n=80) foram transferidos para o biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram alojados individualmente em gaiolas e mantidos a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h/12h. As ratas foram alimentadas com ração comercial, sem adição de chumbo (grupos controles) ou com adição de chumbo (grupos Pb). Tanto a ração, quanto a água, foram ofertadas *ad libitum*. Os animais eram pesados e o consumo de ração verificado 3 vezes na semana. O cálculo para obter os valores da ração consumida foi feito pela diferença entre a quantidade de

ração ofertada e o resto de ração que permanecia na gaiola, incluindo os resíduos de ração na bandeja abaixo da gaiola. Dois grupos de ratas, com 78 dias de idade, foram submetidos ao acasalamento e mantidos, como descrito anteriormente, durante a prenhez até a amamentação dos filhotes. Para que o acasalamento ratos machos Wistar (provenientes do Biotério Central da UEL) foram colocados em gaiolas junto com as fêmeas na proporção 1:3 ou 1:4 (macho: fêmeas). A pesagem e verificação do consumo de ração foram interrompidas durante o tempo que os animais foram mantidos para acasalar. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Animais Experimentais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL – Processo: 34715.2011.16).

### **IV.2.2** *Delineamento experimental*

No total foram utilizados 12 grupos de ratas ( $n = 9-10$  em cada) dentre os quais 2 grupos de ratas com 45 dias de idade (Ratas 45d): CTR45d e Pb45d; 2 grupos de ratas com 90 dias (Ratas 90d): CTR90d e Pb90d e 4 grupos de ratas com 140 dias de idade, que ficaram prenhas e amamentaram (Mães 140d): 2 grupos CTR140d e 2 grupos Pb140d. Da prole das ratas dos grupos CTR140d foram selecionadas as fêmeas para formar os grupos prole controle de 45 dias (PCTR45d) e de 90 dias (PCTR90d); e dos grupos Pb140d foram selecionadas fêmeas para compor os grupos prole chumbo de 45 dias (PPb45d) e de 90 dias (PPb90d). Os grupos Ratas 45d, Ratas 90d e Mães 140d iniciaram a ingestão da ração manipulada logo após ocorrer o desmame, com 22 dias de idade e foram alimentados com a ração manipulada até completarem 45, 90 ou 140 dias de idade, respectivamente. As ratas do grupo Mães 140d também foram alimentadas com ração manipulada durante o período de prenhez e amamentação. Os animais dos grupos Prole 45d e Prole 90d, após o desmame, permaneceram ingerindo ração por 45 e 90 dias respectivamente. Os animais dos grupos controles (CTR) ingeriram a ração sem a adição de Pb, e os dos grupos chumbo (Pb) ingeriram a ração contaminada com Pb ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> (Fig. III.2 e III.3). Para as ratas, a idade de 45 dias corresponde ao período da puberdade, enquanto as idades de 90 e 140 dias correspondem à idade adulta, quando já pode ocorrer o acasalamento (Anderson et al., 2004).

### **IV.2.3** *Amostragem*

Após os diferentes tratamentos experimentais, as ratas foram pesadas e a eutanásia ocorreu por meio de exsanguinação com o animal sob efeito de anestesia geral (40 mg Kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico), sem jejum prévio. O sangue coletado, a partir da veia cava

inferior, foi centrifugado (1870 g, 15 min, centrífuga Hsiangtai, modelo MCD-2000) e as células sanguíneas foram utilizadas para a análise de acúmulo de Pb. Um pedaço do intestino (1 cm da primeira porção do duodeno), uma pequena parte do lobo lateral esquerdo do fígado, cérebro, ovários, rim direito, osso tíbia da perna esquerda e um músculo da perna esquerda também foram retirados. Essas amostras, coletadas para análise de acúmulo de chumbo, foram armazenadas em tubos criogênicos previamente lavados com ácido nítrico para descontaminação dos metais. Uma pequena parte do rim direito e do lobo lateral esquerdo do fígado foram separadas para a determinação das proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT).

#### **IV.2.4 Ordenha de leite**

Os filhotes foram separados das mães uma hora antes da ordenha. As ratas receberam injeção intraperitoneal de anestésico Quetamina (60 mg/kg peso, Vetnil) com o analgésico Xilazina 2% (10 mg/kg peso, Hertape Calier) e após anestesiadas foi injetado 0,125 mL de ocitocina (125UI, Vetnil), também via intraperitoneal. O leite foi retirado por ordenha manual das mamas com a ajuda de micropipetador e armazenado em tubos criogênicos previamente lavados com ácido nítrico para a análise do acúmulo de Pb.

#### **IV.2.5 Determinação de chumbo na ração e em órgãos e leite das ratas**

Amostras de ração, órgãos, células sanguíneas e leite foram secas em estufa (60° C) e posteriormente digeridas a 60° C, durante 48 h, em solução de ácido nítrico 5N - Suprapur, Merck (1:5, m/v). Após a digestão, o material foi centrifugado (3600 g, 20 min) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de Pb em forno de grafite acoplado ao Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAnalyst 700, Perkin Elmer, EUA). O limite de detecção deste método para o Pb é de 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A concentração de Pb nos tecidos estão expressos em  $\mu\text{g Pb g de tecido seco}^{-1}$ .

#### **IV.2.6 Determinação das proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT) em fígado e rim**

O conteúdo de PSMT foi determinado segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997) com modificações. As amostras de fígado e rim foram homogeneizadas (1:3 e 1:2- m/v, respectivamente) em tampão específico (Sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM,  $\beta$ -mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugadas (45

min, 21300 g, 4° C). O sobrenadante foi submetido ao fracionamento etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidríla (-SH), utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutatona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em nmol de PSMT mg de proteína<sup>-1</sup>. A concentração de proteína do homogenato foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm, de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### **IV.2.7 Análise estatística**

As comparações dos parâmetros avaliados nas ratas de cada tratamento (Ratas 45d, Ratas 90d, Ratas 140d, Prole 45d e Prole 90d) foram feitas entre os respectivos grupos CTR e Pb, utilizando-se o teste *t* de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição de dados (normalidade e homogeneidade da variância). As concentrações de Pb, em um mesmo tecido ou órgão, foram comparadas entre os grupos Pb dos diferentes tratamentos por meio de ANOVA (uma via) e as diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas Student Newman-Keuls (SNK). Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ . Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.

### **IV.3 Resultados**

---

A concentração de chumbo na ração contaminada por Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foi de  $2,09 \pm 0,3$  mg Pb Kg<sup>-1</sup> de ração (n = 15) e na ração do grupo controle foi de  $0,03 \pm 0,02$  (n = 6). O peso das ratas ao final de cada tratamento e a quantidade de chumbo ingerida estão descritos na Tabela IV.1, com base na média do consumo de ração ingerida por cada animal.

**Tabela IV.1** Peso dos animais ao final de cada tratamento, quantidade total de Pb ingerida e taxa de ingestão de Pb nas ratas que se alimentaram de ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por chumbo (Pb), logo após o desmame até completarem 45, 90 e 140 dias e na sua prole até completarem 45 e 90 dias. Os cálculos de ingestão de Pb foram feitos com base na concentração do metal determinada na ração do grupo CTR ( $0,03 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ ) e do grupo Pb ( $2,09 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ ).

<b>Grupo Idade</b>	<b>Tratamento (n)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Total de Pb ingerido (mg)</b>	<b>Taxa de ingestão de Pb (<math>\text{mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}</math>)</b>
Ratas 45 dias	CTR (10)	$122,70 \pm 7,97$	$0,005 \pm 0,000$	$0,0018 \pm 0,0001$
	Pb (10)	$133,70 \pm 9,68$	$0,41 \pm 0,04$	$0,132 \pm 0,010$
Ratas 90 dias	CTR (10)	$226,10 \pm 19,97$	$0,031 \pm 0,002$	$0,0019 \pm 0,0002$
	Pb (10)	$218,10 \pm 16,49$	$2,51 \pm 0,67$	$0,169 \pm 0,037$
Mães 140 dias*	CTR (10)	$156,20 \pm 25,17$	-	$0,0035 \pm 0,0006$
	Pb (10)	$173,20 \pm 35,22$	-	$0,222 \pm 0,040$
Prole 45 dias	CTR (9)	$173,67 \pm 15,22$	$0,008 \pm 0,001$	$0,0020 \pm 0,0002$
	Pb (9)	$177,33 \pm 5,52$	$0,51 \pm 0,08$	$0,125 \pm 0,021$
Prole 90 dias	CTR (9)	$247,56 \pm 16,46$	$0,036 \pm 0,004$	$0,0022 \pm 0,0002$
	Pb (9)	$246,78 \pm 22,50$	$2,30 \pm 0,23$	$0,169 \pm 0,010$

Os valores representam a média  $\pm$  DP. \*O controle de consumo de ração das ratas foi suspenso durante a prenhez e por isso não foi possível calcular o total de Pb ingerido. A taxa de ingestão de Pb foi calculada com base nos cálculos realizados até as ratas atingirem a idade de 72 dias.

Os resultados referentes ao acúmulo de Pb, em cada tecido ou órgão, para os grupos CTR e Pb das ratas submetidas aos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela IV.2.

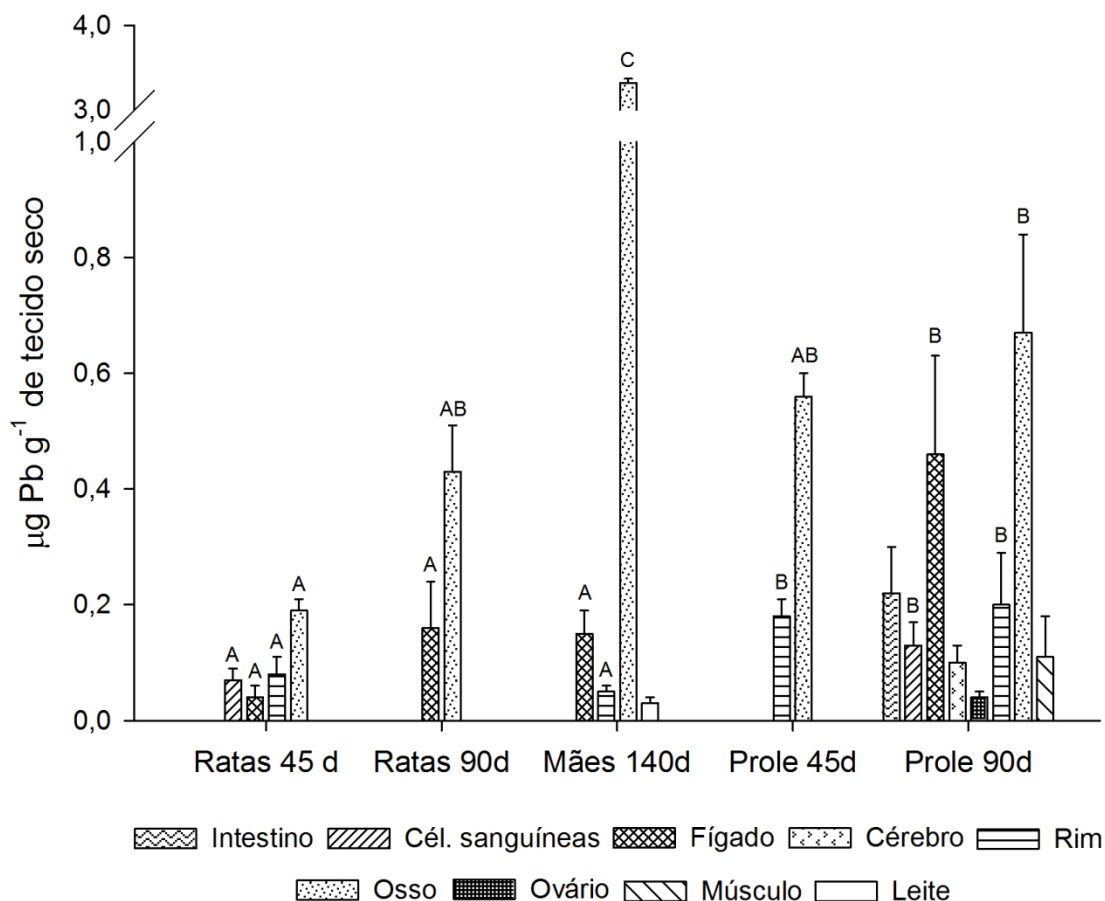
**Tabela IV.2** Concentração de Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas células sanguíneas, nos órgãos e no leite das ratas que se alimentaram de ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por chumbo (Pb), logo após o desmame até completarem 45, 90 e 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias.

		<b>Ratas 45d</b>	<b>Ratas 90d</b>	<b>Mães 140d</b>	<b>Prole 45d</b>	<b>Prole 90d</b>
<b>Intestino</b>	CTR	ND	ND	ND	ND	ND
	Pb	ND	ND	ND	ND	0,22* $\pm$ 0,08
<b>Células sanguíneas</b>	CTR	ND	ND	ND	ND	ND
	Pb	0,07* $\pm$ 0,02	ND	ND	ND	0,13* $\pm$ 0,04
<b>Fígado</b>	CTR	ND	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	ND	0,06 $\pm$ 0,02
	Pb	0,04* $\pm$ 0,02	0,16* $\pm$ 0,08	0,15* $\pm$ 0,04	ND	0,46* $\pm$ 0,17
<b>Cérebro</b>	CTR	ND	ND	ND	ND	ND
	Pb	ND	ND	ND	ND	0,10 $\pm$ 0,03
<b>Ovário</b>	CTR	ND	ND	ND	ND	0,02 $\pm$ 0,00
	Pb	ND	ND	ND	ND	0,04* $\pm$ 0,01
<b>Rim</b>	CTR	0,02 $\pm$ 0,01	ND	ND	ND	ND
	Pb	0,08* $\pm$ 0,03	ND	0,05* $\pm$ 0,01	0,18* $\pm$ 0,03	0,20* $\pm$ 0,09
<b>Ossos</b>	CTR	ND	0,06 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,22	0,10 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,09
	Pb	0,19* $\pm$ 0,02	0,43* $\pm$ 0,08	3,32* $\pm$ 0,48	0,53* $\pm$ 0,04	0,67* $\pm$ 0,17
<b>Músculo</b>	CTR	ND	ND	ND	ND	ND
	Pb	ND	ND	ND	ND	0,11* $\pm$ 0,07
<b>Leite</b>	CTR	-	-	ND	-	-
	Pb	-	-	0,03* $\pm$ 0,01	-	-

Os valores representam a média  $\pm$  DP. ND = não detectado. \* indica diferença significativa em relação ao respectivo CTR ( $P < 0,05$ ).

Os casos nos quais foram constatadas concentrações de Pb significativamente maiores, em relação aos respectivos CTR, estão apresentados na Figura IV.1. As ratas do grupo Pb45d apresentaram maior acúmulo de Pb nas células sanguíneas ( $P = <0,001$ ), no fígado ( $P = 0,003$ ), no rim ( $P = 0,004$ ) e no osso ( $P = 0,018$ ). No grupo Pb90d houve maior acúmulo no fígado ( $P = 0,011$ ) e no osso ( $P = <0,001$ ) e nas mães do grupo Pb140d maior acúmulo de Pb ocorreu no fígado ( $P = 0,004$ ), no rim ( $P = <0,001$ ), no osso ( $P = <0,001$ ) e no leite ( $P = 0,001$ ). Os animais da prole, do grupo PPb 45d, apresentaram maior acúmulo de Pb no rim ( $P = 0,002$ ) e no osso ( $P = <0,001$ ), enquanto do grupo PPb 90d tiveram maior acúmulo no intestino ( $P = <0,001$ ), células

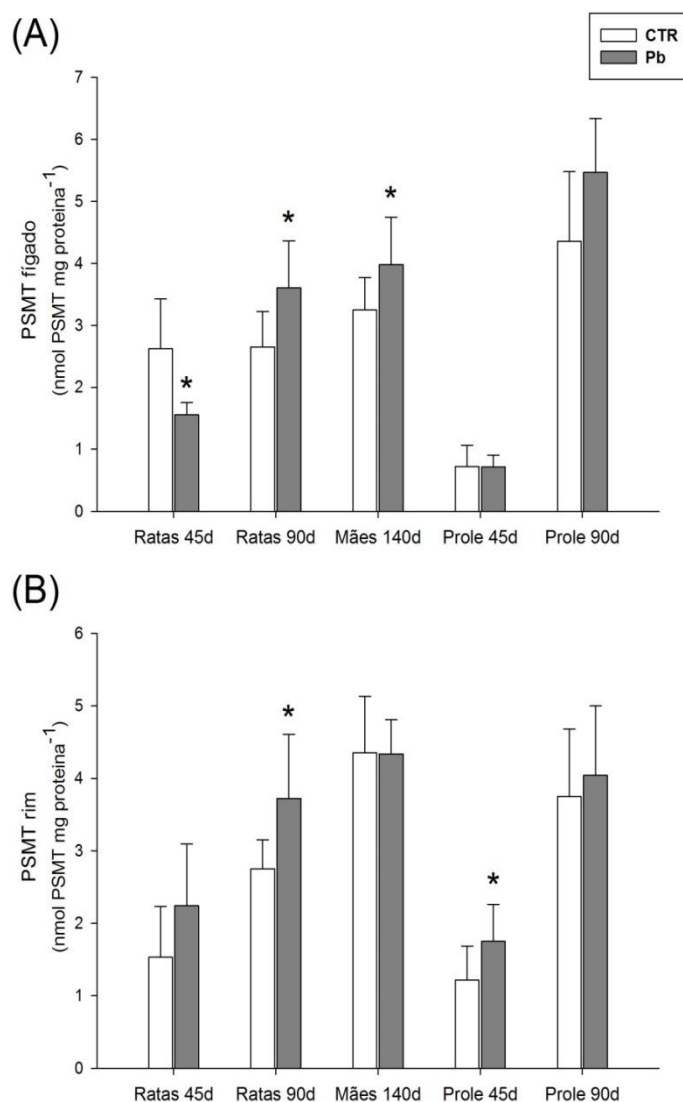
sanguíneas ( $P = <0,001$ ), fígado ( $P = <0,001$ ), ovários ( $P = 0,016$ ), rim ( $P = <0,001$ ), osso ( $P = 0,001$ ) e músculo ( $P = <0,001$ ). Quanto ao resultado encontrado de acúmulo de Pb no leite do grupo Mães 140d, os animais Pb140d apresentaram maior concentração de Pb que os animais CTR140d ( $P = 0,001$ ).



**Figura IV.1** Acúmulo de Pb em tecidos de ratas que ingeriram ração contaminada por Pb na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45, 90 e 140 dias de idade, e na prole do grupo Mães 140d que ingeriram ração contaminada por Pb até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 6-9$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa na concentração de Pb, em um mesmo tecido ou órgão, entre os tratamentos

A concentração de Pb em um mesmo tecido ou órgão foi comparada entre os grupos Pb dos diferentes tratamentos (Fig. IV.1). Os resultados destas comparações mostraram que no grupo Prole 90d a concentração de Pb foi significativamente maior nas células sanguíneas ( $P = 0,014$ ), no fígado ( $P < 0,01$ ) e no rim ( $P < 0,01$ ) destas ratas, em relação aos mesmos tecidos, nos demais grupos. Apenas no osso, a concentração de Pb foi significativamente ( $P < 0,01$ ) maior no grupo Mães 140d, seguida pelos grupos Prole 90d, Prole 45d, Ratas 90d e Ratas 45d.

O conteúdo de PSMT no fígado (Fig. IV.2A) foi significativamente menor ( $P=0,001$ ) nas ratas de 45 dias que ingeriram Pb, em relação ao respectivo grupo CTR. Entretanto, nos animais dos grupos Pb90d e Pb140d o conteúdo de PSMT foi significativamente maior ( $P=0,007$  e  $P=0,038$ , respectivamente) do que nos respectivos grupos CTR. Já no rim (Fig. IV.2B) as ratas dos grupos Pb90d e Prole Pb45d mostraram conteúdo de PMST significativamente maior ( $P=0,007$  e  $P=0,047$ , respectivamente) quando comparado aos respectivos controles.



**Figura IV.2** Conteúdo de PSMT em fígado (A) e rim (B) de ratas que se alimentaram de ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por chumbo (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45 (Ratas 45d), 90 (Ratas 90d) e 140 (Mães 14d) dias e na sua prole até completarem 45 (Prole 45d) e 90 (Prole 90d) dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 6-9$ ). \* indica diferença em relação ao grupo CTR para o mesmo período ( $P < 0,05$ ).

#### IV.4 Discussão

---

Neste trabalho o acúmulo de Pb foi avaliado em órgãos e leite de ratas que ingeriram diariamente alimento contaminado com o metal. A importância de se avaliar os efeitos do Pb após a exposição oral, via alimento, possibilita a compreensão mais realista do prejuízo que este contaminante causa no organismo, já que sua absorção a partir do trato-gastrointestinal é dependente dos diversos nutrientes presentes no alimento (IARC, 2006). Em estudos de toxicidade, o Pb é geralmente administrado em altas doses, via injetável (Taupeau et al, 2001) ou via oral através da água (Josthna et al., 2012), ainda são poucos os trabalhos nos quais o Pb é administrado via alimentação. Recentemente Winiarska-Mieczan (2014) e Winiarska-Mieczan e Kwiecien (2015) comparam o acúmulo e a distribuição de Pb nos órgãos de ratos jovens expostos ao metal, via ingestão de água ( $7 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou de alimento ( $50 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). Entretanto, nestes trabalhos os animais foram alimentados, por até 12 semanas, com uma concentração de Pb no alimento ( $50 \text{ mg Kg}^{-1}$  de alimento) bem superior a concentração utilizada no presente trabalho ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  de ração), que resultou em menores concentrações de Pb nos tecidos, porém o suficiente para causar danos no fígado, rim e células sanguíneas (Capítulos V, VI e VII desta tese).

Em média, na Europa, a exposição alimentar ao Pb em consumidores adultos é de  $0,50 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia, em bebês e crianças é de  $1,32$  e  $1,03 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia, respectivamente (EFSA, 2012). Para estabelecer um limite de ingestão semanal de Pb, a Organização Mundial de Saúde (OMS) avaliou os riscos à saúde, como diminuição do Quociente de inteligência (QI) em crianças e aumento da pressão arterial em adultos e chegou a estabelecer a concentração de ingestão de Pb semanal no valor de  $25 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso (WHO, 2011). Posteriormente, este valor não foi considerado seguro para a saúde dos consumidores e se concluiu que não é possível estabelecer um valor de ingestão de Pb que seja capaz de proteger a saúde (WHO, 2011). No presente trabalho, a ingestão de Pb pelos animais adultos ultrapassou os valores referidos acima, chegando a  $222 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia.

A concentração de Pb nos diferentes órgãos analisados neste estudo mostrou o seguinte padrão: osso > fígado > rim > intestino > células sanguíneas > músculo > cérebro > ovário. O osso foi o tecido que apresentou a maior concentração de Pb acumulado nos animais de todos os tratamentos, confirmando que esse é o principal reservatório de Pb no corpo (Monir et al., 2010). A intoxicação por Pb, direta ou

indiretamente, pode alterar muitos aspectos funcionais das células ósseas (Pounds et al. 1991). O Pb pode promover alterações em hormônios circulantes, particularmente a 1,25-dihidroxi vitamina D3, que modulam as funções destas células. Além disso, o Pb pode perturbar a habilidade das células ósseas em responder à regulação hormonal, como também pode prejudicar a capacidade das células para sintetizar ou segregar outros componentes da matriz óssea, tais como o colágeno ou as sialoproteínas ósseas (osteopontina). E ainda, o Pb pode substituir o cálcio nas vias de sinalização celular, resultando em perda de regulação fisiológica (Pounds et al. 1991).

No presente trabalho ficou bem evidente que o acúmulo de Pb nos ossos das ratas aumentou com a idade, o que reflete um maior período de intoxicação pelo Pb. Isto fica claro quando se avalia o acúmulo nos ossos dos animais dos grupos Pb 45d, Pb 90d e Pb 140d, que tiveram acúmulo nos ossos em ordem crescente, conforme o aumento da idade. Entretanto, ao se comparar os valores nas proles (PPb 45d e PPb 90d) com os valores nas ratas de mesma idade (Pb 45d e Pb90d) verifica-se uma concentração maior de chumbo no tecido ósseo das proles de mães contaminadas. Isto porque estes animais tiveram o primeiro contato com Pb ainda no ventre de suas mães, já que o metal atravessa a barreira placentária pré-natal e, mesmo após o nascimento, o leite materno foi outra fonte de contaminação, que representa um risco para a saúde dos recém-nascidos (Dursun et al., 2015).

Assim, a contaminação do leite materno é um fator que também deve ter contribuído para os valores acumulados de Pb nos ossos das proles, já que a análise do leite das mães 140d mostrou a presença de Pb ( $0,03 \mu\text{g g de leite}^{-1}$ ). Em uma revisão de estudos epidemiológicos em seres humanos, valores muito superiores a este foram detectados em amostras de leite maduro ( $0,15$  a  $6,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e colostro ( $0,48$  a  $14,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ), mostrando que a exposição materna ao Pb é um risco para a saúde de seus filhos (Koyashiki et al., 2010).

Mesmo após cessada a intoxicação por Pb, o osso continua como uma potencial fonte endógena do metal durante a gravidez e lactação, e sua contribuição para o Pb presente no sangue durante o período pós-parto é significativamente maior do que durante a gravidez (Gulson et al., 2003). Já os níveis de Pb no leite materno parecem ser semelhantes ao do plasma, e as crianças amamentadas só estarão em risco se a mãe estiver exposta a elevadas concentrações de contaminante, ou a partir de fonte endógena como os ossos, ou de fonte exógena, como a dieta (Gulson et al., 1998). No presente trabalho, as ratas do grupo mães 140d apresentaram acúmulo de Pb no osso e no leite,

porém o Pb não foi detectado nas células sanguíneas, indicando que o Pb pode ter um fluxo para a placenta, durante a prenhez, e para o leite, após o nascimento, não ficando acumulado nos eritrócitos.

Os resultados obtidos para o acúmulo de Pb nas células sanguíneas referem-se principalmente ao Pb nos eritrócitos, já que os glóbulos brancos representam uma fração muito pequena do volume de sangue total (42 a 47% de hemácias e 1% de leucócitos) (Pries et al., 1996). A concentração de Pb no sangue é aceita como o melhor indicador da concentração deste metal em tecidos moles, refletindo mais uma exposição recente, enquanto a concentração no osso refletiria uma exposição em longo prazo (EFSA, 2010). Ainda, segundo Ahamed e Siddiqui (2007) 99% do Pb no sangue estão acumulados nos eritrócitos. Entretanto, no presente estudo não houve correlação entre o que foi encontrado de Pb nas células sanguíneas e em alguns tecidos moles e no osso. Observamos que nos animais Pb 90d, Pb 140d e PPb 45d a presença de Pb no fígado e no rim foi independente da presença de Pb nos eritrócitos, e mais, a concentração encontrada nestes órgãos foi suficiente para causar danos oxidativos (Capítulos V e VII). Já que o plasma é o componente do sangue no qual o Pb está livre para atravessar as membranas das células e causar toxicidade nos órgãos (Tsaih et al., 1999), sugerimos que por alguns períodos de exposição pode haver um fluxo maior entre o plasma e os tecidos moles e osso, com o Pb não se acumulando nos eritrócitos.

O acúmulo de Pb nos órgãos foi dependente da idade e geração dos animais, e isto fica evidente ao observamos os animais PPb 90d que apresentaram Pb em todos os órgãos analisados. Além dos ossos, fígado, rim e células sanguíneas que apresentarem Pb, assim como outros grupos estudados, estes animais foram os únicos que apresentaram acúmulo de Pb no intestino, músculo, cérebro e ovário. O impacto deste Pb acumulado à saúde destes animais pode ser desde infertilidade até alterações neurológicas. A presença de Pb no intestino destes animais não reflete sua excreção pelo trato-gastrointestinal, já que após ser absorvido o Pb é eliminado pela bile (ATSDR, 2005), e através da circulação entero-hepática, o metal pode retornar ao organismo. Outra possível consequência do acúmulo de Pb nestes animais seria sobre a reprodução, que pode ficar comprometida com a presença do metal no ovário. Sabe-se que as mulheres são mais vulneráveis a infertilidade pelo efeito do Pb nas células reprodutivas, e se a gestação ocorrer, o Pb pode provocar aborto espontâneo e parto prematuro, e durante o período gestacional, pode afetar as fases de desenvolvimento do feto (Pal et al., 2015). A preocupação da exposição ao Pb causando desordens neurológicas,

principalmente em crianças, também é foco de vários estudos (Lidsky e Schneider, 2003; Boucher et al., 2012; Xu et al., 2015). Assim, as ratas do grupo PPb 90d, que têm a maior idade na segunda geração, podem sofrer as consequências do metal no cérebro, podendo levar a doenças em uma idade mais avançada. Já foi evidenciado que a exposição ao Pb eleva a ocorrência de Alzheimer em cérebros de idosos (Bolin et al., 2006).

As MT são particularmente importantes à proteção celular por regular a disponibilidade de alguns metais como Cu, Zn e Cd, mas outros metais, como o Fe e Pb, também podem induzir as MT (Johnson, 1998). Entretanto, se a presença da MT no órgão está associada ao aumento do metal acumulado no mesmo órgão, isto não foi observado nos grupos estudados. O conteúdo de PSMT foi registrado em tecidos de animais que não apresentaram acúmulo de Pb, como o rim dos animais Pb 90d, onde houve aumento de PSMT, mas não foi detectado Pb. Ao contrário, o fígado e rim dos animais PPb 90d não apresentaram aumento de PSMT, mas ocorreu acúmulo de Pb nestes órgãos, não ficando claro a atuação das MT frente à exposição de Pb no presente estudo. Com diferentes concentrações de Pb, Chidinma et al. (2015) observaram flutuações na expressão da MT em fígado de camundongos, mas houve aumento da expressão da proteína apenas quando os animais foram expostos a efluentes industriais, sugerindo que sua maior expressão seja pela presença de outros metais. De qualquer forma, o que se conhece é que o Pb é um fraco indutor da MT, mas quando esta proteína está presente por indução prévia pelo Cd ou Zn, o Pb pode ligar-se a MT, e assim, exibir seu efeito protetor contra a toxicidade deste metal (Gonick, 2011). A disparidade entre o conteúdo de PSMT e a concentração de Pb nos órgãos analisados neste estudo indica que há necessidade de melhor esclarecimento sobre o que ocasionou uma dada alteração, ou a ausência de variação, nas PSMT.

Em conclusão, este estudo mostrou que ao ingerir diariamente a concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  de alimento, o Pb acumula-se no osso, aumentando sua concentração com o aumento da idade e exposição pré-natal. No fígado, rim e células sanguíneas, parece haver uma alternância do Pb, conforme aumenta a idade de exposição, porém na maior idade da segunda geração, o Pb acumulou-se em maior número de órgãos. As mães expostas diariamente ao Pb contaminaram seu leite, expondo sua prole ao metal, através da amamentação. Não houve relação direta entre o conteúdo de PSMT e o acúmulo de Pb nos órgãos, nos animais em diferentes idades ou gerações. Desta forma,

pode-se concluir que com o aumento da idade e com a exposição pré-natal, os organismos tornam-se mais susceptíveis aos danos causados pela toxicidade do metal.

#### **IV.5 Referências bibliográficas**

---

- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57-64.
- Anderson, M.L., D'Almeida, V., KO, G.M., Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S., 2004. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2005. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Public Health Statement, Lead, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2012. Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). Lead toxicity. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- Beier, E.E., Sheu, T.J., Dang, D., Holz, J.D., Ubayawardena, R., Babij, P., Puzas, J.E., 2015. Heavy metal ion regulation of gene expression: mechanisms by which lead inhibits osteoblastic bone forming activity through modulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *JBC Papers in Press*. Published on May 14, 2015 as Manuscript M114.629204. <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.629204>>
- Bolin, C.M., Basha, R., Cox, D., Zawia, N.H., Maloney, B., Lahiri, D.K., Pelaez, F.C., 2006. Exposure to lead (Pb) and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. *FASEB J.* 1-6.

- Boucher, O., Jacobson, S.W., Plusquellec, P., Dewailly, E., Ayotte, P., Forget-Dubois, N., Jacobson, J., Muckle, G., 2012. Prenatal methylmercury, postnatal lead exposure, and evidence of attention deficit/hyperactivity disorder among inuit children in Arctic Québec. *Environ. Health. Persp.* 120, 1456-1461.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2010. Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. U.S. Department of Health and Human Services.
- Chidinma, N.C., Adewale, A., Chiaka, A., 2015. Differential expression of metallothionein-1 and cytochrome p450-2a5 (cyp2a5) in mice in response to lead acetate exposure and industrial effluents in Ibadan, Nigeria Differential expression of metallothionein-1 and cytochrome p450-2a5 (cyp2a5) in mice in response to lead acetate exposure and industrial effluents in Ibadan, Nigeria. *Toxicol. Ind. Health.* 1-7. DOI: 10.1177/0748233715594107.
- Dai, S., Yin, Z., Yuan, G., Lu, H., Jia, R., Xu, J., Song, X., Li, L., Shu, Y., Liang, X., He, C., Lv, C., Zhang, W., 2013. Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 1207–1216.
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R., 2015. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotox. Environ. Saf.* 113, 145-151.
- Dural, M., Goksu, M.Z.L., Ozak, A.A., 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chem.* 102, 415-421.
- Dursun, A., Yurdakok, K., Yalcin, S.S., Tekinalp, G., Aykut, O., Orhan, G., Morgil, G.K., 2015. Maternal risk factors associated with lead, mercury and cadmium levels in umbilical cord blood, breast milk and newborn hair. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 1-8. DOI: 10.3109/14767058.2015.1026255
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J.* 8, 1570.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10, 2831.

- El-Moselhy, Kh.M., Othman, A.I., El-Azem, H.A., Metwally, M.E.A., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 1, 97-105.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014. The state of world fisheries and aquaculture - Opportunities and challenges. Rome.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 47-58.
- Gonick, H.C., 2011. Lead-binding proteins: a review. *J. Toxicol.* 1-10.
- Gulson, B.L., Jameson, C.W., Mahaffey, K.R., Mizon, K.J., Patison, N., Law, A.J., Korsch, M.J., Salter, M.A., 1998. Relationships of lead in breast milk to lead in blood, urine, and diet of the infant and mother. *Environ. Health Persp.* 106, 667-674.
- Gulson, B.L., Mizon, K.J., Korsch, M.J., Palmer, J.M., Donnelly, J.B., 2003. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation-a summary of long-term research. *Sci. Total Environ.* 303, 79-104.
- Horiguchi, H., Oguma, E., Sasaki, S., Miyamoto, K., Ikeda, Y., Mahida, M., Kayama, F., 2004. Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium-exposed female Japanese farmers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 114–123.
- IARC (Internacioanl Agency for Research on Cancer), 2006. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Summaries & evaluations: Inorganic and organic lead compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans), Vol. 87.
- Johnson, F.M., 1998. The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res.* 410, 123-140.
- Josthna, P., Geetharathan, T., Sujatha, P., Deepika, G., 2012. Accumulation of lead and cadmium in the organs and tissues of albino rat. *Int. J. Pharm. & Life Sci.* 3, 2186-2189.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- Koyashiki, G.A.K., Paoliello, M.M.B., Tchounwou, P.B., 2010. Lead levels in human milk and children's health risk: a systematic review. *Rev. Environ. Health.* 25, 243-253.

- Leung, H.M., Leung, A.O.W., Wang, H.S., Ma, K.K., Liang, Y., Ho, K.C., Cheung, K.C., Tohidi, F., Yung, K.K.L., 2014. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 235-245.
- Lidsky, T.I., Schneider, J.S., 2003. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain.* 126, 5-19.
- Liu, J.L., Xu, X.R., Ding, H.Z., Peng, J.X., Jin, M.H., Wang, Y.S., Hong, Y.G., Yue, W.Z., 2015. Heavy metals in wild marine fish from South China Sea: levels, tissue and species specific accumulation and potential risk to humans. *Ecotoxicology.* DOI 10.1007/s10646-015-1451-7.
- Monir, A.U., Gundberg, C.M., Yagerman, S.E., van der Meulen, M.C.H., Budell, W., Boskey, A.L., Dowd, T.L., 2010. The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 Mice. *Bone.* 47, 888-894.
- Pal, M., Sachdeva, M., Gupta, N., Mishra, P., 2015. Lead exposure in different organs of mammals and prevention by Curcumin – Nanocurcumin: a Review. *Biol. Trace. Elem. Res.* DOI 10.1007/s12011-015-0366-8.
- Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 163, 93–100.
- Pounds, J.G., Long, G.J., Rosen, J.F., 1991. Cellular and molecular toxicity of lead in Bone. *Environ. Health Persp.* 91, 17-32.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., Gaehtgens, P., 1996. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 32, 654-667.
- Taupeau, C., Taupeau, K., Nomé, F., Lefèvre, B., 2001. Lead Accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod. Toxicol.* 15, 385-391.
- Tsaih, S.W., Schwartz, J., Lee, M.L.T., Amarasiriwardena, C., Aro, A., Sparrow, D., Hu, H., 1999. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. *Environ. Health Persp.* 107, 391-396.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Donderob, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.*, 44, 69-84.

- Winiarska-Mieczan, A., 2014. Cumulative rate and distribution of Cd and Pb in the organs of adult male Wistar rats during oral exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 751–760.
- Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., 2015. The effect of exposure to Cd and Pb in the form of a drinking water or feed on the accumulation and distribution of these metals in the organs of growing Wistar rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, DOI 10.1007/s12011-015-0414-4.
- Xu, J., Hu, H., Wright, R., Sanchez, B.N., Schnaas, L., Bellinger, D.C., Park, S.K., Martinez, S., Hernández-Avila, M., Téllez-Rojo, M.M., Wright, R.O., 2015. Prenatal lead exposure modifies the impact of maternal self-esteem on children's inattention behavior. *J. Pediatr.* 167, 435-441.
- WHO, (World Health Organization), 2011. Evaluation of certain food additives and contaminants. Seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

## Capítulo V

### **Ingestão diária de chumbo em ratas Wistar de diferentes idades: efeitos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos**

---

*Este capítulo foi submetido para publicação no periódico Environmental Toxicology and Pharmacology, com o título “Daily intake of lead in Wistar rats at different ages: biochemical, genotoxic and physiological effects”.*

## V.1 Introdução

---

O chumbo (Pb) é um metal tóxico e cumulativo que, em níveis relativamente baixos, pode afetar várias funções levando a alterações neurológicas, hematológicas, gastrointestinais, cardiovasculares e renais (Fewtrell et al., 2003). Seu amplo uso tem causado problemas de contaminação ambiental em diversas regiões do mundo (Eades et al., 2002; Paoliello e Capitini, 2005; Mielke et al., 2013). Há vários relatos de contaminação de corpos d'água por Pb, tornando os peixes susceptíveis a este contaminante (Rahman et al., 2012; Leung et al., 2014). O acúmulo de Pb na carne de diferentes espécies de peixes já foi observado em diversos países, como Estados Unidos, Egito, Espanha, Eslováquia, Croácia (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). No Brasil já foi constatada a presença de Pb na carne de peixes de diferentes níveis tróficos, variando entre 0,01 a 7,98 mg Pb Kg<sup>-1</sup> (Terra et al., 2008).

A ingestão de peixes é uma rota importante de exposição ao Pb, considerando-se que eles podem acumular quantidades consideráveis do metal em seus tecidos, especialmente no músculo, que representa a principal fonte de Pb na dieta da população humana (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). No Brasil, o consumo de peixe foi de 17,3 Kg *per capita* no ano de 2013 (MPA, 2013), enquanto que na Europa, o consumo de peixe em 2010 foi de 22 Kg *per capita*, mas com estimativa de 24 Kg *per capita* para o ano de 2030 (FAO, 2007).

Em mamíferos a absorção do Pb ocorre no duodeno, por meio do transportador de metal divalente 1 (DMT1) que transporta até 8 metais, incluindo o Fe<sup>2+</sup> e o Pb<sup>2+</sup> (Garrick et al., 2003). O Pb após ser absorvido é rapidamente distribuído para o plasma, eritrócitos, tecidos moles e ossos. As concentrações de Pb em tecidos moles são mais elevadas no fígado e rins, e menores no cérebro. Embora no plasma o Pb compreenda apenas de 0,2 a 0,3% das concentrações no sangue total, é o plasma responsável por conter o Pb disponível para distribuição e excreção do organismo (IARC, 2006). Os adultos absorvem de 5 a 15% do Pb da dieta e retêm 5% no organismo, dos quais 94% ficam retidos nos ossos; já as crianças absorvem 42% e retêm cerca de 32%, dos quais 73% ficam retidos nos ossos (Liu et al., 2008). As crianças absorvem de 4 a 5 vezes mais Pb que os adultos, e os bebês e crianças pequenas são mais susceptíveis aos efeitos adversos deste metal. Isto porque a absorção do Pb pelo trato gastrointestinal é maior e a barreira hematoencefálica ainda não está totalmente desenvolvida (WHO, 2010).

A exposição ao Pb é responsável por 0,6% da ocorrência de doenças no mundo, com maior incidência em regiões em desenvolvimento (UNEP, 2008). Os efeitos do Pb na saúde humana já são conhecidos há séculos, porém nas últimas décadas estão surgindo muitas informações sobre os efeitos de níveis relativamente baixos de exposição, causando danos ao organismo (Allouche et al., 2011). Algumas doenças, como retardo mental leve em crianças e pressão arterial elevada em adultos, resultam da contaminação crônica por Pb (WHO, 2009). Outros danos causados por este metal já foram relatados, tais como: alteração no perfil de glicose (Feldman et al., 2011), alteração nos parâmetros hematológicos (Hegazy et al., 2010), ocorrência de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em diferentes órgãos (Patra et al., 2001; Harishekar e Kiran, 2011) e danos no DNA de células sanguíneas (Danadevi et al., 2003).

Os impactos na saúde de quem ingere alimentos derivados de animais contaminados devem ser constantemente monitorados (Arnold et al., 2005), por isto a necessidade de estudos sobre a ação do Pb em diferentes funções no organismo, em diferentes idades. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão do Pb, utilizando biomarcadores que representem diferentes níveis de organização biológica, como bioquímicos, genotóxicos e metabólicos, em ratas de diferentes idades alimentadas diariamente com ração contaminada por Pb, na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup> de ração, até completarem 45 e 90 dias de vida.

## V.2 Material e métodos

---

### V.2.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Logo após ocorrer o desmame (22 dias), animais pesando  $37 \pm 5,58$  g (n=40) foram transferidos para o biotério de Ciências Fisiológicas, onde foram alojados individualmente em gaiolas em condições padrão ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclo claro/escuro de 12h:12h). Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. A pesagem dos animais e a verificação do consumo de ração foram realizadas 3 vezes na semana. Os valores da ração consumida foram obtidos pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e o resto de ração dentro da gaiola e resíduos na bandeja abaixo da gaiola. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para

Animais Experimentais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL – Processo: 34715.2011.16).

### **V.2.2** *Delineamento experimental*

Foram utilizados 4 grupos de ratas (n = 10 em cada), 2 grupos de 45 dias (Ratas 45d): CTR45d e Pb45d e 2 grupos de 90 dias de idade (Ratas 90d): CTR90d e Pb90d. Os animais iniciaram a ingestão da ração manipulada logo após ocorrer o desmame, com 22 dias de idade. Os animais foram alimentados com a ração manipulada até completarem 45 (CTR45 e Pb45) ou 90 dias de idade (CTR90 e Pb90). O grupo CTR ingeriu a ração sem a adição de Pb, e o grupo Pb ingeriu a ração contaminada com Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Para ratas, a idade de 45 dias corresponde ao período da puberdade e de 90 à idade adulta, quando já pode ocorrer o acasalamento (Anderson et al., 2004).

### **V.2.3** *Amostragem*

Os animais foram pesados e a eutanásia ocorreu através de exsanguinação com o animal sob efeito de anestesia geral (40 mg.Kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico), e sem jejum prévio. O sangue foi coletado, a partir da veia cava inferior, e uma alíquota foi utilizada para análise dos parâmetros hematológicos e para a realização do ensaio alcalino do cometa. Outra alíquota de sangue total foi centrifugada (1870 g, 15 min, centrífuga Hsiangtai, modelo MCD-2000) e o plasma foi utilizado para a determinação das concentrações de glicose e insulina. O cérebro foi retirado para análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). O fígado foi retirado para análise do conteúdo de glutathiona (GSH) e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST), assim como a ocorrência de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (PCO).

### **V.2.4** *Análises plasmáticas*

A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase com kit comercial (Doles Reagentes Ltda, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA) a 505 nm. A insulina plasmática foi dosada por radioimunoensaio (RIA) (Scott et al., 1981) em um contador de emissão de partículas gama (Wizard<sup>2</sup> Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer<sup>®</sup>, Shelton/CT, USA), sendo utilizado como padrão insulina de rato, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis/MO, USA) e insulina humana recombinante marcada com <sup>125</sup>I

(PerkinElmer<sup>®</sup>, Shelton/CT, USA). O cortisol plasmático foi medido por ensaio imunoenzimático com a utilização de *kit* comercial (DRG Internacional, Inc., USA) baseado no princípio da ligação competitiva. A absorbância foi determinada em leitora de microplacas (450 nm, ELX 800, BioTek, USA).

#### **V.2.5 Análises hematológicas**

Para a contagem do número de eritrócitos por mm<sup>3</sup> de sangue (RBC), o sangue foi adicionado a tampão formol citrato e analisado em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. Para verificação do hematócrito (Htc), o sangue de cada animal foi colocado em um tubo capilar e centrifugado (1200 g; 5 min) em centrífuga de micro-capilar (Luguimac – S. R. C., modelo LC-5, Argentina) para a separação das células e do plasma, e a leitura foi feita em cartela padronizada. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi estimado pelo método colorimétrico da cianometemoglobina (kit comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil) e medido a 540 nm em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido).

#### **V.2.6 Análises bioquímicas no cérebro**

Amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 8,0; 1:10 p/v) e centrifugadas (10000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da AChE. A determinação da atividade da enzima foi realizada segundo o método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa et al., (2007), a partir da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com o reagente de cor contendo DTNB (0,5 mM), em espectrofotômetro a 415 nm. A atividade da AChE foi expressa em nmol DTNB min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> e a concentração de proteína do homogenato foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### **V.2.7 Análises bioquímicas no fígado**

A determinação do glicogênio foi realizada segundo método descrito por Bidinotto et al. (1997). Para tanto, uma alíquota de tecido hepático foi incubada com KOH 6,0 N a 100° C por 5 min. Após a dissolução do tecido, foi adicionado etanol e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%), centrifugado e o precipitado foi ressuscitado com água destilada. A dissolução foi analisada quanto ao seu teor de açúcares redutores totais, pelo método hidrolítico ácido

de Dubois et al. (1956), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 480 nm.

Amostras de fígado foram pesadas, homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para análises dos biomarcadores de estresse oxidativo. A concentração de proteína do homogenato foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A concentração de glutathiona (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), por meio da reação da glutathiona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em 412 nm. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por meio da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo superóxido (resultante da oxidação da xantina pela xantina oxidase), em 550 nm e foi expressa em U SOD mg proteína<sup>-1</sup>, onde U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da catalase (CAT) foi avaliada a partir da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com base na diminuição da absorbância a 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi avaliada de acordo com a metodologia de Hopkins e Tudhope (1973) baseado na oxidação de NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em nmol de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. A atividade da glutathiona redutase (GR) foi estimada de forma indireta, pela redução do NADPH promovida pela GSSG (dissulfeto de glutathiona), em 340 nm e expressa em nmol min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup> (Carlberg e Mannervik, 1975). A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976). A atividade da enzima foi expressa em nmol de CDBN conjugado min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>.

A peroxidação lipídica foi estimada a partir da produção de malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. O MDA foi determinado pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) que mede a quantidade de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 60°C, pela leitura de fluorescência (ex/em: 535nm/590 nm), seguindo a metodologia descrita por Federici et al. (2007). Para avaliação de danos oxidativos em proteínas foi empregado o método

descrito por Levini et al. (1994), que se baseia na reação do 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas (PCO), formando dinitrofenil-hidrazonas, que podem ser detectadas a 348-370 nm.

#### **V.2.8** *Ensaio do Cometa em infócitos*

O ensaio alcalino do cometa com linfócitos foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações descritas por Ramsdorf et al. (2009). Apenas as amostras de sangue que apresentaram viabilidade celular superior a 80%, determinadas pelo método de exclusão por azul de Trypan, foram utilizadas no ensaio do cometa. Após a amostragem, uma alíquota de sangue misturado com soro bovino fetal (1:10) foi adicionada a agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal e as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: a) lise: 1h, a 4°C, protegido de luz, em solução de lise (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-100 1 mL, pH 10.0); b) desnaturação do DNA: 40 min, no escuro, em um tampão de eletroforese (NaOH 0.3 N, EDTA 1mM, pH > 13); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1V cm<sup>-1</sup> e d) neutralização: três lavadas por 5 min cada com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram fixadas com etanol absoluto e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas. Posteriormente, as lâminas coradas com gelRed (Uniscience®) foram analisadas em microscópio Leica (DM 2500), adaptado para fluorescência/epifluorescência, equipado com filtro de excitação azul (450-490 nm) e um filtro de barreira de 515 nm com magnificação de 1000X. Todas as lâminas foram analisadas em teste-cego, sendo avaliados 100 nucleóides por animal. A extensão dos danos no DNA foi quantificada pelo comprimento da cauda formada pela migração dos fragmentos de DNA. Os danos foram visualmente classificados em 5 classes de cometa: classe 0 – representando células sem danos (cometa sem cauda perceptível) e classes de 1 a 4 – representando tamanhos de cauda progressivamente maiores, de acordo com Collins et al. (2008). O escore de danos no DNA foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe de cometa pelo valor da classe.

#### **V.2.9** *Análise estatística*

As comparações dos parâmetros avaliados para ratas em cada uma das idades (45 e 90 dias) foram feitas entre os respectivos grupos CTR e Pb, utilizando o teste *t* de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição de dados (normalidade e

homogeneidade da variância). Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ . Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.

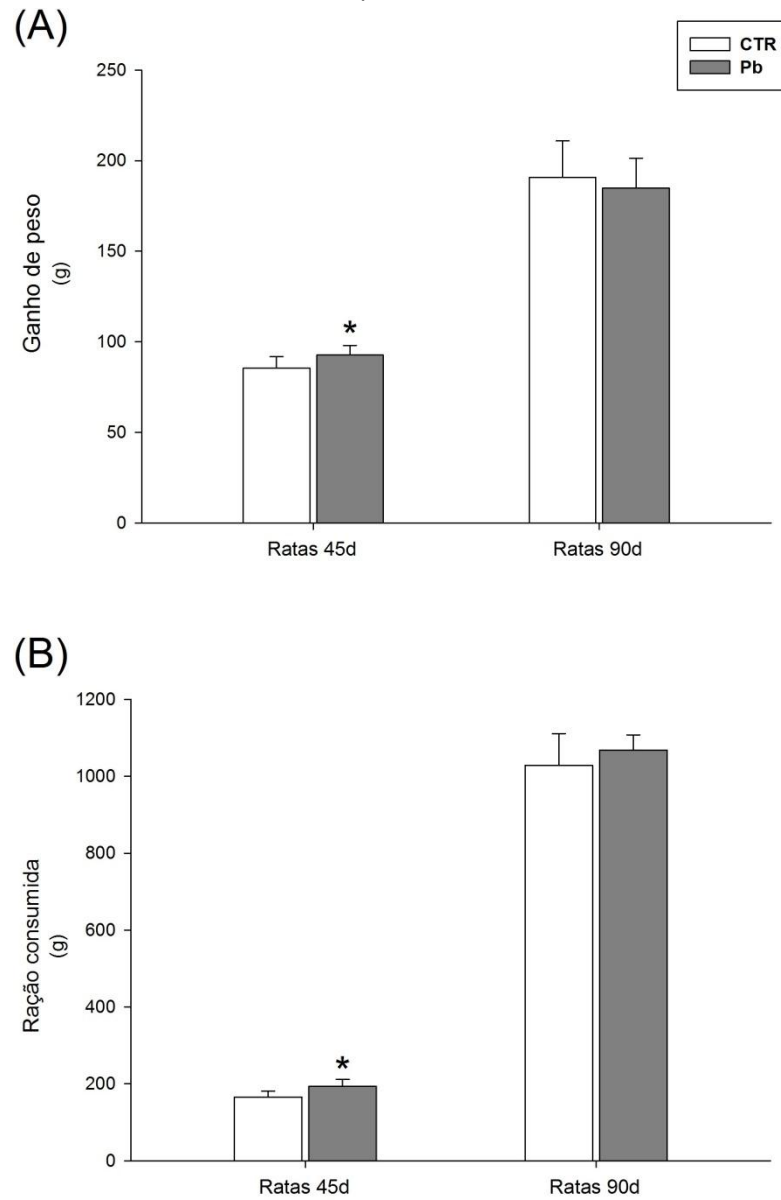
### **V.3 Resultados**

---

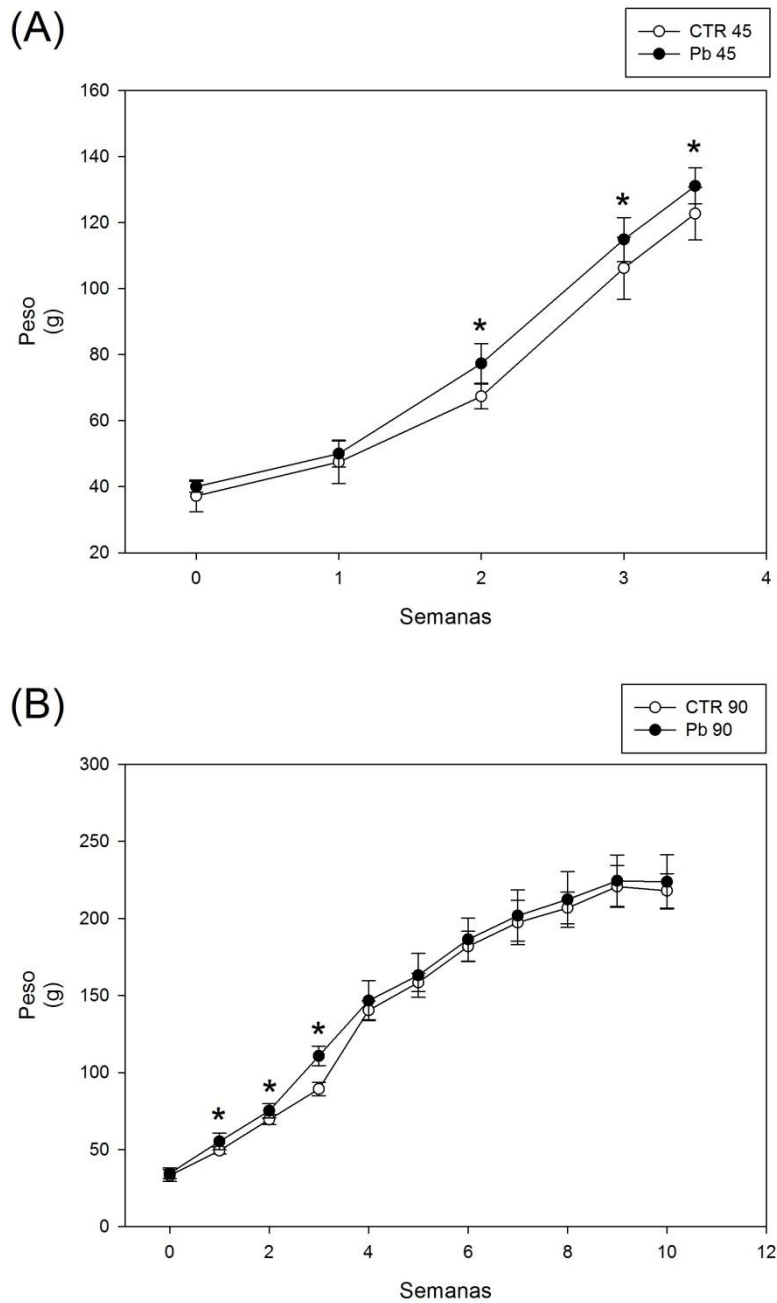
#### **V.3.1** *Ganho de peso, consumo de ração e curva de crescimento*

Os animais do grupo Pb45 apresentaram ganho de peso (Fig V.1A) e consumo de ração (Fig. V.1B) significativamente maiores que o respectivo CTR. Já nos animais com 90 dias não foram observadas variações significativas nestes parâmetros entre o grupo Pb e o respectivo CTR. A análise das curvas de crescimento indicou que o peso dos animais do grupo Pb45 aumentou mais na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana, em relação ao CTR45 (Fig. V.2A). As ratas do grupo Pb90 também ganharam mais peso até a 3<sup>a</sup> semana (Fig. V.2B), após esse período não houve mais diferença na variação de peso entre os grupos Pb e CTR.

## Capítulo V



**Figura V.1** Ganho de peso (A) e ração consumida (B) por ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

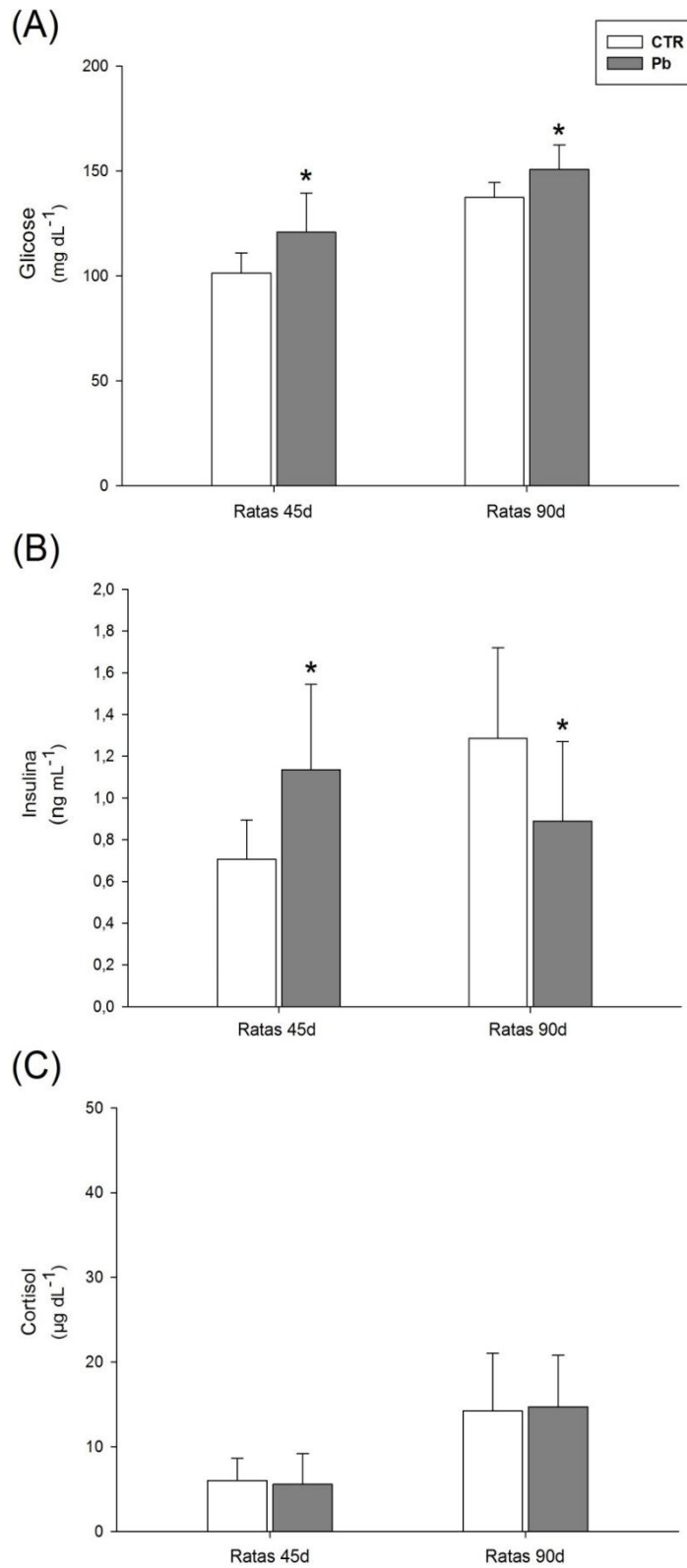


**Figura V.2** Curva de crescimento de ratos ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 45 dias de vida (A) e 90 dias de vida (B). As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 10). \* indica diferença em relação às ratos do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

**V.3.2** *Glicose, insulina e cortisol plasmático*

Os valores de glicose plasmática (Fig. V.3A) foram significativamente maiores nos animais dos grupos Pb45 ( $P = 0,015$ ) e Pb90 ( $P = 0,029$ ) em relação aos respectivos grupos CTR. Os valores de insulina plasmática (Fig. V.3B) foram significativamente maiores no grupo Pb45 ( $P = 0,008$ ) em relação ao respectivo CTR, porém foram significativamente menores no grupo Pb90 em relação ao respectivo grupo CTR ( $P = 0,009$ ). Não houve diferença significativa nos valores de cortisol (Fig. V.3C) para ambos os grupos quando comparado aos seus respectivos grupos CTR.

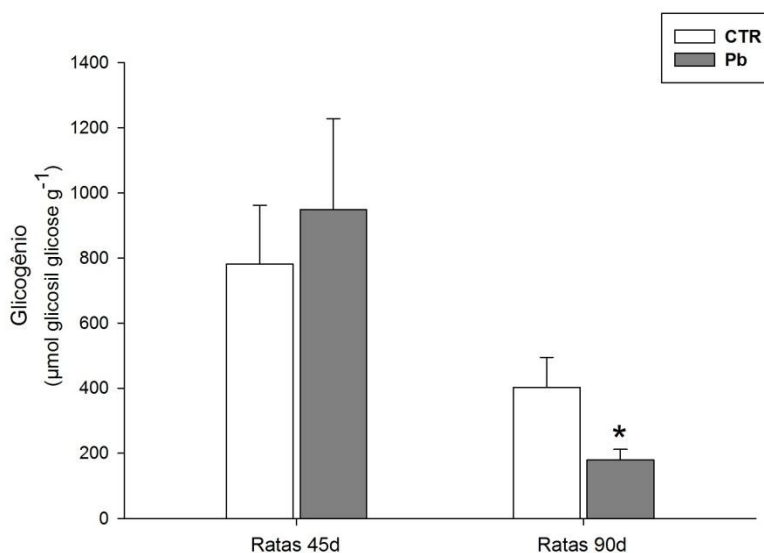
## Capítulo V



**Figura V.3** Glicose plasmática (A), insulina (B) e cortisol (C) de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 7-9). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

### V.3.3 Conteúdo de glicogênio no fígado

O conteúdo de glicogênio hepático (Fig. V.4) apresentou-se significativamente menor nas ratas do grupo Pb90 em relação ao seu grupo CTR ( $P = <0,001$ ).

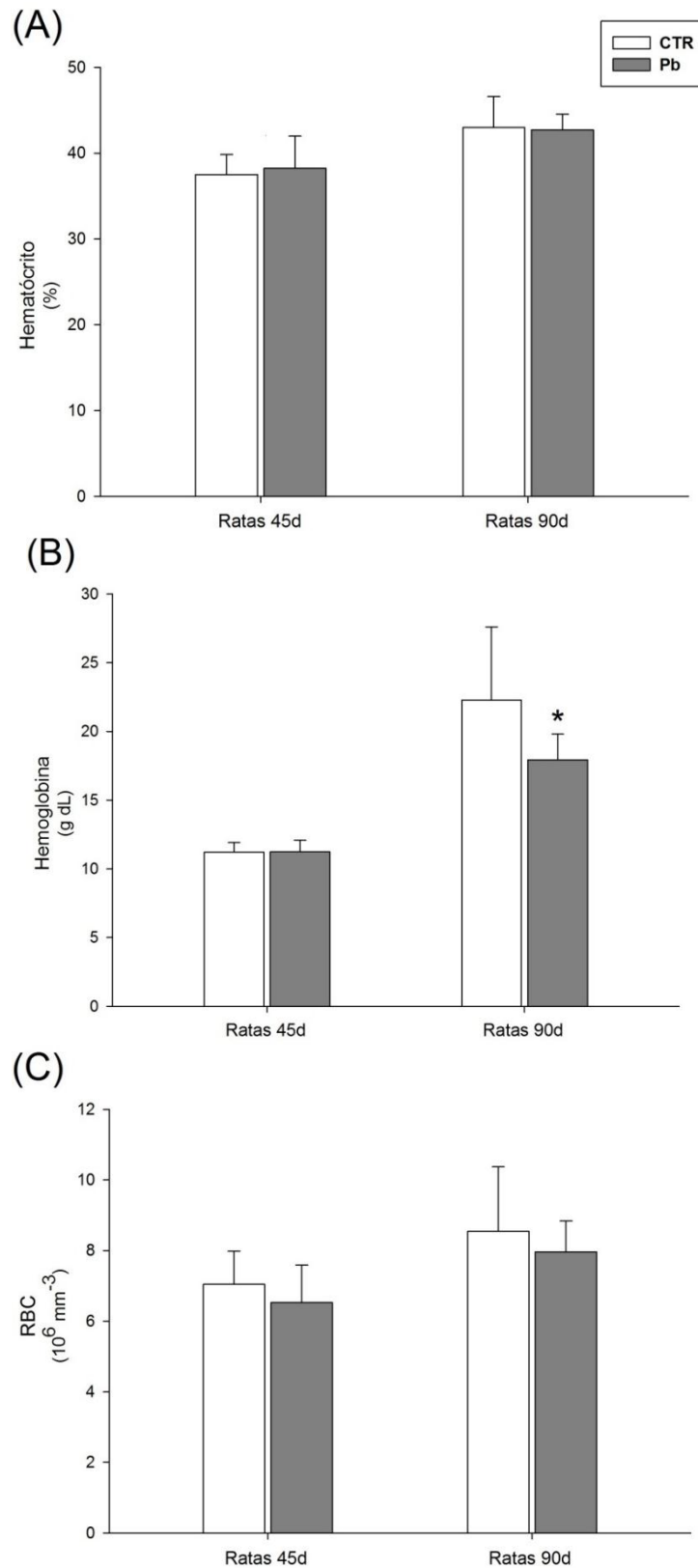


**Figura V.4** Glicogênio hepático de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 7-10$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

### V.3.4 Htc, Hb e RBC

Os parâmetros hematológicos Htc (Fig. V.5A), Hb (Fig. 5B) e RBC (Fig. 5C) não variaram significativamente nos animais do grupo Pb45 em relação ao grupo CTR. Entretanto, nas ratas de 90 dias o grupo Pb apresentou valor de Hb significativamente menor que o respectivo grupo CTR ( $P = 0,047$ ), enquanto os demais parâmetros (Htc e RBC) permaneceram inalterados.

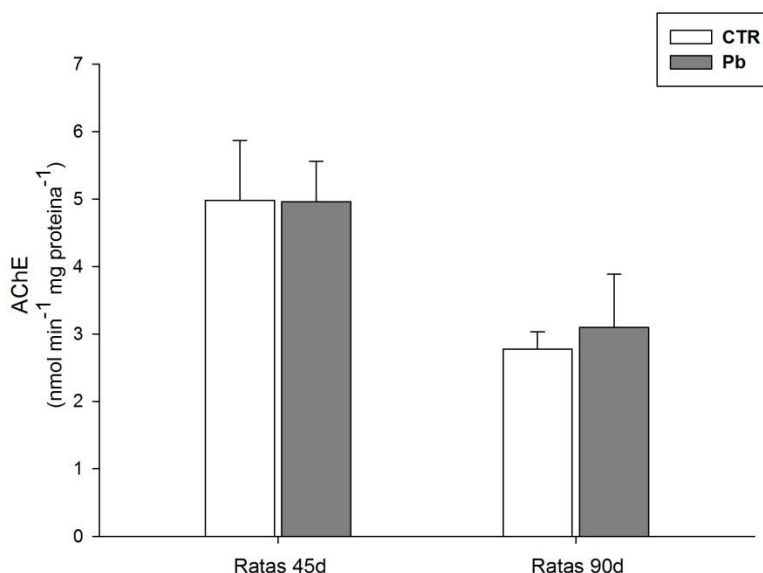
## Capítulo V



**Figura V.5** Hematócrito (A), Hemoglobina (B) e número de células vermelhas (C) de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 8-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

### V.3.5 Atividade da enzima AChE no cérebro

A atividade da AChE (Fig V.6) no cérebro das ratas dos grupos Pb45 e Pb90 não apresentou alteração significativa quando comparada com seus respectivos grupos CTR.



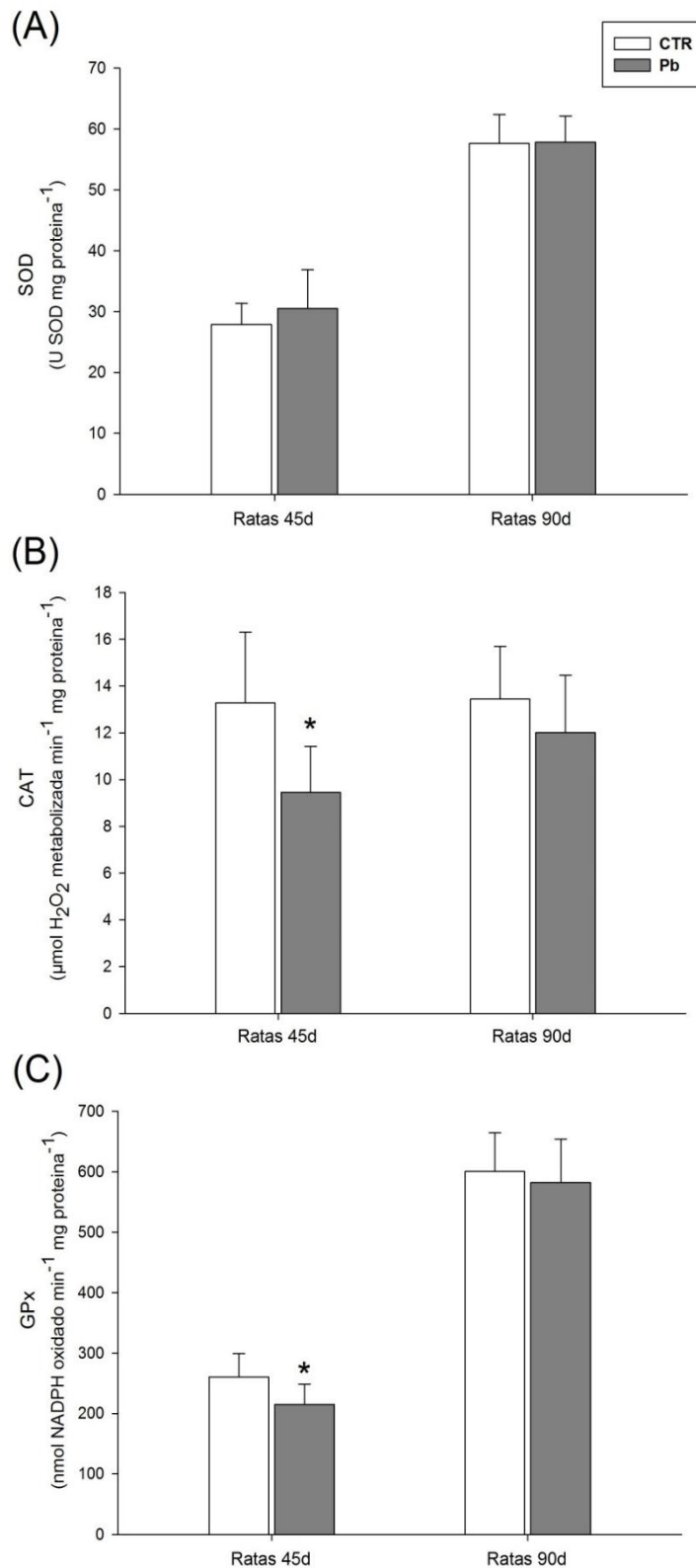
**Figura V.6** Atividade da AChE em cérebro de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 5). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

### V.3.6 Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado

Em relação às enzimas antioxidantes primárias SOD (Fig. V.7A), CAT (Fig. V.7B) e GPx (Fig. V.7C), foi observado que o grupo Pb45 apresentou valores significativamente menores de CAT (P = 0,022) e GPx (P = 0,020) em relação aos respectivos CTR. Já os valores de SOD, nos grupos de Pb45 e Pb90, e de CAT e GPx, no grupo Pb90, permaneceram inalterados em relação aos respectivos CTR.

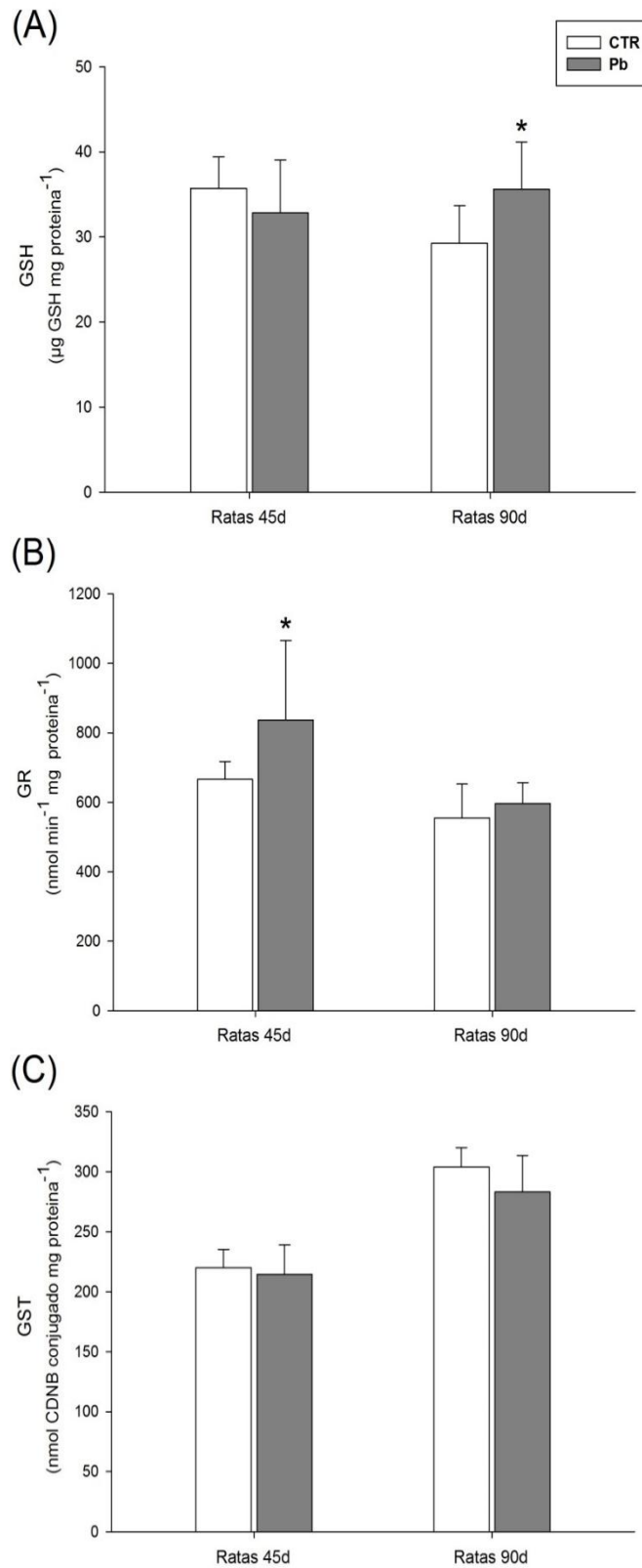
O conteúdo de GSH (Fig. V.8A) foi significativamente maior no grupo Pb90 em relação ao CTR90 (P = 0,013). Os animais do grupo Pb45 não apresentaram alteração significativa no conteúdo de GSH, no entanto apresentaram atividade da GR (Fig.V.8B) significativamente maior (P = 0,030), em relação ao CTR. A atividade da GR no grupo de 90 dias e a atividade da GST (Fig. V.8C) nos grupos de 45 e 90 dias permaneceram inalteradas em relação aos respectivos CTR.

## Capítulo V



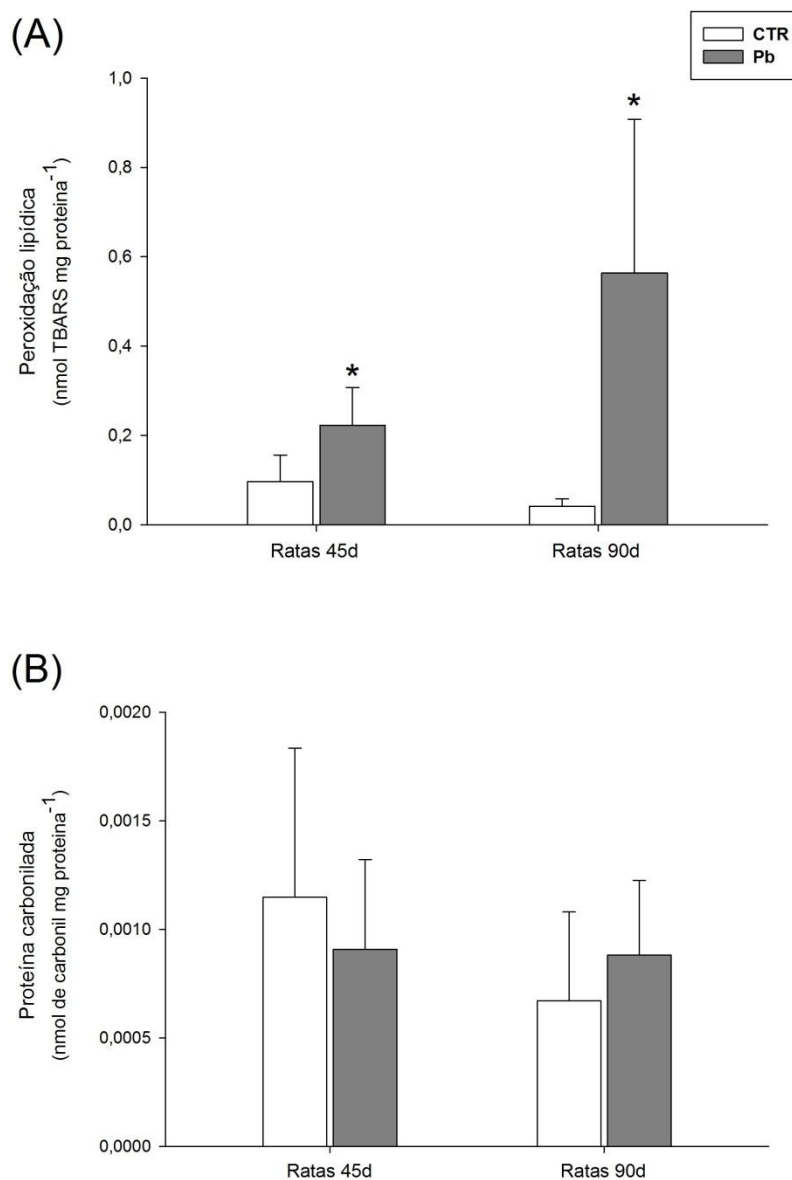
**Figura V.7** Atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em fígado de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 7-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade (P < 0,05).

## Capítulo V



**Figura V.8** Conte\u00fado de GSH (A), atividade da GR (B) e atividade da GST (C) em f\u00edgado de ratas que ingeriram ra\u00e7\u00e3o n\u00e3o contaminada (CTR) ou ra\u00e7\u00e3o contaminada por Pb (Pb), na concentra\u00e7\u00e3o de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo ap\u00f3s o desmame at\u00e9 completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as m\u00e9dias e as linhas verticais o desvio padr\u00e3o ( $n = 7-10$ ). \* indica diferen\u00e7a em rela\u00e7\u00e3o \u00e0s ratas do grupo CTR, de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

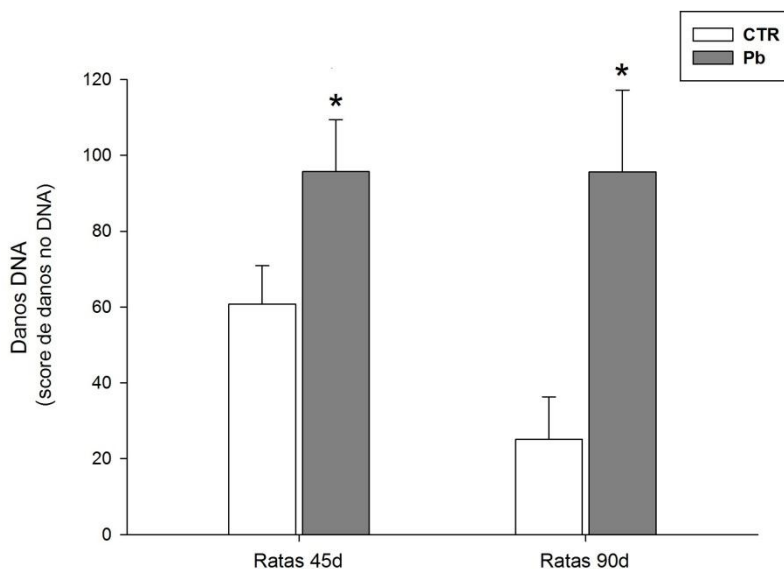
O ensaio TBARS (Fig. V.9A) indicou valores significativamente maiores de peroxidação lipídica no fígado das ratas do grupo Pb45 ( $P = 0,002$ ) e Pb90 ( $P = 0,010$ ), em relação aos respectivos CTR. Entretanto, não houve indicação de variação significativa nos valores de proteínas carboniladas (Fig. V.9B) no fígado das ratas, tanto do grupo P45, quanto do grupo P90, em relação aos respectivos grupos CTR.



**Figura V.9** Peroxidação lipídica (A) e proteínas carboniladas (B) em fígado de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 7-10$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

### V.3.7 Danos no DNA de linfócitos

Os animais dos grupos Pb45 e Pb90 apresentaram valores de escore de danos no DNA (Fig. V.10) significativamente maiores em relação aos respectivos CTR (para ambos  $P < 0,001$ ).



**Figura V.10** Escore de danos no DNA em linfócitos de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 7-10$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR, de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

## V.4 Discussão

Neste trabalho foi investigado, em ratas de diferentes idades, os efeitos de uma alimentação diária contaminada com chumbo na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ . O Pb mostrou promover alterações bioquímicas e fisiológicas como mudanças no peso corporal, no consumo de alimento, na curva de crescimento, no conteúdo de hemoglobina, na glicemia e insulinemia, no conteúdo de glicogênio hepático. O metal também promoveu estresse oxidativo com consequente peroxidação lipídica nos hepatócitos, assim como danos genotóxicos nos linfócitos.

Quanto ao ganho de peso corporal, há diferentes achados na literatura que o relaciona com a ingestão de Pb. Os resultados obtidos neste trabalho para as ratas de 45 dias apontaram que a ingestão de Pb promoveu aumento de peso e maior consumo de ração. Feldman et al. (2011) também mostraram aumento de peso em ratos tratados com

diferentes concentrações de Pb, corroborando os resultados deste trabalho. Entretanto, a redução do peso causado por Pb também já foi relatada em outros estudos (Fewtrell et al., 2003; WHO, 2010; Josthna et al. 2012), assim como o fato do Pb não interferir no ganho de peso corporal (Salinska et al., 2012). O mecanismo de ação do Pb atuando diretamente no ganho ou perda de peso ainda não está claro, o que se observou neste trabalho foi que o ganho de peso até os 45 dias de idade estaria relacionado com o aumento no consumo de ração neste período. Segundo Allouche et al. (2011), o Pb pode afetar o peso corporal no primeiro período de exposição, mas um período mais longo permite que o corpo se ajuste a presença do contaminante, normalizando o seu peso. Esse fato pode ser confirmado pela curva de crescimento dos animais do grupo Pb90, que ganharam mais peso no início do tratamento com Pb, mas após 4 semanas mantiveram o ganho de peso corporal semelhante ao do grupo controle.

Com 45 dias as ratas do grupo Pb apresentaram glicemia e insulinemia maiores que seu grupo CTR, mas o conteúdo de glicogênio hepático não apresentou diferença significativa. Estes animais apresentaram um maior consumo de ração neste período, o que eleva os valores de glicose e insulina sanguíneo. A glicose e a insulina são fatores que levam a deposição de glicogênio hepático (Bollen et al., 1998), mas o excesso de nutrientes é convertido em triacilglicerol no fígado e armazenado no tecido adiposo (Nolan e Prentki, 2008). Esta poderia ser a razão destes animais manterem os valores do conteúdo de glicogênio hepático com conseqüente ganho de peso. O Pb parece elevar os valores sanguíneos de glicose, tanto em exposição aguda como em exposição crônica, mas o mecanismo ainda não está claro. Krishna e Ramachanran (2009) avaliaram os parâmetros bioquímicos induzidos por exposição aguda ao Pb e observaram que o grupo exposto somente ao Pb também apresentou uma concentração elevada de glicose no sangue. Porém, no presente trabalho, as ratas do grupo Pb, com 90 dias de idade, apresentaram glicemia elevada, entretanto a insulinemia e o conteúdo de glicogênio hepático apresentaram valores menores que seu grupo CTR. Feldman et al. (2011) observaram aumento da glicemia em ratas tratadas durante 2 e 3 meses com Pb, e citam o Pb como um fator capaz de alterar vários parâmetros bioquímicos, incluindo a glicemia. Este achado pode estar relacionado com o fato do Pb suprimir a liberação de insulina pelo pâncreas. Hipótese confirmada por Stevenson et al. (1976), que verificaram em ratos os efeitos subagudos e crônicos de Pb na regulação da glicemia. Estes autores observaram redução no índice insulinogênico (relação insulina/glicose no sangue) destes animais e sugeriram que a supressão da função pancreática pode ser

responsável por distúrbios induzido pelo Pb na homeostase da glicose. A supressão da liberação de insulina pelo pâncreas pode explicar o aumento da glicose e os valores menores de insulina plasmática nestes animais de 90 dias. Primeiro porque o Pb pode promover peroxidação lipídica como consequência do estresse oxidativo no pâncreas (Ambali et al., 2011). Segundo, porque o Pb pode promover hiperglicemia (Feldman et al., 2011), e a exposição prolongada à concentrações elevadas de glicose pode resultar na disfunção das células  $\beta$  do pâncreas (McKenzie et al., 2010). Quanto ao estresse oxidativo, em comparação a outros órgãos, o pâncreas tem uma menor capacidade de defesa antioxidante, com expressão da SOD em 30% dos valores encontrados no fígado, e da CAT e GPx em 5%. Assim, as células  $\beta$  do pâncreas apresentam baixos níveis de atividade das enzimas antioxidantes, e, em condições de estresse oxidativo, são incapazes de adaptar-se por meio da hiper-regulação da expressão do gene destas enzimas (Tiedge et al., 1997). Com a captação de glicose nos tecidos periféricos prejudicada pela depressão da insulina, instala-se a hiperglicemia. Contudo, neste momento o fígado ativaria as vias para fornecer glicose ao sangue. Uma função importante do fígado é o fornecimento de glicose para a corrente sanguínea a partir da gliconeogênese (síntese de glicose a partir de glicerol, lactato e  $\alpha$ -cetoácidos) e do glicogênio armazenado após as refeições (Felber e Golay, 1995), podendo ser este o fato destes animais apresentarem uma diminuição significativa do conteúdo de glicogênio no fígado.

O Pb é conhecido por promover alterações no sistema hematológico, como diminuição no conteúdo de hemoglobina e consequente anemia (ATSDR, 2007). Esse efeito do Pb só foi verificado nas ratas de 90 dias, que apresentaram valores de hemoglobina significativamente reduzidos. O Pb promove anemia por bloquear a síntese de heme, por meio da inibição de duas enzimas importantes: ALAD (ácido delta-aminolevulínico desidratase) e ferroquelatase. A ALAD, enzima citosólica que contém zinco, é responsável pela desidratação de duas moléculas de ALA para formar porfobilinogênio, que se condensa para formar uroporfirinogênio III, que por sua vez é convertido em heme com a introdução de  $\text{Fe}^{2+}$  na protoporfirina IX pela enzima ferroquelatase. Estas enzimas são sensíveis à inibição por Pb (Patrick, 2006; Flora et al. 2008).

A intoxicação por Pb pode promover o estresse oxidativo por meio de duas vias distintas, embora relacionadas: 1) a ação direta do Pb na geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e 2) ação direta na redução das defesas antioxidantes (Patrick,

2006). Os resultados do presente trabalho, referentes às defesas antioxidantes enzimáticas, indicaram que o Pb interferiu nas defesas antioxidantes do fígado das ratas, tanto de 45 dias quanto e 90 dias. No grupo 45 dias, as três defesas primárias para neutralizar as ERO estavam em desequilíbrio (SOD, CAT e GPx). A atividade da SOD, que neutraliza o ânion superóxido apresentou valores normais, entretanto a CAT, que neutraliza o peróxido de hidrogênio e a GPx, que neutraliza o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, apresentaram atividade reduzida. Embora o aumento da atividade da GR, que recicla a GSSH para GSH, pode ter contribuído para que os valores de GSH não diminuíssem no fígado destas ratas, houve um desequilíbrio entre produção e neutralização de ERO promovida pelo Pb, que pode causar o estresse oxidativo. Desta forma, com a diminuição da atividade da GPx e CAT, a ação do Pb diminuindo as defesas antioxidantes fica evidente. O Pb pode atuar diretamente na GPx formando um complexo com o selênio, que é essencial para sua atividade, diminuindo assim sua atividade (Flora et al., 2008). O Pb também pode atuar na CAT que contém em sua estrutura o heme, e o Pb é conhecido por inibir a síntese do heme (Flora et al., 2008).

Se as ratas expostas ao Pb por 45 dias tiveram suas defesas antioxidantes diminuídas, o mesmo não aconteceu aos animais com 90 dias, que apresentaram elevação no conteúdo de GSH e atividade das defesas enzimáticas em valores iguais aos seus grupos controle. Stohs e Bagchi (1995) referem que, tal como acontece com alguns metais de transição como o cádmio, o Pb produz um aumento nos níveis de GSH nos tecidos, incluindo fígado, rim e eritrócitos. Este aumento de GSH parece ser uma resposta compensatória para atenuar a toxicidade do Pb, mas que, entretanto, não foi suficiente para impedir danos oxidativos observados neste trabalho.

A ingestão de Pb promoveu peroxidação lipídica no fígado das ratas, tanto de 45 como de 90 dias, como uma indicação de estresse oxidativo. O Pb pode promover a peroxidação lipídica tanto pelo aumento do radical hidroxil e consequente ataque aos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, como pela capacidade de estimular o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a iniciar a peroxidação lipídica nas membranas. Há uma relação entre o dano à membrana induzido por Pb e as mudanças naturais que ocorrem na composição dos ácidos graxos da membrana. O alongamento e insaturação do ácido linoleico, originando ácido araquidônico, estão associados à susceptibilidade a peroxidação da membrana, pois aumentam o número de duplas ligações (Lawton e Donaldson, 1991). Ahamed e Siddiqui (2007) relatam que após a incubação de ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico com chumbo, conforme aumentavam as

duplas ligações, aumentava o produto final da peroxidação lipídica (MDA). A ingestão de Pb parece elevar os níveis de ácido araquidônico nos tecidos de forma dose-dependente, e acredita-se que muitos dos efeitos biológicos associados à toxicidade do Pb são resultados da alteração da composição de ácidos graxos na membrana celular (Donaldson e Knowles, 1993). Esta seria uma possível causa para o resultado observado no grupo de ratas Pb90, no qual ocorreu um aumento de mais de 140% na peroxidação lipídica nos hepatócitos.

A exposição ao Pb também está associada com danos no DNA. Este trabalho mostrou aumento na ocorrência de danos no DNA em linfócitos das ratas dos grupos Pb45 e Pb90. A ATSDR (2007) descreve a correlação significativa entre quebras de DNA, aumento da produção de ERO e diminuição das defesas antioxidantes em linfócitos, apontando o estresse oxidativo causado pelo Pb, como possível causa para este dano. Já a revisão realizada por García-Lestón et al. (2010) mostra trabalhos, inclusive com linfócitos, que apontam haver mecanismos indiretos da genotoxicidade do Pb, como a produção de radicais livres, mas também o Pb atuar na inibição de reparo do DNA.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a ingestão diária de Pb na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  produz importantes alterações no organismo, as quais podem variar de acordo com a idade. Embora o aumento da glicemia e insulinemia nos animais Pb45 sejam justificados pelo fato das ratas estarem alimentadas e terem maior consumo de ração resultando em ganho de peso, nos animais Pb90, houve elevação da glicemia com supressão de insulina, seguido de menor conteúdo de glicogênio hepático. Isto sugere que o consumo de Pb nesta concentração pode levar ao aumento da ingestão alimentar, com ganho de peso e ao longo do tempo, pode haver a uma supressão de insulina com conseqüente aumento da glicemia e utilização de glicogênio elevando ainda mais os níveis de glicose sanguínea. Dentre os parâmetros hematológicos analisados, apenas o conteúdo de Hb apresentou redução significativa, e apenas o grupo Pb90, ou seja, um período mais prolongado no consumo de Pb. Com 45 e 90 dias de idade, não ocorreram alterações significativas na atividade da AChE no cérebro. As defesas antioxidantes foram mais afetadas pelo Pb nas ratas de 45 dias, que apresentaram menor atividade na CAT e GPx e maior atividade na GR, sem alteração no conteúdo de GSH. Entretanto, nas ratas de 90 dias todas as enzimas antioxidantes permaneceram inalteradas e o conteúdo de GSH foi maior, mas isso não impediu que ocorresse a peroxidação lipídica no fígado destes animais, igualmente observado no

Pb45. Também foi observado que tanto no grupo Pb45 quanto o Pb90 houve aumento da ocorrência de danos no DNA em linfócitos, mas em nenhum grupo estudado houve aumento de oxidação de proteínas. Assim, estes resultados mostram que ingerir a concentração de 2,0 mg Pb por Kg<sup>1</sup> de carne de pescado, não é segura para o consumo diário, pois causa prejuízo à saúde em diferentes níveis de organização biológica, com diferentes respostas quando ingerido em menor ou maior tempo de vida.

## V.5 Referências bibliográficas

---

- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57-64.
- Allouche, L., Hamadouche, M., Touabti, A., Khennouf, S., 2011. Effect of long-term exposure to low or moderate lead concentrations on growth, lipid profile and liver function in albino rats. *Adv. Biol. Res.* 5, 339-347.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Assis, H.C.S, Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira, C.R.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotox. Environ. Safe.* 67, 82-88.
- Ambali, S.F., Shuaib, K., Edeh, R., Orieggi, B.C., Shittu, M., Akande, M., 2011. Hyperglycemia induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and lead in Wistar rats: Role of pancreatic lipoperoxidation and alleviating effect of vitamin C. *Biol. Med.* 3, 6-14.
- Anderson, M.L., D'Almeida, V., KO, G.M., Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S., 2004. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.
- Arnold, S.M., Lynn, T.V., Verbrugge, L.A., Middaugh, J.P., 2005. Human biomonitoring to optimize fish consumption advice: reducing uncertainty when evaluating benefits and risks. *Am J Public Health.* 95, 393-397.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-890.
- Bidinotto, P.M.; Moraes, G.; Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *B Tec. CEPTA*, 10, 53-60.
- Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W., 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336, 19-31.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carlberg, I., Mannervil, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Castro-González, M.I., Méndez-Armenta, M., 2008. Heavy metals: implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Phar.* 26, 263-271.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.
- Danadevi, K., Rozati, R., Banu, S.B., Rao, P.H., Grover, P., 2003. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology.* 187, 183-193.
- Donaldson, W.E., Knowles, S.O., 1993. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp. Biochem. Physiol.* 104C, 377-379.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Eades, L.J., Farmer, J.G., MacKenzie, A.B., Kirika, A., Bailey-Watts, A.E., 2002. Stable lead isotopic characterization of the historical record of environmental lead contamination in dated freshwater lake sediment cores from northern and central Scotland. *Sci. Total Environ.* 292, 55-67.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2007. Future prospects for fish and fishery products. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030, Part 1. European Overview.
- Felber, J.P., Golay, A., 1995. Regulation of nutrient metabolism and energy expenditure. *Metab.* 14, 4-9.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415-430.
- Feldman, G., Chain, S., Soria, N., Bautista, N., Riera, N.M., 2011. Presença de síndrome metabólica em ratas inducido por distintas concentraciones de plomo. *Insuf. Card.* 3, 112-116.
- Fewtrell, L., Kaufmann, R., Prüss-Üstün, A., 2003. Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Geneva, World Health Organization. Environmental Burden of Disease Series, No. 2.
- Flora, S.J.S., Mirtal, M., Mehta, A., 2008, Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501-523.
- García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., Laffon, B., 2010. Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environ. Int.* 36, 623-636.
- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D, Porubcin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J. A., Singleton, S., Garrick, L.M., 2003. DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals.* 16, 41-54.
- Harishekar, M.B., Kiran, B., 2011. Studies on lipid peroxidation induced by lead, alcohol on liver and amelioration by vitamin E. *Asia J. Pharmacol. Clin. Res.* 4, 164-167.
- Hegazy, A.A.M Zaher, M.M., Abdel-Hafez, M., Morsy, A.A., Saleh, R.A., 2010. Relation between anemia and blood levels of lead, copper, zinc and iron among children. *BioMed Central.* 3, 1-9.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Hematol.* 25, 563-575.

- IARC (Internacioanl Agency for Research on Cancer), 2006. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Summaries & evaluations: Inorganic and organic lead compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans), Vol. 87.
- Josthna, P., Geetharathan, T., Sujatha, P., Deepika, G., 2012. Accumulation of lead and cadmium in the organs and tissues of albino rat. *Int. J. Pharm. & Life Sci.* 3, 2186-2189.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Krishna, H., Ramachandran, A.V., 2009. Biochemical alterations induced by the acute exposure to combination of chlorpyrifos and lead in Wistar rats. *Biol. Med.* 1, 1-6.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.* 28, 83-97.
- Leung, H.M., Leung, A.O.W., Wang, H.S., Ma, K.K., Liang, Y., Ho, K.C., Cheung, K. C., Tohidi, F., Yung, K.K.L., 2014. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 235-245.
- Levini, R.L., Williams, J.A., Stadman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* 233, 346-357.
- Liu, J., Goyer, R.A., Waalkes, M.P., 2008. Toxic effects of metals, in: Klaassen, C., Doull's, J., Casarett, L.J. (Eds.), *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Mac Graw-Hill, 2008. New York, pp. 931-979.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: na enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McKenzie, M.D., Jamieson, E., Jansen, E.S., Scott, C.L., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Allison, J., Kay, T.W.H., Strasser, A., Thomas, H.E., 2010. Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins bim and puma and multi-BH domain protein bax. *Diabetes J.* 59, 644-652.
- Mielke, H.W., Gonzales, R.C., Powell, E.T., Mielke, P.W., 2013. Environmental and health disparities in residential communities of New Orleans: The need for soil lead intervention to advance primary prevention. *Environ. Int.* 51, 73-81.
- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura), 2013. Cartilha balanço 2013, pesca e aquicultura. Brasil.

- Nolan, C.J., Prentki, M., 2008. The islet  $\beta$ -cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 285-291.
- Paoliello, M.B., Capitini, E.M., 2005. Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 184, 59-96.
- Patra, R.C., Swarup, D., Dwivedi, S.K., 2001. Antioxidant effects of  $\alpha$  tocoferol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 162, 81-88.
- Patrick, L., 2006. Lead Toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Med. Rev.* 11, 114-127.
- Rahman, M.S., Molla, A.H., Saha, N., Rahman, A., 2012. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chem.* 134, 1847-1854.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M., 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutat. Res.* 673, 78-81.
- Salinska, A.; Wlostowski, T.; Zambrzycka, E., 2012. Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. *Ecotoxicology* 21, 2235-2243.
- Scott, A.M., Atwater, I.; Rojas, E., 1981. A method for the simultaneous measurement of insulin release and  $\beta$  cell membrane potential in single mouse islet of Langerhans. *Diabetologia* 21, 470-475.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Stevenson, A., Merali, Z., Kacew, S., Singhal, R.L., 1976. Effects of subacute and chronic lead treatment on glucose homeostasis and renal cyclic. *Toxicology* 6, 265-275.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio. Med.* 18, 321-336.
- Terra, B.F., Araújo, F.G., Calza, C.F., Lopes, R.T., Teixeira, T.P., 2008. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. *Water Air Soil Poll.* 187, 275-284.

- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S., 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1942.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2008. Draft final review of scientific information on lead. Geneva, United Nations Environment Programme Chemicals Branch.
- WHO (World Health Organization), 2009. Global health risks global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- WHO (World Health Organization), 2010. Exposure to lead: a major public health concern. Geneva, World Health Organization, Department of Public Health and Environment.

## **Capítulo VI**

### **Efeitos fisiológicos da ingestão diária de chumbo em ratas Wistar e na sua prole de diferentes idades**

---

## VI.1 Introdução

---

O chumbo (Pb) é classificado como material persistente, bioacumulativo e tóxico. É um dos metais de maior uso industrial, contudo, sua utilização generalizada tem como consequência a contaminação dos ecossistemas. No ecossistema aquático, a presença do Pb já foi constatada em vários estudos (Fatima e Usmani, 2013; Páez-Osuna et al., 2015; Rose et al., 2015). Este metal pode ser acumulado na água, sedimentos, peixes, e posteriormente, transferido para os seres humanos através da cadeia alimentar (Rahman et al., 2012). A carne de peixe é bastante consumida pelo homem por ser fonte de proteína de alto valor biológico, ter baixo teor de gordura saturada e por conter ácidos graxos essenciais como ômega-3 (Yildirim et al., 2009). Porém, a ingestão de carne de peixe contaminada por Pb pode levar a doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e desordens neurológicas (Jomova e Valko, 2011).

O peixe é um dos produtos alimentares mais negociados por todo mundo e especialmente importante para os países em desenvolvimento. A produção global de pescado ultrapassa o crescimento da população mundial, e a aquicultura é um dos setores de produção de alimento que mais cresce (FAO, 2014). Contudo, também cresce o interesse sobre os riscos e benefícios do consumo de peixes, com vários estudos analisando a presença de Pb na carne deste animal e as doenças que este metal pode causar no organismo humano (Tarley et al., 2001; Fung et al., 2013; Urien et al., 2015).

Após a ingestão de Pb, a extensão e a velocidade da absorção através do trato gastrointestinal dependem das características do indivíduo, como idade e estado nutricional. As crianças podem absorver 40-50% de Pb em comparação a 3-10% do adulto, e a distribuição de Pb no organismo dos adultos é cerca de 94% nos ossos, enquanto que em crianças é cerca de 73% (ATSDR, 2007). Os ossos podem ser uma fonte significativa de Pb endógeno, em particular quando a velocidade de reabsorção óssea é aumentada, tal como durante a gravidez, lactação e no período imediatamente após a menopausa. Após a absorção oral, o Pb que não foi absorvido pelo trato gastrointestinal é excretado nas fezes, já o Pb absorvido é excretado na urina e também nas fezes (IARC, 2006). Determinados grupos populacionais são mais vulneráveis a intoxicação pelo Pb, destacando-se as crianças, cuja exposição começa no útero, pois o Pb passa através da placenta para o feto, e as mulheres grávidas, que também se tornam uma população preocupante (UNEP, 2008).

Embora seja mais evidente o acúmulo do Pb no tecido ósseo, uma vez no organismo, o Pb interfere em numerosos processos fisiológicos, tais como

hematopoiéticos, renal, cardíaco, hepático, sistema reprodutivo e o sistema nervoso central (Pal et al., 2015). Os efeitos do Pb nestes processos dependem do nível de contaminação e da duração da exposição, porém sabe-se que mesmo em pequenas concentrações o Pb pode ter efeitos subclínicos sutis, especialmente nas funções neuropsicológicas em crianças (Shaik et al., 2014).

Com a introdução do peixe na dieta humana, como sendo uma das opções de alimento saudável, e a problemática da contaminação da carne de pescado por Pb, cresce a necessidade de se avaliar os possíveis efeitos do Pb em diferentes fases do desenvolvimento, para a proteção da saúde de quem consome este tipo de carne. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos fisiológicos da ingestão diária de Pb em ratas Wistar e na sua prole de diferentes idades.

## **VI.2 Material e métodos**

---

### **VI.2.1 Animais**

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Logo após ocorrer o desmame (22 dias), animais pesando  $37 \pm 5,58$  g (n=40) foram transferidos para o biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram alojados individualmente em gaiolas em condições padrão ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclo claro/escuro de 12:12-h). As ratas foram colocadas para acasalar, com 78 dias de idade, e mantidas durante a prenhez e amamentação de seus filhotes. Para que o acasalamento ocorresse, ratos Wistar foram colocados em gaiolas, junto com as fêmeas, na proporção 1:3 ou 1:4 (macho:fêmeas). Foram preservados 9 animais, de cada grupo (CTR e Pb) para a continuidade da pesquisa (N = 36). Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. A pesagem dos animais e a verificação do consumo de ração foram realizadas 3 vezes na semana, porém a pesagem e verificação do consumo de ração das ratas prenhes foram suspensas quando foram colocados para acasalar, e apenas no dia da amostragem foi realizada nova pesagem. O cálculo para obter os valores da ração consumida foi feito pela subtração do resto de ração dentro da gaiola e na bandeja abaixo da gaiola do total de ração ofertada. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Animais Experimentais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL – Process: 34715.2011.16).

### **VI.2.2 Delineamento experimental**

Para os experimentos foram utilizados 8 grupos de ratas (n = 9-10 em cada), dos quais 4 grupos de ratas com 140 dias (Mães 140d): 2 grupos CTR140d e 2 grupos Pb140d, que ficaram prenhes e amamentaram. Da prole destas ratas foram selecionadas fêmeas de 2 grupos CTR140d para formar os grupos prole controle de 45 dias (PCTR45d) e de 90 dias (PCTR90d) e de 2 grupos Pb140d para formar os grupos prole chumbo de 45 dias (PPb45d) e de 90 dias (PPb90d). As ratas dos grupos Mães 140d iniciaram a ingestão da ração manipulada logo após ocorrer o desmame, com 22 dias de idade, e foram alimentadas com a ração manipulada até completarem 140 dias de idade, sem interrupção durante o período de prenhez e amamentação. Os grupos Prole 45 dias e Prole 90d, após o desmame, permaneceram ingerindo ração manipulada por 45 dias e 90 dias respectivamente. O grupo prole controle (PCTR) ingeriu a ração sem a adição de Pb, e o grupo prole chumbo (PPb) ingeriu a ração contaminada com Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Para ratas, a idade de 45 dias corresponde ao período da puberdade, e de 90 e 140 corresponde à idade adulta, quando já pode ocorrer o acasalamento (Anderson et al., 2004).

### **VI.2.3 Amostragem**

Os animais foram pesados e a eutanásia ocorreu através de exsanguinação com o animal sob efeito de anestesia geral (40 mg Kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico), sem jejum prévio. O sangue foi coletado, a partir da veia cava inferior, e uma alíquota foi utilizada para análise dos parâmetros hematológicos. Outra alíquota de sangue total foi centrifugada (1870 g, 15 min, centrífuga Hsiangtai, modelo MCD-2000) e o plasma foi utilizado para a determinação das concentrações de glicose, insulina e cortisol. O cérebro foi retirado para análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). O fígado foi retirado para a determinação de glicogênio.

### **VI.2.4 Análises plasmáticas**

A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase com kit comercial (Doles Reagentes Ltda, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA) a 505 nm. A insulinemia foi dosada por radioimunoensaio (RIA) (Scott et al., 1981) em um contador de emissão de partículas gama (Wizard<sup>2</sup> Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer®, Shelton/CT, USA), sendo utilizado como padrão insulina de rato, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-

Aldrich<sup>®</sup>, St Louis/MO, USA) e insulina humana recombinante marcada com <sup>125</sup>I (PerkinElmer<sup>®</sup>, Shelton/CT, USA). O hormônio cortisol foi medido por ensaio imunoenzimático com a utilização de *kit* comercial (DRG Internacional, Inc., USA) baseado no princípio da ligação competitiva. A absorbância foi determinada em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA) em 450 nm.

### **VI.2.5** *Análise bioquímica no fígado*

A determinação do glicogênio foi realizada segundo método descrito por Bidinotto et al. (1997) com amostras de tecidos incubadas com KOH 6,0N a 100° C por 5 min. Após a dissolução dos tecidos, foi adicionado etanol e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%), a solução foi centrifugada e o precipitado foi ressuspenso com água destilada. A dissolução foi analisada quanto ao seu teor de açúcares redutores totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956) em 480 nm (espectrofotômetro, Libra S32, Biochrom, Reino Unido).

### **VI.2.6** *Análises hematológicas*

Para verificação do hematócrito (Htc), o sangue de cada animal foi colocado em um tubo capilar e centrifugado (1200 g; 5 min) em centrífuga de micro-capilar (Luguimac – S. R. C., modelo LC-5, Argentina) para a separação das células e do plasma, e a leitura foi feita em cartela padronizada. Para a contagem do número de eritrócitos por mm<sup>3</sup> de sangue (RBC), o sangue foi adicionado a tampão formol citrato e analisado em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi estimado pelo método colorimétrico da cianometemoglobina (kit comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil) e medido a 540 nm em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido).

### **VI.2.7** *Análise bioquímica no cérebro*

Amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 8,0; 1:10 p/v) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4 °C). O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da AChE, segundo o método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa et al., (2007), a partir da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com o reagente de cor contendo DTNB (0,5 mM), em espectrofotômetro a 415 nm. A atividade da AChE foi expressa em nmol DTNB min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> e a concentração de proteína do homogenato foi determinada em

espectrofotômetro a 595 nm de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **VI.2.8** *Análise estatística*

As comparações dos parâmetros avaliados para ratas em cada uma das idades (45, 90 e 140 dias) foram feitas entre os grupos CTR e Pb, utilizando o teste *t* de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição de dados (normalidade e homogeneidade da variância). Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ . Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.

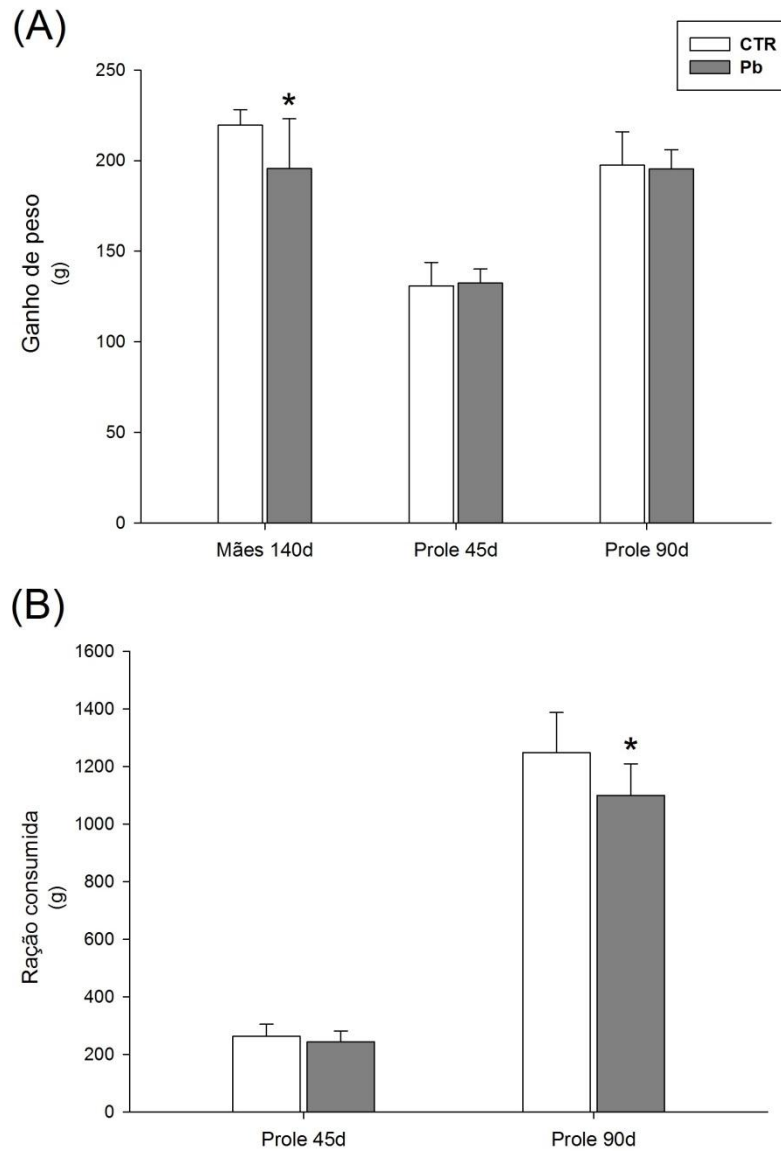
## **VI.3 Resultados**

---

### **VI.3.1** *Ganho de peso e consumo de ração*

Ao final do experimento, quando se comparou o grupo Pb com seu respectivo CTR, foi observado que os animais do grupo Pb140d apresentaram perda de peso, já para os grupos Prole 45d e Prole 90d não foram constatadas diferenças significativas no ganho de peso (Fig. VI.1A). Entretanto, as ratas do grupo PPb90d ingeriram menos ração que as ratas do respectivo grupo controle (Fig. VI.1B).

## Capítulo VI

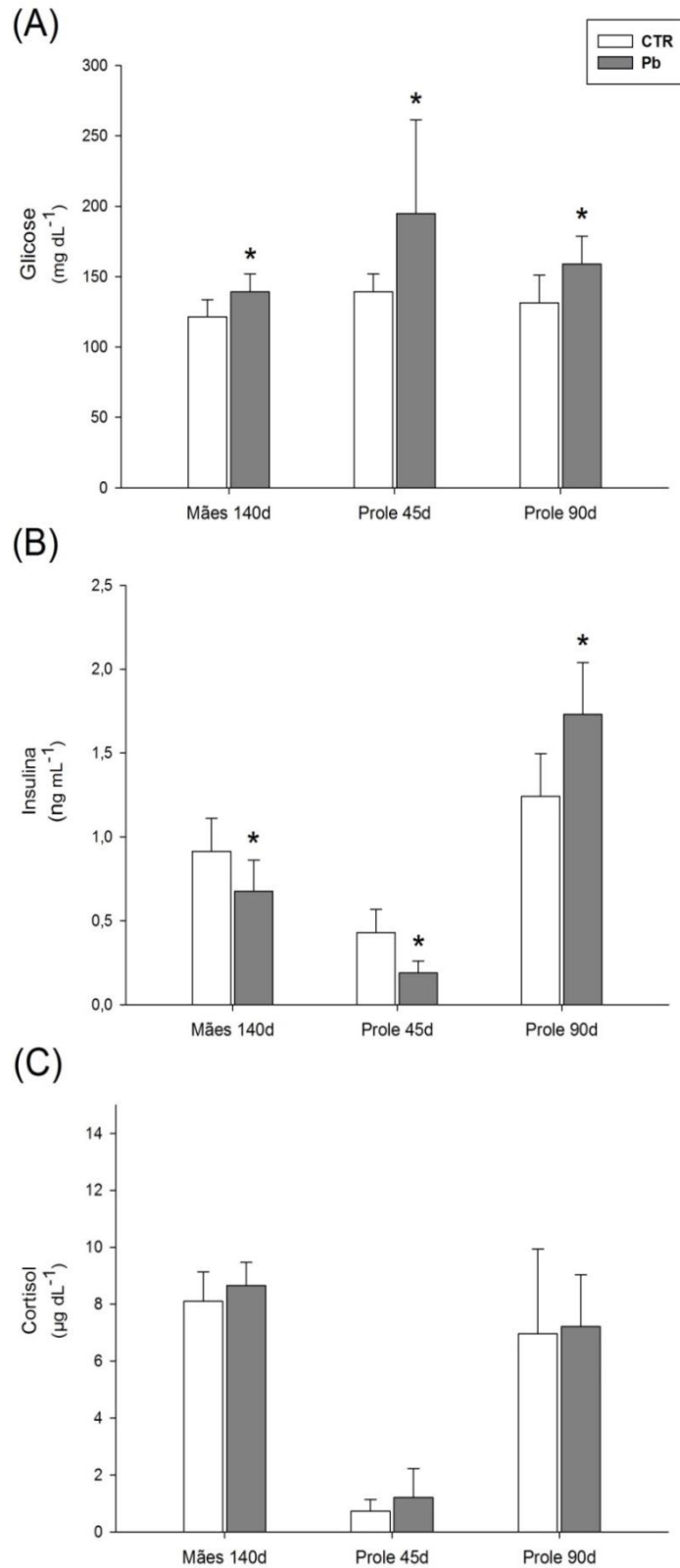


**Figura VI.1** Ganho de peso (A) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. Ração consumida (B) pela prole até completarem 45 e 90 dias de vida. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 8-9$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

**VI.3.2** *Glicose, insulina e cortisol plasmáticos*

A glicemia das ratas que ingeriram Pb, de todos os grupos de idade, foi significativamente maior em relação aos seus grupos CTR (140d:  $P = 0,022$ ; P45d:  $P = 0,041$ ; P95d:  $P = 0,019$ ) (Fig. VI.2A). Em relação às ratas dos grupos CTR, os valores de insulina plasmática foram menores nos grupos Pb140d ( $P = 0,032$ ) e PPb 45d ( $P = 0,002$ ), porém no grupo PPb 90d, os valores foram maiores ( $P = 0,020$ ) (Fig. VI.2B). Já o cortisol plasmático não variou significativamente entre os grupos CTR e Pb nas ratas das diferentes idades (Fig. VI.2C).

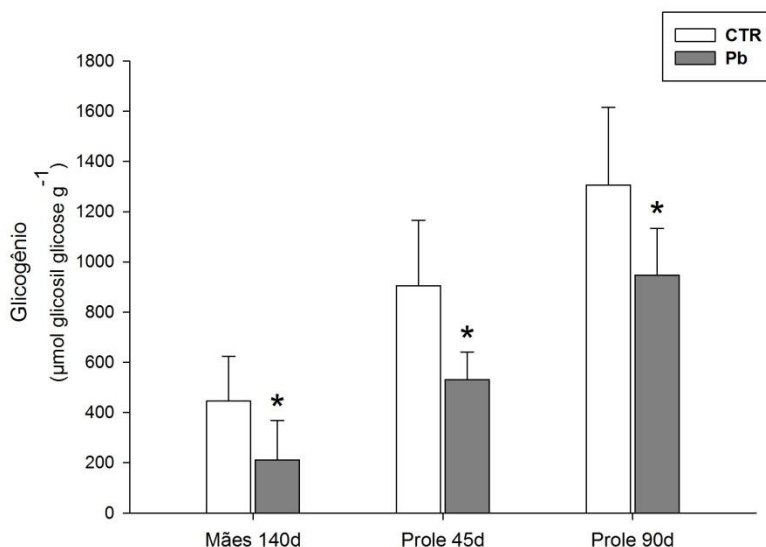
Capítulo VI



**Figura VI.2** Concentrações plasmáticas de glicose (A), insulina (B) e cortisol (C) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 6-9). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

### VI.3.3 Conteúdo de glicogênio no fígado

Tanto os animais do grupo Pb140d ( $P = 0,014$ ), quanto os dos grupos PPb45d ( $P = 0,003$ ) e PPb90d ( $P = 0,035$ ) apresentaram conteúdo de glicogênio hepático com valores significativamente menores que seus respectivos grupos CTR (Fig. VI.3).

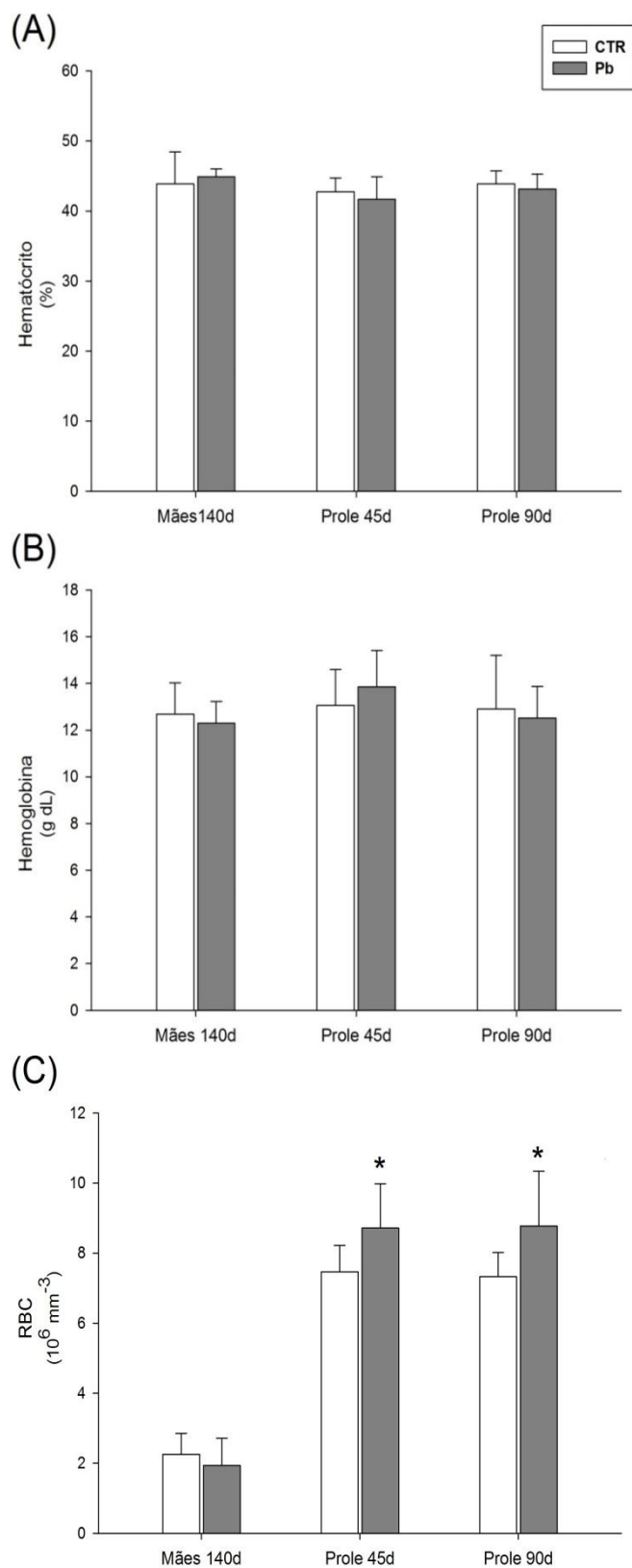


**Figura VI.3** Conteúdo de glicogênio hepático em ratos que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 6-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

### VI.3.4 Htc, Hb e RBC

Os valores de Hb (Fig. VI.4A) e Htc (Fig. VI.4B) não variaram significativamente entre as ratas dos grupos CTR e Pb de nenhuma das idades estudadas. Já em relação à contagem de eritrócitos (Fig. VI.4C), as ratas do grupo Pb, de 45d e 90d, apresentaram valores de RBC significativamente maiores quando comparados aos seus respectivos grupos CTR ( $P = 0,045$  para ambos os grupos).

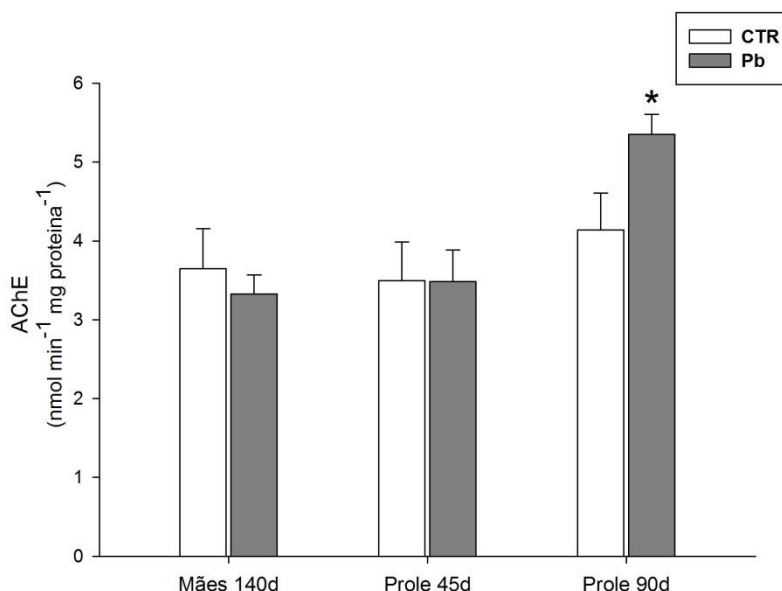
Capítulo VI



**Figura VI.4** Hematócrito (A), Hemoglobina (B) e número de células vermelhas (C) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 7-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

**VI.3.5 Atividade da AChE no cérebro**

A atividade da AChE (Fig. VI.5) não variou significativamente entre os grupos Pb140d e PPb45d e seus respectivos controles. Entretanto, foi observado um valor significativamente maior na atividade da AChE no cérebro das ratas do grupo PPb 90d ao serem comparadas com seu grupo CTR.



**Figura VI.5** Atividade da AChE no cérebro de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 5). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

**VI.4 Discussão**

A exposição a altas concentrações de Pb pode promover efeitos gastrointestinais como cólica e náusea, resultando em perda de apetite com consequente perda de peso. Isto é observado em trabalhadores expostos a elevadas concentrações de Pb que apresentam como consequência destes efeitos a diminuição do peso corporal (ATSDR, 2005). Entretanto, as ratas do grupo Pb 140d apresentaram diminuição do peso corporal ingerindo baixa concentração de Pb. O que se observa é que em baixas concentrações de Pb parece promover diferentes respostas quanto ao ganho de peso. Há registro de aumento de peso (Feldman et al., 2011; Nascimento, 2015), perda de peso (Amjad et al., 2013) ou ainda falta de interferência do Pb no peso corporal (Mahaffey e Fowler, 1977;

Moreira et al., 2001). O fato é que as ratas do grupo Pb140d ficaram prenhes e amamentaram, sem a suspensão da ingestão de Pb. Embora o peso durante o período de prenhez e amamentação não tenha sido monitorado, há um estudo que mostra a flutuação de peso em ratas com ingestão de baixa concentração de Pb no período da gestação e lactação (Moreira et al., 2001). Por outro lado, as ratas do grupo PPb90d, apesar de não apresentarem diferença no peso corporal, mostraram diminuição na ingestão alimentar. Estes animais, assim como o grupo PPb45d, são filhas das ratas Pb140d, que ficaram prenhes e amamentaram ingerindo ração contaminada. O Pb atravessa facilmente a placenta (Pounds et al., 1991), assim como está no leite materno (EFSA, 2010). O Pb parece ser dependente da concentração no organismo na resposta da ingestão alimentar, já que animais com 45, 90 e 140 dias, sem contato prévio com Pb, há aumento de peso e consumo de ração com 45 dias, não apresenta mais esta condição com 90 dias, porém com 140 dias inicia a perda de peso (Capítulo V desta tese). Assim, as proles de mães contaminadas, com 45 dias não há resposta sobre o peso e a ingestão alimentar, porém com 90 dias, esta resposta aparece com diminuição do consumo de ração, mas ainda não reflete na perda de peso.

Os três grupos Pb investigados apresentaram glicemia elevada e glicogênio hepático diminuído, tanto os animais com 140 dias, quanto sua prole com 45 e 90 dias de idade. Já é bem reportado o Pb atuando na elevação da glicose sanguínea (ATSDR, 2007) e este efeito sobre a homeostase da glicose pode ser mediado através dos sistemas adenilato ciclase – AMPc, por alteração da atividade de enzimas da gliconeogênese ou por alteração na função pancreática (Nolan e Shaikh, 1992). Após a administração de Pb em ratos, Mostafalou et al. (2015) verificaram que a função secretora de insulina pelo pâncreas foi interrompida. Estes autores também observaram um aumento da atividade das enzimas da gliconeogênese, fosfoenolpiruvato-carboxiquinase e glicose-6-fosfatase no fígado dos ratos sob efeito subcrônico de Pb. Há evidências que a supressão de insulina pelo pâncreas seja promovida pelo estresse oxidativo que pode ser causado pelo Pb (Mostafalou et al., 2015). O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no pâncreas pode levar ao estabelecimento de estresse oxidativo, já que o pâncreas tem baixos níveis de expressão do gene de enzimas antioxidantes. Lenzen et al. (1996) verificaram em células das ilhotas do pâncreas níveis baixos de expressão de todas as enzimas antioxidantes e sugeriram que esta seria a explicação para a extraordinária sensibilidade das células  $\beta$  pancreáticas a danos citotóxicos.

Assim, o Pb deve ter promovido a supressão de insulina no pâncreas dos animais Pb 1140d e PPb 45d, que resultou em hiperglicemia e, nesta condição o organismo responde como no estado em jejum, mobilizando glicose do glicogênio hepático. Entretanto, as ratas do grupo PPb90d apresentaram glicemia elevada e diminuição do glicogênio hepático, mas com aumento de insulina circulante. Todos os animais Pb estudados responderam como *Diabetes Mellitus* Tipo I (DMT1), com aumento da glicose sanguínea devido a não produção de insulina pelo pâncreas. Contudo, a elevação dos níveis de insulina nos animais PPb90d sugere uma melhora do pâncreas na secreção deste hormônio. O curso natural DMT1 é muitas vezes caracterizado pela restauração transitória da função das células  $\beta$  do pâncreas. Este período de remissão está relacionado com a presença de uma reserva de células  $\beta$  funcionais no pâncreas, mas que com o tempo, cessa totalmente a liberação de insulina (Greenbaum, 2002; Abdul-Rasoul et al., 2006; Meng et al., 2015). Deste modo, pode-se supor que as ratas do grupo PPb90d apresentaram um aumento na liberação de insulina graças a uma reserva de células  $\beta$ . Entretanto, esta hipótese necessita de mais investigações para ser sustentada.

Quanto aos parâmetros hematológicos, somente os valores de RBC apresentaram alterações, e nos grupos PPb45d e PPb90d. Já é bem conhecido que o Pb pode promover a diminuição de hemoglobina dos eritrócitos devido a inibição de duas enzimas necessárias para a síntese do heme, ALAD (ácido  $\delta$  aminolevulínico desidratase) e ferroquelatase (Ahamed e Siddiqui, 2007). Contudo, estes animais não apresentaram os valores de hemoglobina diminuídos, mas apenas os valores de RBC aumentados. Parece haver um mecanismo compensatório para a diminuição de hemoglobina nos eritrócitos, e este mecanismo está ligado com a produção renal de eritropoietina. Um estudo realizado por Factor-Litvak et al. (1998) mostrou que em crianças expostas ao Pb a manutenção normal dos valores de hemoglobina foi devida a hiperprodução de eritropoietina. Porém, Graziano et al. (2004) mostraram que este mecanismo compensatório começa a falhar conforme as crianças ficam mais velhas devido a diminuição da produção de eritropoietina, provavelmente pelo efeito tóxico do Pb sobre o rim. Assim, pode-se sugerir que este mecanismo compensatório esteja mantendo os valores de hemoglobina normais nos animais do grupo PPb45d e PPb90d, graças ao aumento do número de células vermelhas no sangue.

A atividade da AChE no cérebro das ratas deste estudo só apresentou alteração no grupo PPb 90d, com maior atividade desta enzima, ao contrário das respostas

observadas em outros estudos relacionados com a atividade da AChE e Pb. Antonio et al. (2003) mostraram a diminuição na atividade da AChE no cérebro de ratos, filhos de mães tratadas com Pb durante a gestação, logo ao nascer, entretanto, após 21 dias de vida, a atividade desta enzima estava normalizada. Por outro lado, Reddy et al. (2003) mostraram que o Pb promoveu diminuição da AChE em ratos, em vários períodos analisados até a idade de 35 dias, e que o efeito inibidor do Pb sobre a AChE aumentava, com o aumento da idade. A vulnerabilidade para a neurotoxicidade do Pb é particularmente maior na idade infantil (EFSA, 2010), isto porque a barreira hematoencefálica é imatura e o Pb tem a capacidade de atravessar esta barreira (Goldstein, 1990). A atuação do Pb no cérebro envolve centros colinérgicos. Carroll et al. (1977) sugerem que o Pb pode promover a hiperatividade em camundongos, por reduzir a disponibilidade da ACh para nova síntese, ou por interferir no papel do cálcio na liberação da ACh. Entretanto, em várias regiões do cérebro existe uma disparidade entre grandes quantidades de AChE e os baixos níveis de acetilcolina. Uma destas áreas é a substância negra, e, além disto, no interior da substância negra há uma forma insolúvel de AChE independente da transmissão colinérgica. Isto leva a hipótese de que a AChE na substância negra, tem uma função não-colinérgica inesperada (Greenfield, 1991). O presente estudo utilizou todo o cérebro para a análise da AChE, e os animais que mostraram alteração da AChE (grupo PPb 90d) também foram os únicos nos quais foi detectado Pb no cérebro (Capítulo VI).

Em resumo, este trabalho mostrou que a ingestão diária de chumbo afetou o peso corporal de ratas que ficaram prenhes e amamentam, ocorrendo a perda de peso. Ocorreu aumento da glicose sanguínea nas mães e suas proles, com supressão de insulina pelo pâncreas das mães e prole com 45 dias de vida, porém com aumento de insulina circulante na prole de 90 dias, todavia, todos os animais apresentaram uma característica em comum que é a diminuição do conteúdo de glicogênio hepático. Quanto aos resultados encontrados nos parâmetros hematológicos, somente as proles tiveram aumento do número de células vermelhas circulantes, sugerindo uma compensação para a diminuição de hemoglobina nos eritrócitos. A AChE só foi alterada, com aumento atividade, na prole com 90 dias de idade. Com isso, pode-se concluir que a ingestão diária de alimento contaminado com a concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, traz prejuízos ao organismo que podem se refletir negativamente na saúde ao longo do tempo, com desnutrição, diabetes *mellitus*, anemia e desordem neurológica.

## VI.5 Referências bibliográficas

---

- Abdul-Rasoul, M., Habib, H., Al-Khouly, M., 2006. 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatr. Diabetes*. 7, 101-107.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta*. 383, 57-64.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Assis, H.C.S, Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira, C.R.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotox. Environ. Saf.* 67, 82-88.
- Amjad, Z., Iqbal, M.Z., Shoro, A.A., 2013. Lead-Induced reduction in body and kidney weight of Wistar albino rats ameliorated by ginkgo biloba extract (EGb 761). *Biochem. Physiol.* 2, 4.
- Anderson, M.L., D'Almeida, V., KO, G.M., Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S., 2004. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.
- Antonio, M.T., Corredor, L., Leret, M.L., 2003. Study of the activity of several brains enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol. Lett.* 143, 331-340.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2005. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services.

- Bidinotto, P.M.; Moraes, G.; Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *B Tec. CEPTA*, 10, 53-60.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carroll, P.T., Silbergeld, E.K., Oldberg, A.M. 1977. Alteration of central cholinergic function by chronic lead acetate exposure. *Biochem. Pharmacol.* 26, 397-402.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J.* 8, 1570.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Factor-Litvak, P., Slavkovich, V., Liu, X., Popovac, D., Preteni, E., Capuni-Paracka, S., Hadzialievic, S., Lekic, V., Lolacono, N., Kline, J., Graziano, J., 1998. Hyperproduction of erythropoietin in nonanemic lead-exposed children *Environ. Health Persp.* 106, 361-364.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014. The state of world fisheries and aquaculture – Opportunities and challenges. Rome.
- Fatima, M., Usmani, N., 2013. Histopathology and bioaccumulation of heavy metals (Cr, Ni and Pb) in fish (*Channa striatus* and *Heteropneustes fossilis*) tissue: a study for toxicity and ecological impacts. *Pakistan J. Biol. Sci.* 16, 412-420.
- Feldman, G., Chain, S., Soria, N., Bautista, N., Riera, N.M., 2011. Presença de síndrome metabólica em ratas inducido por distintas concentraciones de plomo. *Insuf. Card.* 3, 112-116.
- Fung, L.A.H., Antoine, J.M.R., Grant, C.N., Buddo, D.S.A., 2013. Evaluation of dietary exposure to minerals, trace elements and heavy metals from the muscle tissue of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus 1758). *Food Chem. Toxicol.* 60, 205-212.
- Goldstein, G.W., 1990. Lead poisoning and brain cell function. *Environ. Health Persp.* 89, 81-84.

- Graziano, J., Slavkovich, V., Liu, X., Factor-Litvak, P., Todd, A., 2004. A prospective study of prenatal and childhood lead exposure and erythropoietin production. *JOEM*. 46, 924-929.
- Greenbaum, C.J., 2002. Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18, 192-200.
- Greenfield, S.A., 1991. A Noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the Brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11, 55-77.
- IARC (Internacioanl Agency for Research on Cancer), 2006. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Summaries & evaluations: Inorganic and organic lead compounds. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans), Vol. 87.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283, 65-87.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Bio. Med.* 20, 463-466.
- Mahaffey, K.R., Fowler, B.A., 1977. Effects of concurrent administration of lead, cadmium, and arsenic in the rat. *Environ. Health Persp.* 19, 165-171.
- Meng, X., Gong, C., Cao, B., Peng, X., Wu, D., Gu, Y., Wei, L., Liang, X., Liu, M., Li, W., Su, C., 2015. Glucose fluctuations in association with oxidative stress among children with T1DM: comparison of different phases *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 1828-1836.
- Moreira, E.G., Rosa, G.J.M., Barros, S.B.M., Vassilieff, V.S., Vassillieff, I., 2001. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*. 169, 145-151.
- Mostafalou, S., Baeeri, M., Bahadar, H., Soltany-Rezaee-Rad, M., Gholami, M., Abdollahi, M., 2015. Molecular mechanisms involved in lead induced disruption of hepatic and pancreatic glucose metabolism. *Environ. Toxicol. Phar.* 39, 16-26.
- Nascimento, C.R.B., 2015. Efeitos da ingestão diária de ração contaminada por chumbo em ratas wistar de diferentes idades e gerações: acúmulo em tecidos, estresse oxidativo, danos genotóxicos e alterações fisiológicas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Lodnrina, Brasil. 184 p.

- Nolan, C.V., Shaikh, Z.A., 1992. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology*. 73, 127-146.
- Páez-Osuma, F., Bojórquez-Leyva, H., Bergés-Tiznado, M., Rubio-Hermández, O.A., Fierro-Sanudo, J.F., Ramírez-Rochín, J., León-Canedo, J.A, 2015. Heavy metals in Waters and suspended sediments affected by a mine tailing spill in the upper San Lorenzo River, Northwesters Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 583-588.
- Pal, M., Sachdeva, M., Grupta, N., Mishra, P., Yadav, M., Tiwari, A., 2015 may 26. Lead Eeposure in different organs of mammals and prevention by curcumin – nanocurcumin: a Review. *Biol. Trace Elem. Res.* DOI 10.1007/s12011-015-0366-8
- Pounds, J.G., Long, G.J., Rosent, J.F., 1991. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Persp.* 91, 17-32.
- Rahman, M.S., Molla, A.H., Saha, N., Rahman, A., 2012. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chem.* 134, 1847-1854.
- Reddy, G.R., Basha, Md.R., Devi, C.B., Suresh, A., Baker, J.L., Shafeek, A., Heinz, J.; Chetty, C.S., 2003. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 347-352.
- Rose, M., Fernandes, A., Mortimer, D., Baskaran, C., 2015. Contamination of fish in UK fresh water systems: risk assessment for human consumption. *Chemosphere.* 122, 183-189.
- Scott, A.M., Atwater, I.; Rojas, E., 1981. A method for the simultaneous measurement of insulin release and  $\beta$  cell membrane potential in single mouse islet of Langerhans. *Diabetologia* 21, 470-475.
- Shaik, A.P., Sultana, S.A., Alsaeed, A.H., 2014. Lead exposure: a summary of global studies and the need for new studies from Saudi Arabia. *Dis. Markers.* 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/415160>.
- Tarley, C.R.T., Coltro, W.K.T., Matsushita, M., Souza, N.E., 2001. Characteristic levels of some heavy metals from Brazilian Canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *J. Food Compos. Anal.* 14, 611-617.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2008. Draft final review of scientific information on lead. Geneva, United Nations Environment Programme Chemicals Branch.

- Urien, N., Uher, E., Billoir, E., Geffard, O., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Grammarus pulex*: influence of water chemistry and *in situ* validation. *Environ. Pollut.* 203, 22-30.
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Narin, I., Soylak, M., 2009. Evaluation of trace heavy metal levels of some fish species sold at retail in Kayseri, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 149, 223-228.

## **Capítulo VII**

**Efeitos da ingestão diária de chumbo em ratas Wistar e na sua prole:  
danos genotóxicos e estresse oxidativo**

---

## VII.1 Introdução

---

O chumbo (Pb) é um elemento sem função biológica no organismo e é tóxico, mesmo em níveis de exposição muito baixos, com efeitos agudos, subagudos e crônicos na saúde humana (UNEP, 2008). Este metal ocorre especialmente sob a forma inorgânica no meio ambiente e a exposição humana ocorre através do ar, poeira, solo, mas principalmente através do alimento e da água. Em média, na Europa, a exposição alimentar ao Pb em consumidores adultos é de  $0,50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia, em bebês e crianças é de 1,32 e  $1,03 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso por dia, respectivamente (EFSA, 2012). Nos países da União Europeia (SCOOP, 2004) a carne de pescado é um dos alimentos que mais contribui para a exposição alimentar ao Pb, especialmente na Grécia e Portugal. Nos Estados Unidos, concentrações de chumbo de  $2,3 \text{ mg Kg}^{-1}$  já foram determinadas na carne de *Micropterus salmoides*, peixe conhecido vulgarmente como “black bass” e muito utilizado na alimentação humana (U.S. Department of Health and Human Services, 2009). No reservatório da usina de Itaipú, localizado no Sul no Brasil, valores de até  $7,83 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$  foram determinados no filé do peixe *Pterodoras granulosus*, conhecido como armado, é uma das principais espécies da pesca comercial neste local (Chambo, 2011).

A contaminação de Pb nos corpos d'água têm sido extensivamente estudada ao longo de várias décadas (Ridhway e Price, 1987; Farmer et al., 1996; Du et al., 2015). Neste ambiente, o Pb é tóxico para as plantas, micro-organismos e animais, sendo bioacumulado em peixes e transferido aos seres humanos através da cadeia trófica (Yi et al., 2008). O peixe é extremamente nutritivo, sendo fonte de proteína e nutrientes essenciais, e nos últimos anos houve um aumento no consumo deste alimento. A produção mundial aquícola de peixe se expandiu a uma taxa anual de 6,2 % no período de 2000-2012, de 32,4 milhões para 66,6 milhões de toneladas. Neste período o crescimento foi relativamente mais rápido na África (11,7 %) e na América Latina e Caribe (10%) (FAO, 2014). Entretanto, o consumo de peixe contaminado é um dos responsáveis pela exposição dos seres humanos aos metais tóxicos, como o Pb, tornando uma preocupação global de saúde pública (Li et al., 2015).

A exposição ao Pb pode promover doenças, como hipertensão, doença renal, doença neurodegenerativa e comprometimento cognitivo. O Pb é capaz de induzir danos oxidativos no cérebro, coração, rins, fígado e órgãos reprodutivos, e há evidências que mesmo em baixas concentrações o Pb já promova doenças consequentes do estresse

oxidativo (Ahamed e Siddiqui, 2007). Metais com atividade redox como o Pb possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o radical hidroxil, que promovem danos no DNA, peroxidação lipídica, modificação em proteínas e outros efeitos, todos sintomáticos para numerosas doenças, envolvendo câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (Jomova e Valko, 2011). Estudos detalhados mostram o estresse oxidativo provocado pelo Pb atuando em várias funções do organismo (Lee et al., 2012; Tobwala et al., 2014; Kasperczyk et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão do Pb em parâmetros de estresse oxidativo, em ratas adultas e na sua prole, com diferentes idades, alimentadas diariamente com ração contaminada por Pb.

## VII.2 Material e métodos

---

### VII.2.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Logo após ocorrer o desmame (22 dias), animais pesando  $37 \pm 5,58$  g (n=40) foram transferidos para o biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram alojados individualmente em gaiolas em condições padrão ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com ciclo claro/escuro de 12:12-h). As ratas foram colocadas para acasalar, com 78 dias de idade. Para o acasalamento ratos Wistar foram colocados em gaiolas, junto com as fêmeas, na proporção 1:3 ou 1:4 (macho:fêmeas). Foram preservados 9 animais, de cada grupo (CTR e Pb) para a continuidade da pesquisa (N = 36). Comida e água foram ofertadas *ad libitum*. A pesagem dos animais e a verificação do consumo de ração foram realizadas 3 vezes na semana, porém a pesagem e verificação do consumo de ração das ratas prenhes foram suspensas quando foram colocados para acasalar, e apenas no dia da amostragem foi realizada nova pesagem. O cálculo para obter os valores da ração consumida foi feito pela subtração do resto de ração dentro da gaiola e na bandeja abaixo da gaiola do total de ração ofertada. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Animais Experimentais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel – Process: 34715.2011.16).

### **VII.2.2** *Delineamento experimental*

Para os experimentos foram utilizados 8 grupos de ratas (n = 9-10 em cada), dos quais 4 grupos de ratas com 140 dias (Mães 140d): 2 grupos CTR140d e 2 grupos Pb140d, que ficaram prenhes e amamentaram. Da prole destas ratas foram selecionadas fêmeas de 2 grupos CTR140d para formar os grupos prole controle de 45 dias (PCTR45d) e de 90 dias (PCTR90d) e de 2 grupos Pb140d para formar os grupos prole chumbo de 45 dias (PPb45d) e de 90 dias (PPb90d). As ratas dos grupos Mães 140d iniciaram a ingestão da ração manipulada logo após ocorrer o desmame, com 22 dias de idade, e foram alimentadas com a ração manipulada até completarem 140 dias de idade, sem interrupção durante o período de prenhez e amamentação. Os grupos Prole 45 dias e Prole 90d, após o desmame, permaneceram ingerindo ração manipulada por 45 dias e 90 dias respectivamente. O grupo prole controle (PCTR) ingeriu a ração sem a adição de Pb, e o grupo prole chumbo (PPb) ingeriu a ração contaminada com Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Para ratas, a idade de 45 dias corresponde ao período da puberdade, e de 90 e 140 corresponde à idade adulta, quando já pode ocorrer o acasalamento (Anderson et al., 2004).

### **VII.2.3** *Amostragem*

Os animais foram pesados e a eutanásia ocorreu através de exsanguinação com o animal sob efeito de anestesia geral (40 mg Kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico), e sem jejum prévio. O sangue foi coletado, a partir da veia cava inferior, e uma alíquota foi utilizada para a realização do ensaio alcalino do cometa. O fígado foi retirado para análise do conteúdo de glutathiona (GSH) e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST), para a verificação da ocorrência de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO). O rim esquerdo foi retirado para análise do conteúdo de GSH e da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST, para a verificação da ocorrência de LPO e PCO.

### **VII.2.4** *Análises bioquímicas no fígado e rim*

As amostras de fígado e rim foram pesadas, homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas. A concentração de proteína do

homogenato foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm de acordo com a metodologia de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A concentração de GSH na amostra de fígado e rim foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), por meio da reação da glutathiona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em 412 nm.

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com McCord e Fridovich (1969), por meio da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo superóxido, resultante da oxidação da xantina pela xantina oxidase, em 550 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD mg proteína<sup>-1</sup>, onde U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da CAT foi avaliada a partir da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com base na diminuição da absorbância a 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. A atividade da GPx foi avaliada de acordo com a metodologia de Hopkins e Tudhope (1973), baseada na oxidação de NADPH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em nmol de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. A atividade da GR foi estimada de forma indireta, pela redução do NADPH promovida pela GSSG (dissulfeto de glutathiona), em 340 nm e expressa em nmol min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup> (Carlberg e Mannervik, 1975). A atividade da GST foi determinada pelo monitoramento da complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976). A atividade da enzima foi expressa em nmol de CDNB conjugado min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>.

A peroxidação lipídica foi estimada a partir da produção de malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. O MDA foi determinado pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) que mede a quantidade de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 60°C, pela leitura de fluorescência (ex/em: 535nm/590 nm), seguindo a metodologia descrita por Federici et al. (2007).

Para avaliação de danos oxidativos em proteínas foi empregado o método descrito por Levini et al. (1994), que se baseia na reação do 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas, que podem ser detectadas a 348-370 nm.

### **VII.2.5** *Ensaio do Cometa em linfócitos*

O ensaio alcalino do cometa com linfócitos foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações descritas por Ramsdorf et al. (2009). Apenas as amostras de sangue que apresentaram viabilidade celular superior a 80%, determinadas pelo método de exclusão por azul de Trypan, foram utilizadas no ensaio do cometa. Após a amostragem, uma alíquota de sangue misturado com soro bovino fetal (1:10) foi adicionada a agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal e as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: a) lise: 1h, a 4°C, protegido de luz, em solução de lise (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-100 1 mL, pH 10.0); b) desnaturação do DNA: 40 min, no escuro, em um tampão de eletroforese (NaOH 0.3 N, EDTA 1mM, pH > 13); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1V cm<sup>-1</sup> e d) neutralização: três lavadas por 5 min cada com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram fixadas com etanol absoluto e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas. Posteriormente, as lâminas coradas com gelRed (Uniscience®) foram analisadas em microscópio Leica (DM 2500) adaptado para fluorescência/epifluorescência, equipado com filtro de excitação azul (450-490 nm) e um filtro de barreira de 515 nm com magnificação de 1000X. Todas as lâminas foram analisadas em teste-cego, sendo avaliados 100 nucleóides por animal. A extensão dos danos no DNA foi quantificada pelo comprimento da cauda formada pela migração dos fragmentos de DNA, e os danos foram classificados em quatro classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. O escore de danos no DNA foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo valor da classe.

### **VII.2.6** *Análise estatística*

As comparações dos parâmetros avaliados para ratas em cada uma das idades (45, 90 e 140 dias) foram feitas entre os grupos Pb e respectivos CTR, utilizando o teste *t* de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a distribuição de dados (normalidade e homogeneidade da variância). Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ . Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão.

### VII.3 Resultados

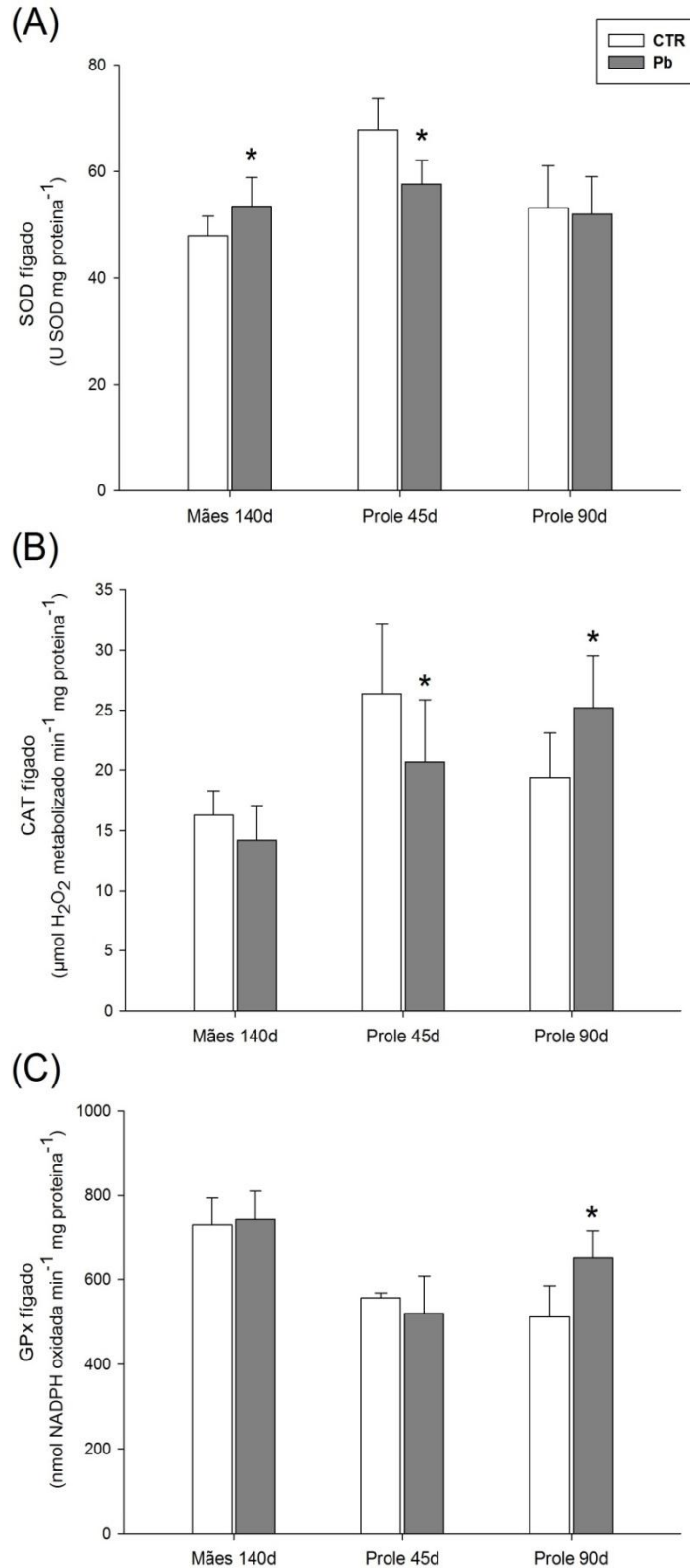
---

#### VII.3.1 *Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de GSH no fígado*

Quanto à atividade hepática das enzimas antioxidantes primárias SOD (Fig VII.1A), CAT (Fig VII.1B) e GPx (Fig VII.1C), ao conteúdo de GSH (Fig. VII.2A) e à atividade da GR (Fig. VII.2B) e GST (Fig. VII.2C), os efeitos do Pb variaram bastante entre os grupos. As ratas do grupo Pb140d apresentaram alteração apenas na SOD, que foi significativamente maior ( $P = 0,021$ ) em relação ao grupo CTR140d. Já os animais do grupo PPb45d apresentaram atividade significativamente menor tanto da SOD ( $P = 0,002$ ) quanto da CAT ( $P = 0,049$ ). Por outro lado, o grupo PPb90d apresentou atividade significativamente maior da CAT ( $P = 0,015$ ) e da GPx ( $P = <0,001$ ).

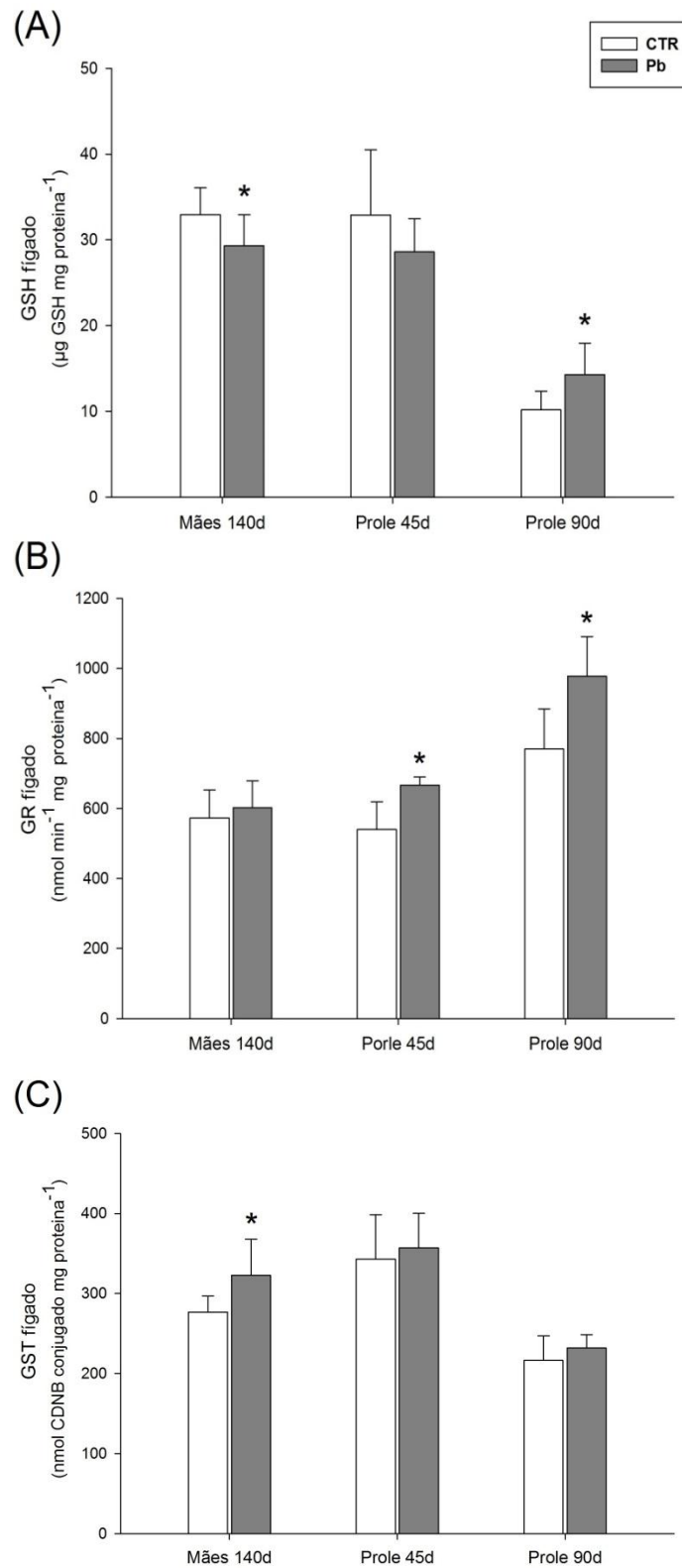
Em relação ao grupo controle, as ratas do grupo Pb140d apresentaram conteúdo de GSH no fígado significativamente menor ( $P = 0,032$ ) e atividade hepática da GST significativamente maior ( $P = 0,019$ ). Já no grupo PPb45d observou-se variação significativa na atividade da GR, que foi maior ( $P = 0,003$ ) em relação ao grupo PCTR45d. Por outro lado, as ratas do grupo PPb90d apresentaram valores de GSH e GR significativamente maiores ( $P = 0,017$  e  $P = 0,003$ , respectivamente) em comparação aos respectivos grupos CTR.

Capítulo VII



**Figura VII.1** Atividade hepática da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 6-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

## Capítulo VII



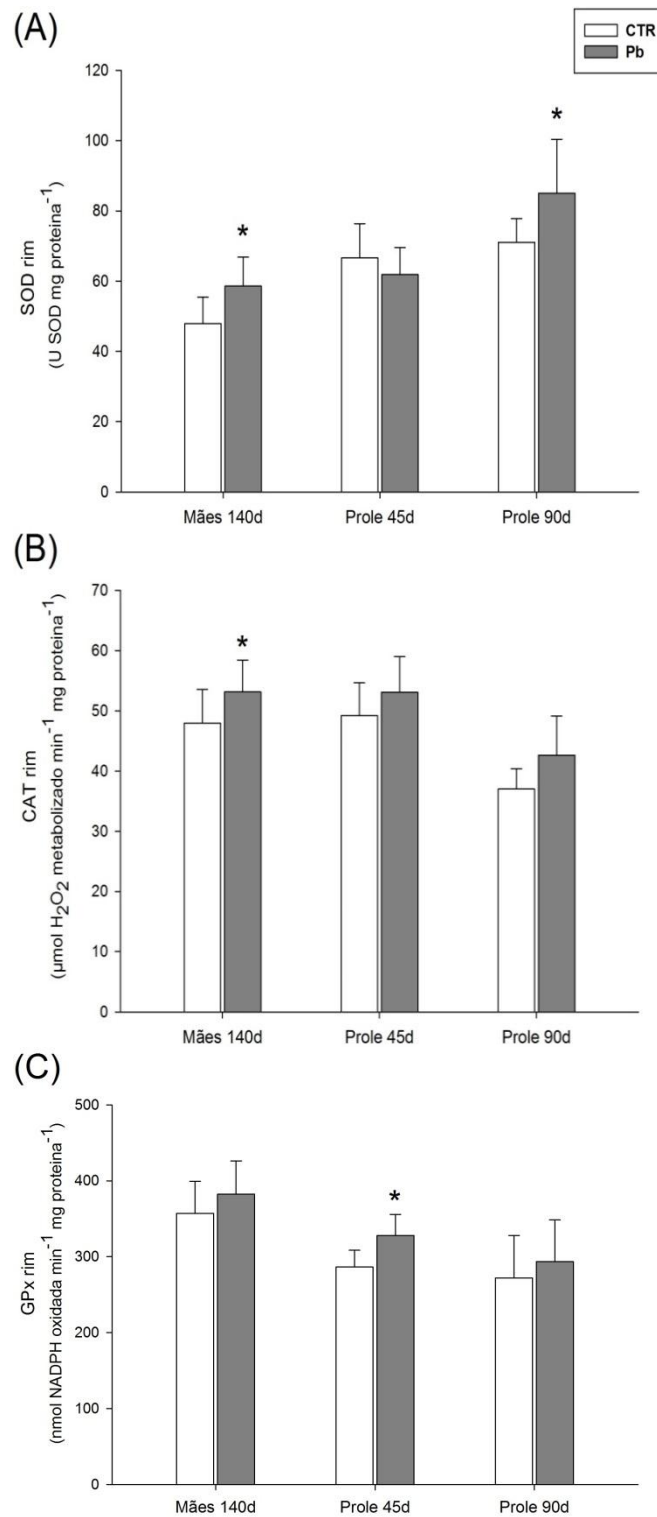
**Figura VII.2** Conteúdo de GSH no fígado (A) e atividade hepática da GR (B) e GST (C) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 7-10$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

**VII.3.2** *Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de GSH no rim*

As ratas do grupo Pb140d apresentaram atividade renal da SOD (Fig. VII.3A) e da CAT (Fig. VII.3B) significativamente maiores ( $P = 0,014$  e  $P = 0,045$ , respectivamente), em relação ao grupo CTR140d. Já a prole do grupo Pb45d apresentou atividade renal da GPx (Fig. VII.3C) significativamente maior ( $P = 0,004$ ) e do grupo Pb90d atividade da SOD significativamente maior ( $P = 0,030$ ) em relação aos respectivos grupos CTR.

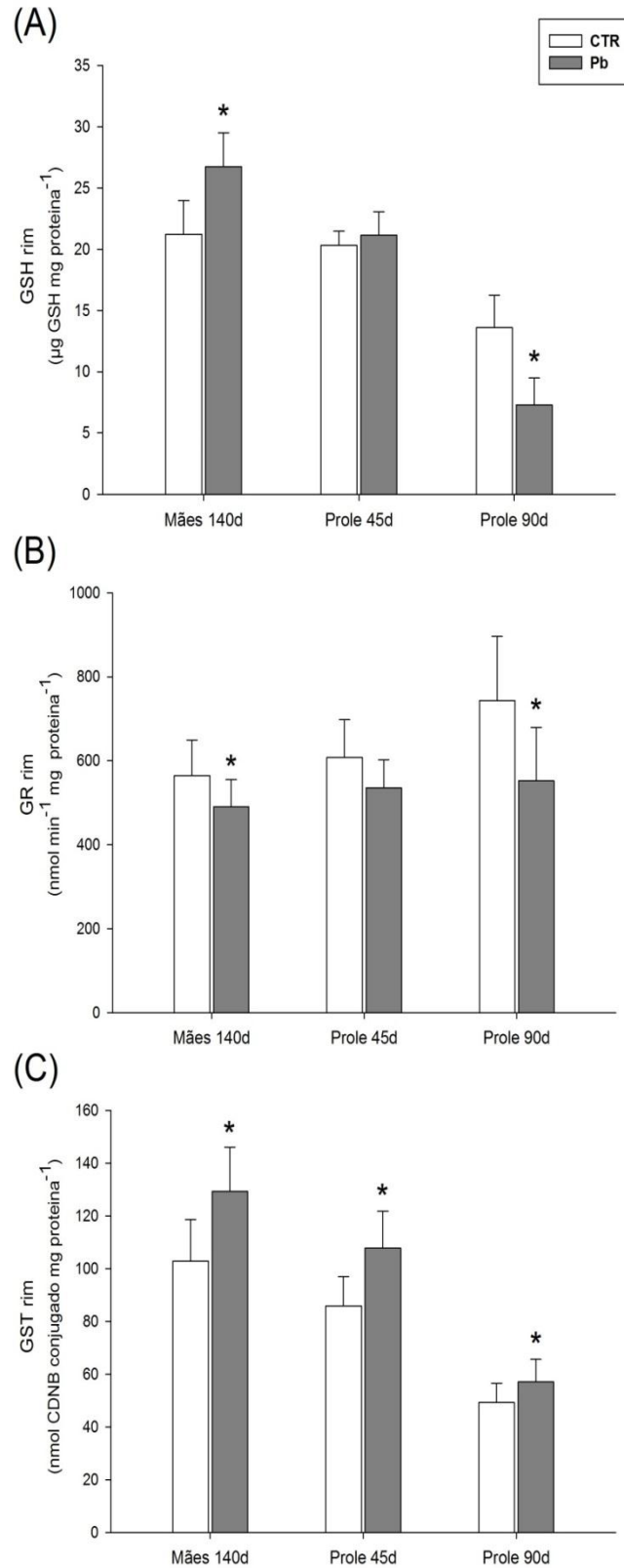
Em relação ao conteúdo renal de GSH (Fig. VII.4A) o efeito do Pb foi bastante variado, já que resultou em aumento significativo de GSH no grupo Pb140d ( $P < 0,001$ ), redução significativa no grupo PPb90d ( $P = 0,002$ ) e nenhuma alteração no grupo PPb45d. A atividade renal da GR (Fig. VII.4B) foi significativamente menor nos grupos Pb140d ( $P = 0,048$ ) e PPb90d ( $P = 0,011$ ) quando comparada aos respectivos controles. O efeito do Pb na atividade renal da GST (Fig. VII.4C) foi o mesmo nos três grupos experimentais, PPb140d, Pb45d e Pb90d, que apresentaram valores de GST significativamente maiores em relação aos respectivos grupos CTR ( $P = 0,003$ ,  $P = 0,004$  e  $P = 0,047$  respectivamente).

## Capítulo VII



**Figura VII.3** Atividade renal da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 9-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

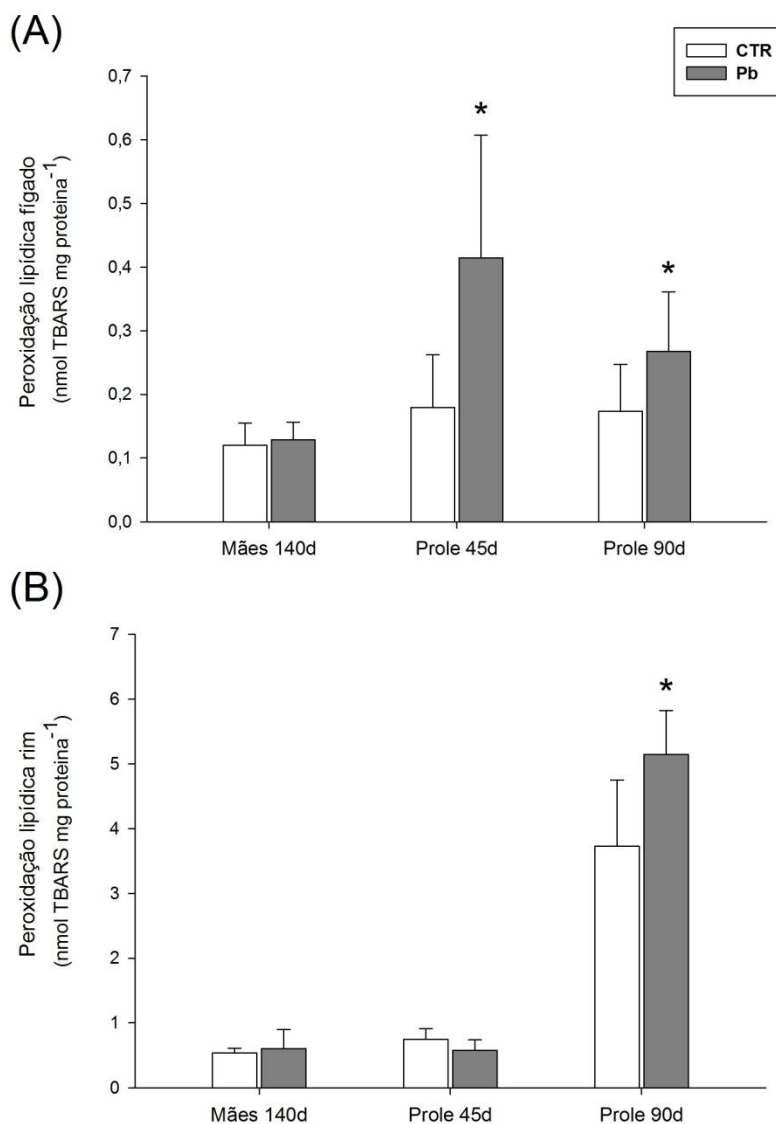
Capítulo VII



**Figura VII.4** Conteúdo de GSH no rim (A) e atividade renal da GR (B) e da GST (C) em ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 8-10). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade (P < 0,05).

### VII.3.3 Peroxidação lipídica no fígado e rim

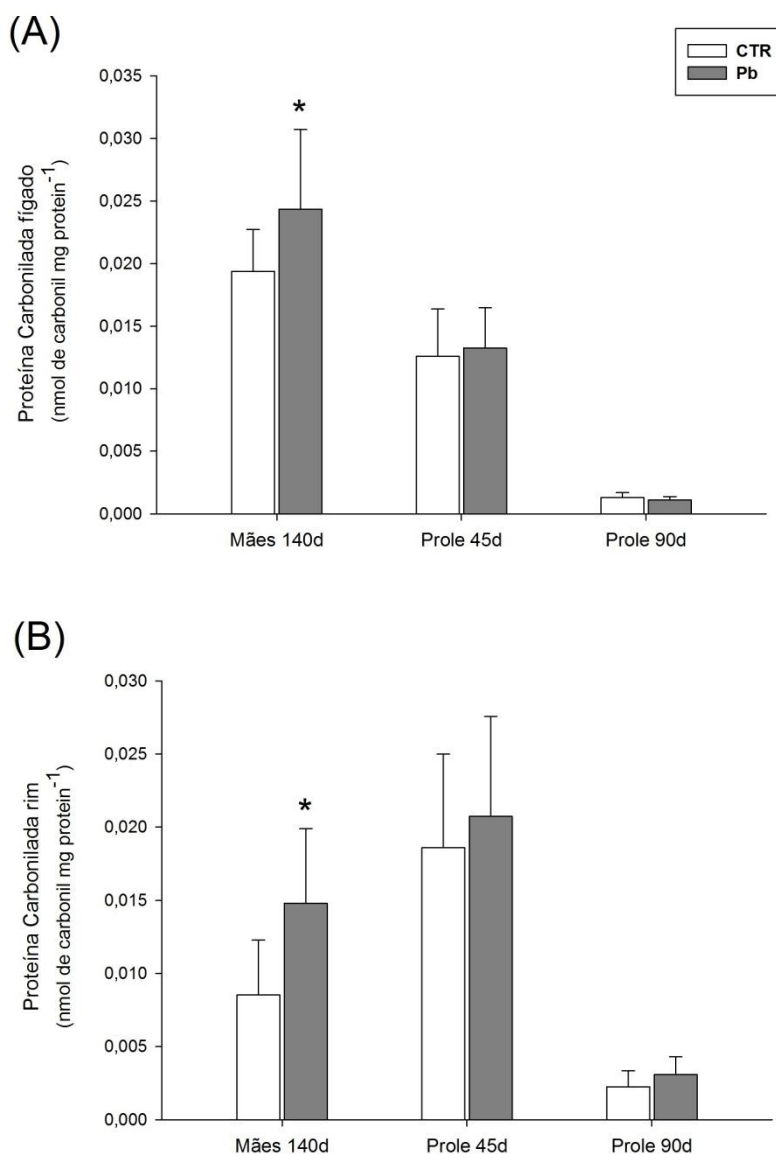
A peroxidação lipídica no fígado (Fig. VII.5A) foi significativamente maior nos grupos PPb 45d ( $P = 0,036$ ) e PPb 90d ( $P = 0,049$ ) em relação aos respectivos grupos CTR. Já no rim (Fig. VII.5B) a peroxidação lipídica foi significativamente maior apenas nas ratas do grupo PPb90d ( $P = 0,010$ ).



**Figura VII.5** Peroxidação lipídica em fígado (A) e rim (B) de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de 2,0 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão (n = 6-8). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

**VII.3.4** Proteínas carboniladas no fígado e rim

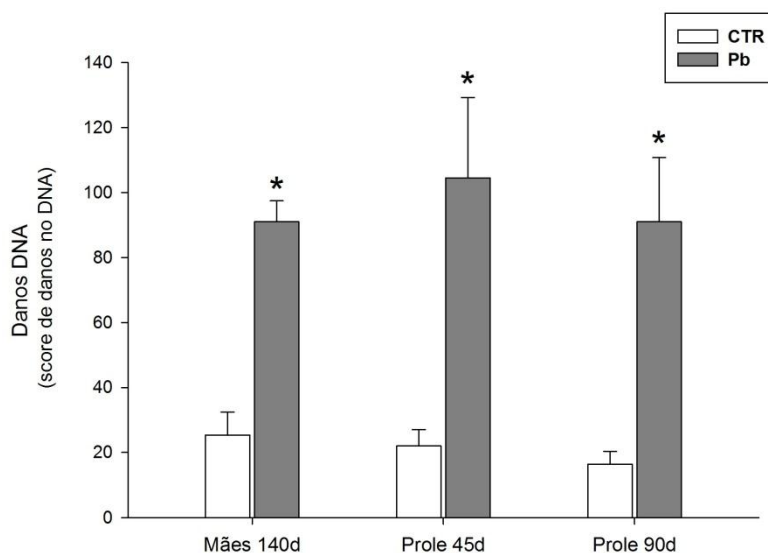
Apenas as ratas do grupo Pb140d apresentaram valores de proteínas carboniladas no fígado (Fig. VII.6A) e no rim (Fig. VII.6B) significativamente maiores ( $P = 0,048$  e  $P = 0,036$ , respectivamente), em relação aos respectivos grupos CTR.



**Figura VII.6.** Concentração de proteína carbonilada em fígado (A) e rim (B) de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 6-8$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

### VII.3.5 Danos no DNA de linfócitos

O escore médio de danos no DNA dos linfócitos (Fig. VII.7) foi significativamente maior nas ratas de todos os grupos que ingeriram ração contaminada com Pb (Pb140d:  $P = <0,001$ ; PPb45d:  $P = <0,001$ ; PPb90d:  $P = <0,001$ ), em relação aos respectivos grupos CTR.



**Figura VII.7** Danos no DNA dos linfócitos de ratas que ingeriram ração não contaminada (CTR) ou ração contaminada por Pb (Pb), na concentração de  $2,0 \text{ mg Pb Kg}^{-1}$ , logo após o desmame até completarem 140 dias e na sua prole, até completarem 45 e 90 dias. As colunas representam as médias e as linhas verticais o desvio padrão ( $n = 6-8$ ). \* indica diferença em relação às ratas do grupo CTR de mesma idade ( $P < 0,05$ ).

### VII.4 Discussão

Foram encontrados danos oxidativos no fígado e no rim de mães e proles alimentadas com Pb. As mães com 140 dias de idade apresentaram aumento na ocorrência de oxidação de proteínas, enquanto suas proles, com 45 e 90 dias de idade, apresentaram aumento na ocorrência de peroxidação lipídica nestes órgãos. O consumo de dieta contendo Pb também causou danos genotóxicos, com aumento da ocorrência de quebras no DNA de linfócitos nas ratas de todas as idades.

Quanto às defesas antioxidantes no fígado, nas ratas do grupo Pb 140d foi constatado o aumento da SOD e GST, com diminuição da GSH. A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, enquanto a CAT e a GPx neutralizam o peróxido de hidrogênio produzido nesta via e outras do metabolismo celular. Porém, não houve diferença nos valores destas duas enzimas importantes para a neutralização do peróxido de hidrogênio. Este desequilíbrio entre a produção e neutralização de ERO, caracteriza o estresse oxidativo, e o peróxido de hidrogênio pode produzir radical hidroxil que pode atacar os lipídios, proteínas e DNA (Kirkinezos e Moraes, 2001). No fígado destes animais não foi observado a ocorrência de peroxidação lipídica, mas houve oxidação de proteínas. Todos os resíduos de aminoácidos de proteínas são susceptíveis a oxidação por radical hidroxil, e alguns são mais vulneráveis para oxidação como a lisina, arginina, prolina e treonina. A oxidação por radical hidroxil pode ocorrer nas cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos, formando ligações cruzadas de proteína ou oxidação do esqueleto da proteína, podendo resultar na fragmentação e perda funcional desta proteína (Berlett e Stadtman, 1997). O aumento da GST no grupo Pb 140d também pode estar relacionado com um processo inflamatório, que estaria ocorrendo neste órgão em resposta ao estresse oxidativo. A GST está intimamente envolvida na síntese ou inativação de prostaglandinas (PGs), e síntese de leucotrienos, por conseguinte, desempenha um papel central na produção de mediadores inflamatórios (Atsmon, et al., 1990; Sherrat e Hayes, 2001; Hayes et al., 2005). A GST catalisa a isomerização de  $PGH_2$  para duas moléculas  $PGD_2$  e  $PGE_2$ , ou sua redução para  $PGF_{2\alpha}$  (Hayes et al., 2005). O produto da prostaglandina  $D_2$  é um composto citotóxico potente e sua inativação se dá facilmente pela conjugação com a GSH (Atsmon, et al., 1990). Outra ação que pode ser decorrente do aumento da GST seria a síntese de PGs para produzir proteínas de choque térmico. As PGs são capazes de induzir a expressão destas proteínas, que são formadas por um conjunto de polipeptídios sintetizados pelas células em resposta a um choque térmico ou outros tipos de estressores ambientais (Santoro et al., 1989).

No rim das mães 140d, o grupo Pb apresentou aumento SOD, CAT, GSH e GST, diminuição da GR e aumento de oxidação de proteínas. Como houve o aumento da SOD, deve ter ocorrido aumento de seu produto, peróxido de hidrogênio, e a enzima CAT pode ter aumentado para neutralizar esta ERO. Como ocorreu diminuição da atividade da GR, o aumento da GSH deve ter ocorrido por outra via, sem utilização do agente redutor NADPH. Uma das possibilidades seria pela importação de outros

tecidos, já que o rim pode captar a GSH a partir do plasma (Kretzschmari et al., 1992) e é o principal órgão de remoção da GSH circulante. A hipótese do fígado estar com GSH diminuída por efluxo celular pode explicar o aumento de GSH no rim, provavelmente para ser degradada. O aumento da GST no rim pode ser pelo mesmo mecanismo que ocorreu no fígado, já que este órgão também apresentou oxidação de proteína.

Os animais do grupo Prole 45d, ao terem contato com o Pb através das mães e até 45 dias de vida, apresentaram diminuição da SOD e CAT, com aumento da GR no fígado. A SOD e CAT podem ter sua diminuição pela ação direta do Pb nestas enzimas. A SOD requer cobre e zinco para a sua atividade, o cobre parece ter um papel funcional na reação de oxidação ao passo que o zinco parece estabilizar a enzima. O Pb se liga fortemente aos sítios proteicos de zinco (Godwin, 2001), resultando na desestabilização desta enzima. Já a CAT tem em sua estrutura o heme (Ercal, 2001), cuja síntese requer duas enzimas chaves, a ALAD (ácido  $\delta$  aminolevulínico desidratase) e a ferroquelatase, e ambas enzimas são sensíveis ao Pb. A inibição da ALAD resulta na elevação do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) (Ahamed e Siddiqui, 2007) que pode ser rapidamente oxidado no interior da célula e gerar ERO, principalmente o radical hidroxil (Patrick, 2006). Portanto, o Pb parece ter promovido o estresse oxidativo por inativar enzimas da defesa antioxidante e, indiretamente, promover aumento das ERO pelo bloqueio da síntese do heme. A ocorrência de ERO também foi indicada pelo aumento da atividade da GR, que reduz GSSG para GSH e, assim, apoia o sistema de defesa antioxidante indiretamente, porém não o suficiente para sobrepor a ausência de outras defesas para evitar o estresse oxidativo, já que foi observada a ocorrência de peroxidação lipídica nos hepatócitos destes animais. Uma dessas ERO, o radical hidroxil, pode atacar os ácidos graxos poli-insaturados das membranas. O comprimento da cadeia dos ácidos graxos e insaturações são fatores determinantes para a susceptibilidade da membrana à peroxidação, que afeta a atividade das enzimas de membrana, endo e exocitose, e o transporte dos solutos através da dupla camada (Patra et al., 2011).

Os efeitos observados no rim do grupo Prole 45d, referente às defesas antioxidantes, foram aumento da GPx e da GST, sem que houvesse um desequilíbrio entre a produção e neutralização das ERO. Isto porque não houve diminuição de outras enzimas importantes na neutralização do peróxido de hidrogênio como a CAT, ou diminuição da GSH por atuação do Pb por mecanismos já referidos neste estudo. Portanto, no rim destes animais parece não ter ocorrido estresse oxidativo, já que não houve aumento na ocorrência de peroxidação lipídica e tampouco de oxidação de proteínas. Provavelmente

pela ação protetora da MT que se apresentou elevada nas células do rim destes animais (Capítulo IV desta tese). Todavia, ocorreu aumento da atividade da GST que poderia estar ligado à síntese de PGs. As PGs renais estão ganhando crescente reconhecimento como moduladores importantes da hemodinâmica e função excretora do rim (Levenson et al., 1982). O Pb pode estar promovendo alguma alteração renal que exija a síntese de PGs, não necessariamente o estresse oxidativo.

As ratas que permaneceram ingerindo ração contaminada por Pb até 90 dias de vida (grupo Prole Pb90d) tiveram as seguintes alterações no fígado: aumento da CAT, GPx, GSH e GR, com ocorrência de peroxidação lipídica. O Pb tem a capacidade de elevar ou suprimir os níveis de cada defesa antioxidante, ou seja, as elevações das defesas antioxidantes já foram observadas em níveis mais baixos de exposição, enquanto que a supressão destas defesas pode ocorrer em níveis de exposição mais elevados ao Pb (Patrick, 2006). Parece que a resposta está ligada à concentração e o período de exposição a este metal. Nestes animais houve elevação de algumas defesas antioxidantes, mas esta compensação não foi suficiente para evitar o estresse oxidativo e o ataque do radical livre às membranas dos hepatócitos. Já no rim foi observado aumento da SOD e GST, e diminuição da GSH e GR, com ocorrência de peroxidação lipídica. Com aumento da SOD, mais peróxido de hidrogênio é formado e a GR, que recicla a GSH, estava diminuída. A GR possui uma ligação dissulfeto no seu sítio ativo que foi sugerido como alvo para a ligação ao Pb, resultando na inibição da enzima. Esta inibição leva a uma diminuição da relação de GSH/GSSG que vai tornar as células mais susceptíveis ao dano oxidativo (Ahamed e Siddiqui, 2007), evidenciado com a ocorrência de peroxidação lipídica no rim destes animais. O hidroperóxido de lipídio, produto peroxidação lipídica, pode ser inativado pela GST (Sherrat e Hayes, 2001). Assim, nestes animais, a GST poderia estar aumentada por estar atuando na neutralização do hidroperóxido de lipídio resultante da peroxidação lipídica que está ocorrendo no rim.

Todos os animais tratados com Pb, mães 140d, Prole 45d e Prole 90d, apresentaram danos genotóxicos nos linfócitos. O dano ao DNA induzido por Pb pode ser por consequência de eventos biológicos complexos, podendo ser resultante de estresse oxidativo (Fracasso et al., 2002). A geração de ERO foi demonstrado por Monteiro et al. (2011) como sendo o mecanismo de ação para explicar a genotoxicidade do Pb. Outra atuação do Pb causando dano ao DNA pode estar relacionado com a oxidação de ALA. O produto final da oxidação de ALA é o ácido 4,5-dioxovalérico, que é um agente

alquilante eficaz das porções de guanina do DNA. Ratos tratados com ALA tiveram níveis aumentados dos produtos da oxidação de DNA 8-oxo-7, 8-dihidroxi-2'-desoxiguanosina e 5-hidroxi-21-desoxicidina. Também há hipótese que o Pb pode interagir com os sítios de zinco sobre importantes proteínas associadas ao DNA (Patra et al., 2011). Os efeitos funcionais dos danos no DNA causados pelo Pb vão depender de quanto o DNA foi afetado, já que as células têm numerosos sistemas de reparo para remover ou reparar estes danos. Problemas funcionais vão ocorrer se os danos ocorrerem em locais críticos ou se não forem rapidamente reparados (Kehrer, 2000). Se a exposição ao Pb é demonstrado enfraquecer o sistema imunitário, resultando em um aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas e virais (Johnson, 1998), estes animais podem estar vulneráveis a exposição a vírus e bactérias.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a ingestão diária de uma dose baixa de Pb promove toxicidade no fígado, rim e linfócitos. O Pb causou estresse oxidativo no fígado das mães e suas proles, com conseqüente ataque às proteínas e às membranas celulares deste órgão. Embora as proles com 45 dias não apresentaram dano oxidativo no rim, as mães e sua prole com 90 dias de idade, apresentaram danos oxidativos, representados pela peroxidação lipídica e oxidação de proteína. O Pb também causou danos genotóxicos nos linfócitos. Portanto, ingerir diariamente um alimento contaminado na concentração estudada, pode causar danos no fígado, problemas renais e imunológicos, independente da idade de exposição.

### VII.5 Referências bibliográficas

---

- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57-64.
- Anderson, M.L., D'Almeida, V., KO, G.M., Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S., 2004. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1998. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e

- seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil.
- Atsmon, J., Freeman, M.L., Meredith, M.J., Sweetman, B.J., Roberts, L.J., 1990. Conjugation of 9-deoxy- $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$  (E)-prostaglandin D<sub>2</sub> with intracellular glutathione and enhancement of its antiproliferative activity by glutathione depletion. *Cancer Res.* 50, 1879-1885.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-890.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carlberg, I., Mannervil, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Chambo, A.P., 2011. *Bioindicadores para determinação de metais pesados no reservatório da Itaipu Binacional, Paraná, Brasil*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil. 98 p.
- Du, J., Du, J., Huang, D., Wang, J., Zhang, J., 2015. Seasonal distribution patterns of <sup>7</sup>Be and <sup>210</sup>Pb in surface sediments in the Changjiang Estuary, China and their implication. *J. Marine Syst.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.05.001>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10, 2831.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529-539.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014. *The state of world fisheries and aquaculture - Opportunities and challenges*. Rome.
- Farmer, J., Eades, L.J., Mackenzie, A.B., Kirika, A., Bailey-Watts, T.E., 1996. Stable lead isotope record of lead pollution in Loch Lomond sediments since 1630 A.D. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3080-3083.

- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415-430.
- Fracasso, M.E., Perbellini, L., Soldà, L., Talamini, G., Franceschetti, P., 2002. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat. Res.* 515, 159-169.
- Godwin, H.A., 2001. The biological chemistry of lead. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 5, 223-227.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Hematol.* 25, 563-575.
- Johnson, J.M., 1998. The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res.* 410, 123-140.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283, 65-87.
- Kasperczyk, A., Dobrakowski, M., Czuba, Z., Horak, S., Kasperczyk, S., 2015. Environmental exposure to lead induces oxidative stress and modulates the function of the antioxidant defense system and the immune system in the semen of males with normal semen profile. *Toxicol. Appl. Pharm.* 284, 339-344.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- Kirkinezos, I.G., Moraes, C.T., 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell Dev. Biol.* 12, 449-457.
- Kretzschmar, M., Pfeifer, U., Machnik, G., Klinger, W., 1992. Glutathione homeostasis and turnover in the totally hepatectomized rat: evidence for a high glutathione export capacity of extrahepatic tissues. *Exp. Toxic. Pathol.* 44, 273-281.
- Lee, J.C., Son, Y.O., Pratheeshkumar, P., Shi, X., 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Bio. Med.* 53, 742-757.
- Levenson, D.J., Simmons, C.E., Brenner, B.M., 1982. Arachidonic acid metabolism, prostaglandins and the kidney. *Am. J. Med.* 72, 354-374.

- Levini, R.L., Williams, J.A., Stadman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* 233, 346-357.
- Li, P., Zhang, J., Xie, H., Liu, C., Liang, S., Ren, Y., Wang, W., 2015. Heavy metal bioaccumulation and health hazard assessment for three fish species from Nansi Lake, China. *Buul. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 431-436.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.G., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291-298.
- Patra, R.C., Rautray, A.K., Swarup, D., 2011. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.* 2011, 9.
- Patrick, L., 2006. Lead Toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Med. Rev.* 11, 114-127.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M., 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutat. Res.* 673, 78-81.
- Ridgway, I.M., Price, N.B., 1987. Geochemical associations and post-depositional mobility of heavy metals in coastal sediments: Loch Etive Scotland. *Marine Chem.* 21, 229-248.
- Santoro, M.G., Garaci, E., Amici, C., 1989. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells *Cell Biology.* 86, 8407-8411.
- SCOOP - Reports on tasks for scientific cooperation, Task 3.2.11, 2004. Assessment of dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States.
- Sherrat, P.J., Hayes, J.D., 2001. Glutathione S-transferase. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics.* 320-352.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

## Capítulo VII

- Tobwala, S., Wang, H.J., Carey, J.W., Banks, W.A., Ercal, N., 2014. Effects of lead and cadmium on brain endothelial cell survival, monolayer permeability, and crucial oxidative stress markers in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Toxics*. 2, 258-275.
- U.S. Department of Health and Human Services, 2009. Health Consultation, Simpson Park Lake - St. Louis County, Missouri. Missouri Department of Health and Senior Services and U.S. Department of Health and Human Services.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2008. Draft final review of scientific information on lead. Geneva, United Nations Environment Programme Chemicals Branch.
- Yi, Y., Wang, Z., Zhang K., Yu G., Duan X., 2008. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. *Int. J. Sediment Res.* 23, 338-347.

## **Capítulo VIII**

### **Considerações finais**

---

## Capítulo VIII

Com os resultados produzidos neste trabalho foi possível constatar a atuação do Pb no organismo promovendo alterações metabólicas, danos no fígado, rim e células sanguíneas (Tabela VII.1).

A hipótese central deste trabalho foi confirmada ao se verificar que o chumbo promove alterações bioquímicas, genotóxicas e metabólicas quando ingerido diariamente na concentração de 2,0 mg de Pb por Kg de alimento, e que estas alterações podem variar nas diferentes idades de vida, e causar maiores danos quando a segunda geração é exposta.

Quanto ao peso corporal, não foi possível definir um padrão na variação de peso das ratas de diferentes idades expostas ao metal, indicando que o mecanismo de ação do Pb atuando diretamente no ganho ou perda de peso deve ser mais explorado. Um resultado comum a todos os grupos estudados foi no perfil glicêmico, visto que todos os grupos que ingeriram Pb apresentaram hiperglicemia. Esta resposta evidencia que o Pb pode alterar o perfil glicêmico, seja por promover aumento da ingestão alimentar, com aumento de insulina circulante, ou por promover a supressão de liberação de insulina pelo pâncreas.

Os resultados dos parâmetros hematológicos analisados confirmaram que o Pb atua nos eritrócitos, resultando em diminuição de hemoglobina com o aumento da idade na primeira geração. Parece haver um mecanismo compensatório aumentando as células vermelhas circulantes nos animais da segunda geração exposta ao Pb.

No cérebro o Pb promoveu aumento na atividade da AChE, nas ratas de maior idade da segunda geração, nas quais também foi detectado Pb no cérebro.

O Pb promoveu estresse oxidativo no fígado, indicado pela ocorrência de peroxidação lipídica nos animais tanto da primeira quanto da segunda geração e pela oxidação de proteína nas ratas de 140d (mães). O aumento das PSMT neste órgão não foi suficiente para impedir os danos oxidativos. Já no rim, apenas na prole de menor idade não houve indicação de danos oxidativos, indicando uma possível ação protetora das PSMT. Por outro lado, a falta de resposta na concentração das PSMT no rim das mães e em sua prole de maior idade pode ter contribuído para a ocorrência dos danos oxidativos observados neste órgão.

**Tabela VIII.1** Alterações fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas nos grupos de ratas que ingeriram ração contaminada por Pb, comparada aos seus respectivos controles.

PARÂMETROS ANALISADOS	Pb 45d	Pb 90d	Pb 140d	PPb 45d	PPb 90d
<i>Acúmulo de Pb</i>					
Células do sangue	↑	=	=	=	↑
Fígado	↑	↑	↑	=	↑
Rim	↑	=	↑	=	↑
Ossos	↑	↑	↑	↑	↑
Intestino	=	=	=	=	↑
Cérebro	=	=	=	=	↑
Ovário	=	=	=	=	↑
Músculo	=	=	=	=	↑
Leite			↑		
Ganho de peso	↑	=	↓	=	=
Consumo de ração	↑	=	nd	=	↓
<i>Plasma</i>					
Glicose	↑	↑	↑	↑	↑
Insulina	↑	↓	↓	↓	↑
Cortisol	=	=	=	=	=
<i>Sangue</i>					
Htc	=	=	=	=	=
Hb	=	↓	=	=	=
RBC	=	=	=	↑	↑
<i>Cérebro</i>					
AChE cerebral	=	=	=	=	↑
<i>Fígado</i>					
Glicogênio	=	↓	↓	↓	↓
SOD	=	=	↑	↓	=
CAT	↓	=	=	↓	↑
GPx	↓	=	=	=	↑
GSH	=	↑	↓	=	↑
GR	↑	=	=	↑	↑
GST	=	=	↑	=	=
LPO	↑	↑	=	↑	↑
PCO	=	=	↑	=	=
PSMT	↓	↑	↑	=	=
<i>Rim</i>					
SOD	nd	nd	↑	=	↑
CAT	nd	nd	↑	=	=
GPx	nd	nd	=	↑	=
GSH	nd	nd	↑	=	↓
GR	nd	nd	↓	=	↓
GST	nd	nd	↑	↑	↑
LPO	nd	nd	=	=	↑
PCO	nd	nd	↑	=	=
PSMT	=	↑	=	↑	=
<i>Linfócitos</i>					
Danos DNA	↑	↑	↑	↑	↑

↑ indica resultado significativamente maior, em relação ao respectivo controle; ↓ indica resultado significativamente menor, em relação ao respectivo controle; = indica que não houve variação significativa em relação ao respectivo controle; nd indica parâmetro não determinado para aquele grupo.

## Capítulo VIII

Outra consequência da ingestão diária de Pb, na concentração estudada, foi o aumento de danos no DNA dos linfócitos. Estes danos ocorreram em todas as idades e gerações, demonstrando assim que o Pb é genotóxico.

A ingestão de Pb na concentração estudada resultou no acúmulo do metal em vários tecidos, que foi dependente do tempo de tratamento e da exposição pré-natal. A primeira geração mostrou o crescente acúmulo de Pb nos ossos, porém houve uma alternância de acúmulo nos tecidos, indicando que a idade pode ser relevante para a presença de Pb nas células sanguíneas, fígado e no rim. Na segunda geração, constatou-se maior concentração de Pb nos ossos, provavelmente devido ao contato com o metal através da placenta e leite materno, mas o acúmulo de Pb foi mais expressivo na prole mais velha. Estes resultados mostram que a segunda geração mais velha está mais susceptível à toxicidade do Pb no organismo.

Em suma, os resultados descritos ao longo desta tese permitem um melhor entendimento dos efeitos do Pb, administrado junto com o alimento, no organismo de animais com diferentes idades e gerações. Desta forma, estes resultados devem fornecer subsídios para se avaliar e prevenir os danos causados na saúde de quem consome alimento contaminado com o Pb.