



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

LUANA KETLEN REIS LEÃO

**EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A DOSE BAIXA DE
CHUMBO INDUZ DÉFICITS LOCOMOTORES E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
ASSOCIADOS A ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO SINÁPTICA**

Belém-PA

Dezembro/2018

LUANA KETLEN REIS LEÃO

**EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A DOSE BAIXA DE
CHUMBO INDUZ DÉFICITS LOCOMOTORES E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
ASSOCIADOS A ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO SINÁPTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Neurociências, como requisito final para obtenção do Grau de doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues
Lima

Belém-PA

Dezembro/2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente
pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

R375e Reis Leão, Luana Ketlen.

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A DOSE BAIXA DE CHUMBO INDUZ DÉFICITS LOCOMOTORES E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADOS A ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO SINÁPTICA / Luana Ketlen Reis Leão. — 2018.

88 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Chumbo. 2. atividade locomotora. 3. alterações morfológicas. 4. estresse oxidativo. 5. alteração sináptica. I. Título.

CDD 571.95

Dezembro/2018

Leão, Luana Ketlen Reis.

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A DOSE BAIXA DE
CHUMBO INDUZ DÉFICITS LOCOMOTORES E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
ASSOCIADOS A ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO SINÁPTICA/Luana Ketlen
Reis Leão – Belém, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Projeto (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências
Biológicas. Área de concentração: Neurociências. Linha de Pesquisa:
Neurofarmacologia.

LUANA KETLEN REIS LEÃO

**EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A DOSE BAIXA DE
CHUMBO INDUZ DÉFICITS LOCOMOTORES E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
ASSOCIADOS A ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO SINÁPTICA**

Tese apresentada e aprovada em 19/12/2018 pela banca examinadora:

Prof. Dr. Marco Aurélio de Moura Freire

Faculdade de Ciências Biomédicas – UERN

Prof^a. Dr^a. Renata Duarte de Souza Rodrigues

Escola de Teatro e Dança da Universidade Federal do Pará (ETDUFPA)

Dr^a. Lygia Segal Nogueira

Instituto Evandro Chagas - IEC

Belém, 18 de dezembro de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, com auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedico esta tese,

A minha filha Cecília e ao meu esposo Francis, que foram minha fortaleza durante todo o tempo empenhado no desenvolvimento deste trabalho. Por todo suporte estrutural e emocional, sempre me mostrando que precisamos confiar nos planos de Deus, mesmo eles não sendo óbvios na maioria das vezes. Por todo o amor, carinho, compreensão e companheirismo. É só mais um ciclo que se fecha e, ao mesmo tempo, outro que se inicia, porém com a certeza de que tudo dará certo, pois eu tenho vocês ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de estar viva e ser capaz de desenvolver este magnífico trabalho, por ter me mostrado o que era certo a ser feito num momento decisivo da minha vida profissional, me tornando capaz de realizar mudanças fundamentais que contribuíram para que eu me tornasse o que sou hoje.

Possuo um sentimento de gratidão eterno à minha família, que me incentivaram nos momentos mais difíceis, me ofereceram suporte, me ajudaram a cuidar da minha filha quando se fez necessário, mediante a minha ausência em prol do desenvolvimento deste doutorado, sempre com muito amor e carinho, em especial a minha mãe!

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Rafael Rodrigues Lima, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e de auxiliar em muitos outros, os quais estamos colhendo os frutos e ainda virão muitos outros pela frente. Agradeço também a oportunidade de ter feito parte da família LABEF, onde todos foram sempre muito solícitos e fundamentais para a conclusão deste trabalho, em especial ao aluno de iniciação científica Leonardo Bittencourt e a aluna de mestrado Priscila Nascimento.

Obrigada à banca avaliadora deste trabalho: Prof. Dr. Marco Aurélio, Prof. Dr^a. Renata Rodrigues e Dr^a. Lygia Nogueira, tenham a certeza de que todas as suas contribuições serão ouvidas e acatadas. Gostaria de agradecer ainda às Professoras Maria Elena Crespo-López, Barbarella Macchi, Cristiane Maia, Marília Buzalaf e Kelly Dantas, pela parceria e por disponibilizarem os seus laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho, bem como todas as suas contribuições. Obrigada!

Gostaria de agradecer as minhas amigas que, apesar de não nos vermos diariamente como antes, não me abandonaram, mesmo com as imposições feitas por nossos antigos orientadores. Muito obrigada, Bruna Puty, Nayara Kauffmann, Lizandra Souto, Ana Paula Araújo, Carol Vasconcelos e Brenda Ataíde. Agradeço também aqueles que estiveram presentes em momentos importantes no início de tudo, como a Alódia Brasil, Tayana Carvalho, Suellen Moraes, Tarcyane Garcia, Caio Maximino, Edinaldo Moraes, Prof^a. Adelaide Passos e Prof. Evander Batista, pessoas que me ensinaram o trabalho árduo de bancada e experimentação durante todos esses anos de vida científica.

Além de todas essas pessoas, não poderia deixar de agradecer aos meus ex orientadores, Prof. Anderson Manoel Herculano e Prof^a. Karen Oliveira. Eles foram fundamentais na minha formação acadêmica, sempre depositando total confiança na minha capacidade em fazer ciência. Quando eu entrei no LNE, foi mediante uma seleção para aluno de iniciação científica voluntário, na qual eu apreensei um artigo escolhido pelo professor e, nesta ocasião, eu apresentei os dados do artigo em forma de texto, visto que eu não sabia como colocar as figuras na apresentação. Lembro-me de nem querer apresentar, pois eu havia visto a apresentação anterior e estava muito mais elaborada, mas naquele dia tive o apoio dos alunos do laboratório e mesmo assim apresentei. Olhando para trás nesse momento e percebendo a minha total evolução, percebo que naquele dia eu já fazia parte da família que o LNE foi para mim. Comecei em 2009 sob a orientação do Prof. Herculano, trabalhando com proteção natural contra déficits comportamentais induzidas por MeHg, depois passei a trabalhar com malária, sendo a primeira aluna da Prof^a. Karen. Apesar das minhas ideias sempre terem sido muito parecidas com as do professor Herculano, a professora Karen sempre me ensinou a arte em fazer ciência, foram muitos e muitos dias até tarde no laboratório tentando desenvolver algumas técnicas novas e eu nunca estive sozinha, ela sempre estava lá. Todo dia tinha uma coisa nova, um artigo novo e ela pensava: vamos? E eu: já começamos! E foi assim que saiu o primeiro extravasamento vascular do laboratório, dentre muitas outras coisas. Muitas coisas foram aprendidas, exatamente tudo, na verdade! O meu amor pela ciência, o meu compromisso com as minhas apresentações e com o meu trabalho e com as pessoas que financiam isso. Eu admiro os dois, obviamente, mas aqui tem um sentimento especial pela professora Karen guardadinho no lado esquerdo do peito. Ela foi a pessoa na qual eu me espelhei para chegar onde estou hoje. Ela é o meu exemplo de mulher na ciência (quando eu era 'criança eu queria ser que nem ela!'). Então, professor Herculano e ex chefe, o meu muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim e me ensinaram, eu serei eternamente grata, de coração.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os envolvidos na minha trajetória, desde a iniciação científica até aqui. Todos que fizeram parte de alguma forma, muito obrigada!

“Ai daqueles que pararem com sua capacidade de sonhar, de invejar sua coragem de anunciar e denunciar. Ai daqueles que, em lugar de visitar de vez em quando o amanhã pelo profundo engajamento com o hoje, com o aqui e o agora, se atrelarem a um passado de exploração e de rotina.”

Paulo Freire

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado, que pode ser utilizado na produção de diversos compostos. A principal via de exposição do homem é através do consumo de comida ou água contaminada, sendo que uma vez absorvido, cerca de 99% do chumbo circulante difunde-se para tecidos moles, dentes, ossos e cérebro. No Sistema Nervoso Central (SNC), diversos estudos vêm demonstrando déficits na capacidade de aprendizagem, cognição e desenvolvimento intelectual em humanos expostos ao chumbo durante determinado período da vida. Contudo, encontra-se pouco compreendido os mecanismos de ação envolvidos com a toxicidade do Pb. A partir disso, este estudo buscou avaliar os efeitos exploratórios, motores e teciduais induzidos pela exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de chumbo, associado a possíveis mecanismos de ação. Foram utilizados ratos machos Wistar, expostos durante 55 dias a uma dose de 50mg/Kg de Pb por gavagem, sendo que os animais controles receberam água destilada. Realizou-se os testes de campo aberto, plano inclinado e rota-rod para avaliação locomotora. Foi realizada coloração com hematoxilina e eosina, bem como, imuno-histoquímica para quantificação de neurônios maduros, bainha de mielina e vesículas sinápticas. Para avaliação da expressão de proteínas foi realizado o perfil proteômico. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de *Student*, sendo considerado como significativo $p < 0,05$. Após observamos depósito de chumbo apenas no cerebelo, foi possível caracterizar déficits exploratórios e motores nos ratos expostos ao chumbo, sendo que observamos diminuição no número de células de Purkinje, bem como neurônios maduros, diminuição de vesículas sinápticas e diminuição da bainha de mielina. Na avaliação da indução de estresse oxidativo, foi possível avaliar aumento de MDA e nitrito apenas no córtex motor. E na avaliação da expressão de proteínas, ambas as regiões apresentaram alterações em proteínas responsáveis pelo processo de liberação de neurotransmissores, bem como receptores e segundos mensageiros e, ainda, proteínas envolvidas com processo de apoptose. Com isso, concluímos que a exposição subcrônica a baixa dose de Pb de ratos Wistar jovens promoveu alterações locomotoras e histológicas, associado a indução de estresse oxidativo, alterações no processo de sinalização celular, bem como morte por apoptose.

Palavras-chave: Chumbo, atividade locomotora, alterações morfológicas, ratos jovens, baixas doses, estresse oxidativo, alteração sináptica.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a heavy metal, which can be utilized in the production of several compounds. The main route of human exposure is through the consumption of contaminated food or water, and once absorbed, about 99% of the circulating lead spreads to soft tissues, teeth, bones and brain. In the Central nervous system (CNS), several studies have demonstrated deficits in learning capacity, cognition and intellectual development in humans exposed to lead during a given period of life. However, it is poorly understood the mechanisms of action involved with the toxicity of Pb. From this, this study aimed to evaluate the exploratory, motor and tissue effects induced by the subchronic exposure of young wistar rats to 50 mg/Kg of lead, associated with possible mechanisms of action. Male Wistar rats were exposed for 55 days at a dose of 50mg/Kg of Pb per gavage, and the control animals received distilled water. The open field, inclined plane and route-rod tests were performed for locomotor evaluation. Staining was performed with Hematoxylin and Eosin, as well as immunohistochemistry for the quantification of mature neurons, myelin sheath and synaptic vesicles. To evaluate the protein expression, the Proteomic profile was performed. The statistical analysis was performed by Student's T-Test, being considered significant $p < 0.05$. After we observed lead deposition only in the cerebellum, it was possible to characterize exploratory and motor deficits in the rats exposed to lead, and we observed a decrease in the number of Purkinje cells, as well as mature neurons, reduction of vesicles synaptic and decreased myelin sheath. In the evaluation of oxidative stress induction, it was possible to evaluate the increase of MDA and nitrite only in the motor cortex. And in the evaluation of protein expression, both regions presented alterations in proteins responsible for the release process of neurotransmitters, as well as receptors and second messengers, and also proteins involved in the process of apoptose. Thus, we conclude that the subchronic exposure to low Pb dose of young Wistar rats promoted locomotor and histological tracings, associated with induction of oxidative stress, alterations in the process of cell signaling, as well as death by apoptosis.

Keywords: lead, locomotor activity, morphological alterations, young rats, low doses, oxidative stress, synaptic alteration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Órgãos, tecidos e células afetadas pelas diferentes exposições ao chumbo presente no meio ambiente. Adaptado de Boskabady et al., 2018.----- 5
- Figura 2:** Possíveis mecanismos de ação da exposição ao chumbo sobre diversos órgãos. Adaptado de Boskabady et al., 2018.-----11
- Figura 3:** Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de campo aberto. Autoria: Priscila Cunha.-----16
- Figura 4:** Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de Plano inclinado. Autoria: Priscila Cunha.-----17
- Figura 5:** Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-Test). Autoria: Priscila Cunha.-----18
- Figura 6:** Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o ganho de massa corpórea.-----29
- Figura 7:** Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre depósito de chumbo no cerebelo.-----30
- Figura 8:** Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial no córtex motor de ratos expostos ao grupo PB vs controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da ontologia gênica do processo biológico. Termos significativos (escore Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com o percentual de número de genes. O número de acessos de proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plug-in ClueGo® do software de Cytoscape® 3.6.1.-31
- Figura 9:** Subredes criadas pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do córtex motor com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós vermelhos indicam proteínas exclusivas/exclusivas do grupo controle. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulada e upregulada, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----32
- Figura 10:** Subredes criadas pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do córtex motor com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós vermelhos indicam proteínas exclusivas/exclusivas do grupo controle. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulada e upregulada, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----32
- Figura 11:** Subredes criadas pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do córtex motor com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós vermelhos indicam proteínas exclusivas/exclusivas do grupo controle. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulada e upregulada,

respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----33

Figura 12: Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial no cerebelo de ratos expostos ao grupo PB vs controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da ontologia gênica do processo biológico. Termos significativos (escore Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com o percentual de número de genes. O número de acessos de proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plug-in ClueGo® do software de Cytoscape® 3.6.1.-34

Figura 13: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----35

Figura 14: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----35

Figura 15: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----36

Figura 16: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.-----37

Figura 17: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a bioquímica oxidativa no córtex motor. Em (A) Níveis de nitrito, (B) Níveis de MDA.	38
Figura 18: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a bioquímica oxidativa no cerebelo. Em (A) Níveis de nitrito, (B) Níveis de MDA.	39
Figura 19: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de neurônios de Purkinje do cerebelo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias representativas do (A) grupo controle administrado com água destilada e (B) grupo exposto ao acetato de chumbo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 30 μm	40
Figura 20: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o córtex motor. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias representativas de (A) animais controles administrados com água destilada e (B) animais expostos ao acetato de chumbo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 30 μm	41
Figura 21: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de células NeuN ⁺ no córtex motor. Fotomicrografias representativas do grupo controle (A) e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 20 μm	42
Figura 22: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de células NeuN ⁺ no cerebelo. Fotomicrografias representativas do (A) grupo controle e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 20 μm	43
Figura 23: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcção de proteína básica de mielina (MBP) em cerebelo. (A) Grupo controle e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 20 μm	44
Figura 24: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcção da sinaptofisina (SINA) no córtex motor. (A) Grupo controle e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 20 μm	45
Figura 25: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcção da sinaptofisina em cerebelo. (A) Grupo controle e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Barra de escala: 20 μm	46
Figura 26: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade exploratória no teste de campo aberto. Em (A) Distância total percorrida, (B) Distância percorrida na área central, (C) Distância percorrida na área periférica.	48
Figura 27: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade exploratória no teste de campo aberto. Em (A) Cruzamento de quadrantes, (B) 'Rearing'.	49
Figura 28: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre coordenação motora, equilíbrio e força muscular no teste de plano inclinado.	50
Figura 29: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade motora no teste de Rota-rod.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

(HO ^{2*})	Peróxido hidroelétrico
4-HA	4-hidroxiálcenos
ACN	Acetonitrila
AMBIC	bicarbonato de amônio
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHC	Barreira hematoencefálica
BSA	Soro bovino
CAT	Catalase
GABA	Ácido γ -aminobutirico
GPx	Glutaciona peroxidase hepática
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona s-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
IAA	Iodoacetamida
IEC	Instituto Evandro Chagas
LDH	Lactato desidrogenase
LNNE	Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malonaldeído
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMFI	N-metil-2-fenilindol

NO	Óxido nítrico
Pb	Chumbo
PbCO ₃	Carbonato de chumbo
PbS	Sulfeto de chumbo
PbSO ₄	Sulfato de chumbo
PM	Peso Molecular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO CHUMBO	4
1.3 EFEITOS DO CHUMBO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	7
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO ASSOCIADOS A TOXICIDADE DO CHUMBO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MODELO EXPERIMENTAL	15
3.2 EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO	15
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	16
3.3.1 Campo aberto	16
3.3.2 Plano inclinado	17
3.3.3 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-Test)	17
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO TECIDUAL DE CHUMBO	19
3.5 AVALIAÇÃO TECIDUAL	19
3.5.1 Processamento tecidual e cortes histológicos	19
3.5.2 Coloração por Hematoxilina e Eosina	20
3.5.3 Imunohistoquímica	20
3.6 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	21
3.6.1 Quantificação de nitrito	21
3.6.2 Quantificação de Peroxidação lipídica	22
3.6.3 Quantificação de proteína	22
3.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO	23

3.7.1 Extração de proteínas	23
3.7.2 Eletroforese bi-dimensional	24
3.7.3 Visualização e análise de imagens da eletroforese bi-dimensional	25
3.7.4 Preparo das amostras para a espectrometria de massas	25
3.7.5 Sequenciamento das proteínas	27
3.7.6 Análise das sequencias peptídicas	27
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS	29
4.1 EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE Pb NÃO INDUZ ALTERAÇÃO NO GANHO DE MASSA CORPÓREA	29
4.2 EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE Pb INDUZ ACÚMULO DE CHUMBO NO CEREBELO	29
4.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb SOBRE O PERFIL PROTEÔMICO E A BIOQUÍMICA OXIDATIVA DO CÓRTEX MOTOR E CEREBELO	30
4.3.1 Perfil proteômico do córtex motor de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica a 50 mg/Kg de chumbo	30
4.3.2 Perfil proteômico do cerebelo motor de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica a 50 mg/Kg de chumbo	33
4.3.3 Exposição ao chumbo induz estresse oxidativo apenas no córtex motor	37
4.4 EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb INDUZ DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE PURKINJE NO TECIDO CEREBELAR	39
4.5 EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb PROMOVE DIMINUIÇÃO NA COMPOSIÇÃO TECIDUAL NO CÓRTEX MOTOR E CEREBELO	40
4.5.1 Diminuição do número de neurônios maduros no córtex motor e cerebelo	41
4.5.2 Diminuição da bainha de mielina no cerebelo	43

4.5.3 Diminuição de vesículas sinápticas no córtex motor e cerebelo -----	44
4.6 ALTERAÇÕES EXPLORATÓRIAS E MOTORAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO SUBCRONICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE CHUMBO -----	46
5 DISCUSSÃO -----	52
6 CONCLUSÕES -----	58
7 REFERÊNCIAS -----	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O chumbo (Pb) é um metal pesado, levemente azulado, com propriedades únicas, como maciez, alta maleabilidade, ductilidade, baixo ponto de fusão (327.502°C), que está disponível naturalmente na crosta terrestre sob a forma livre, apresentando quatro formas isotópicas (PM: 208, 207, 206 e 204), em forma metálica ou conjugado a outros compostos (SHARMA AND DUBEY, 2005; JACOBS et al., 2009) como carbonato de chumbo (PbCO₃), sulfato de chumbo (PbSO₄), sulfeto de chumbo (PbS), dentre outros (ATSDR, 2007) .

Inicialmente, o Pb foi utilizado para produção de armas, adornos e utensílios pelos antigos egípcios, devido ao baixo ponto de fusão, durabilidade e facilidade em formar ligas metálicas. Além disso, na Roma antiga, era comum o uso deste metal na composição de cosméticos e tintas (LARINI et al., 1997). Contudo, com o avanço da industrialização o Pb passou a ser utilizado na produção de pesticidas e fertilizantes, gasolina e pigmentos, baterias, cosméticos, produtos de metal, como munições, soldas, canos de encanamento, dentre outros (THÜRMER et al., 2002; FORTOUL et al., 2005; SHARMA AND DUBEY, 2005; MARTIN AND GRISWOLD, 2009). Tornando-se um importante contaminante ambiental, com natureza não biodegradável, que apresenta efeitos tóxicos bem descritos na literatura, podendo ser considerado como um problema de saúde pública (NRC, 1972; CHEN et al., 1997; SMITH et al., 2009, 2010).

Os níveis de Pb no meio ambiente tem aumentado mais de 1.000 vezes nos últimos três séculos como resultado da atividade humana. O maior aumento ocorreu entre os anos 1950 e 2000, e refletiu o aumento do uso mundial de gasolina com Pb. Em 1979, os carros foram responsáveis por liberar cerca de 94,6 milhões kg de Pb no ar nos Estados Unidos. Em 1989, quando o uso de Pb foi limitado, mas não suspenso, os carros liberaram cerca de 2,2 milhões kg (ATSDR, 2007).

O solo é considerado um dos principais depósitos de Pb e a sua contaminação pode ocorrer de forma natural ou através de atividades de mineração, o que ocasiona uma variação dos níveis de Pb encontrados em diferentes regiões (LARINI et al., 1997). Com relação a água potável, os níveis de contaminação são inferiores a 5 µg/L. No entanto, a água retirada de torneiras domiciliares, onde o Pb pode ficar em repouso

nos encanamentos, pode ser detectado níveis superiores a 100 µg/L, especialmente quando a água permanece parada nos canos durante algumas horas (IPCS, 1995). Vale ressaltar que os valores de tolerância de chumbo presente em água potável segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) passaram de 50 µg/L em 1984 para 10 µg/L em 1993 (WHO 1993).

A poluição do meio ambiente representa a principal via de exposição de animais silvestres (HARDING et al., 1998; SMITH et al., 2009, 2010; TÊTE et al., 2015). Aves aquáticas são expostas ao Pb através da cadeia trófica após o consumo de peixes contaminados, representando a via de poluição primária. Assim como, aves de rapina são expostas ao Pb durante o consumo de carcaças de cervos (via de poluição secundária) (STAUBER et al. 2010).

Smith et al., (1985) observaram o envenenamento por Pb em ovelhas, no qual verificaram que a concentração desse metal no leite das mesmas (8,1%) foi maior do que o permitido. No Egito, Zaki et al., (2010) observaram que oito em cada cinquenta ovelhas apresentaram toxicidade pelo Pb após consumirem plantas contaminadas por este metal. Em outro estudo, analisou-se o plasma de animais expostos ao Pb, no qual verificaram alto grau de degeneração dos rins e fígado, acompanhado de elevados níveis de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, ureia, creatinina, cortisol, sódio e potássio no plasma (PLUMB, 2002).

A exposição do homem ao Pb, de modo geral, ocorre a partir do consumo de alimentos ou água contaminados. Porém, pode-se destacar o contato com o solo ou poeira, ou ainda através da inalação, principal via responsável pela exposição de trabalhadores industriais que produzem ou refinam Pb ou compostos de Pb, também chamada de contaminação ocupacional (IPCS, 1995; SOLIMAN et al., 2013).

Segundo a OMS, o Pb é reconhecido como um dos elementos químicos que apresentam maior risco à saúde humana, podendo atingir e se depositar em diferentes órgãos e tecidos (VANZ et al., 2003). As diferentes estruturas anatômicas e a presença de sítios ligantes que atraem o íon metálico determinam a sensibilidade e a ação tóxica provocada pelos metais pesados nos organismos vivos (MOREIRA AND MOREIRA, 2004).

Existem três principais vias de absorção do Pb pelo homem, sendo que as mesmas estão de acordo com a composição deste metal. Compostos inorgânicos, mais

comumente formados por sais e óxidos de chumbo (macromoléculas), podem ser diretamente absorvidos, distribuídos e excretados. Esses compostos são responsáveis, principalmente, pela intoxicação através das vias respiratória e digestiva (BOSKABADY et al., 2018). Outra via de absorção é a pele, que ocorre através do uso de cosméticos e de remédios que possuem Pb em sua composição (BOSKABADY et al., 2018). A absorção pelo sistema respiratório ocorre após a inalação de compostos da atividade industrial, gasolina e tinta (BOSKABADY et al., 2018). Por fim, a absorção pelo sistema digestivo está relacionada com o consumo de água e comida contaminada (BOSKABADY et al., 2018).

1.2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO CHUMBO

O primeiro registro de envenenamento por Pb foi realizado a mais de 100 anos atrás. Desde então, a compreensão científica da natureza, bem como importância deste metal tem aumentado em um ritmo acelerado (NRIAGU et al., 1997; KASUBA et al., 2010). Até 1943, acreditava-se que pessoas expostas a doses agudas de Pb, sem evolução para óbito, eram capazes de recuperar-se completamente. Contudo, Needleman et al., (1990), demonstraram as primeiras comprovações científicas de déficits comportamentais e fisiológicos permanentes de crianças expostas a doses agudas de Pb.

Os tratos gastrointestinais e respiratórios são as principais vias de absorção do Pb (LEVIN AND GOLDBERG, 2000), porém ele também pode ser absorvido pela pele (chumbo composto na gasolina). Quase 35–40% das partículas de Pb inaladas são depositadas nos pulmões, 37% de todas as partículas de chumbo $\leq 1 \mu\text{m}$ são depositadas na região alveolar e 50% do Pb depositado no trato respiratório é absorvido, entrando na circulação sistêmica (LEVIN AND GOLDBERG, 2000). Cinco a 15% do Pb inorgânico ingerido é absorvido pela mucosa gastrointestinal. Entretanto, esta porcentagem depende de fatores como a idade, presença de gravidez e fatores nutricionais como o cálcio, zinco, magnésio e o fosfato (RUSSELL JONES, 1989).

Uma vez absorvido, cerca de 99% do Pb circulante se liga a eritrócitos e difunde-se para tecidos moles, dentes, ossos e cérebro (HOHNADDEL et al., 1973 KHAROUBI et al, 2011; KOH et al, 2015) (Figura 1). Concentrações sanguíneas iguais ou maiores que 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ apresentam risco iminente para crianças, jovens e adolescentes e concentrações sanguíneas igual ou acima de 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ não são seguras para adultos que sofrem exposição ocupacional (BARRY, 1975).

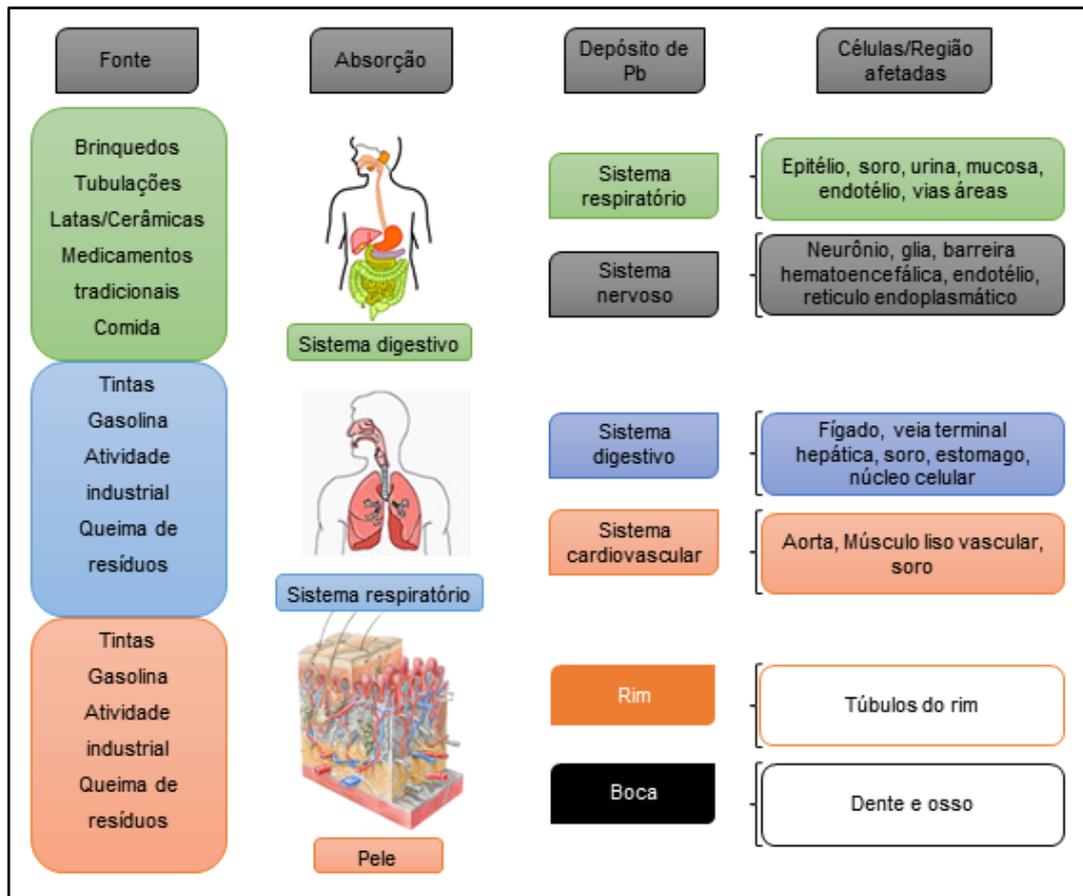


Figura 1: Órgãos, tecidos e células afetadas pelas diferentes exposições ao chumbo presente no meio ambiente. Adaptado de Boskabady et al., 2018.

Após episódio de exposição ao chumbo, em uma escala de 30-80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de Pb no sangue, o homem pode apresentar sintomas clínicos como dor abdominal, cólica gastrointestinal, constipação e paralisia intestinal (MUDIPALLI, 2007). Além disso, estudos em modelo animal e *in vitro*, destacam o papel hepato-carcinogênico do Pb (MUDIPALLI, 2007), sendo que o fígado é o primeiro órgão a entrar em contato com xenobióticos.

Abirami et al., (2007) demonstraram que injeções intraperitoneais de 10 mg/Kg de Pb é capaz de induzir hepatotoxicidade, mediante o aumento de fosfatase ácida, fosfatase alcalina, aspartato transaminase, alanina transaminase, níveis de lactato desidrogenase, bem como anormalidades em hepatócitos. Somado a isso, dados na literatura demonstraram que exposição de ratos ao Pb induz diminuição da glutatona

peroxidase hepática (GPx), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), redução da glutathione (GSH), ocasionando déficits na resposta antioxidante endógena (OMOBOWALE et al., 2014). Demonstraram ainda, aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio H₂O₂.

No sistema cardiovascular, a exposição ao Pb pode induzir o quadro de hipertensão (NAWROT et al., 2002; NAVAS-ACIEN et al., 2007), sendo que Vazire et al., (1997) e Ding et al., (1998) demonstraram que este quadro está envolvido com a alteração do metabolismo de óxido nítrico (NO), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e alteração da homeostasia de NO, após exposição de ratos machos ao Pb.

Já no sistema urinário, Liu et al., (2012) demonstraram que elevadas doses de acetato de chumbo (500 mg/L) induziram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, ocasionado pela produção de peroxidação lipídica, assim como diminuição dos níveis de GSH. Além disso, eles também demonstraram que o Pb induziu apoptose pela técnica de TUNEL através da ativação da mitocôndria e liberação de citocromo c, inibição de Bcl-2 e ativação de caspase-3 no tecido renal.

Os efeitos desencadeados pela exposição ao Pb variam de acordo com a dose exposta, o tempo de exposição e a idade (FDA, 2000). Yuan et al., (2014), observaram o efeito da exposição de ratos machos e fêmeas (Sprague-Dawley) a doses agudas e subcrônica (90 dias) do mix de chumbo e cádmium. Neste estudo, foi determinado LD₅₀ de 2696.54 mg/Kg pelo método de Bliss (BLISS, 1939) no tratamento agudo. Já no ensaio subcrônica, foi testado 3 doses: 29.96 mg/Kg (baixa); 89.88 mg/Kg (média); 269.65 mg/Kg (alta), administrados diariamente por gavagem durante 90 dias. Foi demonstrado que os parâmetros avaliados apresentaram um efeito dose-dependente, sendo que mesmo a dose mais baixa foi capaz de induzir alterações em alguns parâmetros hematológicos e clínicos.

Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos com doses baixas, administrados via oral (principal via de exposição humana), durante períodos subcrônico ou crônicos, com modelo animal entre 4-8 semanas pós-natal.

1.3 EFEITOS DO CHUMBO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

No Sistema Nervoso Central (SNC), diversos artigos ao longo dos anos vêm demonstrando déficits na capacidade de aprendizagem, cognição e desenvolvimento intelectual em humanos expostos ao Pb durante algum período da vida (STEWART et al., 2006; CECIL et al., 2008; JUSKO et al., 2008; BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012).

Anteriormente, acreditava-se que adultos demonstravam resistência aos efeitos neurotóxicos de Pb devido aos seus complexos mecanismos de defesa e o desenvolvimento da barreira hematoencefálica (BHC). Contudo, estudos recentes indicam que vários fatores ambientais, incluindo o Pb, podem induzir déficits neurológicos em adultos (BRADBURY AND DEANE, 1993; JAKUBOWSKI, 2011) e perda de volume do cérebro em idosos (STEWART et al., 2006; CECIL et al., 2008). Além disso, Baranowska-Bosiacka et al., (2012) sugeriram que a exposição a longo prazo ao Pb induz alterações cognitivas, bem como mudanças neurofisiológicas, as quais podem acelerar ou desencadear doenças neurodegenerativas.

Ainda assim, jovens e crianças são mais propícias a desenvolver déficits neurológicos após exposição ao Pb (LANPHEAR et al., 2005; JUSKO et al., 2008). Estudos recentes em humanos demonstraram que a exposição ao Pb^{2+} no início da vida está associada a diminuição da função cognitiva (SCHWARTZ, 2000), bem como comportamento antissocial e delinquente persistente (NEEDLEMAN et al. 1996; CANFIELD et al. 2003; BELLINGER; 2004). Além disso, dados da literatura apontam que baixas concentrações de Pb são suficientes para alterar processos bioquímicos, assim como induzir desordens não específicas no funcionamento do cérebro, como diminuição da percepção, déficits visuais, auditivos e cognitivos (AL-SALEH et al., 2009; BIJLOOR et a., 2012). Crianças expostas a doses agudas de Pb (80 g/dL) apresentaram formação de edema cerebral, episódios de convulsão e coma, além de induzir um quadro de encefalopatia (BRADBURY AND DEANE 1993)

O Pb induz alterações estruturais na barreira hematoencefálica, ocasionando degeneração glial, permitindo a entrada de patógenos. Uma vez depositado na região encefálica, o dano induzido por Pb ocorre, principalmente, no córtex pré-frontal, no cerebelo e no hipocampo, afetando muitas atividades biológicas em nível molecular,

celular e intracelular, o que pode resultar em alterações morfológicas permanentes (BOSKABADY et al., 2018.).

Tang et al., (1996) demonstraram que o Pb induziu o descolamento de células astrocíticas em cultura celular de forma dose e tempo dependente. Além disso, induziu o aumento da densidade lisossomal, inclusão nuclear, expansão do retículo endoplasmático rugoso e aumento na produção de lactato desidrogenase (LDH) e diminuição de grupamentos sulfidrilas. Outro efeito do Pb sobre as células astrocíticas é a indução de mudança conformacional de proteínas do retículo endoplasmático e do ciclo celular, bem como o aumento dos níveis de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e proteína S100-β (SELVIN-TESTA et al., 1991; STRUZYNSKA et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Dados da literatura também demonstraram que o Pb participa da ativação de astrócitos e processos inflamatórios no cérebro (Microglia) (STRUZYNSKA et al., 2007; ZHANG et al., 2008). As células gliais representam 90% da composição celular do SNC, atuando principalmente como células de sustentação e manutenção para os neurônios (LOPACHIN et al., 1991).

A comunicação química neuronal é mediada por sinapses, que são rápidas e eficientes na liberação de neurotransmissores. Essa liberação ocorre em zonas ativas pré-sinápticas que são regiões especializadas, justapostas a região pós-sináptica. Em terminais pré-sinápticos, os neurotransmissores são armazenados em vesículas sináptica, as quais migram e se ligam ao terminal pré-sináptico para liberação dos neurotransmissores após a membrana celular sofrer despolarização e o influxo de Ca^{2+} (RIZZOLI AND BETZ, 2005; DENKER AND RIZZOLI, 2010). Alterações nesse processo de comunicação celular pode induzir o desenvolvimento de doenças neurológicas (VAN SPRONSEN et al., 2010; VOS et al., 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que a exposição aguda ou crônica ao Pb^{2+} induz alterações na liberação de neurotransmissores em modelos *in vivo* e *in vitro*. Lasley et al., (2002) observaram que o chumbo diminuiu a liberação de glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) evocado em ratos jovens e em cultura de hipocampo e 'slices' de cérebro expostos agudamente ao Pb (BRAGA et al., 1999; XIAO et al., 2006), porém pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesses déficits.

Processos celulares fundamentais, como sinalização intracelular e entre células, adesão celular, maturação de proteínas, apoptose, transporte de ions, regulação

enzimática e liberação de neurotransmissores tem sido muito alterado por esse mecanismo (NEAL et al., 2013). Além disso, esse mecanismo também contribui para a indução de déficits neurológicos após a permuta de Pb com íons de cálcio, tornando-o capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), assim como induzir o acúmulo de Pb em células astrogliais (contendo proteínas ligantes de chumbo), sendo que a toxicidade do chumbo é mais proeminente em células astrogliais imaturas (sistema nervoso em desenvolvimento), tornando fácil a indução de danos nessas células, dificultando a formação da bainha de mielina, ambos envolvidos no desenvolvimento da BHE (FLORA, 2011; KATSUYAMA et al., 2012).

É importante ressaltar que o sistema neuroquímico está diretamente relacionado com processos de aprendizagem e memória, cognição, bem como planejamento e execução de movimentos e emoção (NEAL et al., 2010a; NEAL et al., 2010b; STANSFIELD et al., 2012). Portanto, a indução de estresse oxidativo, ativação de proteínas envolvidas no processo de apoptose, bem como alteração na liberação de neurotransmissores podem promover alterações funcionais permanentes.

1.4 MECANISMOS DE AÇÃO ASSOCIADOS A TOXICIDADE DO CHUMBO

A capacidade de vincular alterações comportamentais induzidas quimicamente a alterações de parâmetro neurofisiológico e neuroquímico resulta em maior aceitação da validade e confiabilidade de mecanismos neurocomportamentais. O Pb pode causar efeitos imediatos, alterando a química e fisiologia do cérebro (FINKELSTEIN, et al., 1998; SIDHU AND NEHRU, 2003).

Os mecanismos celulares, intracelulares e moleculares de neurotoxicidade de Pb são numerosos, uma vez que o Pb impacta muitas atividades biológicas em diferentes níveis de controle: nos canais de voltagem e no primeiro, segundo e terceiro sistemas de mensageiro (CHEN, et al., 1998; SIDHU AND NEHRU, 2003). Esses efeitos podem estar relacionados à capacidade do Pb de interferir na ação regulatória do cálcio nas funções celulares. Conseqüentemente, pode-se supor que a ligação atua como um estressor químico e causa alterações dos mecanismos celulares homeostáticos. Isso se expressa tanto no local anatômico quanto nos sistemas de neurotransmissores, que são cruciais na modulação da resposta emocional (COLLINS, et al. 1992; CHEN, et al., 1998; SIDHU AND NEHRU, 2003).

A maioria dos estudos sobre o chumbo buscam elucidar seus efeitos sobre os diversos sistemas do corpo humano, como os sistemas hematológicos, cardiovasculares, renais, reprodutores e neurológicos (ATSDR, 2007). Contudo, poucos estudos buscam elucidar os mecanismos de ação envolvidos nos déficits encontrados nesses sistemas. O estresse oxidativo pode desempenhar um importante papel sobre as alterações induzidas pela exposição ao chumbo, desencadeando o desbalanço entre a produção de radicais livres e os mecanismos de proteção de moléculas antioxidantes (proteção endógena), promovendo dano celular (ISHIKAWA, 2012).

De acordo com a literatura, duas vias são responsáveis por estimular simultaneamente o estresse oxidativo durante a exposição ao chumbo (Figura 2). Uma delas é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido hidroelétrico (HO^2^*), oxigênio atômico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A outra via está relacionada com a diminuição na biodisponibilidade de moléculas antioxidantes endógenas (KATSUYAMA et al., 2012). O Pb apresenta uma alta capacidade em compartilhar elétrons, o que facilita a formação de ligações covalentes entre ele e os

grupamentos sulfidrilas presentes em enzimas antioxidantes como a GSH, inativando-as. Além disso, o Pb promove a diminuição de GSH, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (ATSDR, 2007). Um bom marcador para estresse oxidativo é a peroxidação de lipídios de membrana, visto que as ROS retiram elétrons da camada lipídica da membrana celular, ocasionando dano celular através da desnaturação lipídica (FLORA, 2011; ISHIKAWA, 2012; KATSUYAMA et al., 2012).

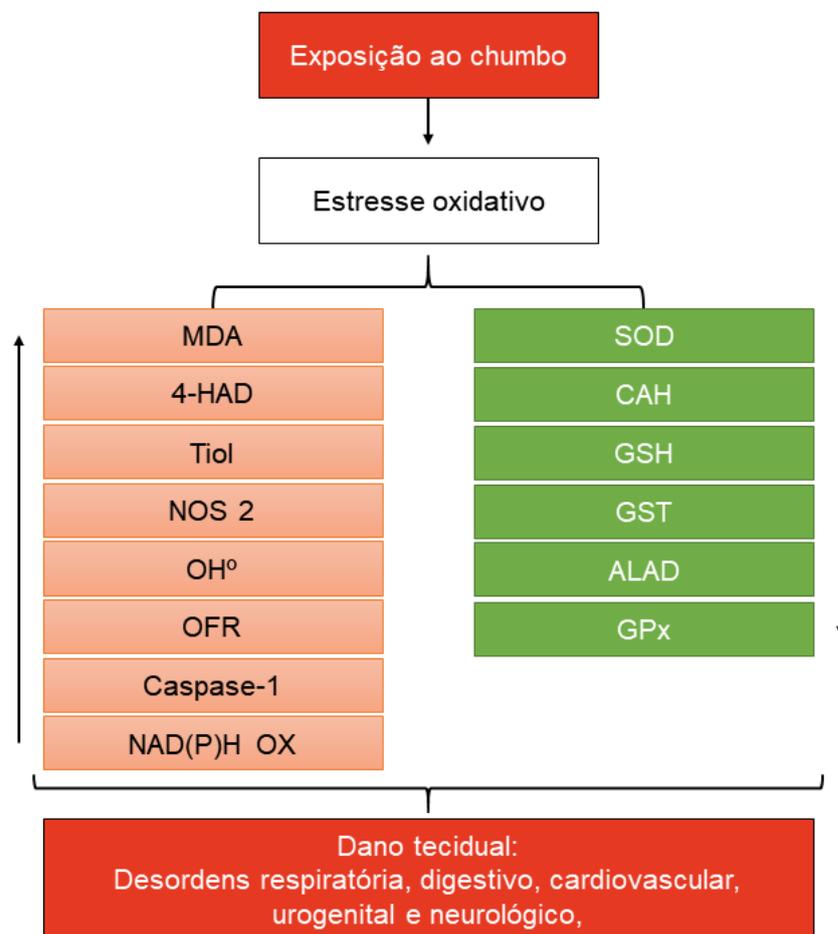


Figura 2: Possíveis mecanismos de ação da exposição ao chumbo sobre diversos órgãos. Adaptado de Boskabady et al., 2018.

A toxicidade do Pb, encontra-se relacionada principalmente com a capacidade que este metal tem em substituir outras cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}

que pode afetar a estabilidade celular, promovendo alterações em diversos processos fisiológicos, incluindo adesão celular, regulação enzimática e equilíbrio oxidante-antioxidante, dobramento proteico, maturação, apoptose, transporte iônico e sinalização celular (JAISHANKAR et al., 2014). Além disso, esse mecanismo também contribui para a indução de déficits neurológicos após a permuta de Pb com íons de cálcio, tornando-o capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), assim como induzir o acúmulo de Pb em células astrogliais (contendo proteínas ligantes de chumbo), sendo que a toxicidade do Pb é mais proeminente em células astrogliais imaturas (sistema nervoso em desenvolvimento), tornando fácil a indução de danos nessas células, dificultando a formação da bainha de mielina, ambos envolvidos no desenvolvimento da BHE (FLORA, 2011; KATSUYAMA et al., 2012).

Zhang et al., (2015), juntamente com outros pesquisadores buscaram elucidar tais mecanismos. Foi demonstrado que a exposição ao chumbo durante o período de sinaptogênese afeta o desenvolvimento e função sináptica, explicando os efeitos do chumbo tanto na região pré-sináptica quanto na pós-sináptica (NEAL et al., 2010a; NEAL et al., 2010b; STANSFIELD et al., 2012). Além disso, eles também demonstraram que o chumbo inibe receptores pós-sinápticos do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) alterando a sinalização intracelular promovida pelo influxo de Ca^{2+} , induzindo alteração na produção de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) e diminuindo a sinalização para fosforilação de sinapsina I em sítios de serina envolvidos na movimentação vesicular (NEAL et al., 2010a; NEAL et al., 2010b; STANSFIELD et al., 2012). A diminuição dos níveis de BDNF promove alterações nos níveis de sinaptofisina e sinaptobrevina, inibindo a liberação vesicular (NEAL et al., 2010a). Este efeito foi corrigido, quando foi adicionado BDNF exógeno.

Outra via capaz de induzir danos neurológicos está relacionada com a liberação de neurotransmissores. Em neurônios em desenvolvimento, a estabilização funcional de sítios pré-sinápticos de liberação de neurotransmissores é controlada por sinais retrógrados pós-sinápticos. O BDNF é um desses sinais retrógrados, que atua na morfologia de axônios, conexões sinápticas e na ultraestrutura de neurônios (NEAL et al., 2013). Neal et al., (2013), demonstraram que a exposição de neurônios hipocámpais ao Pb promove diminuição nos níveis de BDNF, assim como de proteínas sinápticas envolvidas na liberação de vesículas. Contudo, quando as células foram incubadas com BDNF exógena esse efeito foi revertido.

Neal e Guilarte (2011), propuseram um modelo do mecanismo molecular pelo qual o Pb altera a formação sináptica e desenvolvimento da plasticidade de neurônios do hipocampo. Em uma condição normal em sinapses glutamatérgica, as vesículas sinápticas são dependentes de Ca^{2+} . Esse processo é mediado pela interação de vesículas com proteínas sinápticas sinaptobrevina (v-SNARE) e sintaxina (tSNARE) ou com proteínas SNAP-25. O resultado desta interação consiste na liberação de glutamato (Glu), o qual ativa receptores pós-sinápticos e ocasiona a entrada de íons Ca^{2+} na célula pós-sináptica, ativando a via de sinalização e a expressão da subunidade NR2A de receptores NMDA. Esse mecanismo induzi a fosforização de CREB que promove a expressão de BDNF ligado a receptores TrkB (receptores B de tropomiosina cinase), o qual, por sua vez, induz o ancoramento de vesículas e incorporação de sinaptofisina e sinaptobrevina na célula pré-sináptica, aumentando a liberação de neurotransmissores.

Durante a exposição ao Pb, ocorre o bloqueio de receptores NMDA, impedindo o influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. Além disso, a expressão da subunidade NR2A de receptores NMDA diminui, enquanto a expressão da subunidade NR2B aumenta, a ativação de CREB reduz, diminuindo assim a expressão de BDNF e, conseqüentemente reduzindo a ativação de receptores Trk pré-sinápticos.

A partir disso, e devido aos poucos estudos que buscam elucidar os efeitos induzidos pela exposição subcrônica de ratos jovens a doses baixas de chumbo, bem como demonstrar os possíveis mecanismos utilizados por este metal. É fundamental o desenvolvimento de estudos que se proponham a estudar os possíveis mecanismos que possam estar relacionados com as alterações locomotoras e histológicas induzidas pelo chumbo durante o período de maturação do sistema nervoso central.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a doses baixas de acetato de chumbo sobre a atividade exploratória e motora, associando a possíveis mecanismos de neurotoxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de massa corpórea de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica a dose baixa de acetato de chumbo;
- Quantificar o depósito de chumbo no córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens após exposição ao chumbo;
- Caracterizar o perfil proteômico do córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens após exposição ao chumbo;
- Observar a produção de estresse oxidativo no córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens, induzido após exposição subcrônica a dose baixa de acetato de chumbo;
- Avaliar a citoarquitetura e composição tecidual do córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica a doses baixas de acetato de chumbo;
- Avaliar a atividade exploratória e locomotora de ratos Wistar jovens após exposição ao chumbo;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, obtidos na seção de criação e produção de animais de laboratório do Instituto Evandro Chagas (IEC). Durante as atividades experimentais, as normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente aplicadas, estando este projeto aprovado pelo comitê de ética (Parecer: 2237110716).

Os animais foram obtidos com 40 dias pós-natal, pesando aproximadamente 150-160g. Inicialmente, realizou-se o processo de aclimação dos ratos, durante uma semana no biotério de experimentação do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE), onde foram mantidos durante todo o período de exposição experimental até a realização dos experimentos. Durante este período, os ratos foram alojados em gaiolas de polipropileno, em grupo de cinco animais por gaiola, em condições assépticas, com água e ração (NUVITAL) *ad libitum*, ciclo circadiano de 12/12 horas e temperatura ambiente controlada em $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2 EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO

O desenho experimental deste estudo foi adaptado de FDA Redbook (2000) e Yuan et al., (2014a, 2014b), onde foi demonstrado que co-exposição subcrônica (90 dias) a doses baixas (29.96 mg/Kg/dia) de chumbo e cádmium induz alterações sutis em parâmetros clínicos, tais como diminuição de hematócrito, alanina amino transferase, colesterol total e degeneração granular no fígado.

Após uma semana de aclimação, os 60 animais foram divididos em dois grupos: o grupo exposto ao Acetato de chumbo [$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$] (Sigma-Aldrich), que recebeu uma dose diária de 50 mg/Kg, através de uma cânula orogástrica (Insight, Brasil), durante 55 dias (48-102 dias pós natal); o grupo controle recebeu água destilada (H_2O_d), em mesmo volume que o grupo exposto ao chumbo. Todos os animais foram pesados antes e durante a exposição ao chumbo, semanalmente.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliação da atividade exploratória e motora dos animais experimentais após exposição subcrônica a 50 mg/Kg/dia de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, foram realizados testes comportamentais 24h após a última gavagem. Os animais foram encaminhados para o biotério do Laboratório de inflamação e comportamento farmacologia, onde foram aclimatados na sala de experimentação uma hora antes dos testes iniciarem.

3.3.1 Campo aberto

A atividade locomotora espontânea dos animais experimentais foi avaliada pelo teste de campo aberto, adaptado de Pandolfo et al., (2007). Neste ensaio, os animais foram posicionados no centro de uma arena de madeira (100x100x30cm), dividida em quadrantes, onde exerceram livre exploração durante 300 segundos (Figura 3). Todas as sessões foram filmadas e, posteriormente analisadas. Os parâmetros avaliados foram: distância percorrida total, distância percorrida na área central, distância percorrida na área periférica, número de vezes que o animal se posicionou apenas nas patas traseiras – ‘Rearing’ (exploração vertical), número de cruzamentos entre os quadrantes (exploração horizontal). Após o término do teste de campo aberto os animais foram submetidos ao teste de plano inclinado.

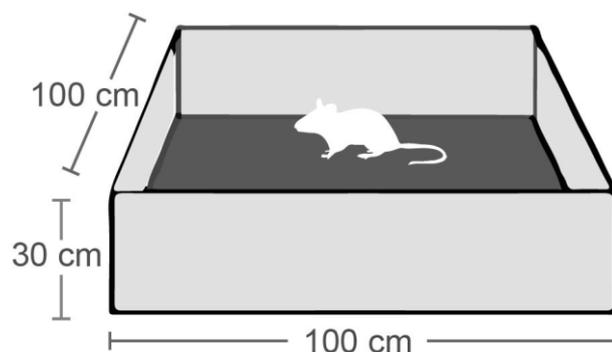


Figura 3: Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de campo aberto. Autoria: Priscila Cunha.

3.3.2 Plano inclinado

Para avaliação da função motora dos animais experimentais, bem como coordenação motora, equilíbrio e força muscular, foi realizado o teste de plano inclinado, descrito por Rivilin e Tator, (1977). De acordo com o protocolo adaptado de Murphy et al. (1995), os animais foram posicionados sobre o plano móvel em ângulo 0° do aparato constituído por duas plataformas retangulares de madeira compensada unidas por uma dobradiça. Uma das plataformas é a base e a outra, um plano inclinado móvel, este foi revestido de borracha para permitir a aderência e movimentação do animal (Figura 4). Após o posicionamento do animal, o ângulo de inclinação foi gradativamente aumentado de zero grau até o ângulo máximo em que o rato não conseguiu mais se manter na posição durante 5 segundos (a cada 5 segundos o ângulo de inclinação da plataforma foi aumentado em 5 graus). Após o término do teste, os animais foram submetidos ao teste de rota-rod.

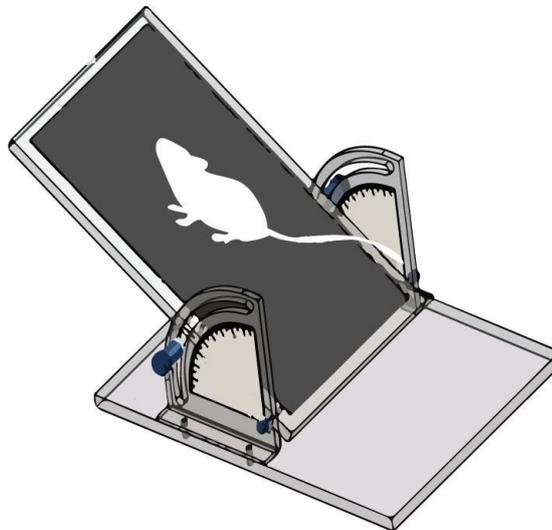


Figura 4: Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de Plano inclinado. Autoria: Priscila Cunha.

3.3.3 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-Test)

Para avaliação da atividade motora dos animais experimentais, foi realizado o teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-test), em um aparelho

automatizado (Insight®, EFF-411). O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e que é mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 5). Para o teste, cada animal foi colocado sobre o cilindro já em movimento e o tempo que o mesmo conseguiu se equilibrar até cair (latência) foi registrado. Na queda, o cronômetro que verificou o tempo de permanência sobre o cilindro foi automaticamente parado, já que o equipamento possui um sistema instalado no solo de cada baia que detecta o impacto da queda.

No treinamento do teste, os animais foram colocados no eixo giratório por um período de 120 segundos a 8 rotações por minuto. Quando os animais caíam eram reposicionados no eixo giratório quantas vezes foram necessárias até a finalização do tempo estipulado para esta fase (120 segundos). Após o treinamento, o teste foi realizado em três exposições de 120 segundos. Foi registrado o tempo de latência, isto é, tempo de permanência do animal sobre a barra de rolagem do rotarod até a primeira queda (adaptado de SLAMBEROVÁ et al., 2006).

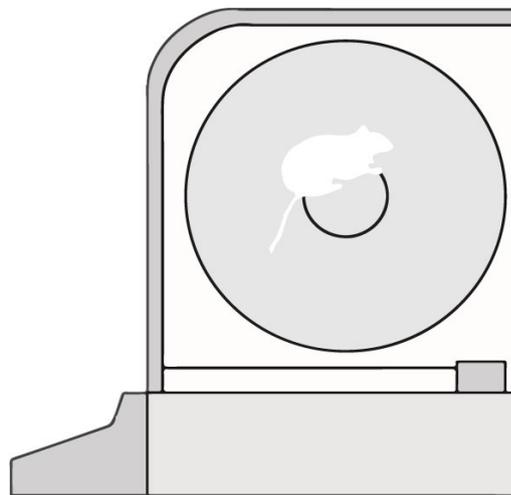


Figura 5: Desenho esquemático do aparato utilizado no teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-Test). Autoria: Priscila Cunha.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO TECIDUAL DE CHUMBO

Para a avaliação do nível de Pb tecidual, 20 animais experimentais (10 em cada grupo) foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg i.p) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg i.p), o córtex motor e o cerebelo foram dissecados após craniotomia, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C até serem quantificados.

Para quantificação as amostras foram liofilizadas individualmente com um liofilizador L 101 (Liotop, São Carlos, Brasil). Após a liofilização, foi realizado um pool de amostras para cada grupo. A massa das amostras foi digerida em 4,0 mL de HNO₃ (14 mol/L), 2,0 mL de H₂O₂ (35% w/w) e 2,0 mL de H₂O ultrapura em forno de microondas com Cavity Start E (Milestone, Sorisole, Itália) a uma temperatura de 180°C durante 1 hora e 15 minutos. Após a digestão, as soluções foram transferidas para frascos volumétricos e preenchidas até o volume final de 40 mL com água ultrapura. Para determinação do chumbo (Pb), as amostras foram diluídas até a acidez final de 5,0%. Uma curva analítica de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 mg / L Pb foi construída para a determinação de Pb nas amostras usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (Modelo 4100, Thermo Scientific) (MIPOES). O comprimento de onda utilizado na determinação do chumbo foi de 405.781 nm. A fim de avaliar a precisão das análises, após as leituras das amostras, foram adicionadas às amostras digeridas 3,5, 4,5 e 5,5 mg / L do Pb padrão e depois determinadas pelo MIPOES. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,57 mg/kg e 1,89 mg/kg.

3.5 AVALIAÇÃO TECIDUAL

3.5.1 Processamento tecidual e cortes histológicos

Para avaliação das alterações teciduais do córtex motor e cerebelo, inicialmente, 20 animais experimentais (10 em cada grupo) foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg i.p) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg i.p) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M. O cérebro foi obtido por craniotomia e pós-fixados em solução de Bouin por 6 horas e, posteriormente imersos em álcool 70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, xilol I e xilol II, seguidos pela inclusão em paraplast. Após a inclusão, os blocos foram cortados em

micrótomo, onde secções coronais de 5 µm de espessura foram obtidas. Algumas secções do mesmo tecido cerebral foram montadas em lâminas de microscopia revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma®) para ensaios imunohistoquímicos. No córtex motor, todas as análises histológicas foram realizadas na área M1, especificamente entre as camadas 3 e 4 (áreas de neurônios piramidais), com base em Paxinos e Watson (1998) e no cerebelo, nas folhas cerebelares.

3.5.2 Coloração por Hematoxilina e Eosina

A avaliação histopatológica dos cortes obtidos do córtex motor e cerebelo dos animais experimentais foi realizada através da coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes histológicos dos tecidos de interesse selecionados foram, inicialmente, desidratados sendo submerso durante 5 minutos em H₂O_d, posteriormente foi feita a primeira coloração com Hematoxilina durante 20-30 segundos, os tecidos foram transferidos para água corrente durante 5-10 minutos, em seguida, foi realizado a segunda coloração com Eosina por 20 segundos e, novamente, foram lavados em água corrente por 5-10 minutos. Posteriormente, os tecidos foram colocados em álcool 70% durante 5 minutos. Para melhor observação da lâmina, a mesma foi imersa em xilou durante 1 minutos, após este processo a lâmina foi selada com permont e lamínula. A análise do material foi realizado por microscopia de luz (Nikon Eclipse E200) com grade de 1 mm² acoplada à ocular e objetiva com 40x de ampliação. Pelo menos 3 campos no córtex motor e cerebelo por seção e 3 seções por animal de cada grupo foram analisados. Todas as imagens foram analisadas pelo Software Image J versão 1.39.

3.5.3 Imunohistoquímica

Para essas análises, as lâminas com cortes foram desparafinizadas e reidratadas por soluções de calor, xileno e hidroalcoólicas e imersas em PBS por 3 min antes da incubação em tampão citrato a 70 °C por 25 min. Após a recuperação antigênica, foram imersos em PBS por 10 min e, consecutivamente, por inibição endógena da peroxidase, imersos em solução de metanol-peróxido de hidrogênio (3:100, v/v). Foram utilizados anticorpos Anti-NeuN (1: 100, Chemicon), anti-sinaptofisina (1: 1000, Wako) e Anti-MBP (1:250, Promega) para imunomarcção de neurônios, vesículas

sinápticas e bainha de mielina, respectivamente, conforme previamente estabelecido por nosso grupo (LIMA et al., 2017, SANTANA et al., 2018). Procedeu-se a revelação com solução de 3,3'-diaminobenzidina em PBS; secções imunomarcadas com anti-Sinaptofisina e anti-MBP foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e todas as lâminas foram desidratadas e montadas com lâminola e Entellan® (Merck, Alemanha).

As células positivas para imunomarcção anti-NeuN foram analisadas por microscopia de luz (Nikon Eclipse E200) com 1 mm² acoplado ao ocular e usando lente objetiva de 40x, avaliando a densidade de células anti-NeuN⁺ (SANTANA et al., 2018). Para as análises de imunomarcção anti-Synaptofisina e anti-MBP, primeiramente obtivemos as fotomicrografias utilizando o microscópio Nikon Eclipse E500 com o Moticam 2500® acoplado a ele. As fotomicrografias foram analisadas utilizando-se o software ImageJ com 'plugin de Color Deconvolution' conforme trabalhos anteriores de nosso grupo (FERNANDES et al. 2015, FAGUNDES et al., 2016, LIMA et al., 2017) que extraíram a fração de área imunomarcada pelos anticorpos e revelada por DAB. Os resultados foram expressos como fração de área (%) imunomarcada em comparação com a área total de seção capturada pelo sistema de câmeras.

3.6 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliação da indução do quadro de estresse oxidativo no córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens após exposição a 50 mg/Kg de Pb(C₂H₃O₂)₂, foi quantificado os níveis de peroxidação lipídica (LPO) e nitrito. Inicialmente, os animais foram anestesiados e, posteriormente sacrificados, seguidos pela obtenção dos tecidos de interesse por meio de craniotomia. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C até serem quantificados.

3.6.1 Quantificação de nitrito

Os níveis de nitritos foram determinados pela reação de Griess. As amostras foram descongeladas e ressuspensas em Tris-HCl (20mM, pH 7,4, a 4°C) por desagregação sônica (concentração aproximada de 1g/mL). O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado em alíquotas

destinadas a determinação dos nitritos. A concentração de nitritos foi determinada com base na reação destes com o reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% -1:1). Esta reação forma compostos azoicos, que atribuem coloração azulada característica. A intensidade do azul é proporcional a concentração do cromógeno, sendo verificado por leitura espectrofotométrica (GREEN et al., 1981). Em seguida, 100µL do sobrenadante ou soluções padrões de nitritos foram adicionados a 100 µL do reagente de Griess e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi realizada a leitura ($\lambda = 570\text{nm}$) e os resultados foram expressos como µmoles de nitritos para cada mg de proteínas.

3.6.2 Quantificação de Peroxidação lipídica

Os níveis de LPO foram determinados através do método proposto por Esterbauer e Cheeseman (1990), baseado na reação dos metabólitos de ácidos graxos poliinsaturados, malonaldeído (MDA) e 4-hidroxicenonas (4-HA), com o N-metil-2-fenilindol (NMFI). Esta reação, em presença de ácido metanosulfônico, produz um cromóforo estável, cuja coloração é proporcional à concentração de lipídios oxidados, podendo ser mensurado por espectrofotometria. Para as análises, as amostras foram descongeladas e ressuspendidas em Tris-HCl (20 mM, pH 7,4, a 4°C) por desagregação sônica (concentração aproximada de 1 g/mL). Alíquotas das amostras foram separadas para dosagem de proteína. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5600rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante separado em alíquotas destinadas a determinação da peroxidação lipídica. Para desencadear a reação foram adicionados 325 µL de NMFI 10,3 mM diluído em metanol (1:3) e 75 µL de ácido metanosulfônico a 100 µL das soluções padrões de MDA ou das amostras. Depois essa mistura foi aquecida a 45° C por 40 minutos. Após este período, foi realizada a leitura ($\lambda = 570\text{ nm}$) e os resultados expressos como picomoles de MDA por mg de proteína.

3.6.3 Quantificação de proteína

Para normatização dos resultados obtidos na quantificação de peroxidação lipídica e níveis de nitrito foi realizado a dosagem de proteína descrito pelo método de Bradford (1976). Este método baseia-se na interação entre o corante azul de

Coomassie e moléculas de proteínas, que no pH da reação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma catiônica (coloração vermelha) para a forma aniônica (coloração azulada), de acordo com a quantidade de proteínas presente na reação. Neste ensaio, alíquotas de 5µl das amostras foram adicionadas a 250µl do reagente de Bradford (100mg Azul Brilhante de Coomassie, 50ml de etanol 95%, 100ml de ácido fosfórico 85%) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a leitura foi determinada em um comprimento de onda de 570 nm por espectrofotômetro. As concentrações das proteínas foram determinadas pela comparação com uma curva-padrão com BSA.

3.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO

Para caracterização das vias metabólicas envolvidas no processo de alteração funcional dos ratos Wistar expostos ao chumbo foi realizado a análise de proteômica, técnica que permite identificar as proteínas participantes nas rotas metabólicas de processos celulares variados (SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2012). Proteoma configura-se como a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, incluindo também as proteínas resultantes dos processos pós-transcricionais e pós-traducionais e complexos formados por essas biomoléculas (AHRENS et al., 2010).

3.7.1 Extração de proteínas

Para realização da extração de proteínas, inicialmente, foi realizado a eutanásia dos animais e, posteriormente, a obtenção dos tecidos do córtex motor e cerebelo. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, pesados e pulverizados em moinho criogênico em ciclo de 30 segundos. Em seguida, o tecido foi armazenado em tubo eppendorf também a -80°C em nitrogênio líquido (evitando a degradação proteica). Foram pesadas 100mg das amostras devidamente homogeneizadas e adicionadas 300 ml de tampão de lise (ureia 7mol/L, tiourea 2mol/L, CHAPS 4%, DTT 1%, anfólitos carreadores 0,5% pH 3-10 e coquetel de inibidores de protease) e posteriormente incubados em gelo por 1h. após a incubação, o conteúdo será centrifugado e o sobrenadante coletado.

Removeu-se do sobrenadante o excesso de sais, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos, utilizando-se 1,5 ml de wash buffer, agitando-se em vórtex. Os tubos foram incubados a -20°C por 2h e 50 min em freezer, agitando em vórtex por 30 segundos a cada 10 minutos. Na sequência, foram centrifugados por 10 minutos, removendo e descartando o sobrenadante. Foi adicionado 1ml de acetona 90% e agitado por 30 segundos até que o pellet se torne disperso. Novamente, o sobrenadante foi removido e descartado, e o pellet deixado para secar até que se torne translúcido. Logo após este pellet foi ressuspensão em 200µl de solução de reidratação contendo ureia 7mol/L, tiourea 2mol/L, CHAPS 2%, DTT 18,2 mmol/L, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e 0,002% de azul de bromofenol (GE HEALTHCARE).

A concentração de proteínas totais foi obtida utilizando-se o Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) baseado no método de Bradford (1976). Às amostras foram adicionados reagentes de coloração, incubando por 5 minutos em temperatura ambiente, determinando a absorbância em espectrofotômetro. As concentrações proteicas foram calculadas por comparação com uma curva padrão com concentrações conhecidas de proteína de soro bovino (BSA). Após a quantificação, aproximadamente 1000µg de proteínas de cada uma das amostras foram combinadas e carregadas na eletroforese bi-dimensional. Este procedimento objetiva minimizar a variabilidade individual (TILTON et al., 2007).

3.7.2 Eletroforese bi-dimensional

A primeira dimensão consiste na focalização isoeletrica (IEF), separando as proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) submetendo-as à IEF. Para tanto, 1000 µg de proteína foram misturadas ao tampão de reidratação para o volume final de 450 µl. Na sequência, tal volume foi transferido para canaletas em bandeja de reidratação e posteriormente as tiras de fita com gradientes de pH imobilizados (IPG) de 24 cm com pH 3-10 (GE Healthcare) foram posicionadas sobre o tampão de reidratação contendo as proteínas, e cobertas com óleo mineral ultrapuro (Cover Fluid, GE Healthcare), submetidas a processo de reidratação durante 14 horas a 20°C. A IEF foi realizada no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) nas seguintes condições: 500 V por 1h, 1000 V por 1h e, por fim, 10.000 V até atingir 40.000 V.

Na segunda dimensão, as tiras foram removidas do Ettan IPGphor 3, lavadas com tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) concentrado uma vez e sem seguida transferidas para tubos contendo 10ml de solução tampão equilíbrio (ureia 6mol/L, Tris-HCL 75 mmol/L, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) acrescido de 1% DTT e deixadas equilibrar por 15min. Posteriormente, as tiras foram submetidas a um segundo equilíbrio, acrescida a solução de equilíbrio 2,5% de iodoacetamida (IAA) por mais 15 minutos.

A eletroforese de segunda dimensão foi iniciada com o término das etapas de equilíbrio das fitas, sendo posicionadas em gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida, tanto as fitas quanto o padrão de peso molecular de faixa ampla e fixadas no gel com uma solução pré-aquecida de 0,5% de agarose solubilizada em tampão de corrida Laemmli (1970). A separação eletroforética das proteínas foi realizada em sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), em dois estágios, sendo utilizado no primeiro uma corrente fixa de 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1h, para migração das proteínas de fita IPG para o gel e no segundo estágio a corrida foi conduzida com corrente constante de 500 V, 60 mA/ gel e 100 W a 20°C durante cerca de 6 horas, até que o azul de bromofenol atinja o fundo do gel.

3.7.3 Visualização e análise de imagens da eletroforese bi-dimensional

Após a eletroforese bi-dimensional, o gel foi colocado em solução fixadora durante uma hora para evitar a mobilidade das proteínas no gel. Os géis foram lavados com água deionizada e coradas com solução contendo 10% de ácido fosfórico, 10% de sulfato de amônio, 0,12% de Coomassie Brilliant Blue G-250 e 20% de metanol durante 12 horas, repetindo o processo por mais 24 horas (NEUHOFF et al., 1988; CANDIANO et al., 2004). Em seguida, os géis foram lavados com solução de ácido acético 5%, sendo a solução renovada durante 6 dias.

3.7.4 Preparo das amostras para a espectrometria de massas

Após análise e escolha dos spots de interesse, estes foram recortados dos géis e preparados para espectrometria de massas, conforme protocolo de Andrade (2006). As amostras de cada grupo foram posicionadas sobre placas de vidro e usando

ponteiras universais 1000 µl e 200 µl, os spots foram excisados em segmentos de aproximadamente 1mm³, transferidos para tubos de 2 ml contendo 200 µl de ácido acético 5% e armazenados a 4°C até o próximo passo. Procede-se com a lavagem dos segmentos de gel para remoção total do corante e desidratação. Em seguida, os spots foram reduzidos e aniquilados. Para isso, foram reidratados com DTT 20 mmol/L em bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mmol/L e incubados por 40 minutos a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por iodoacetamida (IAA) 55 mmol/L em AMBIC 50 mmol/L. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi novamente removido, os fragmentos lavados em AMBIC 25 mmol/L e em seguida desidratados em acetonitrila (ACN) 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel passaram por reidratação com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos spots, que permanecerão a 37°C por 14 h. Finalizadas as 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v)). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v)), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v)) e duas lavagens com ACN 100%, a 40°C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos extraídos foram submetidas à secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 4 horas.

Objetivando o preparo das amostras para o sequenciamento, os peptídeos foram dessalinizados manualmente utilizando para isto Zip-Tip (Millipore). As amostras foram ressuspensas em 10 µL de solução ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) preparada em H₂O ultrapura. Em seguida, as Zip-Tips foram acopladas em uma pipeta de 10 µL e em seguida, por meio de pipetagem, equilibradas com três soluções: 10 µL de solução de TFA 0,1% (v/v) preparada em ACN 100% (v/v), seguido de 10 µL da solução TFA 0,1% (v/v) preparada em ACN 50% (v/v), e por fim, 10 µL da solução de TFA 0,1% (v/v) preparada em H₂O ultrapura. A última solução foi descartada, e em seguida 10 µL da amostra aspirados para ligação à coluna C18. Na sequência, foi realizada uma lavagem com 10 µL de solução TFA 0,1% (v/v) preparada em 5% (v/v)

de metanol. Após a lavagem, as amostras foram eluídas com 10 µL de solução de TFA 0,1% (v/v) em ACN 50%.

3.7.5 Sequenciamento das proteínas

A identificação dos peptídeos foi feita utilizando-se o sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS (Waters, Manchester, Reino Unido). O nanoACQUITY UPLC estava equipado com a coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 µm X 150 mm, 1.8 µm particle size, Waters Manchester, UK). A coluna foi equilibrada com a fase móvel A (ácido fórmico 0,1 % em água). Então, os peptídeos foram separados com um gradiente linear de 7-85% da fase móvel B (Ácido fórmico 0,1% em ACN) por 31 minutos, num fluxo de 0,4 µL/minuto. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C. O espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF (Waters, Manchester, Reino Unido) foi operado em modo iônico nano eletrospray positive e os dados coletados usando o método MSE em energia elevada (19-45 V), que permite a aquisição tanto dos íons precursores quanto dos fragmentos iônicos, numa única injeção. As condições de fonte utilizadas incluíram: voltagem capilar 2,5 kV; cone de amostra 30 V; cone de extração 5,0 V e temperatura da fonte 80°C. A aquisição dos dados ocorreu durante 20 minutos e a amplitude de escaneamento foi 50-2000 Da.

3.7.6 Análise das sequencias peptídicas

A versão 3,0 do ProteinLynx Global Server (PLGS) foi utilizada para processar e pesquisar os dados contínuos LC-MSE. As proteínas foram identificadas com o algoritmo incluso no software, conjuntamente com busca na base de dados *Rattus* (revisada apenas, UniProtKB/Swiss-Prot).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta dos dados, os resultados foram tabulados e analisados pelo software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) e realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk. Para a diferença estatística significativa entre os grupos, foi aplicado o teste *t* de *Student*, e o teste de Mann-Whitney foi aplicado apenas para análise da fração de área. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para

qualquer um dos testes selecionados. Cálculos de potência para a diferença entre duas médias foram feitos usando o OpenEpi (Versão 2.3.1), com erro tipo I 5% e potência de 80%

4. RESULTADOS

4.1 EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE Pb NÃO INDUZ ALTERAÇÃO NO GANHO DE MASSA CORPÓREA

Durante o processo de gavagem os animais podem perder massa corpórea. Por isso, os animais foram pesados semanalmente, no qual foi observado que a exposição subcrônica ao Pb e o processo de gavagem não induziram perda de massa corpórea durante o período de experimentação em comparação ao grupo controle (F [7, 184]; $p=0,6788$) (Figura 6).

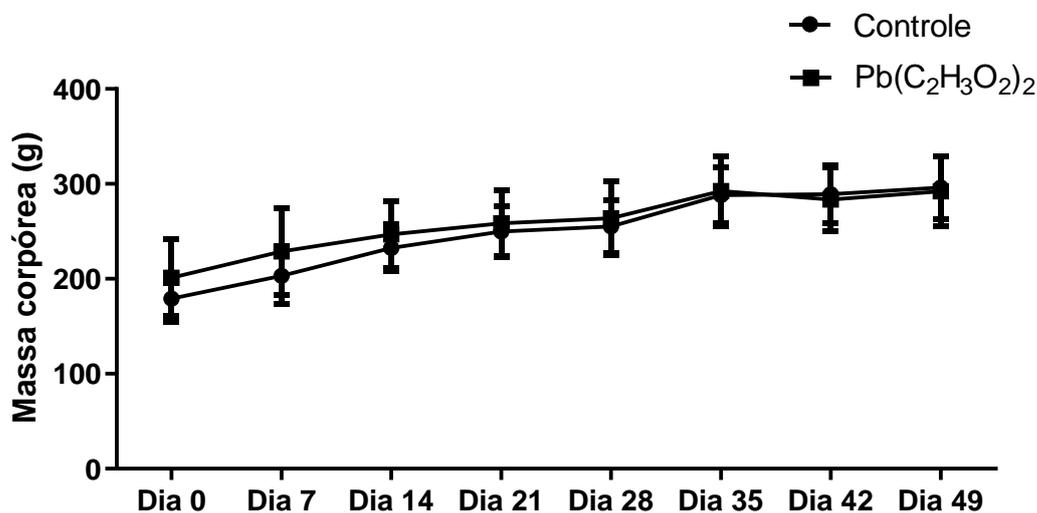


Figura 6: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o ganho de massa corpórea. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão após análise do teste ANOVA duas vias.

4.2 EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE Pb INDUZ ACÚMULO DE CHUMBO NO CEREBELO

Após 55 dias de exposição ao Pb(C₂H₃O₂)₂, foi realizada a quantificação de chumbo no córtex motor e cerebelo. Nossos dados demonstram depósito de chumbo não apenas no cerebelo quando comparado o grupo exposto ao grupo controle ($3,12 \pm 0,09$ vs $16,13 \pm 0,03$; $p < 0,0001$) (Figura 7).

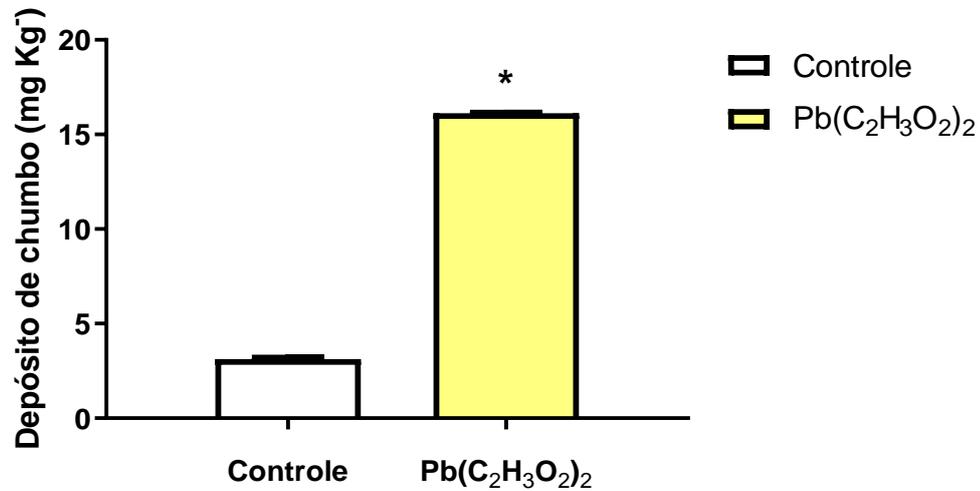


Figura 7: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre depósito de chumbo no cerebelo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. * (Pb(C₂H₃O₂)₂) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.0001$).

4.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb SOBRE O PERFIL PROTEÔMICO E A BIOQUÍMICA OXIDATIVA DO CÓRTEX MOTOR E CEREBELO

4.3.1 Perfil proteômico do córtex motor de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica a 50 mg/Kg de chumbo

Após a exposição subcrônica ao Pb, observamos uma intensa modulação do perfil proteômico no córtex motor de ratos jovens. Diversas proteínas foram afetadas pela exposição ao metal, prejudicando diversos processos biológicos. Um total de 454 proteínas foi único/exclusivo no grupo controle ou exposto, enquanto 403 proteínas foram encontradas 'up' ou 'down' reguladas em grupo exposto em comparação ao controle. E após a avaliação bioinformática, foram identificados diversos alvos de processos biológicos, como mostrado na Figura 8, incluindo processos metabólicos, funções neurais e constituintes morfológicos. O processo biológico mais afetado foi o processo metabólico de ATP (16,6%), seguido de regulação negativa do desenvolvimento da projeção de neurônios (6,3%), morfogênese de dendritos (6,3%),

regulação da polimerização do filamento de actina (5,9%), Purina ribonucleosídeo processo biossintético de trifosfato (5,2%) e outros, relacionados à atividade neural e vias de sinalização de comunicação.

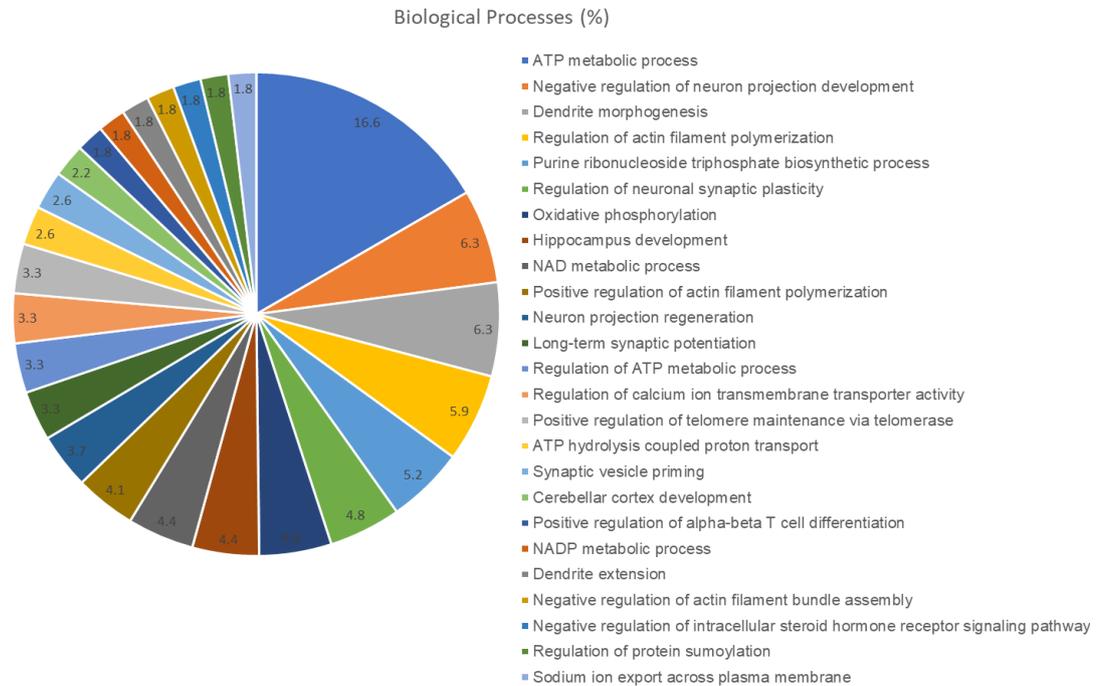


Figura 8: Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial no córtex motor de ratos expostos ao grupo PB vs controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da ontologia gênica do processo biológico. Termos significativos (escore Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com o percentual de número de genes. O número de acessos de proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plug-in ClueGo® do software de Cytoscape® 3.6.1.

Além disso, as figuras 9, 10 e 11 representam os agrupamentos gerados pela abordagem da bioinformática, desfazendo vínculos importantes entre as proteínas-alvo na intoxicação por Pb associadas àqueles processos biológicos prejudicados.

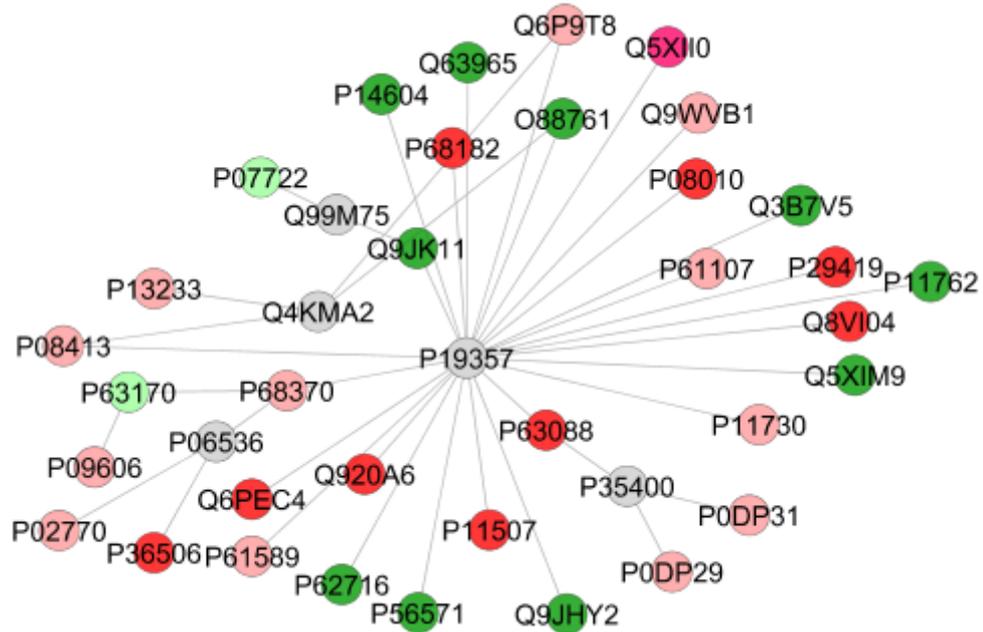


Figura 9: Subredes criadas pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do córtex motor com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós vermelhos indicam proteínas exclusivas/exclusivas do grupo controle. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulada e upregulada, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.

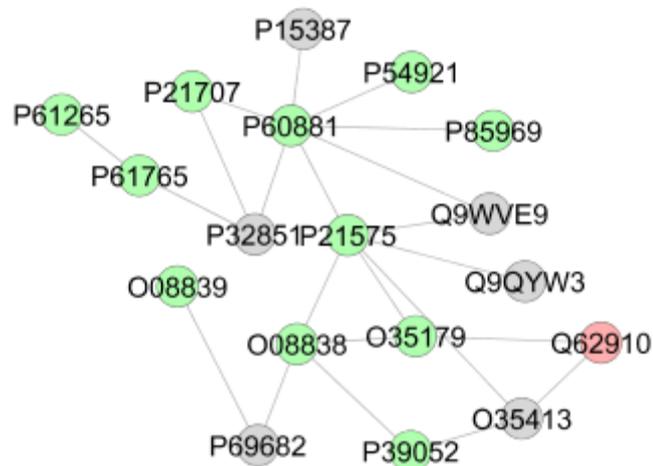


Figura 10: Subredes criadas pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do córtex motor com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós vermelhos indicam proteínas exclusivas/exclusivas do

Pb (18%), seguida pelo processo biossintético alfa-aminoácido (17%), transporte transmembrana acoplado à hidrólise do ATP (12%), processo metabólico aldeído celular (6%), resgate de compostos metabólicos celulares (3%) e outros, que estão associados à atividade neuroquímica, componentes celulares do citoesqueleto e desenvolvimento celular neural.

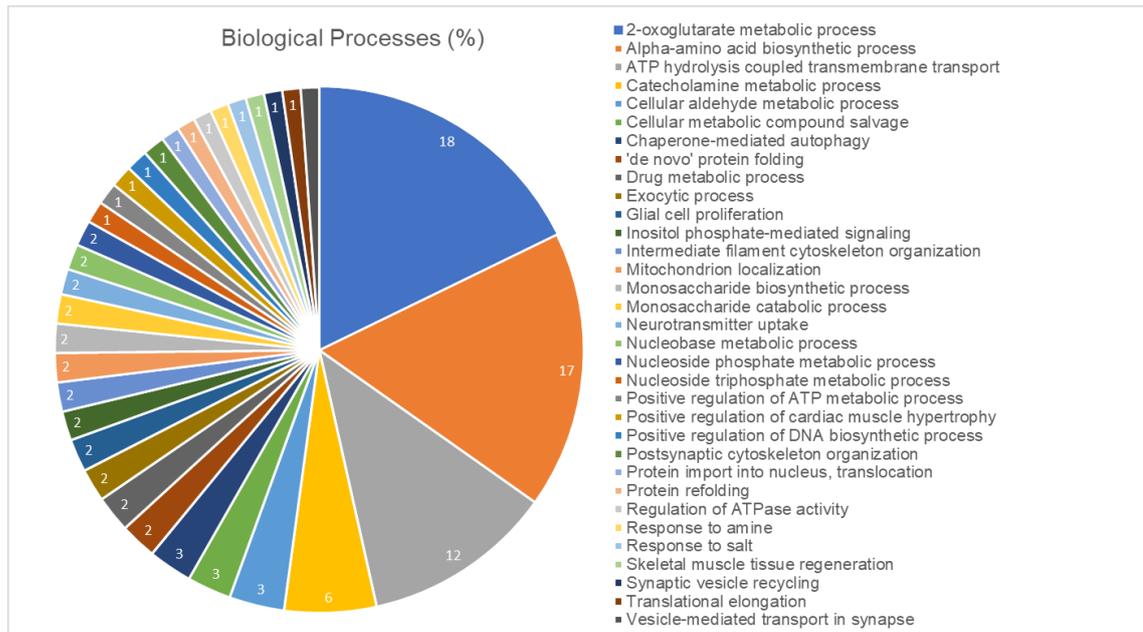


Figura 12: Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial no cerebelo de ratos expostos ao grupo PB vs controle. Categorias de proteínas baseadas na anotação da ontologia gênica do processo biológico. Termos significativos (escore Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com o percentual de número de genes. O número de acessos de proteínas foi fornecido pela UNIPROT. A ontologia gênica foi avaliada de acordo com o plug-in ClueGo ® do software de Cytoscape ® 3.6.1.

As análises bioinformáticas do proteoma cerebelar de ratos expostos ao Pb também apresentaram sub-redes de interações proteicas, como visto nas Figuras 13-16. Revelando interações entre proteínas vitais para o metabolismo celular e funções de sinalização, principalmente associadas a atividades/neurais.

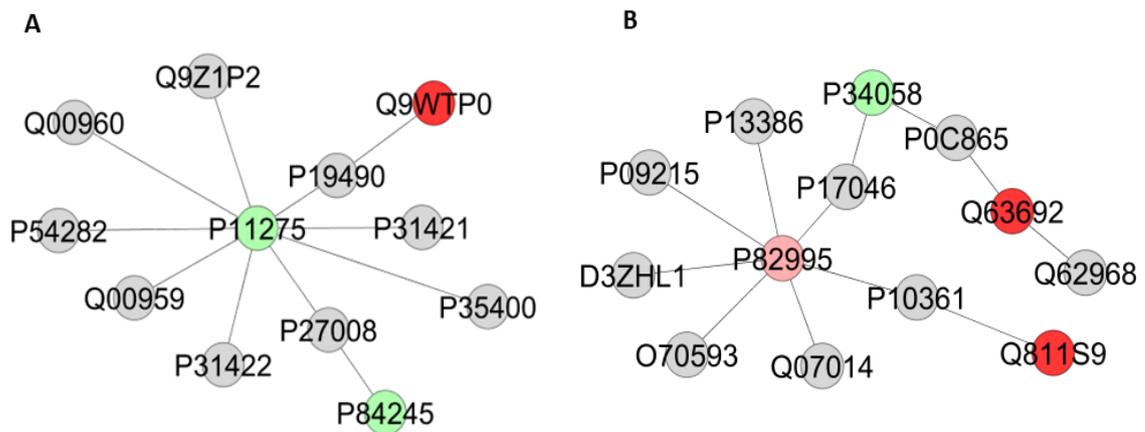


Figura 13: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.

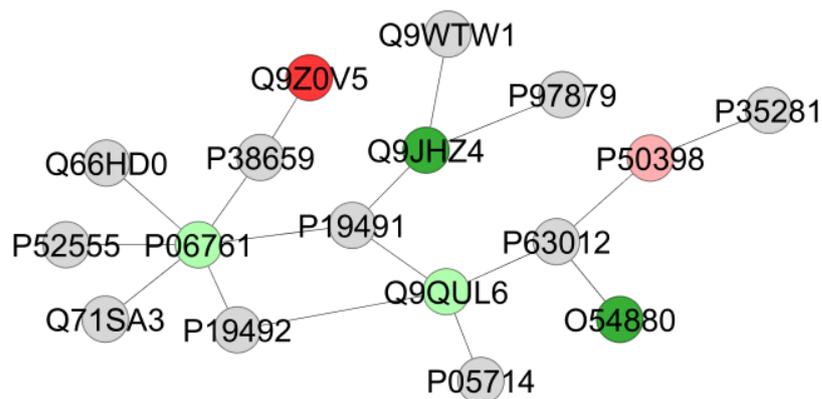


Figura 14: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos

representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.

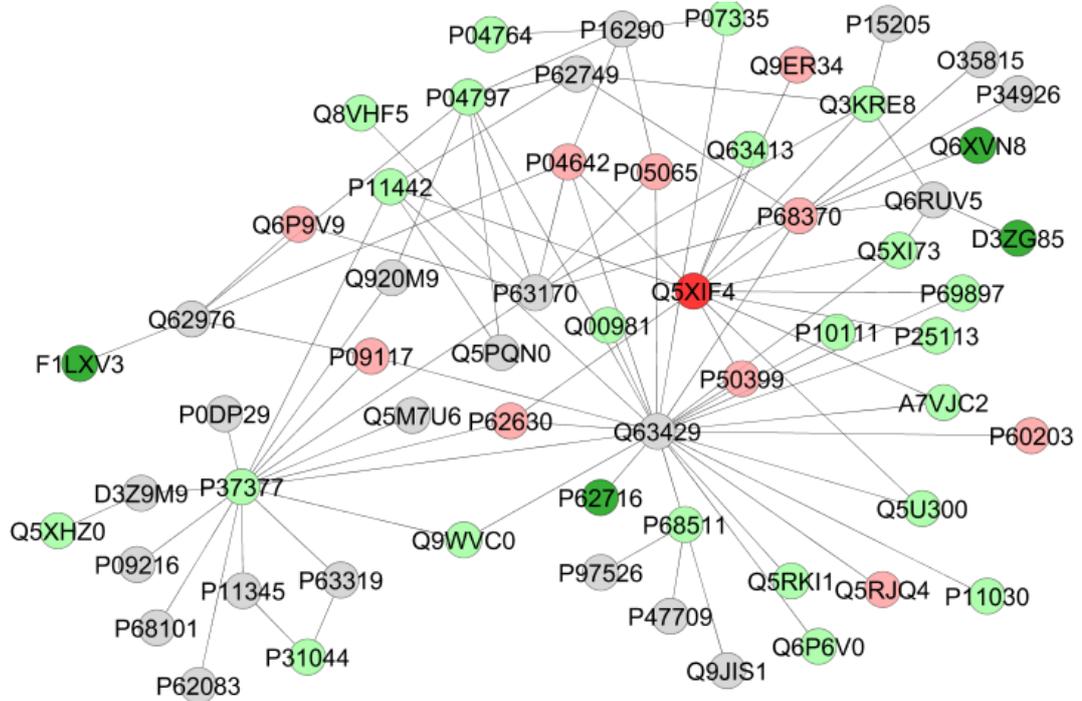


Figura 15: Subnetwork criado pelo aplicativo ClusterMarker para determinar a interação entre as proteínas identificadas do cerebelo com diferentes expressões no grupo exposto versus grupo controle. As cores do nó indicam o status diferente da expressão da proteína respectiva, nomeada por sua identificação da adesão de Uniprot. Os nós verdes vermelhos e escuros indicam proteínas únicas/exclusivas de grupos controle e expostos, respectivamente. Os nós claros cor-de-rosa e verde claro indicam proteínas downregulado e do upregulado, respectivamente. Os nós cinzentos representam aquelas proteínas que não foram identificadas em nosso estudo, mas interagiram na rede pela importação das bases de dados públicas.

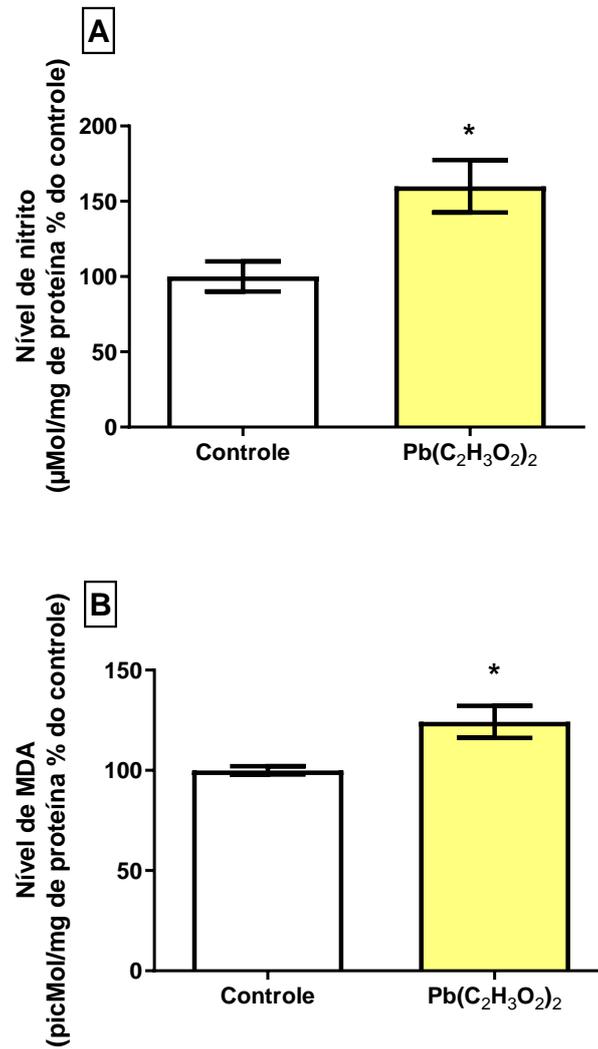


Figura 17: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a bioquímica oxidativa no córtex motor. Em (A) Níveis de nitrito, (B) Níveis de MDA. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.05$).

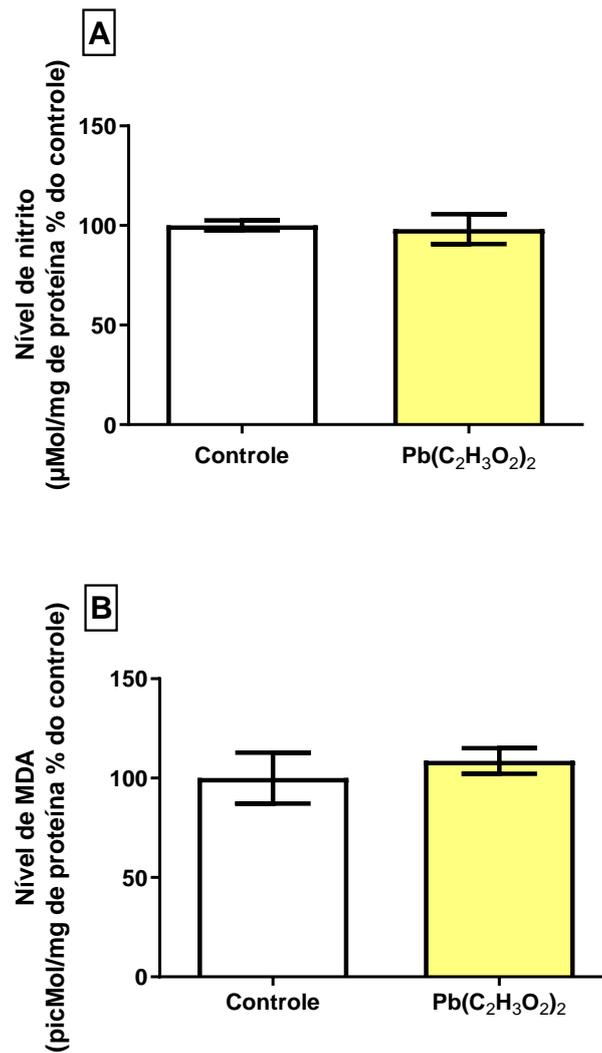


Figura 18: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a bioquímica oxidativa no cerebelo. Em (A) Níveis de nitrito, (B) Níveis de MDA. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão após análise do teste *t* de Student.

4.4 EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb INDUZ DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE PURKINJE NO TECIDO CEREBELAR

Para avaliarmos o efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar a 50 mg/Kg de Pb sobre o padrão morfológico tecido cerebelar, foi realizada a coloração HE. Nossos resultados mostram que a exposição ao acetato de chumbo reduz a população de

células de Purkinje de ratos quando comparada ao grupo controle ($7,28 \pm 0,37$ vs $5,2 \pm 0,38$; $p = 0,016$) (Figura 19).

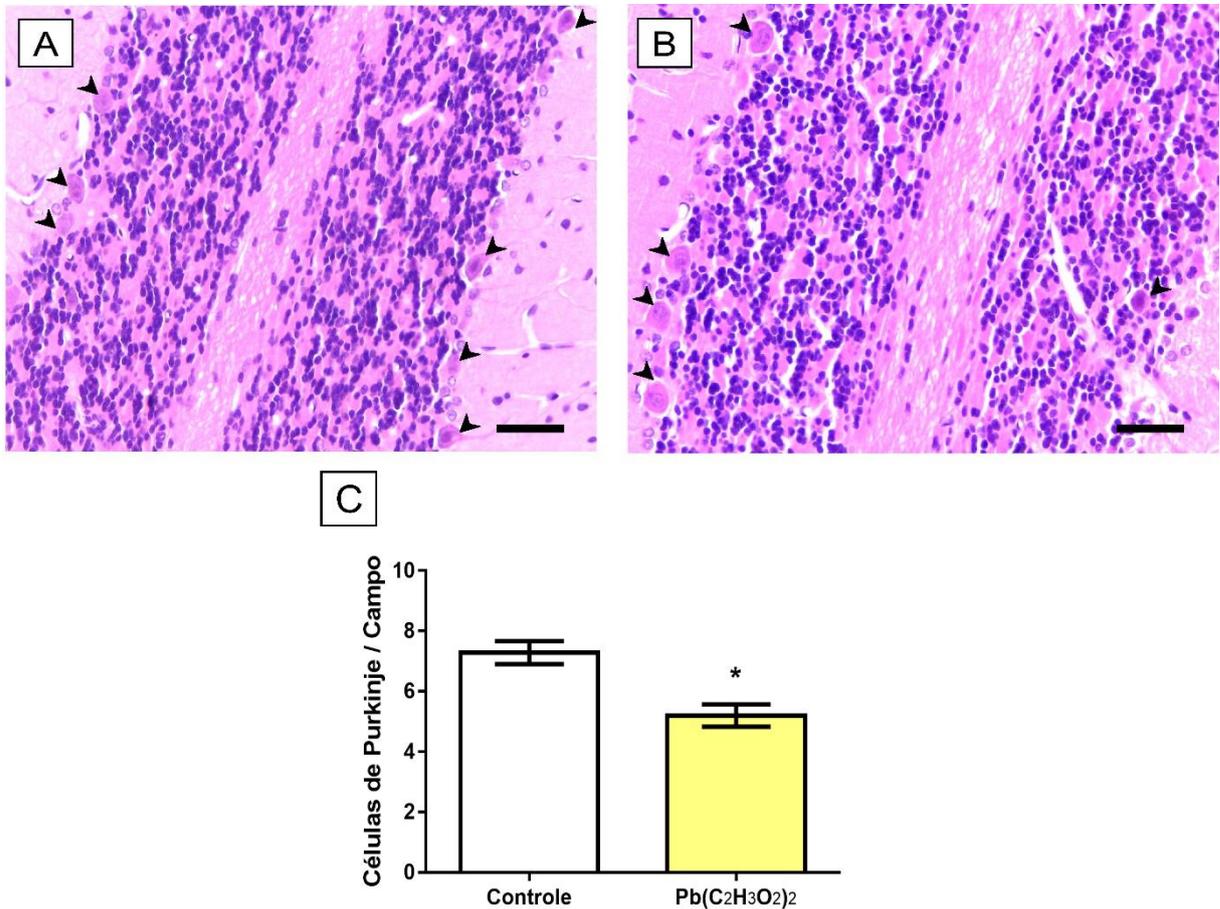


Figura 19: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de neurônios de Purkinje do cerebelo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias representativas do (A) grupo controle administrado com água destilada e (B) grupo exposto ao acetato de chumbo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão do número (C) de células Purkinje. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *t* de Student). Barra de escala: 30 μ m.

4.5 EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg de Pb PROMOVE DIMINUIÇÃO NA COMPOSIÇÃO TECIDUAL NO CÓRTEX MOTOR E CEREBELO

4.5.1 Diminuição do número de neurônios maduros no córtex motor e cerebelo

Após a histopatologia macroscópica do córtex motor na região M1 (Figura 20), foram realizados ensaios imunohistoquímicos para NeuN⁺ no córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens após exposição subcrônica ao Pb, nos quais foi observado que o Pb induz diminuição de neurônios maduros tanto no córtex motor ($19 \pm 0,83$ vs $8,75 \pm 0,41$; $p = 0,027$) (Figura 21) quanto no cerebelo, quando comparados ao grupo controle dos animais ($733,9 \pm 35,43$ vs $624,2 \pm 30,3$; $p = 0,027$) (Figura 22).

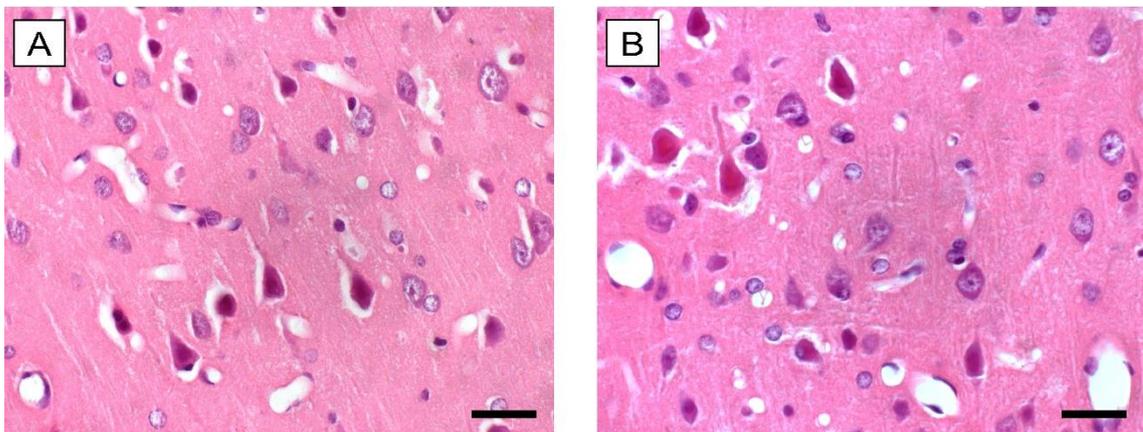


Figura 20: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o córtex motor. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Fotomicrografias representativas de (A) animais controles administrados com água destilada e (B) animais expostos ao acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$). Barra de escala: 30 μm .

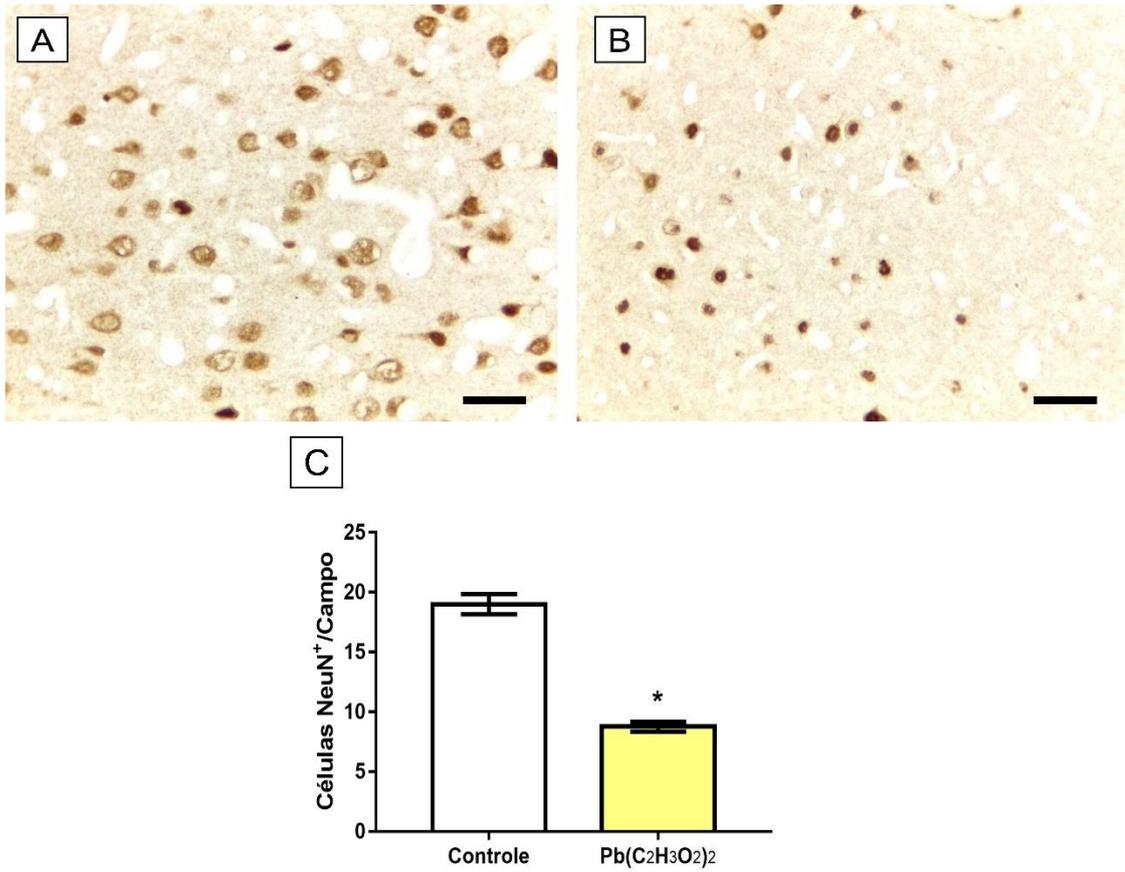


Figura 21: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de células NeuN⁺ no córtex motor. Fotomicrografias representativas do grupo controle (A) e (B) grupo (Pb(C₂H₃O₂)₂). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da (C) densidade de células NeuN⁺. * p < 0,05 comparado ao grupo controle (teste *t* de *Student*). Barra de escala: 20 μm.

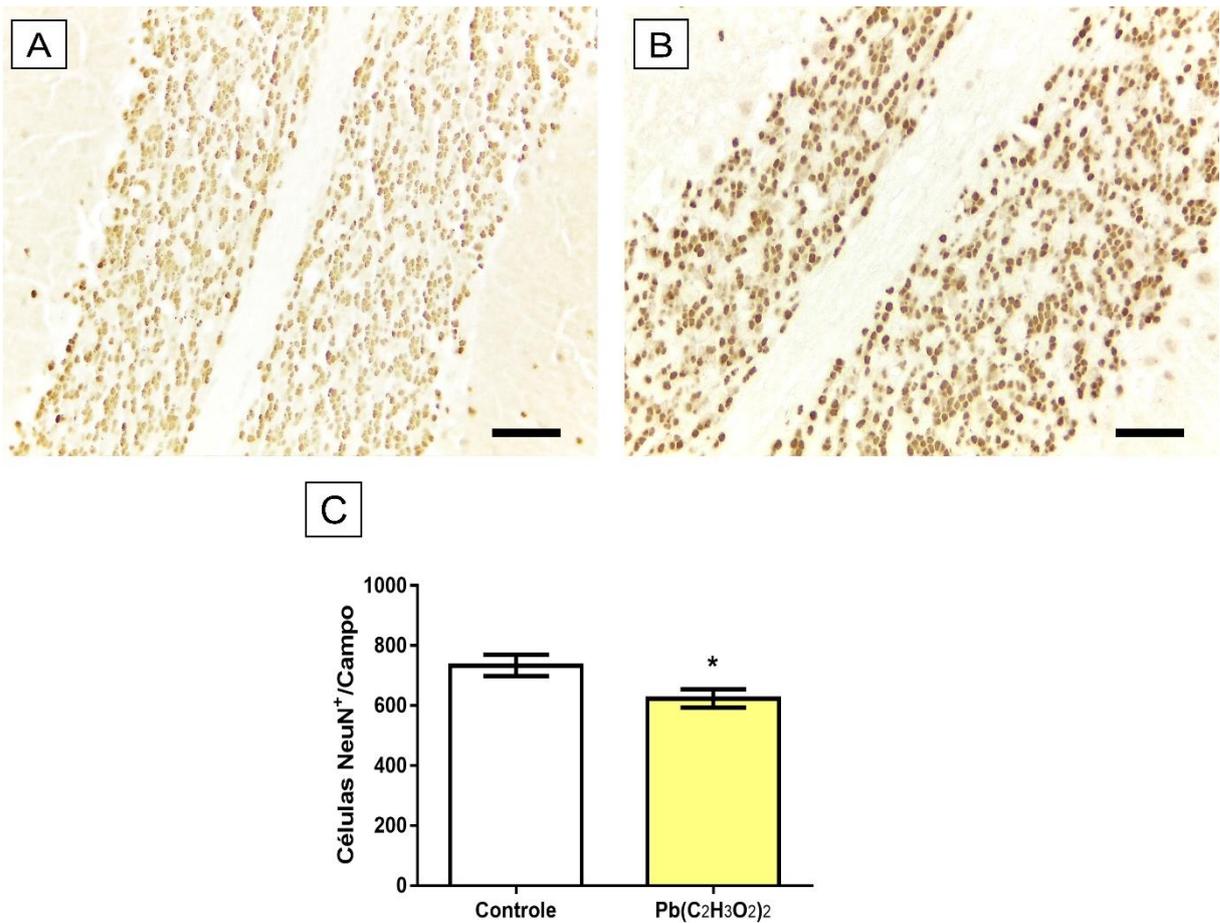


Figura 22: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre o número de células NeuN⁺ no cerebelo. Fotomicrografias representativas do (A) grupo controle e (B) grupo $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da (C) densidade de células NeuN⁺. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student). Barra de escala: 20 μm .

4.5.2 Diminuição da bainha de mielina no cerebelo

Além das alterações morfológicas causadas pela exposição ao chumbo, observamos que o padrão proposto foi capaz de diminuir a fração de área da imunomarcção de MBP no grupo Pb em relação ao grupo controle ($49,18 \pm 3,08$ vs $33,86 \pm 2,4$; $p = 0,001$), como visto na Figura 23.

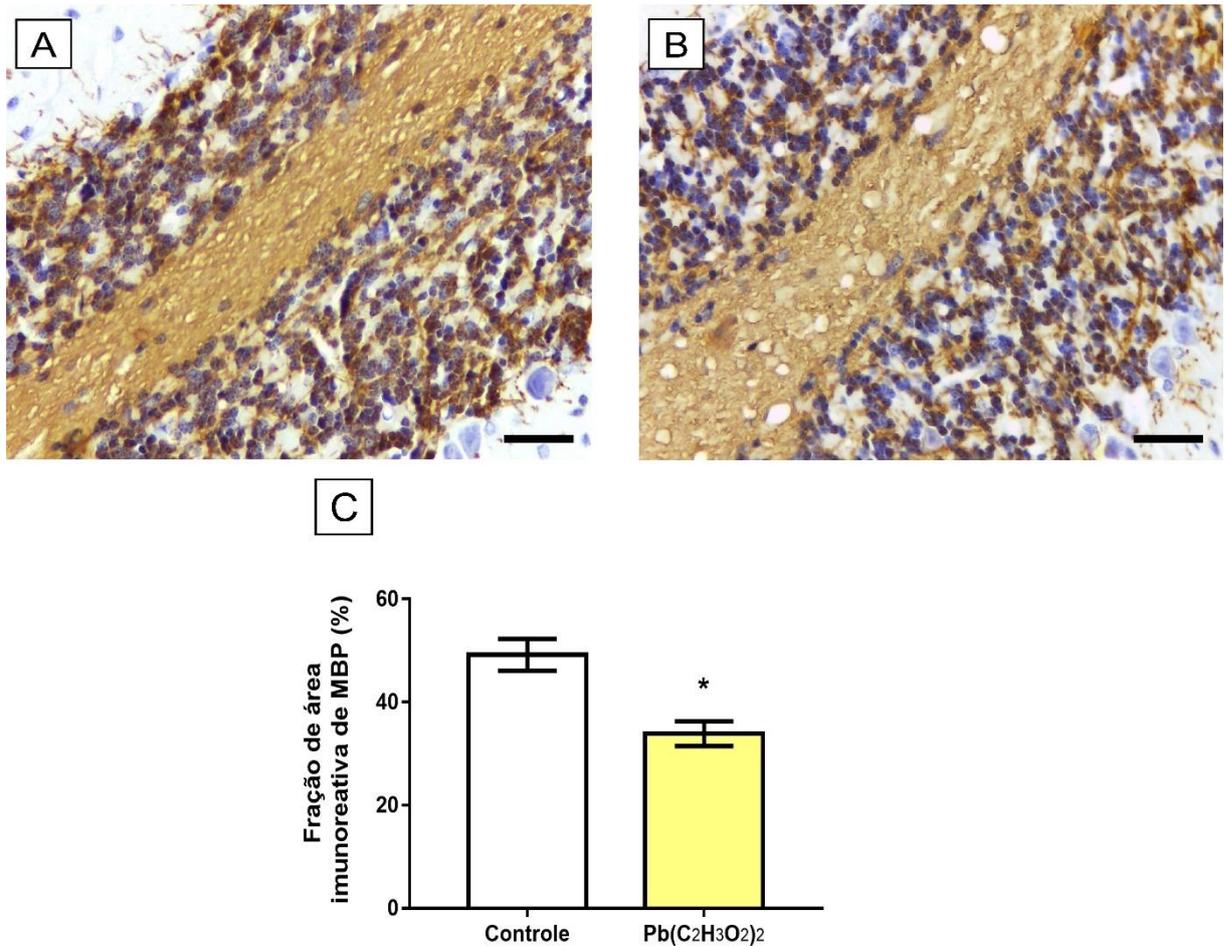


Figura 23: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcção de proteína básica de mielina (MBP) em cerebello. (A) Grupo controle e (B) grupo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da (C) fração de área da imunomarcção. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Barra de escala: 20 μ m.

4.5.3 Diminuição de vesículas sinápticas no córtex motor e cerebello

A exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb também foi capaz de promover diminuição na fração de área da imunomarcção de aproximadamente 60% para sinaptofisina no córtex motor ($9,18 \pm 0,36$ vs $6,87 \pm 0,54$; $p = 0,0008$) (Figura 24), assim como também promoveu diminuição no cerebello ($p = 0,0001$) (Figura 25).

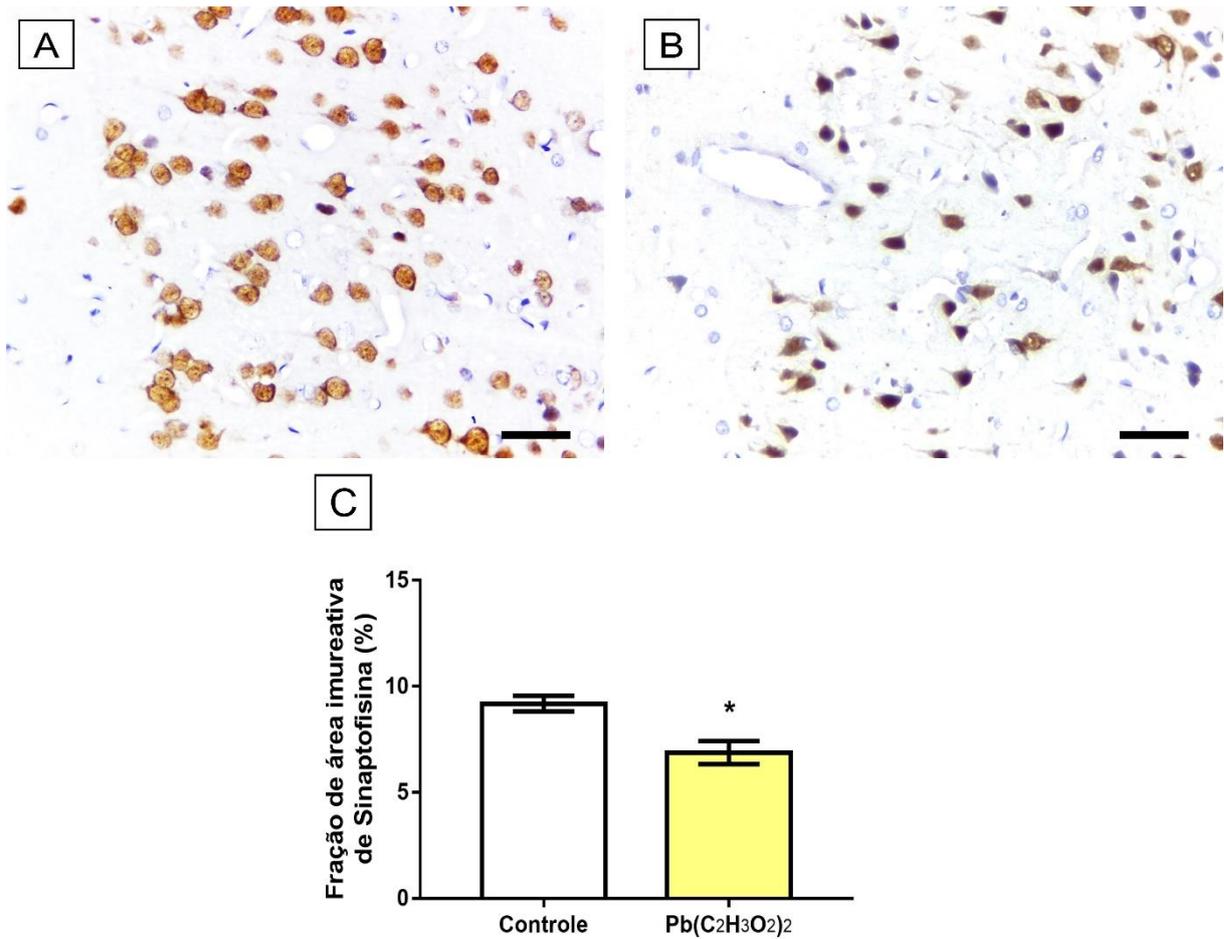


Figura 24: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcagem da sinaptofisina (SINA) no córtex motor. (A) Grupo controle e (B) grupo (Pb(C₂H₃O₂)₂). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da porcentagem da (C) fração de área da imunocoloração. * p <0,05 comparado ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Barra de escala: 20 μm.

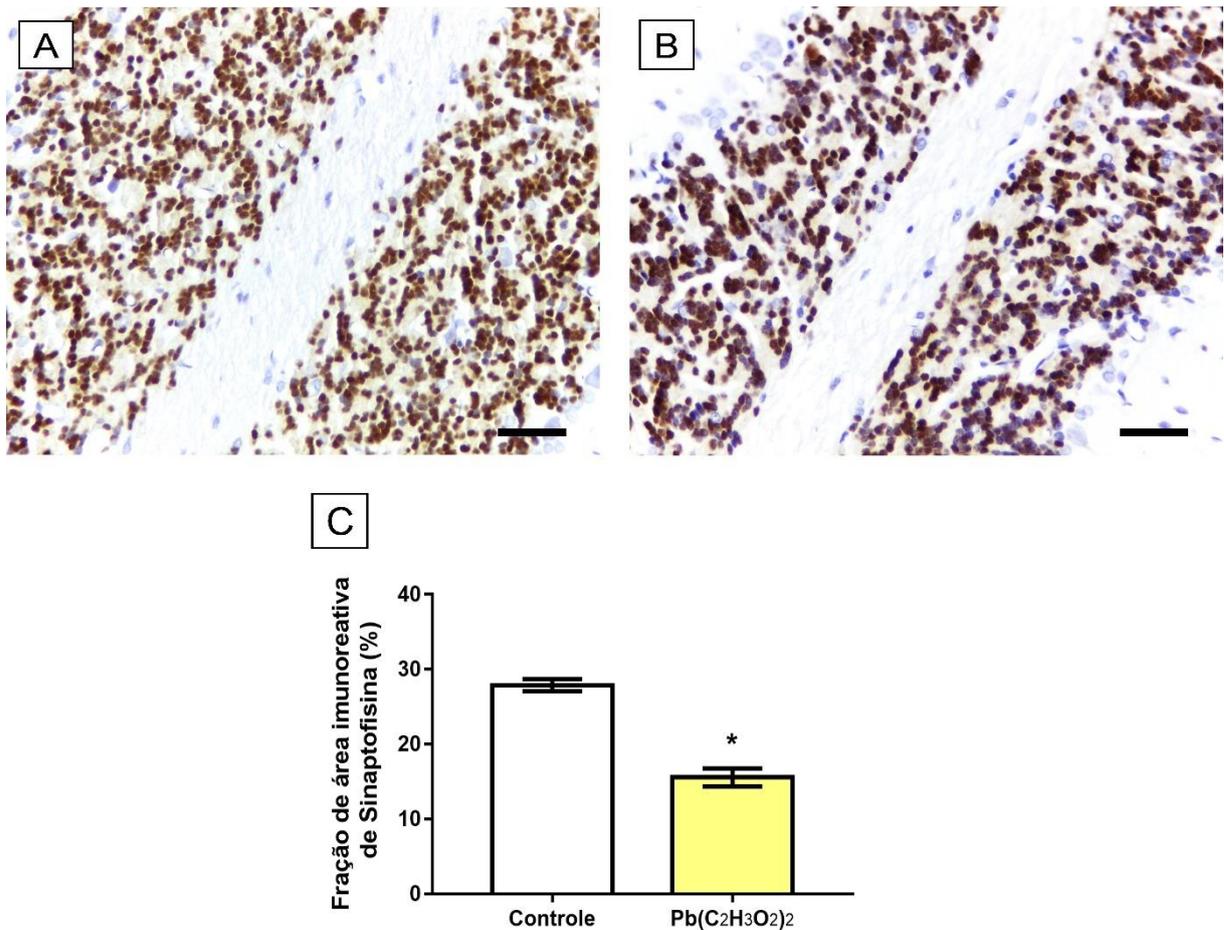


Figura 25: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a imunomarcagem da sinaptofisina em cerebelo. (A) Grupo controle e (B) grupo (Pb(C₂H₃O₂)₂). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da (C) fração de área da imunomarcagem. * p < 0,05 comparado ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Barra de escala: 20 µm.

4.6 ALTERAÇÕES EXPLORATÓRIAS E MOTORAS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RATOS WISTAR JOVENS A 50 mg/Kg DE CHUMBO

Para avaliarmos a atividade exploratória e motora dos animais após exposição subcrônica de ratos Wistar adolescentes a 50 mg/Kg de Pb foram realizados três testes comportamentais. Inicialmente, realizou-se o teste de campo aberto onde foi avaliado o deslocamento total percorrido, o deslocamento percorrido na área central, o deslocamento na área periférica, o número de cruzamento de quadrantes e o número de 'Rearing'. Após análise desses parâmetros, foi observado que a exposição

subcronicamente a 50 mg/Kg de Pb induziu diminuição em todos eles, exceto no deslocamento percorrido na área central, quando comparado ao grupo controle (Distância total percorrida: $F_{2,927} [15, 16]$, $p = 0,0404$; Distância percorrida na área central: $F_{2,727} [7, 6]$, $p = 0,2424$; Distância percorrida na área periférica: $t=2,407$, $df=13$, $p = 0,0316$; Cruzamento de quadrantes: $t=2,290$, $df=14$, $p = 0,0381$; Rearing: $t=2,346$, $df=18$, $p = 0,0306$) (Figura 26 e 27).

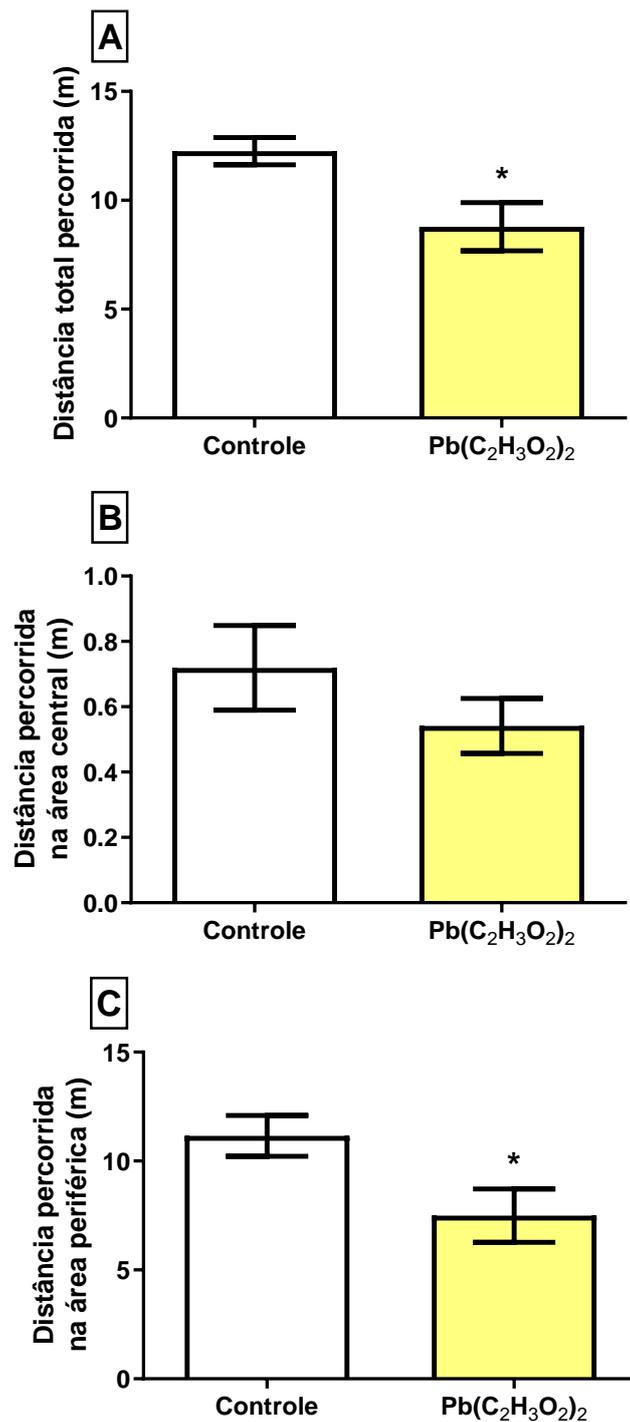


Figura 26: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade exploratória no teste de campo aberto. Em (A) Distância total percorrida, (B) Distância percorrida na área central, (C) Distância percorrida na área periférica. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.05$).

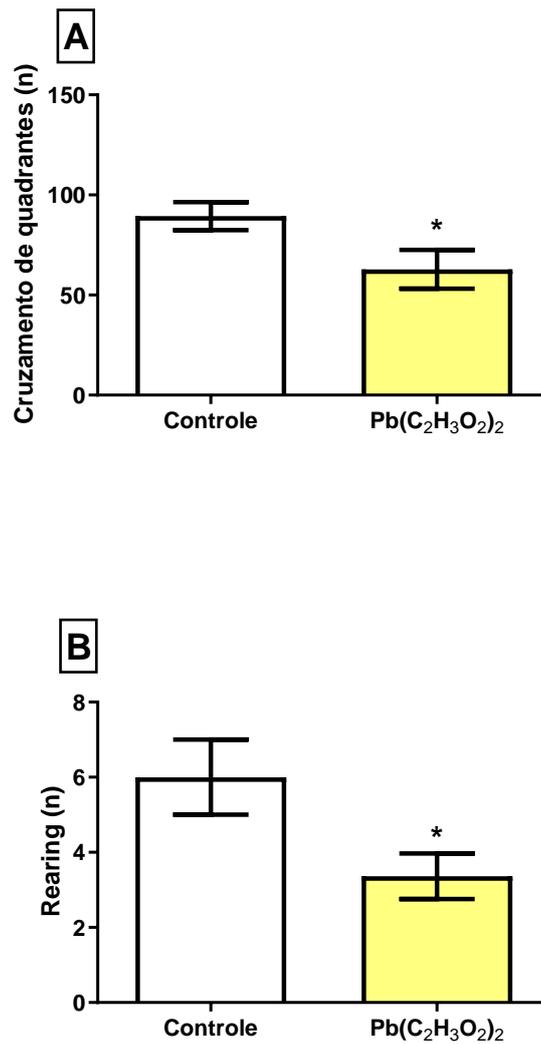


Figura 27: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade exploratória no teste de campo aberto. Em (A) Cruzamento de quadrantes, (B) 'Rearing'. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * (Pb(C₂H₃O₂)₂) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.05$).

Após o ensaio de campo aberto, foi realizado o teste de plano inclinado, onde observamos que a exposição subcrônica de ratos Wistar jovens ao Pb também induziu diminuição no ângulo de queda dos animais em comparação ao grupo controle ($t=6,788$, $df=16$, $<0,0001$) (Figura 28).

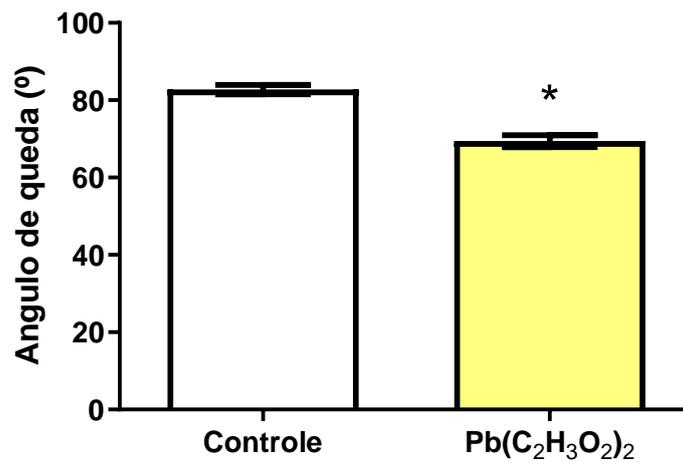


Figura 28: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre coordenação motora, equilíbrio e força muscular no teste de plano inclinado. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * (Pb(C₂H₃O₂)₂) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.0001$).

Posteriormente, foi realizado teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod-Test) para avaliação da atividade motora dos animais após exposição subcrônica dos ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb. Ao avaliarmos os dados obtidos, foi observado que a exposição ao Pb induziu diminuição na latência do primeiro e segundo teste quando comparado ao grupo controle (F Infinity [9, 7], $p < 0,0001$) (Figura 29).

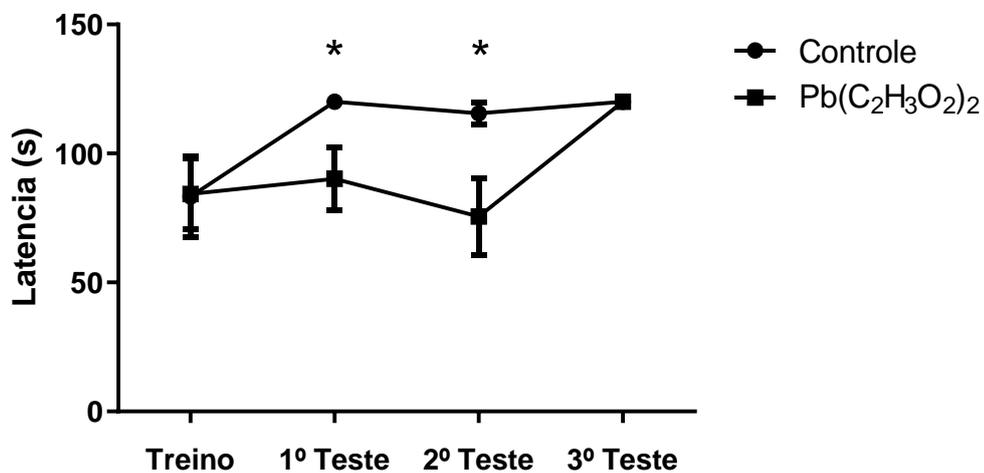


Figura 29: Efeito da exposição subcrônica de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb sobre a atividade motora no teste de Rota-rod. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) vs Controle (Teste *t* de *student*, $p < 0.0001$).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, pela primeira vez, é realizado a descrição do perfil proteômico do córtex motor e cerebelo de ratos Wistar jovens expostos de forma subcrônica a 50 mg/Kg de acetato de chumbo. Essa abordagem revelou importantes alvos de proteínas na intoxicação por Pb, estando associada a processos biológicos para a manutenção do órgão, como metabolismo energético, função neural e manutenção morfológica. Ainda assim, apresentamos que este modelo de exposição é capaz de prejudicar as habilidades exploratórias e motoras, provavelmente relacionadas a uma redução na densidade celular de neurônios encontrados em camadas granulares, moleculares e Purkinje no cerebelo, e diminuição de neurônios encontrados no cortex motor, possivelmente associado ao estresse oxidativo e/ou com o comprometimento funcional ampliado pela disfunção sináptica e redução de mielina.

Os tratos gastrointestinal e respiratório são as principais vias de exposição do homem ao chumbo (LEVIN AND GOLDBERG, 2000). A maioria dos estudos com modelo animal, utilizam a água de beber para exposição ao Pb (HOHNADEL et al., 1973 KHAROUBI et al, 2011; KOH et al, 2015). Contudo, apesar da concentração deste metal não ser variável, é difícil saber com exatidão a quantidade de Pb ingerida durante a exposição. Por isso, o processo de gavagem é mais confiável, visto que o Pb é introduzido diretamente no estomago (FDA, 2002). Entretanto, este processo pode induzir a perda de peso dos animais por ser um método invasivo. A partir disso, foi realizado a análise do ganho de massa dos animais no decorrer da exposição ao chumbo, demonstrando que tanto o processo de gavagem quanto o Pb não ocasionaram alterações (figura 6). Com isso, pode-se sugerir que as alterações encontradas nos testes comportamentais estão associados apenas aos efeitos induzidos pela exposição ao metal.

Uma vez presente na corrente sanguínea, o chumbo é um metal facilmente difundido pelo corpo, capaz de se acumular em diversos tecidos, inclusive o cerebral (HOHNADEL et al., 1973 KHAROUBI et al, 2011; KOH et al, 2015). Após a exposição de ratos Wistar jovens a 50 mg/Kg de Pb foi realizado a quantificação do depósito de chumbo nas regiões do cortex motor e cerebelo, onde observamos que houve acúmulo apenas na região cerebelar. As diferentes estruturas anatômicas e a presença de sítios ligantes que atraem o chumbo determinam a sensibilidade e a ação tóxica provocada pelos metais pesados nos organismos vivos (MOREIRA AND

MOREIRA, 2004). De acordo com a literatura, quando depositado na região encefálica, o chumbo induz danos, principalmente, no córtex pré-frontal, no cerebelo e no hipocampo, afetando muitas atividades biológicas em nível molecular, celular e intracelular, o que pode resultar em alterações funcionais permanentes (NEAL et al., 2013).

O cortex motor é a região cerebral responsável pelo planejamento e execução de movimentos voluntários (SHENOY et al., 2013). Neurônios do trato piramidal na camada 5B se projetam para estruturas subcorticais que controlam o movimento, incluindo o colículo superior, o tronco cerebral e a medula espinhal (LI et al., 2015). Já o cerebelo desempenha um papel importante nas funções motoras, sendo responsável basicamente pela modulação do desempenho motor, equilíbrio e coordenação fina (BUCKNER, 2013). Os testes utilizados neste estudo visaram investigar parâmetros específicos das funções do cortex motor e cerebelo (MURPHY, 1995; PANDOLFO, et al., 2007), como atividade exploratória, atividade locomotora espontânea e equilíbrio.

Vários estudos demonstram que danos no cortex motor e cerebelo podem conduzir ao mau desempenho exploratório e motor (SIDHU AND NEHRU, 2003; RIVILIN AND TATOR, 2017; STEINMETZ AND FREEMAN, 2018), no entanto, poucos estudos caracterizam os prejuízos funcionais relacionados com essas regiões após a exposição ao Pb, bem como os efeitos de uma exposição subcrônica à dose baixa desse metal. Nossos dados dos testes comportamentais realizados mostraram que a exposição ao chumbo ocasionou alterações exploratórias e motoras, diminuindo os deslocamento total, deslocamento total percorrido na periferia, o número de 'rearing', o ângulo de queda no plano inclinado e a latência para primeira queda no teste de locomoção forçada em cilindro giratório (rotarod) (figuras 26-29).

Essas alterações comportamentais podem estar associadas a alterações histológicas no cortex motor e cerebelo. Nosso trabalho demonstrou diminuição no número células de Purkinje no cerebelo, bem como alterações histopatológicas da região M1 do cortex motor (figuras 19 e 20). Além disso, observamos diminuição no número de neurônios maduros tanto no cortex motor quanto no cerebelo (figuras 21 e 22), bem como, diminuição da bainha de mielina no cerebelo (figura 23) e diminuição de vesículas sinápticas em ambas as regiões (figuras 24 e 25). De acordo com a literatura, alterações morfológicas do rim (MASSANYI et al., 2014; AMJAD et al., 2017;

DURKOVÁ et al., 2017), fígado (ALEKSIICHUK et al., 2017; DURKOVÁ et al., 2017; REDÓN et al., 2018) e cérebro (DURKOVÁ et al., 2017) foram observadas após exposição subcronicamente a baixas doses de Pb. Além disso, estudos recentes com modelo murino de animais em desenvolvimento, expostos subcronicamente a doses baixas de Pb, induziram diminuição na atividade de vesículas sinápticas, na região do hipocampo (ZHANG et al., 2015; GUARIGLIA et al., 2016).

Todas essas alterações na composição do tecido cortical e cerebelar podem comprometer diretamente a atividade funcional dos animais após exposição ao chumbo (DURKOVÁ et al., 2017). A diminuição do número de neurônios maduros no cortex motor, bem como, vesículas sinápticas responsáveis pela liberação de neurotransmissores são fundamentais para os processos fisiológicos envolvidos no planejamento e execução dos movimentos (ZHANG, et al., 2015), podendo estar relacionados com as alterações locomotoras induzidas pelo Pb observadas neste trabalho.

Possíveis mecanismos envolvidos com as alterações comportamentais e histológicas induzidas pelo Pb podem estar associados a indução de estresse oxidativo, visto que este metal é capaz de se ligar a grupamento sulfidril e outros grupamentos funcionais, bem como induzir o aumento da produção de radicais livres, e danos na membrana celular pela peroxidação lipídica (ZELIKOFF et al., 1993; KASTEN-JOLLY et al., 2010). O MDA (malonaldeído) é um dos produtos da peroxidação lipídica, comumente utilizado como marcador de estresse oxidativo (CANDAN AND TUZMEN, 2008). Dados da literatura apontam que, mais do que induzir o quadro de estresse oxidativo, os níveis de Pb no cérebro estão relacionados com a produção de MDA (VILLEDA-HERNANDEZ et al., 2001; CANDAN AND TUZMEN, 2008; BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2012).

Neste trabalho, foi demonstrado que a exposição subcronicamente de ratos jovens a 50 mg/Kg/dia de Pb induziu aumento na produção de MDA em comparação ao grupo controle apenas na região do cortex motor, promovendo peroxidação lipídica, juntamente com o aumento dos níveis de nitrito quando comparamos o grupo exposto ao Pb com o grupo controle. O nitrito, também representa um marcador para estresse oxidativo, bem como para processos inflamatórios (BOSKABADY, et al., 2018). BOSKABADY, et al., (2018) demonstrou que a exposição de ratos ao Pb aumenta marcadores inflamatórios como TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) e NO (óxido

nítrico), juntamente com a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH) e alterações na atividade antioxidante de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Somado a isso, Kasten-Jolly et al., (2012) observou alterações na expressão inter-região de genes efetores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL18, IL-33, caspase 1 e NOS₂, após exposição ao Pb. Contudo, poucos trabalhos buscaram avaliar o papel do sistema nitrérgico na toxicidade induzida por este metal.

Curiosamente, este estudo não demonstrou aumento de MDA e nitrito no tecido cerebelar, apesar de termos demonstrado que apenas esta região apresentou depósito de chumbo. Acreditamos fortemente que este efeito foi desencadeado devido possíveis rearranjos de proteínas relacionadas ao equilíbrio da bioquímica oxidativa, visto que ao avaliarmos o perfil proteômico do cerebelo, foi observado que a proteína '*Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial*' (P07895) e '*Peroxiredoxin-5, mitochondrial*' (Q9R063), apresentaram maior expressão (figura 16). Além disso, a exposição subcrônica ao Pb induziu aumento na expressão de proteínas relacionadas com o processo de apoptose no cerebelo, como '*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha*' (P11275) e '*Cellular tumor antigen p53*' (P10361) (figura 13), '*Endoplasmic reticulum resident protein 29*' (P52555) e '*Endoplasmic reticulum chaperone BiP*' (P06761) (figura 27) e '*Apoptosis regulator BAX*' (Q63690) (figura 16). O mesmo efeito não foi observado no córtex motor, onde o Pb promoveu a diminuição na expressão de '*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma*' (P11730); '*Calmodulin-3*' (P0DP31); '*Calmodulin-1*' (P0DP29) e '*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta*' (P08413) (figura 9) e a proteína '*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2*' (P11507) (figura 9) foi encontrada apenas no controle, sugerindo que mesmo tendo sido expostos sob as mesmas condições, o córtex motor e cerebelo apresentaram mecanismos diferentes para os efeitos desencadeados pelo Pb.

Somado a isso, falhas na comunicação celular e conseqüentemente disfunção sináptica induzem prejuízos motores após danos no córtex motor e cerebelo (SERVAIS et al., 2007; HOXHA et al., 2012). Nessa perspectiva, o Pb tem sido relatado como um toxicante capaz de alterar as proteínas associadas às comunicações sinápticas, através da ligação molecular, como a proteína '*Synaptotagmin-1*' (Q62910) e '*Synaptotagmin-1*' (P21707) (figura 10) (SUGITA et al., 2000; EVANS AND MORGAN., 2002).

O Pb é relatado como um metal capaz de imitar o papel Ca^{2+} nas células (BOUNTON et al., 2001) e alguns estudos apontam que o Pb tem uma maior afinidade para a ligação fosfolipídica a '*Synaptotagmin-1*' (P21707), no entanto, este metal interrompe a ligação entre '*Synaptotagmin-1*' (P21707) a sintaxina, que medeia o influx de Ca^{2+} na liberação do neurotransmissor (BOUNTON et al., 2001). Mesmo que na avaliação do perfil proteômico, tenha sido demonstrado aumento na expressão destas três proteínas, '*Synaptotagmin-1*' (P21707), '*Syntaxin-1B*' (P61265) e '*Syntaxin-binding protein 1*' (P61765) (figura 10), o chumbo também promoveu diminuição na expressão de '*Synaptojanin-1*' (Q62910). A partir disso, ao avaliarmos a imunoreatividade do cortex motor e cerebelo para sinaptofisina, foi demonstrado diminuição na fração de área para esse marcador nas duas áreas, sugerindo que estas proteínas são, não somente alvos principais para a toxicidade do Pb, mas podem ser úteis como biomarcadores para a exposição do Pb e provável deficiência na comunicação sináptica.

Na sequência desta perspectiva de disfunção sináptica, a nossa abordagem proteômica também observou que a '*Clathrin heavy chain*' (F1M779) e sua isoforma '*Clathrin heavy chain 1*' (P11442) (figura 15) foram reguladas aumentando e diminuindo a expressão, respectivamente, sendo que ambos estão relacionados com o processo de endocitose vesicular regulada por clatrina (MAYCOX et al., 1992; MORGAN et al., 2000). O agrupamento de interações proteicas criada por '*ClustMarker*' demonstrou forte associação com proteínas no tráfico de vesículas, como '*GRIP1-associated protein 1*' (Q9JHZ4) (figura 14), encontrada apenas no grupo exposto e envolvida na localização da reciclagem por endossomos nos dendritos (HOOGENRAAD et al., 2010). Além disso, foram encontradas proteínas como '*Glutamate receptor-interacting protein 2*' (Q9WTW1) e '*Glutamate receptor-interacting protein 1*' (P97879) (figura 14), ambos integrantes do sistema glutamatérgico, não pertencentes a nossa avaliação, porém capaz de interagir com nossos dados a partir da base de dados, e '*Vesicle-fusing ATPase*' (Q9QUL6) (figura 14), que apresentou expressão aumentada, o qual catalisa a fusão de vesículas transportadoras com as cisternas do complexo de golgi (ABUL-HUSN et al., 2009).

Sabe-se que a excitotoxicidade pode induzir morte celular através do desequilíbrio na liberação e na captação de glutamato na fenda sináptica (ARUNDINE AND TYMIANSKI, 2003). A rede em 'cluster' na figura 13, revelou interações de proteínas

como o '*Glutamate receptor 1*' (P19490), '*Metabotropic glutamate receptor 2*' (P31421), '*Metabotropic glutamate receptor 7*' (P35400), '*Metabotropic glutamate receptor 3*' (P31422), '*Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A*' (Q00959), '*Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A*' (P54282) e '*Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B*' (Q00960), com outras proteínas encontradas em nosso proteoma. Por um lado, é possível sugerir uma deficiência na comunicação sináptica, mas por outro lado, é associado diretamente com a neurotransmissão excitatória, sugerindo que assim como outros metais (CULBRETH AND ASCHNER, 2006), a morte celular por exposição ao chumbo e o prejuízo das funções locomotoras podem estar associadas à excitotoxicidade (GILL, et al., 2003).

O mecanismo de excitotoxicidade está associando ao influxo excessivo de cálcio (GILL, et al., 2003). Nessa perspectiva, sabendo que diversas proteínas do transporte de cálcio e sua função foram encontradas alteradas em nossa análise, juntamente com as proteínas envolvidas no processo de morte celular por apoptose descrito anteriormente, esses dados nos levam a sugerir que as alterações induzidas pelo chumbo na composição celular do cerebelo estejam fortemente envolvidas com o processo de excitotoxicidade e morte por apoptose, enquanto que o mecanismo envolvido nas alterações na composição do cortex motor parece estar associado com a indução de estresse oxidativo. Contudo, a junção de todas essas alterações foram fundamentais para os deficits exploratórios e motores observados nos testes comportamentais deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

- Concluimos que a exposição subcrônica a 50 mg/Kg de acetato de chumbo promove deficits exploratórios e motores em ratos Wistar jovens;
- As alterações locomotoras podem estar relacionadas com as alterações na citoarquitetura e composição celular, mediante diminuição do número de células de Purkinje, número de neurônios, diminuição da bainha de mielina e vesículas sinápticas no cerebelo;
- Além disso, observamos também diminuição do número de neurônios e diminuição de vesículas sinápticas no cortex motor;
- Ao avaliarmos os possíveis mecanismos envolvidos com a toxicidade do chumbo, observamos que os efeitos no cerebelo possivelmente não estão relacionados com a indução de estresse oxidativo, mediante produção de peroxidação lipídica e aumento de nitrito no cerebelo, e sim associado com o processo de excitotoxicidade e morte por apoptose;
- Contudo, ao avaliarmos o cortex motor, observamos aumento de nitrito e peroxidação lipídica, sugerindo a indução de um quadro de estresse oxidativo pela exposição de ratos Wistar jovens ao chumbo;
- Além disso, no perfil proteômico, tanto o cortex motor quanto o cerebelo apresentaram diminuição na expressão de proteínas envolvidas com os mecanismos de liberação de neurotransmissores, bem como receptores pós-sinápticos e segundos mensageiros, sugerindo um deficits na comunicação celular, fundamental para o funcionalidade dessas regiões e, conseqüentemente, no processo locomotor.

7 REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, N; RAJU, VS; RAJATHI, K. **Effect of semecarpus anacardium against lead induced toxicity in rats.** Ancient science of life. 2007, 27: 24–27.
- ABUL-HUSN, NS; BUSHLIN, I; MORÓN, JÁ; JENKINS, SL; DOLIOS, G; WANG, R; IYENGAR, R; MA'AYAN, A; DEVI, LA. **Systems approach to explore components and interactions in the presynapse.** Proteomics. 2009, 9(12): 3303-15.
- AHRENS, CH; SCHRIMPF, SP; BRUNNER, E; AEBERSOLD, R. **Model organism proteomics.** Journal of Proteomics. 2010, 73(11): 2051-2053.
- AL-SALEH, I; NESTER, M; MASHHOUR, A; MONCARIL, L; SHINWARI, N. **Prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development: longitudinal study in Saudi Arabia.** International Journal of Occupational Medicine. 2009, 28: 283–302.
- AMJAD, Z; YASMIN, T; ASHRAF, I; PERVEEN, K; MIRZA, T; SHORO, AA. **Lead-induced morphometric changes in the kidneys of albino rats ameliorated by ginkgo biloba extract (EGb 761).** Journal of Pakistan Medical Association. 2017, 67(1): 58-65.
- ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis* [tese].** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2006.
- ARUNDINE, M; TYMIANSKI, M. **Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity.** Cell Calcium. 2003, 34(4-5): 325-37.
- ATSDR, (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Lead.** (Draft for Public Comment) Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, United State Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 2007.
- BARANOWSKA-BOSIACKA, I; GUTOWSKA, I; RYBICKA, M; NOWACKI, P; CHLUBEK, D. **Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders.** Neurologia i Neurochirurgia Polska. 2012, 46(6): 569-578.
- BARBOSA, EB; VIDOTTO, A; PLACHINI, GM; HENRIQUE, T; MARQUI, ABT; TAJARAS, EH. **Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas.** Revista da Associação Médica Brasileira. 2012, 58: 366-375.
- BARRY, PS. **A comparison of concentrations of lead in human tissues.** British Journal of Industrial Medicine. 1975, 32: 119–139.
- BELLINGER, DC. **Assessing environmental neurotoxicant exposures and child neurobehavior: confounded by confounding?** Epidemiology. 2004, 15(4): 383–384.
- BIJLOOR, AR; SUDHA, S; VENKATESH, T. **Neurochemical and neurobehavioral effects of low lead exposure on the developing brain.** Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2012, 27(2): 147-151.

- BLISS, C. **The toxicity of poisons applied jointly.** *Annals of Applied Biology.* 1939, 26: 585-615.
- BOSKABADYA, M; MAREFATIB, N; FARKHONDEHB, T; SHAKERIC, F; FARSHBAFD, A; BOSKABADY, MH. **The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review.** *Environment International.* 2018, 120: 404-420.
- BRADBURY, MW; DEANE, R. **Permeability of the blood-brain barrier to lead.** *Neurotoxicology.* 1993, 14: 131-136.
- BRADFORD, MM. **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry.* 1976, 72: 248-254.
- BRAGA, MFM; PEREIRE, EFR; ALBUQUERQUE, EX. **Nanomolar concentration of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons.** *Brain Research.* 1999, 826: 22–34.
- BUCKNER, RL. **The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging.** *Neuron.* 2013, 30;80(3): 807-815.
- CANDAN, N; TUZMEN, N. **Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection.** *Neurotoxicology.* 2008, 29(4): 708-13.
- CANDIANO, G; RUSCHI, M; MUSANTE, L; SANTUCCI, L; GHIGGERI, GM; CARNEMOLLA, B; ORECCHIA, P; ZARDI, L; RIGHETTI, PG. **Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis.* 2004, 25(9): 1327-33.
- CANFIELD, RL; KREHER, DA; CORNWELL, C; HENDERSON, CR JR. **Low-level lead exposure, executive functioning, and learning in early childhood.** *Child Neuropsychology.* 2003, 9(1): 35–53.
- CECIL, KM; BRUBAKER, CJ; ADLER, CM; DIETRICH, KN; ALTAYE, M; EGELHOFF, JC; WESSEL, S; ELANGOVAN, I; HORNUNG, R; JARVIS, K. **Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure.** *PLoS Med.* 2008, 5: e112.
- CHEN, S; MILLER, T; GOLEMBOSKI, K; DIETERT, R. **Suppression of macrophage metabolite production by lead glutamate in vitro is reversed by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA).** *Toxicology in vitro.* 1997, 10: 351–358.
- CHEN, HH; MA, T; HUME, AS; HO, IK. **Developmental lead exposure alters the distribution of protein kinase activity in rat hippocampus.** *Biomedical and Environmental Sciences.* 1998, 11(1): 61–64.
- COLLINS, MF; HRDINA, PD; WHITTLE, E; SINGHAL, RL. **Lead in blood brain regions of rats chronically exposed to low doses of the metal.** *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1982, 65: 314–332.
- CULBRETH, M; ASCHNER, M. **Dysregulation of Glutamate Cycling Mediates Methylmercury-Induced Neurotoxicity.** *Advances in neurology.* 2016, 13: 295-305.

- DENKER, A; RIZZOLI, SO. **Synaptic vesicle pools: an update.** *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2010, 2: 1–12.
- DING, Y; VAZIRI, ND; GONICK, HC. **Lead-induced hypertension: II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside.** *Environmental Research*. 1998, 76: 107–113.
- ESTERBAUER, H; CHEESEMAN, KH. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.** *Methods in Enzymology*. 1991, 186: 407-421.
- EVANS, GJ; MORGAN, A. **Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I.** *Biochem J*. 2002, 1;364(Pt 2): 343-7.
- FAGUNDES, NC; FERNANDES, LM; PARAENSE, RS; FARIAS-JUNIOR, PM; TEIXEIRA, FB; ALVES-JUNIOR, SM; PINHEIRO, J; CRESPO-LOPEZ, ME; MAIA, CS; LIMA, RR. **Binge Drinking of Ethanol during Adolescence Induces Oxidative Damage and Morphological Changes in Salivary Glands of Female Rats.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 7323627. doi: 10.1155/2016/7323627.
- FDA, U. Chapter IV. C. 4.a. **Subchronic Toxicity Studies with Rodents.** *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients*. Redbook 2000.
- FERNANDES, LM; TEIXEIRA, FB; ALVES-JUNIOR, SM; PINHEIRO J, MAIA, CS; LIMA, RR. **Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands.** *Histology and Histopathology*. 2015, 30(9): 1069-78.
- FINKELSTEIN, Y; MARKOWITZ, ME; ROSEN, JF. **Low level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects.** *Brain Research*. *Brain Research Reviews*. 1998, 27(2): 168–176.
- FORTOUL, TI; MONCADA-HERNÁNDEZ, M; SALDIVAR-OSORIO, L; ESPEJELMAYA, G; MUSSALI-GALANTE, P; CARMEN ÁVILA-CASADO, M; COLÍN-BARENQUE, L; HERNÁNDEZ-SERRATO, MI; ÁVILA-COSTA, MR. **Sex differences in bronchiolar epithelium response after the inhalation of lead acetate (Pb).** *Toxicology*. 2005, 207(2): 323-330.
- GUARIGLIA, SR; STANSFIELD, KH; MCGLOTHAN, J; GUILARTE, TR. **Chronic early life lead (Pb²⁺) exposure alters presynaptic vesicle pools in hippocampal synapses.** *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2016, 2;17(1): 56.
- GILL, KD; GUPTA, V; SANDHIR, R. **Ca²⁺/calmodulin-mediated neurotransmitter release and neurobehavioural deficits following lead exposure.** *Cell biochemistry and function*. 2003, 21: 345–353.
- GREEN, LC; DE LUZURIAGA, KR; WAGNER, DA. **Nitrate biosynthesis in man.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1981, 78: 7764-7768.
- HARDING, LE; HARRIS, ML; ELLIOTT, JE. **Heavy and trace metals in wild mink (*Mustela vison*) and river otter (*Lontra canadensis*) captured on rivers**

- receiving metals discharges.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1998, 61(5): 600–607.
- HOHNADDEL, DC; SUNDERMAN JR; FW; NECHAY, MW; MCNEELY, MD. **ATOMIC absorption spectrometry of nickel, copper, zinc, and lead in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing.** Clinical Chemistry. 1973, 19: 1288–1292.
- HOOGENRAAD, CC; AKHMANOVA, A. **Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules.** The Neuroscientist. 2010, 16(6): 650-61.
- HOXHA, E; TONINI, R; MONTAROLO, F; CROCI, L; CONSALEZ, GG; TEMPIA F. **Motor dysfunction and cerebellar Purkinje cell firing impairment in Ebf2 null mice.** Molecular and Cellular Neuroscience. 2013, 52: 51-61.
- IPCS. **International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165 for Inorganic Lead.** 1995.
- ISHIKAWA, ET; GONZALEZ-NIETO, D; GHIAUR, G; DUNN, SK; FICKER, AM; MURALI, B; CANCELAS, JA. **Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012, 109(23): 9071-9076.
- JACOBS, DR; WILSON, J; DIXON, SL; SMITH, J; EVENS, A. **The relationship of housing and population health: a 30-year retrospective analysis.** Environmental Health Perspectives. 2009, 117-597.
- JAISHANKAR, M; TSETEN, T; ANBALAGAN, N; MATHEW, BB; BEEREGOWDA, KN. **Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals.** Interdisciplinary Toxicology. 2014, 7(2): 60-72.
- JAKUBOWSKI, M. **Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment in children-the current concepts of risk assessment.** International Journal of Occupational Medicine. 2011, 24: 1-7.
- JUSKO, TA; HENDERSON, CR; LANPHEAR, BP; CORY-SLECHTA, DA; PARSONS, PJ; CANFIELD, RL. **Blood lead concentrations<10microg/dl and child intelligence at 6years of age.** Environmental Health Perspectives. 2008, 116: 243–248.
- KASTEN-JOLLY, J; PABELLO, N; BOLIVAR, VJ; LAWRENCE, DA. **Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female balb/canntac mice.** Neurotoxicology. 2012, 33: 1005–1020.
- KATSUYAMA, M; MATSUNO, K; YABE-NISHIMURA, C. **Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme.** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2012, 50(1): 9-22.
- KAŠUBA, V; ROZGAJ, R; MILIĆ, M; ŽELJEŽIĆ, D; KOPJAR, N; PIZENT, A; KLJAKOVIĆ-GAŠPIĆ, Z. **Evaluation of lead exposure in battery-manufacturing workers with focus on different biomarkers.** Journal of Applied Toxicology. 2010, 30: 321–328.

- KHAROUBI, O; SLIMANI, M; AOUES, A. **Neuroprotective effect of wormwood against lead exposure**. Journal of Emergencies, Trauma and Shock. 2011, 4(1): 8288.
- KOH, DH. *et al.* **Lead exposure in US worksites: A literature review and development of an occupational lead exposure database from the published literature**. American Journal of Industrial Medicine. 2015, 58(6): 605-616.
- LAEMMLI, UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature. 1970, 227(5259): 680-685.
- LANPHEAR, BP; HORNUNG, R; KHOURY, J; YOLTON, K; BAGHURST, P; BELLINGER, DC; CANFIELD, RL; DIETRICH, KN; BORNSCHEIN, R; GREENE, T. **Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis**. Environmental Health Perspectives. 2005, 113: 894.
- LARINI, L; SALGADO, PET; LEPERA, JS. **Metais**. In: LARINI, Lourival. Toxicologia 3.Ed. São Paulo: Manole. 1997, 131-135.
- LASLEY, SM; GILBERT, ME. **Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level**. Toxicological Sciences. 2002, 66: 139–147.
- LEVIN, SM; GOLDBERG, M. **Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers**. American Journal of Industrial Medicine. 2000, 37: 23–43.
- LIMA, RR; SANTANA, LN; FERNANDES, RM; NASCIMENTO, EM; OLIVEIRA, AC; FERNANDES, LM; DOS SANTOS, EM; TAVARES, PA; DOS SANTOS, IR; GIMARAES-SANTOS, A; GOMES-LEAL, W. **Neurodegeneration and Glial Response after Acute Striatal Stroke: Histological Basis for Neuroprotective Studies**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Journal. 2016, vol. 2016, 3173564.
- LI, N; CHEN, TC; GUO, ZV; GERFEN, CR; SVOBODA, K. **A motor cortex circuit for motor planning and movement**. Nature. 2015, 5;519(7541): 51-56.
- LIU, CM; MA, JQ; SUN, YZ. **Puerarin protects rat kidney from lead-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway**. Toxicology and Applied Pharmacology. 2012, 258: 330–342.
- LOPACHIN, RM; CASTIGLIA, CM; SAUBERMANN, AJ. **Elemental composition and water content of myelinated axons and glial cells in rat central nervous system**. Brain Research. 1991, 549: 253–259.
- MARTIN, S; GRISWOLD, W. **Human health effects of heavy metals**. Environmental Science and Technology Briefs for Citizens. 2009, (15): 1–6.
- Massanyi, P; Lukac, N; Makarevich, AV; Chrenek, P; Forgacs, Z; Zakrzewski, M; Stawarz, R; Toman, R; Lazor, P; Flesarova, S. **Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo**. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. 2007, 42(5): 671-676.

- MAYCOX, PR; LINK, E; REETZ, A; MORRIS, SA; JAHN, R. **Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling.** *Journal of Cell Biology*. 1992, 118(6): 1379-88.
- MOREIRA, FR; MOREIRA, JC. **A cinética do chumbo no organismo e sua importância para a saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*. 2004, 9(1): 167-181.
- MORGAN GW, ALLEN CL, JEFFRIES TR, HOLLINSHEAD M, FIELD MC. **Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*.** *Journal of Cell Science*. 2001, 114(Pt 14): 2605-15.
- MUDIPALLI, A. **Lead hepatotoxicity & potential health effects.** *Indian J. Med. Res.* 2007, 126: 518.
- MURPHY, MP; RICK, JT; MILGRAM, NW; IVY, GO. **A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 1995, 64(2): 181-6.
- NAVAS-ACIEN, A; GUALLAR, E; SILBERGELD, EK; ROTHENBERG, SJ. **Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review.** *Environmental Health Perspective*. 2007, 115: 472.
- NAWROT, T; THIJS, L; DEN HOND, E; ROELS, H; STAESSEN, JA. **An epidemiological reappraisal of the association between blood pressure and blood lead: a meta-analysis.** *Journal of Human Hypertension*. 2002, 16: 123.
- NEAL, AP; WORLEY, PF; GUILARTE, TR. **Lead exposure during synaptogenesis alters NMDA receptor targeting via NMDA receptor inhibition.** *Neurotoxicology*. 2013, 32: 281-289.
- NEAL, AP; STANSFIELD, KH; WORLEY, PF; THOMPSON, RE; GUILARTE, TR. **Lead exposure during synaptogenesis alters vesicular release proteins and impairs vesicular release: potential role of NMDA receptor-dependent BDNF signaling.** *Toxicological Sciences*. 2010a, 116: 249–263.
- NEAL, AP; GUILARTE, TR. **Molecular neurobiology of lead (Pb²⁺): effects on synaptic function.** *Molecular Neurobiology*. 2010b, 42: 151-160.
- NEEDLEMAN, HL. **The future challenge of lead toxicity.** *Environmental Health Perspectives*. 1990, 89: 85-89.
- NEEDLEMAN, HL; RIESS, JA; TOBIN, MJ; BIESECKER, GE; GREENHOUSE, JB. **Bone lead levels and delinquent behavior.** *JAMA*. 1996, 275: 363–369.
- NEUHOFF, V; AROLD, N; TAUBE, D; EHRHARDT, W. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis*. 1988, 9(6): 255-62.
- NRC. **Lead: airborne lead in perspective (Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants).** Washington: National Academy of Sciences. 1972.

- NRIAGU, J; OLERU, NT; CUDJOE, C; CHINE, A. **Lead poisoning of children in Africa, III. Kaduna, Nigeria.** *Science of the Total Environment*. 1997, 30;197(13):13-9.
- OMOBOWALE, TO; OYAGBEMI, AA; AKINRINDE, AS; SABA, AB; DARAMOLA, OT; OGUNPOLU, BS; OLOPADE, JO. **Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014, 37: 1202–1211.
- PANDOLFO, P; PAMPLONA, FA; PREDIGER, RDS; TAKAHASHI, RN. **Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2.** *European Journal of Pharmacology*. 2007, 563: 141–148.
- PAXINOS, G; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Academic Press. 1998.
- PLUMB, DC. **Veterinary Drug Handbook.** 4th ed. Iowa State Press, Ames. 2002: 42-45.
- RIVLIN, AS; TATOR, CH. **Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat.** *Journal of Neurosurgery*. 1977, 47: 577-581.
- RIZZOLI, SO; BETZ, WJ. **Synaptic vesicle pools.** *Nat Ver Neurosci*. 2005, 6: 57–69.
- RUSSELL JONES, R. **The continuing hazard of lead in drinking water.** *Lancet* 2, 1989, 669–670.
- SCHWARTZ, BS; STEWART, WF; BOLLA, KI; SIMON, PD; BANDEEN-ROCHE, K; GORDON, PB; LINKS, JM; TODD, AC. **Past adult lead exposure is associated with longitudinal decline in cognitive function.** *Neurology*. 2000, 55: 1144–1150.
- SELVIN-TESTA, A; LOPEZ-COSTA, JJ; NESSI, DE; AVINON, AC; PECCI, SJ. **Astroglial alterations in rat hippocampus during chronic lead exposure.** *Glia*. 1991, 4: 384–92.
- SERVAIS, L; HOUREZ, R; BEARZATTO, B; GALL, D; SCHIFFMANN, SN; CHERON, G. **Purkinje cell dysfunction and alteration of long-term synaptic plasticity in fetal alcohol syndrome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007, 5;104(23): 9858-63.
- SIDHU, P; NEHRU, B. **Relationship Between Lead-Induced Biochemical and Behavioral Changes with Trace Element Concentrations in Rat Brain.** *Biological Trace Element Research*. 2003, 92: 245-255.
- SHARMA, P; DUBEY, RS. **Lead toxicity in plants.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005, 17(1): 35–52.
- SHENOY, KV; SAHANI, M; CHURCHLAND, MM. **Cortical control of arm movements: a dynamical systems perspective.** *Annual Review of Neuroscience*. 2013, 36: 337–359.

- SILVA, MAS; CORRÊA, GC; REIS, EM. **Proteômica: uma abordagem funcional do estudo do genoma.** Saúde & Amb Rev. 2007, 2(2): 1-10.
- SLAMBEROVÁ, R; POMETLOVÁ, M; CHAROUSOVÁ, P. **Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2006, 30: 82 – 88.
- SMITH, KM; ABRAHAMS, PW; DAGLEISH, MP; STEIGMAJER, J. **The intake of lead and associated metals by sheep grazing mining-contaminated floodplain pastures in mid-Wales, UK: I. Soil ingestion, soil-metal partitioning and potential availability to pasture herbage and livestock.** Science of the Total Environment. 2009, 407: 3731-3739.
- SMITH, KM; DAGLEISH, MP; ABRAHAMS, PW. **The intake of lead and associated metals by sheep grazing mining-contaminated floodplain pastures in mid-Wales, UK: II. Metal concentrations in blood and wool.** Science of the Total Environment. 2010, 408: 1035-1042.
- SMITH, PK; KROHN, RI; HERMANSON, GT; MALLIA, AK; GARTNER, FH; PROVENZANO, MD; FUJIMOTO, EK; GOEKE, NM; OLSON, BJ; KLENK, DC. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** Analytical Biochemistry. 1985, 150: 76-85.
- SOLIMAN, AM; ABU-BASHA, EA; YOUSSEF, SAH; AMER, AM; MURPHY, PA; HAUCK, PC; GEHRING, R; HSU, WH. **Effect of chronic lead intoxication on the distribution and elimination of amoxicillin in goats.** Journal of Veterinary Science. 2013, 14(4): 395-403.
- STANSFIELD, KH; PILSNER, JR; LU, Q; WRIGHT, RO; GUILARTE, TR. **Dysregulation of BDNF-TrkB signaling in developing hippocampal neurons by Pb²⁺: implications for an environmental basis of neurodevelopmental disorders.** Toxicological Sciences. 2012, 127: 277–295
- STAUBER, E; FINCH, N; TALCOTT, PA; GAY, JM. **Lead poisoning of bald (*Haliaeetus leucocephalus*) and Golden (*Aquila chrysaetos*) eagles in the U.S. inland Pacific northwest region—an 18-year retrospective study: 1991–2008.** Journal of Avian Medicine and Surgery. 2010, 24(4): 279–287.
- STEINMETZ AB, FREEMAN JH. **Cannabinoid agonist administration within the cerebellar cortex impairs motor learning.** Neurobiology of Learning and Memory. 2018, 30, S1074-7427(18)30151-5.
- STEWART, WF; SCHWARTZ, BS; DAVATZIKOS, C; SHEN, D; LIU, D; WU, X; TODD, AC; SHI, W; BASSETT, S; YOUSSEM, D. **Past adult lead exposure is linked to neurodegeneration measured by brain MRI.** Neurology. 2006, 66: 1476–1484.
- STRUZYNSKA L; DABROWSKA-BOUTA B; KOZA K; SULKOWSKI, G. **Inflammation- like glial response in lead-exposed immature rat brain.** Toxicological Sciences. 2007, 95: 156-162.
- SUGITA, Y; MORITA, E; KAWAMOTO, H; HORIUCHI, K; YAMADA, S; KORO, O; YAMAMOTO, S. **Correlation between deposition of immuno-components and infiltration pattern of polymorphonuclear leukocytes in the lesions of chronic urticaria.** The Journal of Dermatology. 2000, 27(3): 157-62.

- TANG, HW; YAN, HL; HU, XH; LIANG, YX; SHEN, XY. **Lead cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells.** Journal of toxicology. 1996, 16: 187–96.
- TÊTE, N; AFONSO, E; BOUGUERRA, G; SCHEIFLER, R. **Blood parameters as biomarkers of cadmium and lead exposure and effects in wild woodmice (*Apodemus sylvaticus*) living along a pollution gradient.** Chemosphere. 2015, 138: 940–946.
- THÜRMER, K; WILLIAMS, E; REUTT-ROBEY, J. **Autocatalytic oxidation of lead crystallite surfaces.** Science. 2002, 297(5589): 2033–2035.
- TILTON, RG; HAIDACHER, SJ; LEJEUNE, WS; ZHANG, X; ZHAO, Y; KUROSKY, A; BRASIER, AR; DENNER, L. **Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** Proteomics. 2007, 7(10): 1729-42.
- VAN SPRONSEN, M; HOOGENRAAD, CC. **Synapse Pathology in Psychiatric and Neurologic Disease.** Current Neurology and Neuroscience Reports. 2010, 10: 207–214.
- VANZ, A; MIRLEAN, N; BAISCH, P. **Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: Uma abordagem geoquímica.** Química Nova. 2003, 26(1): 25-29.
- VAZIRI, ND; DING, Y; NI, Z; GONICK, HC. **Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy.** Kidney International. 1997, 52: 1042–1046.
- VILLEDA-HERNÁNDEZ, J; BARROSO-MOGUEL, R; MÉNDEZ-ARMENTA, M; NAVA-RUÍZ, C; HUERTA-ROMERO, R; RÍOS, C. **Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate.** Brain Research Bulletin. 2001, 15;55(2): 247-51.
- VOS, M; LAUWERS, E; VERSTREKEN, P. **Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease.** Frontiers in Synaptic Neuroscience. 2010, 2: 1–10.
- WHO. **Guidelines for drinking-water quality.** 2nd ed, Vol 1: Recommendations. Geneva, World Health Organization, 1993, p 188.
- XIAO, C; GU, Y; ZHOU, CY; WANG, L; ZHANG, MM; RUAN, DY. **Lead impairs GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal slices: a possible involvement of presynaptic calcium channels.** Brain Research. 2006, 1088: 93–100.
- YUAN, G; DAI, S; YIN, Z; LU, H; JIA, R; XU, J; SONG, X; LI, L; SHU, Y; ZHAO, X. **Toxicological assessment of combined lead and cadmium: Acute and sub-chronic toxicity study in rats.** Food and Chemical Toxicology. 2014a, 65: 260-268.
- YUAN, G; DAI, S; YIN, Z; LU, H; JIA, R; XU, J; SONG, X; LI, L; SHU, Y; ZHAO, X; CHEN, Z; FAN, Q; LIANG, X; HE, C; YIN, L; LV, C; LEI, Q; WANG, L; MI, Y; YU, X; ZHANG, M. **Sub-chronic lead and cadmium co-induce apoptosis**

- protein expression in liver and kidney of rats.** International Journal of Clinical and Experimental. 2014, 7(6): 2905-2914.
- ZAKI, MS; MOSTAFA, S; AWAD I. **Some studies on lead toxicity in Marino sheep.** American Journal of Science. 2010, 6: 128-131.
- ZELIKOFF, JT; PARSONS, E; SCHLESINGER, RB. **Inhalation of particulate lead oxide disrupts pulmonary macrophage-mediated functions important for host defense and tumor surveillance in the lung.** Environmental Research. 1993, 62(2): 207-22.
- ZHANG, XY; LIU, AP; RUAN, DY; LIU, J. **Effect of developmental lead exposure on the expression of specific NMDA receptor subunit mRNAs in the hippocampus of neonatal rats by digoxigenin-labeled *in situ* hybridization histochemistry.** Neurotoxicology and Teratology. 2008, 24: 149-160.
- ZHANG, XL; GUARIGLIA, SR; MCGLOTHAN, JL; STANSFIELD, KH; STANTON, PK; GUILARTE, TR. **Presynaptic Mechanisms of Lead Neurotoxicity: Effects on Vesicular Release, Vesicle Clustering and Mitochondria Number.** PLoSONE. 2015, 10(5): e0127461. doi:10.1371/journal.pone.0127461