

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
E
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO CHUMBO
EM RATOS JOVENS E ADULTOS**

ANA LÚCIA SEVERO RODRIGUES

ORIENTADOR

PROF. DR. DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Curitiba
1996

AGRADECIMENTOS

Ao Diogo, pelo incentivo, liberdade concedida, orientação, amizade e alegria do convívio.

Aos colegas do grupo de pesquisa.

A Andrea pelas lindas figuras que ilustram esta Tese, pela participação em parte dos experimentos e pelo apoio e amizade em todos os momentos.

Ao João Batista, Maria Ester, Maribel e Carlos pela participação no planejamento e execução de uma parte dos experimentos desta Tese.

A Mayte e Stella Maris pelas dosagens de chumbo.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde foi realizada esta Tese, pela contribuição ao meu trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica da UFSC que me propiciou a liberação para conclusão do Doutorado e pela amizade.

As Coordenadorias de Pós-Graduação dos Departamentos de Bioquímica da UFRGS e UFPR.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS e da UFSC pela colaboração ao meu trabalho.

Aos funcionários do Biotério da UFRGS, especialmente a D. Geni e Sr. Aristeu.

Aos bolsistas que participaram desta Tese.

Ao Guido pelo auxílio no computador.

Aos amigos Andrea, Nice, Rodrigo, Boris, Tatiana, Beti, Alexandre, João, Afonso, Nelson, Lúcia e Maribel.

Ao Murilo, meu querido amigo, *in memoriam*.

Um agradecimento especial a Andrea, Nice e Tatiana que com sua ajuda e carinho tornaram menos árdua esta etapa final de trabalho.

A meus pais, por tudo.

Ao Jorge, pela paciência, companheirismo, apoio, carinho e pelos ótimos momentos que temos vivido juntos.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESP-UFRGS pelo apoio financeiro.

PUBLICAÇÕES

Os resultados desta Tese geraram as seguintes publicações:

RODRIGUES, A. L. S., RUBIN, M. A., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Lead exposure and latent learning ability of adult female rats. Behavioral and Neural Biology v.60, p. 274-279, 1993.

RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E. & SOUZA, D. O. δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v.57, p. 47-53, 1996.

RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., MELLO, C. F. & SOUZA, D. O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. Pharmacology and Toxicology. No prelo.

Artigos em preparação:

RODRIGUES, A. L. S. & SOUZA, D. O. Effects of lead on [3 H]Gpp(NH)p binding in cerebral cortical membranes in rats (para ser submetido ao FEBS Letters).

RODRIGUES, A. L.S., REGNER, A. & SOUZA, D. O. Effects of lead on [3 H]glutamate binding in cerebral cortical and cerebellar membranes of young and adult rats (para ser submetido ao Neurochemical Research).

RESUMO

O chumbo é um metal com ação neurotóxica. No entanto, pouco se tem de conclusivo sobre suas ações no SNC.

Neste trabalho ratas Wistar adultas foram expostas ao acetato de chumbo na água de beber nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM. O grupo controle recebeu água milli-Q. A exposição das ratas compreendeu os seguintes períodos: 6 semanas pré-acasalamento, 5 dias de acasalamento, gestação, lactação e 3 a 4 semanas pós-desmame dos filhotes. Nos ratos de 1 dia de idade filhos de ratas mães expostas ao chumbo foram determinados os pesos corporal, cerebral e renal e o teor de chumbo no cérebro, sangue e conteúdo estomacal. Cerca de metade da ninhada dos ratos desmamados foram avaliados quanto a parâmetros: a) físicos (pesos corporal, cerebral e renal), b) químicos (teor de chumbo no sangue, córtex cerebral e rins), c) hematológicos (dosagem de hemoglobina, hematócrito e contagem de leucócitos), d) neuroquímicos (união específica de [³H]glutamato e atividade da adenilato ciclase (AC), e) comportamentais e f) bioquímicos (atividade da enzima ALA-D em cérebro e rim). O restante da ninhada permaneceu com o mesmo tratamento que era administrado às ratas mães, até seis meses de idade. Nesta idade, foram avaliados os mesmos parâmetros dos ratos jovens, exceto dosagens de chumbo no cérebro e parâmetros hematológicos. Nas ratas mães foram avaliados os mesmos parâmetros dos ratos jovens, exceto os testes comportamentais e a atividade da ALA-D.

O modelo de exposição ao chumbo empregado não causou alterações grosseiras nos parâmetros físicos e gerais dos animais. As dosagens de chumbo confirmaram que os animais estavam intoxicados. Os ratos jovens apresentaram hiperatividade e falta de habituação no campo aberto, déficit de retenção na esQUIVA ativa e um aparente comprometimento no aprendizado de fuga ao choque na tarefa de esQUIVA ativa. Os ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo não apresentaram déficit no aprendizado latente em labirinto.

Foi observado um efeito inibitório do chumbo sobre a atividade da enzima ALA-D em cérebro e em rim de ratos de seis meses de idade expostos ao metal desde a concepção. No entanto, a atividade específica da ALA-D em cérebro e em rim de ratos jovens não foi sensível ao chumbo. Apenas o índice de reativação da ALA-D renal em ratos jovens, que apresentaram 1,5 ppm de chumbo no rim (grupo 4,0 mM), mostrou um efeito inibitório do chumbo sobre a síntese de heme renal.

A exposição ao chumbo causou uma redução na união específica de [³H]glutamato em cerebelo e córtex cerebral de ratos jovens do grupo 4,0 mM. Por outro lado, não ocorreu um efeito significativo do chumbo *in vivo* sobre a união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral e cerebelo de ratas mães e de ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo. Este resultado indica que o SNC de ratos adultos é mais resistente aos efeitos do chumbo.

Houve um efeito inibitório do chumbo *in vivo* sobre a atividade basal da adenilato ciclase (AC) de cerebelo e córtex cerebral. Em cerebelo, somente nas ratas mães dos grupos 2,0 e 4,0 mM houve uma redução da atividade basal da adenilato ciclase (AC). Em córtex cerebral, ocorreu uma inibição da atividade da AC nas ratas mães do grupo 0,5 mM e nos ratos jovens dos grupos 1,0; 2,0 e 4,0 mM. A exposição dos ratos ao chumbo não afetou os efeitos estimulatório do Gpp(NH)p 10 μM e inibitório do chumbo 3,0 μM adicionados *in vitro* sobre a atividade da AC em cerebelo e córtex cerebral.

Os estudos neuroquímicos com adição de chumbo *in vitro*, mostraram que o chumbo na faixa de μM inibiu a união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral de ratos jovens e adultos, mas não afetou esta união em cerebelo. Em córtex cerebral de ratos adultos, o efeito inibitório do chumbo sobre o sistema glutamatérgico parece envolver os receptores NMDA, cainato, AMPA, quisqualato e ACPD.

A atividade basal da AC de cerebelo e córtex cerebral foi inibida pelo chumbo *in vitro*, com IC₅₀ na faixa de 2,1 a 4,0 μM, conforme a estrutura cerebral (cerebelo ou córtex cerebral) e a idade do animal.

O chumbo *in vitro* na concentração de 5,0 μM diminuiu a união específica de [³H]Gpp(NH)p em córtex cerebral de ratos adultos. Os resultados indicaram que este efeito se deu por interação com proteínas G. Por outro lado, o chumbo a partir da concentração de 20,0 μM estimulou a união específica de [³H]Gpp(NH)p em sítios fora da proteína G, presumivelmente em sítios de união de nucleotídeos da guanina relacionados com o receptor glutamatérgico.

SUMÁRIO

	Página
<u>PUBLICAÇÕES</u>	iv
<u>RESUMO</u>	v
<u>SUMÁRIO</u>	vii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xiii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xviii
<u>ABREVIATURAS</u>	xx
<u>1. INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
<u>2. OBJETIVOS</u>	5
<u>CAPÍTULO I - ESTUDO DE UM MODELO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM RATOS: PARÂMETROS GERAIS RELACIONADOS À INTOXICAÇÃO DOS ANIMAIS, CONTEÚDO DE CHUMBO NOS TECIDOS E ATIVIDADE DA ALA-D EM CÉREBRO E RIM</u>	6
I.1. INTRODUÇÃO	6
I.1.1. Crescimento cerebral e intoxicação com chumbo	6
I.1.2. Toxicidade renal causada pelo chumbo	7
I.1.3. Ações do chumbo sobre a biossíntese do heme	8

I.1.4. O chumbo e a enzima δ -aminolevulinato desidratase	10
I.1.5. Objetivos	13
I.2. MATERIAL E MÉTODOS	13
I.2.1. Reagentes	13
I.2.2. Equipamentos	14
I.2.3. Animais e tratamento com chumbo inorgânico	14
I.2.4. Dissecção do cérebro anterior, córtex cerebral e cerebelo dos animais.	20
I.2.5. Dosagem de chumbo	20
I.2.6. Determinação de hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos	21
I.2.7. Determinação da atividade da ALA-D	21
I.2.8. Dosagem de proteínas	22
I.2.9. Análise estatística	22
I.3. RESULTADOS	22
I.3.1. Ingesta líquida e pesos corporais dos ratos expostos ao acetato de chumbo	22
I.3.2. Número de filhotes por ninhada	29
I.3.3. Peso de cérebro anterior e de estruturas cerebrais e razão peso do tecido/peso corporal de ratos expostos ao acetato de chumbo	30
I.3.4. Peso renal e razão peso renal/peso corporal de ratos expostos ao acetato de chumbo	34
I.3.5. Parâmetros hematológicos	37
I.3.6. Determinação do teor de chumbo nos tecidos de ratos expostos ao acetato de chumbo	39
I.3.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D e sobre o índice de reativação com DTT.	43
I.4. DISCUSSÃO	49
I.4.1. Parâmetros gerais relacionados com a intoxicação dos animais	49
I.4.2. Conteúdo de chumbo nos tecidos	51
I.4.3. Atividade da ALA-D	53
<u>CAPÍTULO II - ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM RATOS</u>	<u>57</u>

II.1. INTRODUÇÃO	57
II.1.1. Estudos comportamentais em ratos expostos ao chumbo	57
II.1.2. Objetivos	61
II.2. MATERIAL E MÉTODOS	61
II.2.1. Equipamentos	61
II.2.2. Tratamento dos animais	61
II.2.3. Tarefas comportamentais	61
II.2.4. Análise estatística	64
II.3. RESULTADOS	65
II.3.1. Efeito da exposição perinatal ao chumbo sobre o comportamento de ratos jovens	65
II.3.2. Avaliação comportamental em ratos de seis meses de idade expostos ao acetato de chumbo desde a concepção	72
II.4. DISCUSSÃO	76
II.4.1. Exposição perinatal ao chumbo até o desmame (campo aberto) ou até 28 dias de idade (esquiva ativa)	76
II.4.2. Exposição ao chumbo desde a concepção até a idade de seis meses	79
<u>CAPÍTULO III - ESTUDO DE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM RATOS</u>	<u>82</u>
III.1. INTRODUÇÃO	82
III.1.1. O glutamato como neurotransmissor	83
III.1.2. A enzima adenilato ciclase (AC)	87
III.1.3. Objetivos	92
III.2. MATERIAL E MÉTODOS	93
III.2.1. Reagentes	93
III.2.2. Equipamentos	94
III.2.3. Animais experimentais	94
III.2.4. Dissecção do córtex cerebral e cerebelo	94
III.2.5. Preparação da membrana	95
III.2.6. Determinação da união específica de [³ H]glutamato em membranas	95

III.2.7. Ensaio da atividade da adenilato ciclase	98
III.2.8. Dosagem de AMP cíclico (AMPC)	98
III.2.9. Dosagem de proteínas	99
III.2.10. Dosagem de chumbo em preparações de membrana de córtex cerebral	99
III.2.11. Análise estatística e expressão dos resultados	99
III.3. RESULTADOS	100
III.3.1. Efeito do tratamento com chumbo sobre o teor de proteínas na fração das membranas de cerebelo e córtex cerebral de ratos	100
III.3.2. Dosagem de chumbo remanescente nas membranas de ratos tratados com acetato de chumbo	102
III.3.3. Efeitos do chumbo sobre o sistema glutamatérgico	103
III.3.4. Efeitos do chumbo sobre a adenilato ciclase (AC)	112
III.4. DISCUSSÃO	124
III.4.1. União específica de [³ H]glutamato	125
III.4.2. Atividade da adenilato ciclase	129
III.4.3. Considerações gerais sobre os efeitos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do chumbo sobre a união específica de [³ H]glutamato e sobre a atividade da AC em cerebelo e córtex cerebral	131
<u>CAPÍTULO IV - EFEITOS DO CHUMBO IN VITRO SOBRE A UNIÃO ESPECÍFICA DE Gpp(NH)p EM MEMBRANAS DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS</u>	<u>132</u>
IV.1. INTRODUÇÃO	132
IV.1.1. Proteínas G	132
IV.1.2. Possível sítio de união extracelular para nucleotídeos da guanina relacionado com o receptor glutamatérgico	139
IV.1.3. Interações do chumbo com o sistema glutamatérgico e com nucleotídeos da guanina	142
IV.1.4. Objetivos	143
IV.2. MATERIAL E MÉTODOS	144
IV.2.1. Reagentes	144
IV.2.2. Equipamentos	144

IV.2.3. Animais experimentais	145
IV.2.4. Dissecção do córtex cerebral dos animais	145
IV.2.5. Preparação da membrana	145
IV.2.6. Ensaio da união específica de [³ H]Gpp(NH)p	145
IV.2.7. Dosagem de proteínas	151
IV.2.8. Análise estatística e expressão dos resultados	151
IV.3. RESULTADOS	151
IV.3.1. Efeito do chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p	151
IV.3.2. Efeito do chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em proteínas G	152
IV.3.3. Efeito da pré-incubação com Gpp(NH)p, acetato de chumbo ou Gpp(NH)p + acetato de chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p fora das proteínas G	154
IV.3.4. Efeito da adição de acetato de chumbo 100 µM na incubação sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada em condição controle, com Gpp(NH)p, com acetato de chumbo ou com Gpp(NH)p + acetato de chumbo	156
IV.3.5. Estudo comparativo do efeito de concentrações crescentes de chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 µM X membrana pré-incubada em condição controle	158
IV.3.6. Efeito do tempo de incubação sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 µM	159
IV.3.7. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do chumbo na união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada em condição controle	162
IV.3.8. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do chumbo na união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 µM	164
IV.3.9. Avaliação do desligamento de Gpp(NH)p ligado a proteínas G, durante a incubação	166
IV.4. DISCUSSÃO	171

3. CONCLUSÕES	176
----------------------	------------

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
--------------------------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura I.1. Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos.	9
Figura I.2. Reação de formação de porfobilinogênio catalisada pela enzima ALA-D.	10
Figura I.3. Fluxograma da exposição ao chumbo e das análises subseqüentes.	18
Figura I.4. Fluxograma das análises efetuadas após o desmame de ratos expostos ao chumbo.	19
Figura I.5. Atividade da ALA-D em cérebro anterior de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM.	44
Figura I.6. Índice de reativação com DTT em cérebro anterior de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM.	45
Figura I.7. Atividade da ALA-D em cerebelo de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM	46
Figura I.8. Índice de reativação com DTT em cerebelo de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM,	47
Figura I.9. Atividade da ALA-D em rim de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM	48
Figura I.10. Índice de reativação com DTT em rim de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM	49
Figura II.1. Representação esquemática do labirinto utilizado para a tarefa de aprendizado latente.	64
Figura II.2. Respostas de orientação de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto.	66
Figura II.3. Respostas de cruzamento de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto.	67
Figura II.4. Defecação de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto.	68
Figura II.5. Respostas de esquiva na tarefa de esquiva ativa de duas vias de ratos de 28 dias de idade expostos ao chumbo.	69

Figura II.6. Respostas de cruzamentos interprova (CIP) de ratos de 28 dias de idade expostos ao chumbo, na tarefa de esquiva ativa de duas vias.	70
Figura II.7A. Aprendizado latente de ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo avaliado através do número de erros.	75
Figura II.7B. Aprendizado latente de ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo avaliado pela e latência para atingir o recipiente de comida.	76
Figura III.1. Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos.	85
Figura III.2. Reação de síntese de AMPc a partir do ATP catalisada pela enzima adenilato ciclase (AC).	88
Figura III.3. Representação esquemática da união total, inespecífica e específica de [³ H]glutamato em receptores na membrana.	97
Figura III.4. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre o teor de proteínas na membrana de cerebelo.	101
Figura III.5. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre o teor de proteínas na membrana de córtex cerebral.	102
Figura III.6. Dosagem de chumbo na preparação de membrana de córtex cerebral obtida de ratas mães dos grupos controle e 4,0 mM de acetato de chumbo.	103
Figura III.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a união específica de [³ H]glutamato em membranas de cerebelo.	104
Figura III.8. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a união específica de [³ H]glutamato em membranas de córtex cerebral.	105
Figura III.9. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a união específica de [³ H]glutamato em preparação de membrana de cerebelo de rato jovem (21 a 23 dias de idade) e rato adulto (6 meses de idade).	106
Figura III.10. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a união específica de [³ H]glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovem (21 a 23 dias de idade) e rato adulto (6 meses de idade).	107

Figura III.11. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a união específica de [³ H]glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovem (21 dias de idade) na presença de 10 mM de magnésio ou na ausência de magnésio no meio de incubação.	109
Figura III.12. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a união específica de [³ H]glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto na presença de 10 mM de magnésio ou na ausência de magnésio no meio de incubação.	110
Figura III.13. Efeito do acetato de chumbo 300 μ M <i>in vitro</i> sobre a união específica de [³ H]glutamato deslocada por agonistas glutamatérgicos.	112
Figura III.14. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade basal da AC em membranas de cerebelo.	114
Figura III.15. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade basal da AC em membranas de córtex cerebral.	115
Figura III.16. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC estimulada por Gpp(NH)p 10 μ M em membranas de cerebelo.	116
Figura III.17. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC estimulada por Gpp(NH)p 10 μ M em membranas de córtex cerebral.	117
Figura III.18. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC inibida por acetato de chumbo 3,0 μ M em membranas de cerebelo.	118
Figura III.19. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC inibida por acetato de chumbo 3,0 μ M em membranas de córtex cerebral.	118
Figura III.20. Efeito de concentrações crescentes de cloreto de magnésio sobre a atividade basal da AC em membranas de cerebelo e córtex cerebral de rato adulto.	119
Figura III.21. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a atividade basal da AC em preparação de membrana de córtex cerebral de ratos adultos na presença de 1 mM de ditiotreitól (DTT) ou na ausência de DTT no meio de incubação.	121

Figura III.22. Efeito do acetato de chumbo <i>in vitro</i> sobre a atividade basal da AC em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovens = 21 dias (cxj), de córtex cerebral de ratos adultos = 3 a 6 meses (cxad), de cerebelo de ratos jovens = 21 dias (cbj) e de cerebelo de ratos adultos = 3 a 6 meses (cbad).	123
Figura IV.1. Ciclo de ativação e desativação das proteínas G.	134
Figura IV.2. Representação esquemática da união específica de [³ H]Gpp(NH)p após pré-incubação da preparação de membrana com Gpp(NH)p ou na ausência de Gpp(NH)p (controle).	149
Figura IV.3. Representação esquemática da união específica de [³ H]Gpp(NH)p na proteína G.	150
Figura IV.4. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto.	152
Figura IV.5. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em sítios na proteína G em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto.	154
Figura IV.6. Efeito do pré-tratamento da membrana com Gpp(NH)p 10 µM, acetato de chumbo 100 µM ou Gpp(NH)p 10 µM + acetato de chumbo 100 µM sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p.	156
Figura IV.7. Efeito da adição de acetato de chumbo 100 µM sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p 10 µM, acetato de chumbo 100 µM ou Gpp(NH)p 10 µM + acetato de chumbo 100 µM.	157
Figura IV.8. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em preparação de membrana pré-incubada em condição controle (o) ou em membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p 10 µM (•).	159
Figura IV.9A. Efeito do tempo de incubação sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em preparação de membrana pré-incubada em condição controle (o) ou em membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p 10 µM (•).	161
Figura IV.9B. Efeito do tempo de incubação sobre a porcentagem de união específica de [³ H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 µM em relação à membrana pré-incubada em condição controle (100%).	162
Figura IV.10. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do acetato de chumbo 5,0 µM (□) e 100 µM (◇) sobre a união específica de [³ H]Gpp(NH)p em preparação de membrana pré-incubada em condição controle.	164

- Figura IV.11.** Efeito do tempo de incubação sobre a ação do acetato de chumbo 5,0 μM (■) e 100 μM (◆) sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p em preparação de membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM . 166
- Figura IV.12A.** Determinação de [^3H]Gpp(NH)p liberado durante a incubação a 30°C. A membrana foi pré-incubada com [^3H]Gpp(NH)p 200 nM. 168
- Figura IV.12B.** Determinação de [^3H]Gpp(NH)p que permaneceu nas membranas durante a incubação a 30°C. 169
- Figura IV.13A.** Determinação de [^3H]Gpp(NH)p liberado durante a incubação a 30°C. A membrana foi pré-incubada com [^3H]Gpp(NH)p 2 μM . 170
- Figura IV.13B.** Determinação de [^3H]Gpp(NH)p que permaneceu nas membranas durante a incubação a 30°C. 171

LISTA DE TABELAS

Página	
	Tabela I.1. Ingesta líquida de ratas fêmeas antes do casamento. 24
	Tabela I.2. Peso corporal de ratas fêmeas antes do acasalamento. 26
	Tabela I.3. Efeito do tratamento com acetato de chumbo na água de beber sobre o peso corporal das ratas mães nos períodos de gestação e lactação. 27
	Tabela I.4. Peso corporal de ratos amamentados por mães controle e expostas ao acetato de chumbo. 28
	Tabela I.5. Efeito do tratamento com acetato de chumbo na água de beber sobre o peso corporal de ratos de seis meses de idade. 29
	Tabela I.6. Número de filhotes por ninhada, peso cerebral e renal de ratos de 1 dia de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães durante o período pré-natal. 29
	Tabela I.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratas mães. 31
	Tabela I.8. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratos de 22 a 23 dias de idade. 32
	Tabela I.9. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratos de seis meses de idade tratados com acetato de chumbo desde a concepção. 33
	Tabela I.10. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratas mães. 35
	Tabela I.11. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratos jovens. 36
	Tabela I.12. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratos de seis meses de idade. 37
	Tabela I.13. Parâmetros hematológicos em ratas mães e ratos de 22 a 23 dias de idade expostos ao acetato de chumbo. 38

Tabela I.14. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratas mães expostas ao acetato de chumbo.	40
Tabela I.15. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 1 dia de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães durante o período pré-natal.	41
Tabela I.16. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 23 dias de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães.	42
Tabela I.17. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 6 meses de idade expostos ao acetato de chumbo cronicamente.	43
Tabela II.1. Latência de fuga ao choque em ratos de 28 dias expostos ao acetato de chumbo.	71
Tabela II.2. Respostas de orientação (A) e de cruzamento (B) dos ratos submetidos a três sessões no campo aberto.	73
Tabela II.3. Respostas de orientação (A) e de cruzamento (B) dos ratos submetidos a três sessões no labirinto.	74
Tabela III.1. IC ₅₀ para inibição da AC de cerebelo e córtex cerebral de de ratos jovens e de ratos adultos por acetato de chumbo.	123
Tabela IV.1. Determinação de [³ H]Gpp(NH)p liberado por ciclos de lavagem após a pré-incubação.	167

ABREVIATURAS

AC	adenilato ciclase
ACPD	trans-1-amino ácido ciclopentano-1,3-dicarboxílico
ALA	ácido delta-aminolevulínico, ácido 5-aminolevulínico ou delta-aminolevulinato
ALA-D	delta-aminolevulinato desidratase ou 5-aminolevulinato hidrolase
ALA-S	delta-aminolevulinato sintetase
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina ou adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutirato
ATP	adenosina-5'trifosfato
Bmax	união específica máxima que reflete o número de sítios de ligação do receptor
CIP	cruzamentos interprova
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GABA	ácido gama-aminobutírico
G ₁₂	refere-se à subunidade de proteínas G cujo efector é fosfolipase C
G $\beta\gamma$	dímero formado pelas subunidades β e γ da proteína G
G _i	proteína G inibitória
G _s	proteína G estimulatória
G _o	refere-se a outras proteínas G ("other")
G _q	refere-se à subfamília de proteínas G cujo efector é fosfolipase C
GMP	guanosina-5'monofosfato
GMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina ou guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GDP	guanosina-5'difosfato
GDP- β -S	guanosina-5'-O-(2-tiodifosfato)
Gpp(CH ₂)p	5'-guanililmetileno-difosfato ou guanosina-5'- $\alpha\beta$ -metileno-trifosfato
Gpp(NH)p	guanosina-5'- $\beta\gamma$ -imidotrifosfato, 5'guanililimidodifosfato, guanina imidodifosfato

GTP	guanosina-5'trifosfato
GTP γ S	guanosina 5'(γ -tio) trifosfato
IC ₅₀	concentração do inibidor que reduz a atividade enzimática ou a união específica de um agonista a 50% da atividade original
i.c.v.	intracerebroventricular
Kd	constante de dissociação
kDa	quilodaltons
mGluR	receptor metabotrópico de glutamato
MK801	5metil-10,11-diidro-5H-dibenzocicloepten-5-10iminahidrogênio maleato ou dizolcipina
NEM	N-etilmaleimida
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBG	porfobilinogênio
PKC	proteína quinase C
pg.	página
POPOP	1,4-bis [5-fenil-2-oxazolil] benzeno; 2,2'-p-fenileni-bis[5-feniloxazol]
PPO	2,5difeniloxazol
Proteína G	proteína ligadora de nucleotídeos da guanina
SDS	dodecil sulfato de sódio
SN	sobrenadante
SNC	sistema nervoso central
TCA	ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os metais pesados são poluentes ambientais acumulados pelos seres vivos e que possuem uma durabilidade muito grande. Entre estes, o chumbo destaca-se por ser um metal cuja exposição parece ter aumentado de 100 a 1.000 vezes em comparação com os níveis existentes antes do advento da poluição por metais pesados (Grandjean, 1993). Enquanto em muitos países desenvolvidos a exposição ao chumbo tem diminuído, tendo em vista a adoção de políticas governamentais seriamente preocupadas com o problema, estima-se que tem se agravado em países sub-desenvolvidos (Grandjean, 1993).

O chumbo é um dos metais mais antigos conhecidos pela espécie humana, conforme fica evidenciado pela descoberta de artefatos egípcios feitos de chumbo datados de 4.000 A.C. A partir da era Romana, há 2.000 anos atrás, seu uso atingiu proporções industriais. Os problemas de saúde mais extensos relacionados à exposição ao chumbo ocorreram na história moderna, advintos do uso deste metal em tintas, na gasolina e, em menor extensão, em baterias. Seu amplo uso resultou na sua incorporação ubíqua nos solos, alimentos, poeiras, águas e ar (Al-Saleh, 1994; Cory-Slechta, 1995^a).

O chumbo é um metal do grupo IV com muitas propriedades comuns aos metais alcalino terrosos. O símbolo químico do chumbo é Pb, do nome latino "plumbum". Ele pode ter a valência +2 ou +4 e pode formar compostos orgânicos ou inorgânicos. O chumbo inorgânico bivalente forma sais, tais como acetato de chumbo, nitrato de chumbo e cloreto de chumbo. Por outro lado, os compostos orgânicos de chumbo são geralmente formados por chumbo tetravalente. Os exemplos mais conhecidos deles são o chumbo tetraetila e o chumbo tetrametila, os quais são usados como aditivos antidetonantes na gasolina (Al-Saleh, 1994).

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

As principais vias de absorção do chumbo são o trato gastrointestinal e o sistema respiratório. A absorção intestinal do chumbo varia com a idade, pois o adulto absorve aproximadamente 10 % do chumbo ingerido, enquanto que a criança absorve até 40 % (Klaassen, 1996). Dietas com baixo cálcio podem aumentar a absorção intestinal de chumbo (Bodgen et al., 1992). A absorção de chumbo inalado varia com a forma: vapor

ou partícula. Aproximadamente 90% das partículas de chumbo inaladas do ar são absorvidas (Klaassen, 1996).

O chumbo distribui-se inicialmente no sangue e nos tecidos periféricos, particularmente no rim e no fígado. Com o tempo, acumula-se no osso, dentes e cabelo. No sangue, a maior fração do metal está ligada aos eritrócitos (Al-Saleh, 1994; Philip & Gerson, 1994; Klaassen, 1996). Uma fração do chumbo acumula-se no cérebro, onde exerce efeitos tóxicos (Bressler & Goldstein, 1991; Silbergeld, 1992).

Em animais experimentais, o chumbo é excretado na bile, nas fezes e na urina. Em humanos, a principal via de excreção do chumbo é através da urina. A excreção do chumbo, no entanto, é lenta (Klaassen, 1996).

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

Alguns segmentos da população em geral são considerados mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do chumbo. As crianças são particularmente mais vulneráveis à exposição ao metal, devido ao hábito de levar as mãos à boca, a sua baixa capacidade de excretar o chumbo, a sua alta capacidade de absorvê-lo comparado aos adultos e também devido a sua menor proporção de tecido ósseo denso do que os adultos com a conseqüente incapacidade de transferir uma quantidade apreciável de chumbo para o osso. A quantidade não captada pelos ossos tende a permanecer nos tecidos periféricos, onde produz efeitos tóxicos nos sistemas nervoso, hematopoiético e renal (Al-Saleh, 1994). Uma segunda subpopulação vulnerável ao chumbo é constituída pelas mulheres grávidas e seus fetos em desenvolvimento. O chumbo atravessa a placenta e pode ter efeitos deletérios para o feto (Silbergeld, 1986; Schweinsberg & von Karsa, 1990). É interessante ressaltar que durante a gravidez e lactação as alterações hormonais podem levar a uma maior mobilização de cálcio do osso, bem como do chumbo armazenado (Keller & Doherty, 1980; Al-Saleh, 1994). Ainda devemos considerar a população de idosos, pois a maior desmineralização óssea que ocorre com o envelhecimento pode ser acompanhada de mobilização de chumbo estocado no osso (Silbergeld et al., 1988; Al-Saleh, 1994). Além dos segmentos da população acima citados, destacamos como um segmento da população que merece particular atenção: os adultos ocupacionalmente expostos a este metal.

A exposição ocupacional ao chumbo ocorre principalmente em trabalhadores de fábricas de recuperação de baterias, de minas de carvão, pintores (tintas a óleo e

anticorrosivas apresentam um teor relativamente alto de chumbo), gráficos e soldadores (Davis et al., 1993; Spurgeon, 1994). A exposição não ocupacional em adultos ocorre principalmente devido ao cozimento de alimentos ácidos em recipientes cerâmicos, ao uso de cosméticos (tintas para cabelo) e ao consumo de água e alimentos contaminados (Davis et al., 1993).

Nos Estados Unidos, o Centro de Controle de Doenças ("Center for Disease Control") estabeleceu em 1985 o limite de segurança de 25 µg chumbo/dl sangue em crianças. Contudo, este limite foi alterado para 10 µg chumbo/dl sangue em 1991 (Silbergeld, 1992; Philip & Gerson, 1994). Estudos realizados nos Estados Unidos em 1990 pela E.P.A. (Agência de Proteção Ambiental) estimaram que cerca de 15% da população de crianças apresentavam níveis sanguíneos de chumbo superiores ao limite de segurança atualmente aceito de 10 µg chumbo/dl sangue (Davis et al., 1993), sendo que a intoxicação por chumbo situa-se entre as quatro principais doenças da infância (Silbergeld, 1992). Da mesma forma, um estudo realizado na Austrália mostrou que cerca de 85% das crianças apresentavam um teor de chumbo no sangue superior a 10 µg chumbo/dl sangue (Gulson et al., 1994). Estudos epidemiológicos realizados com a população infantil norte-americana apontaram que acima deste valor de chumbo de sangue, já foram observados comprometimentos no desempenho escolar (Bellinger et al., 1987; Davis et al., 1993). Aqui no Brasil é desconhecida a dimensão deste problema. Além disto, deficiências nutricionais, doenças crônicas e exposições a outros agentes poluentes podem causar efeitos aditivos ou sinérgicos (Grandjean, 1993).

O chumbo é especialmente tóxico para o sistema nervoso central (SNC) (Schweinsberg & von Karsa, 1991; Silbergeld, 1992). Em adultos, o efeito neurotóxico mais comum do chumbo é a neuropatia periférica. Um alto nível de exposição a este metal está associado a cólicas gastrointestinais, provavelmente consequência da neuropatia. Os efeitos do chumbo sobre o SNC de adultos incluem apatia, irritabilidade, perda de atenção, dor de cabeça, tremores musculares, perda da memória e alucinação (Philip & Gerson, 1994). Os efeitos de baixas doses de chumbo sobre o SNC de adultos parecem ser principalmente alterações de humor e afeto (Silbergeld, 1992).

As crianças são mais sensíveis do que os adultos em relação à neurotoxicidade por chumbo (Mushak et al., 1989; Silbergeld, 1992). Atualmente tem sido dada uma atenção especial à exposição de crianças a baixos níveis de chumbo, a qual parece estar associada a comprometimento no desenvolvimento cognitivo, hiperatividade com deficit de atenção e outras disfunções do SNC, tais como deficits do desenvolvimento

motor e disfunções emocionais (Bellinger et al., 1992, 1994; Davis & Svendsgaard, 1987; Dietrich et al., 1993; Rosen, 1992).

Embora o chumbo seja um dos agentes neurotóxicos de maior importância do ponto de vista de saúde ambiental (Silbergeld, 1992), muito pouco se obteve de conclusivo sobre as bases moleculares que estão envolvidas nos distúrbios neuroquímicos, neurofisiológicos, neuromorfológicos e comportamentais causados por este metal em animais e seres humanos (Bressler & Golstein, 1991; Silbergeld, 1992).

2. OBJETIVOS

Considerando que a exposição ao chumbo está associada com neurotoxicidade e que seus efeitos sobre o SNC não se encontram bem estabelecidos, esta Tese tem quatro objetivos gerais, os quais serão tratados nos Capítulos I a IV, que são:

Capítulo I. Estabelecer um modelo de intoxicação com acetato de chumbo não associado a alterações morfológicas grosseiras em ratos, medindo os níveis de chumbo nos tecidos e avaliando parâmetros morfológicos (ganho de peso e peso das estruturas) dos animais e a atividade da enzima ALA-D de tecidos.

Capítulo II. Avaliar manifestações comportamentais nos ratos expostos ao chumbo.

Capítulo III. Avaliar alguns parâmetros neuroquímicos nos ratos expostos ao chumbo: união específica de [³H]glutamato e atividade da adenilato ciclase (AC) em cerebelo e córtex cerebral.

Capítulo IV. Estudar o efeito do chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p, um análogo não hidrolisável do GTP, em membranas de córtex cerebral de ratos.

CAPÍTULO I - ESTUDO DE UM MODELO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM RATOS: PARÂMETROS GERAIS RELACIONADOS À INTOXICAÇÃO DOS ANIMAIS, CONTEÚDO DE CHUMBO NOS TECIDOS E ATIVIDADE DA ALA-D EM CÉREBRO E RIM

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Crescimento cerebral e intoxicação por chumbo

O cérebro não é um órgão homogêneo. Ele é composto por várias regiões, cada uma com diferentes tipos de células que controlam diversas funções. No rato a multiplicação neuronal acontece principalmente durante a última semana de gestação, mas nas três primeiras semanas de vida pós-natal ocorre um crescimento rápido do cérebro, caracterizado por uma intensa sinaptogênese e mielinização (Gottlieb et al., 1977; Bayer et al., 1993). A neurogênese pós-natal é pequena na maioria das estruturas cerebrais, mas é particularmente conspícua no cerebelo e no hipocampo (Vitiello & Gombos, 1987; Bayer et al., 1993). Sendo assim, durante os períodos de gestação e/ou lactação os ratos são particularmente vulneráveis a qualquer espécie de agressão externa, como por exemplo a exposição a agentes neurotóxicos como o chumbo (Kostial et al., 1978; Rocha et al., 1995). Como o chumbo é um metal ubíquo no ambiente, a exposição a este metal em humanos pode ocorrer antes, durante e após a gestação (Silbergeld, 1986).

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

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

Em casos de encefalopatia causadas pela administração de doses elevadas de chumbo, o teor deste metal no cérebro chega a atingir em torno de 2 a 4 ppm (Mykkänen et al., 1979; Lefauconnier et al., 1980; Sandhir & Gill, 1994; Singh, 1995). No entanto, em se tratando de exposição de animais experimentais a baixas doses de chumbo, sua concentração no cérebro situa-se na faixa de 0,08 a 1,0 ppm (Ewers & Erbe, 1980; Cory-Slechta et al., 1981; Livesey et al., 1986; Lasley, 1992; Guilarte & Miceli, 1992; Flora et al., 1994; Widzowski et al., 1994; Altmann et al., 1994; Jett & Guilarte, 1995). O valor de chumbo no cérebro de animais controle fica na faixa de 0,02 a 0,07 ppm (Ewers & Erbe, 1980; Livesey et al., 1986; Altmann et al., 1994; Widzowski et al., 1994).

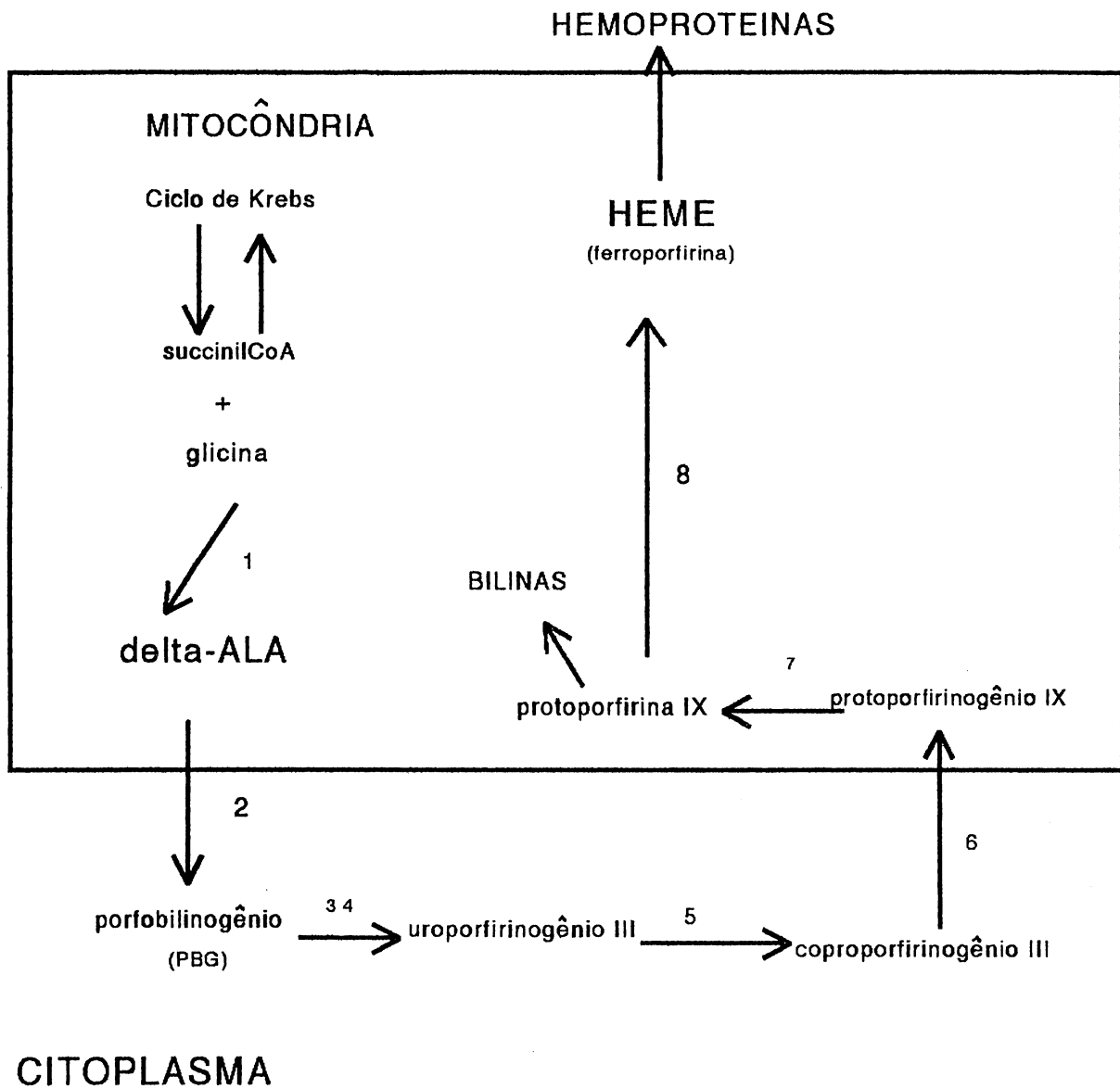
1.1.2. Toxicidade renal causada pelo chumbo

Está bem estabelecido que o chumbo pode causar sérios efeitos sobre as funções renais. O acúmulo inicial do chumbo absorvido ocorre primariamente nos rins, principalmente através de filtração glomerular e subsequente reabsorção e, em menor escala, através de absorção direta do sangue. A nefropatia aguda causada pelo chumbo caracteriza-se por disfunção proximal tubular com fosfatúria, glicosúria e aminoacidúria, alterações na estrutura mitocondrial e pelo desenvolvimento de corpúsculos de inclusão nucleares e citosólicos. (Nolan & Shaikh, 1992). A nefropatia após exposição crônica ao chumbo é irreversível e é geralmente caracterizada por uma lenta e progressiva degeneração do tecido renal com a simultânea diminuição da função renal. Ela está acompanhada por fibrose, hiperplasia e atrofia dos túbulos renais, glomerulonefrite e falha renal, sendo que em ratos foi observado a ocorrência de neoplasia ou adenocarcinoma (Al-Saleh, 1994; Goyer, 1989; Nolan & Shaikh, 1992).

O chumbo intracelular parece estar associado com proteínas ligadoras do metal. Duas proteínas com pesos moleculares aparentes de 11.500 e 63.000 foram identificadas em extratos renais de rato. Ambas as proteínas tem uma alta afinidade, mas uma baixa capacidade de ligar chumbo, e podem participar precocemente na ligação do metal nas células tubulares renais (Oskarsson et al., 1982; Mistry et al., 1985). Tem sido sugerido que as proteínas ligadoras do chumbo estão envolvidas na detoxificação do chumbo por insolubilizar o metal e, conseqüentemente, impedir a sua interação com alguns componentes celulares, mantendo uma concentração de chumbo citoplasmática relativamente baixa (Nolan & Shaikh, 1992).

I.1.3. Ações do chumbo sobre a biossíntese do heme

A via de biossíntese do heme (**Figura I.1.**) é sabidamente inibida pelo chumbo. Esta via possui enzimas citosólicas e enzimas mitocondriais. Embora muitas das enzimas da via de biossíntese do heme sejam em algum grau inibidas por este metal, as duas reações de maior importância são as catalisadas pelas enzimas δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) (enzima citosólica) e ferroquelatase (enzima mitocondrial). A inibição destas duas reações leva ao acúmulo dos substratos ácido δ -aminolevulínico (ALA) no sangue e urina e protoporfirina no sangue, respectivamente (Al-Saleh, 1994). A redução da concentração de heme livre causa um aumento da atividade da enzima marca-passo δ -aminolevulinato sintetase (ALA-S), com o conseqüente aumento da concentração de ALA (Goering, 1993; Al-Saleh, 1994).



1. δ -ALA sintetase
2. δ -ALA desidratase
3. Uroporfirinogênio I sintetase
4. Uroporfirinogênio III cossintase
5. Uroporfirinogênio descarboxilase
6. Coproporfirinogênio oxidase
7. Protoporfirinogênio oxidase
8. Ferroquelatase

Figura 1.1. Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos. Obs: A compartimentalização mitocôndria e citoplasma refere-se à biossíntese do heme.

I.1.4. O chumbo e a enzima δ -Aminolevulinato desidratase

A enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) (E.C.: 4.2.1.24.) também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase participa da via de biossíntese do heme, catalisando a reação de condensação e ciclização de duas moléculas do ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG). Nesta reação, que ocorre no citosol, há eliminação de duas moléculas de água (Figura 1.2.).

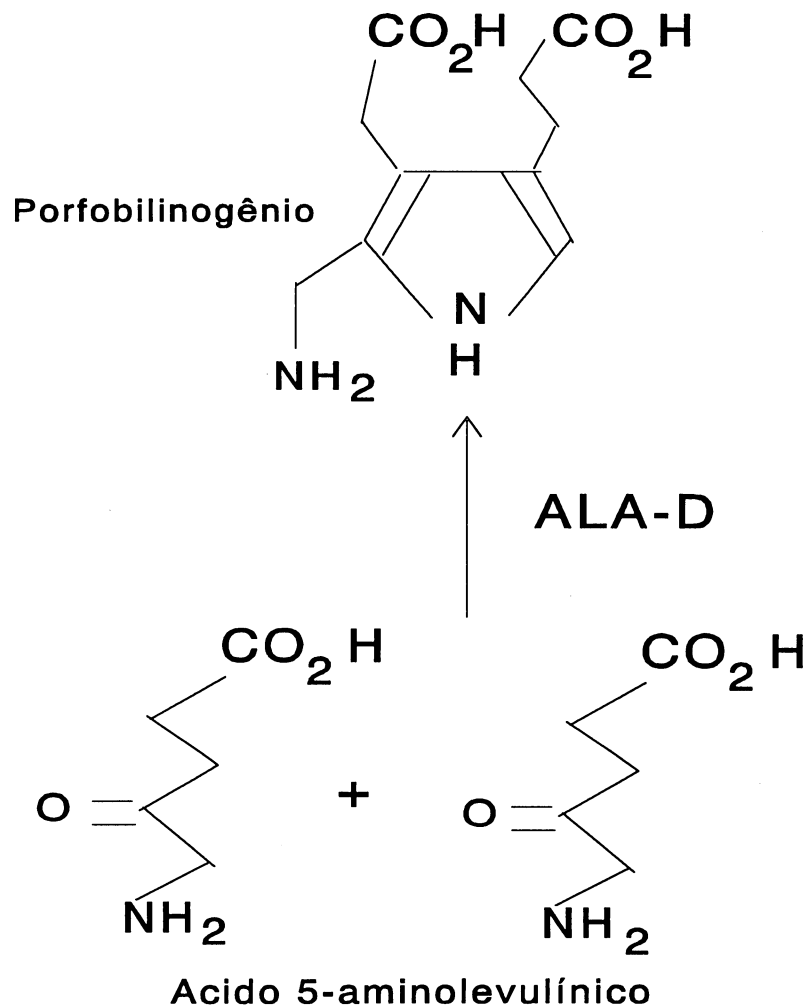


Figura 1.2. Reação de formação de porfobilinogênio catalisada pela enzima ALA-D.

Gibson et al. (1955) isolaram e purificaram pela primeira vez a ALA-D em fígado de boi. A estrutura da ALA-D é semelhante em todas as espécies, tecidos e idades. A enzima tem uma massa molecular de aproximadamente 280 kDa e consiste de oito subunidades, cada uma contendo oito grupos sulfidríla (-SH) (Goering, 1993). Uma importante característica desta enzima, independentemente da fonte estudada, é a essencialidade dos grupos sulfidríla para sua ação catalítica (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980). Desta forma, a enzima é inibida por bloqueadores de grupos -SH, tais como paracloromercuribenzoato, N-etilmaleimida, monoiodoacetamida e ácido 5-5'ditiobis (2-nitrobenzólico) (Battle et al., 1967; Wilson et al., 1972; Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977). Ela também é inibida por íons metálicos que possuem elevada afinidade por grupos sulfidríla, tais como chumbo, cobre, cádmio e mercúrio (Gibson et al., 1955; Wilson et al., 1972; Hutton, 1983; Rodrigues et al., 1989; Rocha et al., 1993, 1995) e é oxidada quando submetida ao oxigênio puro (Tsukamoto et al., 1979). Tsukamoto et al. (1980) e Hasnain et al. (1985) demonstraram que os resíduos de aminoácidos críticos no sítio catalítico são dois resíduos de cisteína, dois grupos imidazólicos da histidina e um grupo lisina. O Zn^{2+} tem sido apontado como o íon que faz parte da estrutura da ALA-D de mamíferos e bactérias. A atividade da enzima é máxima com 4 Zn^{2+} ligados por octâmero da enzima (Bevan et al., 1980; Spencer & Jordan, 1993), embora a enzima ligue até 8 Zn^{2+} /octâmero. O papel do zinco parece ser evitar a autooxidação dos grupos -SH da ALA-D e/ou estabilizar a conformação ativa da enzima, (Tsukamoto et al. 1979; Hasnain et al., 1985), além de participar da atividade catalítica da mesma (Spencer & Jordan, 1994).

Dentre os metais inibidores da ALA-D de várias origens, o chumbo destaca-se por ser o metal mais estudado quanto à inibição da enzima e por ser um metal que apresenta uma grande eficiência inibitória (Hinmarsh, 1986). A ALA-D é a enzima mais sensível da via de biossíntese do heme à inibição pelo chumbo (Goering, 1993). A inibição desta enzima pelo chumbo tem sido implicada na patogênese da intoxicação por este metal, uma vez que vários processos celulares críticos são afetados por uma concentração reduzida de heme. Vários estudos sugerem que a neurotoxicidade associada à exposição ao chumbo resulta da depleção de heme (Goering, 1993). O heme é grupo prostético de várias proteínas. O metabolismo mitocondrial do SNC é intenso e a síntese dos grupos heme dos citocromos é uma etapa fundamental para suas atividades metabólicas (Goering, 1993). Além disto, tem sido proposto que o substrato da enzima, o ácido δ -aminolevulínico (ALA), o qual acumula-se na intoxicação por chumbo, seja responsável, pelo menos em parte, pela neurotoxicidade deste metal por gerar espécies

ativas de oxigênio (Bechara et al., 1993) e/ou por causar dano mitocondrial (Hermes-Lima et al., 1992). Também foi demonstrado que o ALA compete com receptores neuronais para GABA (Brennan et al., 1980).

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

A inibição da ALA-D por chumbo parece ser devido ao fato de o chumbo formar uma ponte com dois grupos sulfidril vizinhos ao centro ativo da enzima (Goering, 1993). A inibição é, na maioria das fontes enzimáticas estudadas, do tipo não competitiva (Wilson et al., 1972; Sakai et al., 1983; Rodrigues et al., 1989). A ligação do Pb^{2+} ao grupo -SH ao qual normalmente liga Zn^{2+} evita a ligação da segunda molécula de ALA (Goering, 1993).

1.1.4.1. Efeito do ditiotreitol sobre a ALA-D

O DL-ditiotreitol (DTT) ou reagente de Cleland é um agente redutor capaz de reduzir dissulfetos quantitativamente e de manter grupos tiólicos no estado reduzido (Cleland, 1963). Ele também funciona como um eficiente quelante metálico. O Pb^{2+} forma vários complexos com DTT. Está demonstrado que 1 mM de DTT liga até 999 partes em 1.000 de Pb^{2+} em solução, em pH 7,0 (Gnonlonfoun et al., 1991).

Granick et al. (1973) utilizaram o quociente entre a atividade da ALA-D reativada por DTT e a atividade não reativada em sangue humano para a avaliação do nível de inibição desta enzima por chumbo. Sakai et al. (1980) usaram o inverso deste quociente. Em ambos os casos, foram obtidos índices de correlação ainda superiores ao observado entre a concentração sangüínea de chumbo e a atividade da enzima como tal. Portanto, o uso do DTT no ensaio enzimático da ALA-D em indivíduos expostos ao chumbo parece ser um parâmetro eficiente e sensível para avaliar o grau de inibição da ALA-D pelo chumbo, pelo menos no que diz respeito à enzima de fonte sangüínea. A partir destes relatos, o DTT tem sido usado por alguns investigadores para ativar a ALA-D incubada na ausência de metais inibidores ou inibida por chumbo (Sassa, 1982; Murase et al., 1993; Burns & Godwin, 1991; Gupta et al., 1995).

1.1.4.2. Efeitos do chumbo sobre a ALA-D cerebral

Segundo Goering (1993) há uma carência de estudos que examinam os efeitos do chumbo sobre a biossíntese de heme no cérebro de mamíferos. Os dados da literatura sobre a atividade específica da ALA-D em animais expostos ao chumbo são principalmente em sangue, rim e fígado. Poucos estudos tem investigado a atividade da ALA-D cerebral, sendo que os resultados revelam uma insensibilidade da enzima cerebral à ação do chumbo (Silbergeld & Lamon, 1982; Oskarsson, 1989; Rocha et al., 1995). Contudo, nestes estudos, a exposição ao chumbo ocorreu durante períodos de tempos relativamente curtos, os quais podem não terem sido suficientes para causar um efeito sobre a enzima. A ALA-D de origem renal também parece ser insensível ao chumbo *in vivo* (Fowler et al., 1980).

Alguns estudos tem indicado que provavelmente a insensibilidade da ALA-D de cérebro e rim em casos de exposição de animais experimentais ao chumbo seja devido à presença de uma proteína ligadora de chumbo no cérebro e no rim de animais intoxicados (Goering et al., 1986; DuVal & Fowler, 1989), o que reduziria a disponibilidade de chumbo intracelular.

1.1.5. Objetivos

O objetivo deste capítulo é estabelecer um modelo de intoxicação crônica com acetato de chumbo em ratos, que torne possível investigar os efeitos do chumbo sobre parâmetros gerais (ingesta líquida, dosagem de hemoglobina, hematócrito e contagem de leucócitos), parâmetros físicos (peso corporal, cerebral e renal e razão peso estruturas/peso corporal), parâmetros químicos (dosagem de chumbo em sangue, cérebro e/ou rim) e parâmetros bioquímicos (atividade da enzima ALA-D em cérebro e rim). O intuito é produzir um modelo de exposição com baixas doses de chumbo, não associado com desnutrição e/ou alterações morfológicas grosseiras nos animais.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Reagentes

Acetato de chumbo - Baker's Analyzed

Ácido acético glacial - Merck

Ácido δ -aminolevulínico-hidrocloreto - Sigma, St. Louis, MO

Ácido clorídrico - Merck

Ácido nítrico concentrado - Merck
Ácido orto-fosfórico - Merck
Ácido perclórico - Merck
Ácido tricloroacético - Reagen
Albumina de soro bovino - Sigma, St. Louis, MO
Cloreto de sódio - Reagen
Cloreto de mercúrio II - Merck
Coomassie brilhante azul G - Sigma, St. Louis, MO
p-Dimetilaminobenzaldeído - Riedel, Merck
DL-Ditiotreitol - Sigma, St. Louis, MO
Etanol p.a. - Merck
Fosfato de amônio dibásico - Merck
Fosfato de sódio dibásico - Reagen
Fosfato de sódio monobásico - Reagen
Heparina - Roche (Liquemine)
Triton X-100 - Merck

I.2.2. Equipamentos

Agitador de tubos: Phoenix
Balanças: Sartorius modelo 2842, Sartorius Basic, Fisher/Ainsworth modelo MX-300, analítica Sartorius Basic modelo BA 110 S, analítica Marte modelo AS 2000
Banho térmico: Quimis modelo Q304.164
Bombas Tölg de Teflon para digestão nítrica
Centrífugas: Janetzki K 23, centrífuga de microhematócrito
Digestor modelo Berghof para 10 cápsulas
Espectrofotômetros: Incibrás MF 200 UV/VIS e espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite Perkin-Elmer modelo 2380
Estufa: Heraeus modelo T 5060
Freezer a -20°C
Potenciômetro: Digimed

I.2.3. Animais e tratamento com chumbo inorgânico

Ratas Wistar fêmeas adultas (110-150g) provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS foram utilizadas. Elas foram mantidas em ciclo claro-escuro a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). As ratas foram divididas em 5 grupos, a saber: o

grupo controle que recebeu água milli-Q e os grupos expostos a acetato de chumbo, aos quais foi administrado acetato de chumbo na água de beber nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM e 4,0 mM. A **Figura 1.3.** mostra o fluxograma da exposição ao chumbo. As soluções de acetato de chumbo foram preparadas em água milli-Q, a fim de impedir a formação de carbonato de chumbo, que é um sal insolúvel. Duas ratas do mesmo grupo, a serem submetidas ao tratamento com acetato de chumbo, foram escolhidas aleatoriamente e colocadas em caixas de plástico medindo 50 X 25 X 18 cm. Todos os animais foram pesados no início do tratamento e tiveram livre acesso à ingesta líquida (água milli-Q ou solução de acetato de chumbo, conforme o grupo experimental) e sólida (ração comercial Purina). O período de pré-acasalamento teve a duração de 6 semanas. Neste período foram monitorados a ingesta hídrica e o peso corporal das ratas. Após 6 semanas de exposição, as ratas foram acasaladas com ratos Wistar machos adultos não intoxicados com chumbo. O acasalamento foi realizado através da exposição de duas fêmeas virgens por caixa, durante 5 noites consecutivas, com um macho. Durante o referido período as garrafas de líquido eram removidas, a fim de evitar a ingesta de chumbo dos machos. As ratas grávidas foram mantidas durante toda a gravidez com o mesmo tratamento até então administrado. As ratas visivelmente grávidas foram colocadas em gaiolas individuais contendo serragem. O dia do nascimento dos filhotes era registrado, os animais eram contados e 24 horas após o nascimento, os filhotes eram pesados e a ninhada era ajustada a 8 filhotes, a fim de evitar desnutrição dos filhotes por excesso de animais. Na medida do possível era deixado o mesmo número de filhotes fêmeas e machos. Os filhotes que excediam a 8 eram sacrificados por decapitação. Nos filhotes sacrificados, o cérebro total era imediatamente dissecado no gelo, os rins e o conteúdo estomacal removidos. As amostras de animais da mesma ninhada eram reunidas e colocadas em tubos eppendorf previamente lavados com ácido nítrico. Os rins e o cérebro total eram pesados em balança analítica e, juntamente com o conteúdo estomacal eram congelados a -20°C para posterior dosagem de chumbo. Os 8 filhotes restantes de cada ninhada receberam o chumbo indiretamente durante a fase pré-natal e através do leite materno, uma vez que as ratas mães permaneceram com o mesmo tratamento prévio durante toda a lactação. Eles foram pesados durante a fase de lactação nos dias 1, 5, 10, 15, 20. Aos 21 dias de idade, 1 a 3 ratos por ninhada foram utilizados para testes comportamentais conforme será detalhado no capítulo II. O desmame ocorreu aos 22 dias de idade para não interferir com a realização do teste comportamental iniciado aos 21 dias de idade. A atividade da ALA-D foi determinada em ratos de 21 a 22 dias de idade. Na idade de 22-23 dias os filhotes fo-

ram utilizados para ensaios neuroquímicos e para dosagens de chumbo nos tecidos. Os filhotes de 21 a 23 dias de idade serão referidos no texto como ratos jovens. Devido ao grande número de animais, tornou-se inviável utilizar todos os grupos experimentais para todas as determinações e análises realizadas. Desta forma, para algumas determinações alguns grupos foram excluídos. Além disto, nem todas as ninhadas foram usadas para cada uma das determinações efetuadas. As **Figuras I.3 e I.4.** mostram fluxogramas das análises efetuadas com os ratos expostos ao chumbo. Entretanto, de maneira mais detalhada, a seguir estão discriminados os ensaios efetuados e os grupos experimentais usados nos ratos jovens:

- determinação de pesos de cérebro anterior, córtex cerebral, cerebelo e rim - todos os grupos experimentais.
- dosagens de chumbo no sangue, córtex cerebral e rim - todos os grupos experimentais. O cerebelo não foi utilizado para a dosagem de chumbo devido ao peso insuficiente da amostra para o método de dosagem.
- determinação de hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos - grupos controle, 0,5 mM, 2,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo.
- determinação da atividade da ALA-D - grupos controle, 0,5 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo.
- testes comportamentais (campo aberto e esquiva ativa) com os ratos jovens - grupos controle, 0,5 mM, 2,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo.
- ensaios neuroquímicos (medida da união específica de glutamato e medida dos níveis de AMPc em preparações de membrana de córtex cerebral e cerebelo) - todos os grupos experimentais.

Os ratos que após o desmame não foram usados para nenhuma das determinações acima citadas (aproximadamente metade de cada ninhada) foram separados por sexo e permaneceram recebendo o mesmo tratamento que era administrado a suas mães até a idade de 6 meses a 6 meses e meio, quando então foram utilizados para:

- testes comportamentais - grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo
- determinação da atividade da ALA-D - grupos controle, 0,5 e 4,0 mM
- dosagens de chumbo no sangue e rim - todos os grupos experimentais.
- ensaios neuroquímicos (medida da união específica de glutamato e medida dos níveis de AMPc em preparações de membrana de córtex cerebral e cerebelo) - todos os grupos experimentais.

As ratas mães que até o momento do desmame já tinham sido submetidas ao tratamento com água (grupo controle) ou acetato de chumbo por um período de 13 semanas, permaneceram recebendo o mesmo tratamento por mais 3 a 4 semanas. Sendo assim, após um período de exposição de 16 a 17 semanas, as ratas foram sacrificadas por decapitação, sendo então efetuadas as seguintes determinações:

- determinação de pesos de cérebro anterior, córtex cerebral, cerebelo e rim - todos os grupos experimentais.
- dosagens de chumbo no sangue, córtex cerebral e rim - todos os grupos experimentais. O cerebelo não foi utilizado para a dosagem de chumbo devido ao peso insuficiente da amostra para o método de dosagem.
- determinação de hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos - grupos controle, 0,5 mM, 2,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo.

ensaios neuroquímicos (medida da união específica de glutamato e medida dos níveis de AMPc em preparações de membrana de córtex cerebral e cerebelo) - todos os grupos experimentais.

Figura I.3. Fluxograma da exposição ao chumbo e das análises subseqüentes

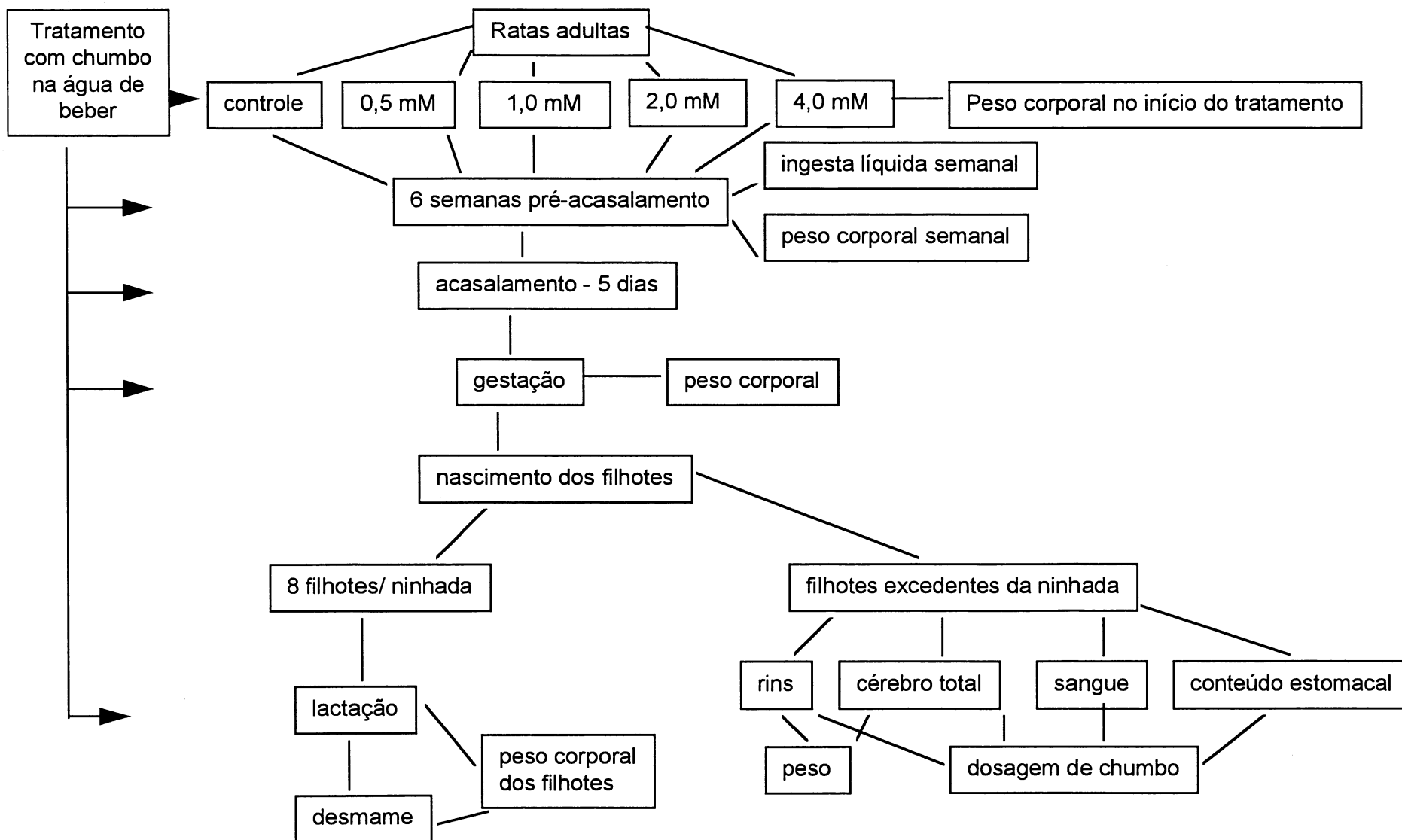
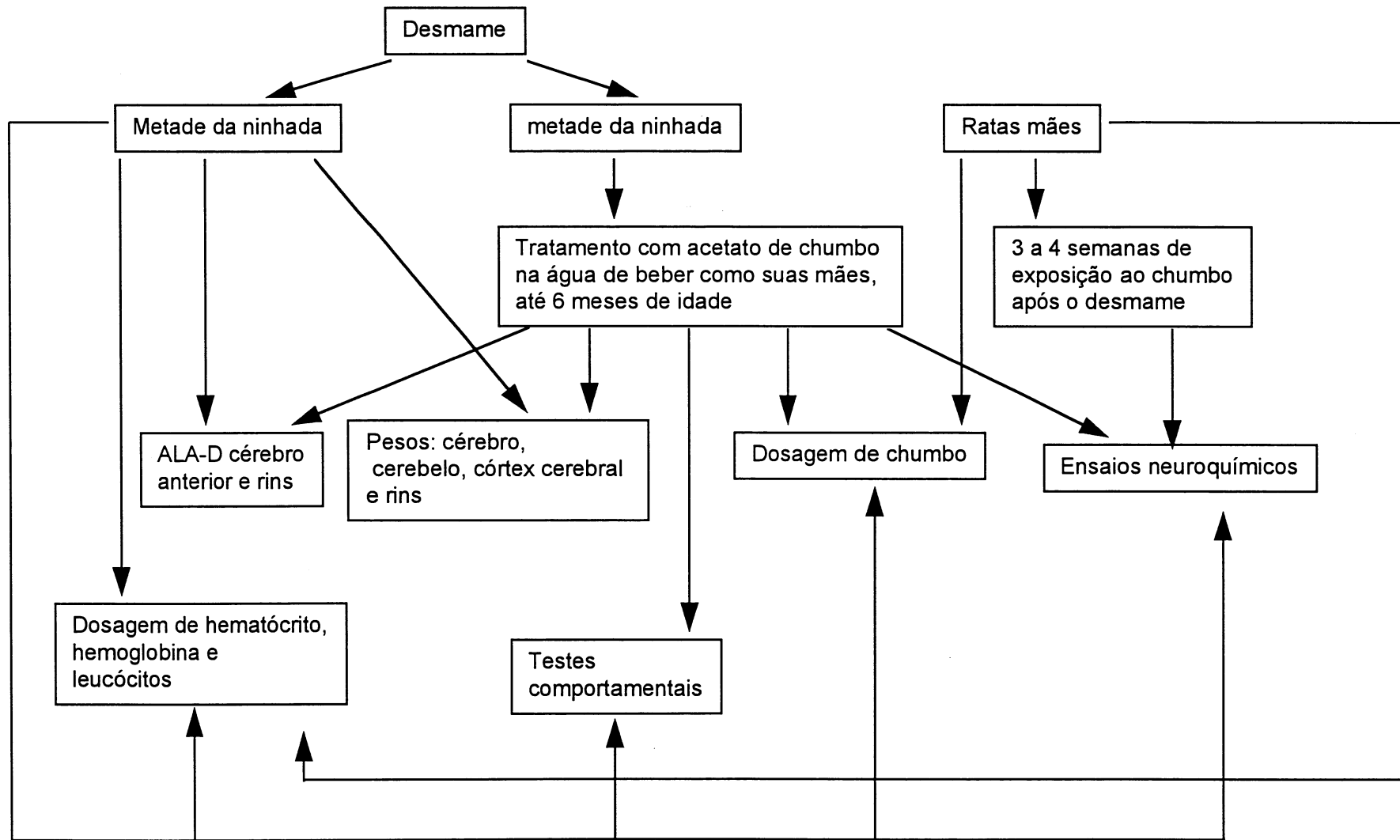


Figura I.4. Fluxograma das análises efetuadas após o desmame de ratos expostos ao chumbo



I.2.4. Dissecção do cérebro anterior, córtex cerebral e cerebelo dos animais

Os ratos foram decapitados com guilhotina e logo após a pele da cabeça foi rebatida e um corte foi feito entre os forames oculares. O encéfalo foi exposto cortando-se medialmente o osso na sutura parieto-frontal até atingir o corte entre os forames oculares. O crânio foi aberto e o encéfalo removido com o auxílio de uma espátula. Este foi colocado sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo picado, a qual era revestida com papel de filtro umedecido com solução fisiológica. O cerebelo, o tronco cerebral e o bulbo olfatório foram removidos. O cérebro anterior (isento de cerebelo, tronco cerebral e bulbo olfatório) foi então imediatamente pesado em balança analítica digital. Logo a seguir, com o auxílio de um bisturi, o encéfalo foi dividido medialmente. O córtex cerebral foi imediatamente dissecado e secado com papel filtro. O córtex cerebral e o cerebelo foram pesados em balança analítica.

I.2.5. Dosagem de chumbo

As dosagens de chumbo foram realizadas no Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras de tecidos que estavam congeladas a -20°C eram descongeladas lentamente e submetidas a uma secagem em estufa a 80°C até peso constante (24 h). As amostras de tecido eram então submetidas a uma digestão nítrica. O método adotado de digestão seguiu o recomendado por Tölg (Kotz et al., 1972). Após a secagem, as amostras eram pesadas em balança analítica e adicionadas a bombas de Teflon juntamente com 2,0 ml de ácido nítrico concentrado. Em seguida, cada bomba era transferida a uma cápsula metálica de alta pressão e adicionadas ao digestor modelo Berghof durante 2 horas a uma temperatura de 120°C . Ao final da digestão o volume final das amostras era elevado para 4,0 ml para posterior leitura. O teor de chumbo das amostras era registrado em um espectrofotômetro de absorção atômica tipo Perkin-Elmer modelo 2380 com forno de grafite. As amostras de sangue foram tratadas com um modificador de matriz, o qual continha Triton X-100 (0,5% v/v) e fosfato de amônio dibásico (0,2% v/v) e também analisadas por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite. Os resultados de chumbo no sangue foram expressos em $\mu\text{g Pb/dl}$ de sangue total e o teor de Pb nos tecidos foi expresso em ppm, ou seja, $\mu\text{g Pb/g}$ de peso úmido da amostra.

I.2.6. Determinação do hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos

A medida do hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos foi realizada no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A determinação do hematócrito foi realizada em uma centrífuga de microhematócrito. A dosagem da hemoglobina foi feita pelo método de van Kampen & Zijlstra (1961). A contagem de leucócitos foi realizada através de um contador automático.

I.2.7. Determinação da atividade da ALA-D

Ensaio padrão: a atividade da ALA-D em cérebro anterior, cerebelo e rim foi realizada conforme método de Sassa (1982) com as modificações feitas por Rocha et al. (1995). A preparação dos tecidos para a realização do ensaio da medida da atividade da enzima foi basicamente realizado conforme Rocha et al. (1995). As estruturas foram dissecadas em gelo, pesadas e imediatamente homogeneizadas a 1.200 rpm com o auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjem. A homogeneização foi feita com 10 movimentos de vai e vem vagarosos em 5 volumes (cérebro anterior e cerebelo) ou 10 volumes (rim) de tampão fosfato de sódio 70 mM pH 6,8. O material era centrifugado a 5.000 g durante 15 minutos a 4°C em uma centrífuga refrigerada (Janetzki K 23). Os sobrenadantes foram coletados e usados nos ensaios enzimáticos. O meio de incubação continha uma quantidade adequada de material enzimático: 1,9 a 4,2 mg para o cérebro anterior, 0,71 a 1,1 mg para o cerebelo e 0,7 a 2,0 mg para o rim; tampão fosfato de sódio 70 mM pH 6,8; ALA 2,5 mM. O tempo de incubação era de 1 h (rim) a 3 h (cérebro anterior e cerebelo) a temperatura de 39°C. A reação era finalizada através da adição de TCA 10% contendo 0,05 M de HgCl₂.

O método baseia-se na medida da produção de porfobilinogênio (PBG) através de método colorimétrico, usando reagente de Ehrlich modificado. A leitura da absorbância era realizada a 555 nm. O coeficiente de absorção molar do produto da reação do PBG com o reagente de Ehrlich modificado é $6,2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Mauzerall & Granick, 1956). O ensaio foi realizado sob condições de velocidade constante e havia uma relação linear entre o conteúdo de proteína e a formação de PBG. A atividade da enzima foi expressa em nmol PBG/h/mg proteína.

Ensaio utilizando 15 mM de ditioneitol (DTT): paralelamente ao ensaio padrão foi realizado um ensaio com DTT, nas mesmas condições de incubação, exceto que 15,0 mM de DTT era adicionado. O objetivo da adição do mesmo era obter o índice de reativação.

Este índice indica a extensão da reativação da ALA-D com DTT e é obtido da seguinte forma:

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

I.2.8. Dosagem de proteínas

Alíquotas dos homogeneizados de cérebro anterior e rim utilizados para determinação da atividade da ALA-D foram utilizadas para dosar proteínas pelo método de Bradford (1976), usando Coomassie Brillhante Azul G como reagente de cor e albumina de soro bovino como proteína padrão.

I.2.9. Análise estatística

Os resultados de ganho de peso corporal e de ingesta hídrica foram analisados por análise de variância (ANOVA) (5 grupos tratados X tempo), com o tempo considerado como medida repetida (Sokal & Rohlf, 1981). Os demais resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste do raio múltiplo de Duncan quando apropriado ou teste t não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Não mais de um ou dois ratos da mesma ninhada foi usado como uma medida independente nas análises dos resultados referentes aos ratos jovens e de 6 meses, respectivamente, a fim de evitar um efeito da ninhada (Abbey & Howard, 1973).

I.3. RESULTADOS

I.3.1. Ingesta líquida e pesos corporais dos ratos expostos ao acetato de chumbo

Tendo em vista que alguns trabalhos da literatura relatam alterações na ingesta líquida e no peso corporal em alguns protocolos de exposição ao chumbo em ratos (Mykkänen et al., 1980; Rosen et al., 1985; Kumar & Desiraju, 1990), decidimos avaliar se o presente protocolo de exposição ao chumbo estaria associado com alterações nestes parâmetros. Foi medida a ingesta líquida nas ratas fêmeas no período pré-acasalamento, sendo os resultados mostrados na Tabela I.1. A ANOVA de duas vias (5 grupos X 6 semanas), considerando as semanas como medida repetida mostrou que houve um efeito significativo do tratamento com chumbo [$F(4, 28) = 10,46, p < 0,001$], do tempo [$F(5, 140) = 5,11, p < 0,001$] e da interação tratamento com chumbo X tempo

[F(20, 140) = 2,23, $p < 0,01$]. Foi observada uma redução da ingesta líquida nos grupos expostos ao chumbo, principalmente no grupo exposto a solução de acetato de chumbo 4,0 mM, pelo teste *post-hoc* de Duncan.

Tabela I.1. Ingesta líquida de ratas fêmeas antes do acasalamento.

	CONTROLE	GRUPO 0,5 mM	GRUPO 1,0 mM	GRUPO 2,0 mM	GRUPO 4,0 mM
1 ^a . semana	14,6 ± 0,4 ^a	11,9 ± 0,3 ^b	13,2 ± 0,6 ^a	12,3 ± 0,6 ^b	10,0 ± 0,3 ^c
2 ^a .semana	13,6 ± 0,7 ^a	13,0 ± 0,6 ^a	14,4 ± 0,8 ^a	11,5 ± 0,4 ^b	9,3 ± 0,2 ^c
3 ^a . semana	14,3 ± 0,5 ^a	11,8 ± 0,5 ^b	12,6 ± 0,6 ^a	10,2 ± 0,6 ^c	10,1 ± 0,1 ^c
4 ^a . semana	14,1 ± 0,7 ^a	12,0 ± 0,8 ^b	13,5 ± 0,9 ^a	12,0 ± 0,5 ^b	10,1 ± 0,4 ^c
5 ^a . semana	13,6 ± 0,6 ^a	11,8 ± 1,0 ^b	13,2 ± 1,0 ^a	12,0 ± 0,7 ^b	10,6 ± 0,1 ^c
6 ^a . semana	13,8 ± 0,7 ^a	10,5 ± 0,3 ^b	12,0 ± 1,0 ^b	10,8 ± 0,5 ^b	9,9 ± 0,2 ^b
média	14,0 ± 0,2 ^a	11,8 ± 0,3 ^b	13,1 ± 0,3 ^a	11,5 ± 0,3 ^b	10,0 ± 0,2 ^c

A ingestiva líquida foi monitorada uma vez por semana e os resultados são valores médios diários da semana. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão em ml /dia/ 100 g peso corporal.

As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste do raio múltiplo de Duncan, pelo menos para $p < 0,05$.

A ANOVA de duas vias (5 grupos experimentais X tempo), com o tempo considerado como medida repetida, mostrou que não houve alterações nos pesos corporais das ratas induzidas pelo tratamento com acetato de chumbo no período pré-acasalamento. Também não houve interação entre o tratamento com acetato de chumbo X tempo, pois o ganho de peso corporal foi semelhante em todos os grupos (Tabela I.2.), embora tenha havido uma diminuição da ingesta líquida nos grupos expostos a este metal durante este período (Tabela I.1.). Quanto aos pesos corporais das ratas durante os períodos de gestação e lactação (Tabela I.3.), não foram observadas diferenças significativas entre as médias dos pesos dos diferentes grupos pela ANOVA de uma via que avaliou as médias de pesos corporais no 1º dia de gestação, no 1º dia de lactação e no 21º dia de lactação, isoladamente:

Tabela I.2. Peso corporal de ratas fêmeas antes do acasalamento.

	CONTROLE	GRUPO 0,5 mM	GRUPO 1,0 mM	GRUPO 2,0 mM	GRUPO 4,0 mM
início do tratamento	160,0 ± 3,8	163,7 ± 3,4	158,0 ± 1,8	153,7 ± 3,5	158,6 ± 2,3
1 ^a semana de tratamento	176,1 ± 2,9	183,8 ± 2,8	173,3 ± 2,3	173,3 ± 4,0	172,4 ± 2,4
2 ^a semana de tratamento	186,6 ± 3,3	194,5 ± 3,2	182,8 ± 3,1	183,1 ± 3,6	182,1 ± 3,1
3 ^a semana de tratamento	195,2 ± 2,9	205,6 ± 3,8	196,4 ± 3,6	191,7 ± 3,2	194,9 ± 3,8
4 ^a semana de tratamento	204,1 ± 3,7	212,9 ± 4,5	201,3 ± 3,1	199,5 ± 3,8	200,3 ± 3,2
5 ^a semana de tratamento	210,4 ± 3,1	218,9 ± 5,3	210,3 ± 3,4	207,0 ± 4,2	210,3 ± 3,5
6 ^a semana de tratamento	213,2 ± 3,1	225,0 ± 5,1	213,8 ± 3,4	209,5 ± 3,8	213,0 ± 3,5

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão em gramas. Foram usadas para a estatística as ratas que ficaram grávidas (n = 11, 8, 10, 7, e 10 para os grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM e 4,0 mM, respectivamente). Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de duas vias (5 grupos tratados X tempo), com o tempo considerado como medida repetida.

Tabela I.3. Efeito do tratamento com acetato de chumbo na água de beber sobre o peso corporal das ratas mães nos períodos de gestação e lactação.

	1° dia de gestação	1° dia de lactação	21° dia de lactação
CONTROLE	211,0 ± 5,7	239,8 ± 8,2	259,6 ± 9,7
GRUPO 0,5 mM Pb	228,0 ± 7,7	228,3 ± 12,1	268,5 ± 12,2
GRUPO 1,0 mM Pb	213,5 ± 4,8	239,4 ± 7,5	263,2 ± 6,6
GRUPO 2,0 mM Pb	216,8 ± 5,4	241,0 ± 11,5	255,8 ± 4,6
GRUPO 4,0 mM Pb	215,6 ± 6,1	233,2 ± 8,2	251,8 ± 8,5

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão em gramas. O número de ratas para os grupos controle; 0,5, 1,0; 2,0 e 4,0 mM era 11, 8, 10, 7 e 10, respectivamente. Não foi observado efeito do tratamento pela ANOVA de uma via.

A evolução do ganho de peso dos filhotes expostos ao chumbo através de suas mães durante a gestação e lactação está mostrada na **Tabela I.4**. A ANOVA de duas vias (5 grupos experimentais X tempo), com o tempo considerado como medida repetida, mostrou que não houve um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre o ganho de peso corporal dos filhotes. A ANOVA mostrou um efeito do tempo [F(4, 164) = 615,75, p<0,01], mas não houve interação significativa entre o tratamento com acetato de chumbo X tempo, pois o ganho de peso corporal foi semelhante em todos os grupos.

Tabela I.4. Peso corporal de ratos amamentados por mães controle e expostas ao acetato de chumbo.

	PN 1	PN 5	PN 10	PN 15	PN 20
CONTROLE	5,4 ± 0,2	9,4 ± 0,4	17,7 ± 0,7	25,7 ± 0,7	36,0 ± 0,7
GRUPO 0,5 mM Pb	5,3 ± 0,2	8,4 ± 0,6	15,9 ± 0,9	24,8 ± 0,8	33,3 ± 0,9
GRUPO 1,0 mM Pb	5,5 ± 0,1	9,4 ± 0,5	17,0 ± 0,8	26,5 ± 0,8	35,5 ± 0,9
GRUPO 2,0 mM Pb	5,3 ± 0,1	8,6 ± 0,5	16,2 ± 0,9	25,9 ± 0,8	35,5 ± 0,8
GRUPO 4,0 mM Pb	5,4 ± 0,1	8,6 ± 0,4	15,9 ± 0,8	24,8 ± 1,0	33,4 ± 1,2

Os resultados estão expressos como média em gramas (g) ± erro padrão dos pesos corporais do 1º ao 20º dia de vida pós-natal (PN1-PN20) de 7 a 11 ninhadas. Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de duas vias (5 grupos tratados X tempo), com o tempo considerado como medida repetida.

A ANOVA de uma via mostrou que o peso corporal dos ratos machos e fêmeas de 6 meses de idade expostos cronicamente ao acetato de chumbo também não foi alterado pelo tratamento (Tabela I.5.). A análise estatística através de ANOVA de duas vias (5 grupos experimentais X sexo) só mostrou um efeito significativo do sexo [F(1, 58) = 718,35, p<0,001], pois os machos apresentaram um peso corporal superior ao das fêmeas.

Tabela I.5. Efeito do tratamento com acetato de chumbo na água de beber sobre o peso corporal de ratos de seis meses de idade.

	Machos		Fêmeas*	
CONTROLE	354 ± 6	(7)	242 ± 8	(8)
GRUPO 0,5 mM Pb	341 ± 6	(5)	234 ± 6	(8)
GRUPO 1,0 mM Pb	347 ± 8	(5)	252 ± 4	(10)
GRUPO 2,0 mM Pb	346 ± 6	(4)	246 ± 4	(7)
GRUPO 4,0 mM Pb	354 ± 4	(6)	248 ± 6	(8)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão em gramas (g). O número de ratos está indicado entre parênteses.

Não foi observado efeito do tratamento pela ANOVA de uma via.

* indica efeito significativo do sexo ($p < 0,01$) pela ANOVA de duas vias.

I.3.2. Número de filhotes por ninhada

Foi analisado o número de filhotes por ninhada nascidos de ratas expostas ao acetato de chumbo durante as fases pré-acasalamento, acasalamento e gestação (Tabela I.6.). A ANOVA de uma via mostrou que não houve um efeito significativo do tratamento com o metal sobre este parâmetro.

Tabela I.6. Número de filhotes por ninhada, peso cerebral e renal de ratos de 1 dia de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães durante o período pré-natal.

	Nº filhotes/ninhada	Peso cerebral	Peso renal
CONTROLE	10,2 ± 1,0	197,1 ± 4,0	48,4 ± 4,2
GRUPO 0,5 mM Pb	10,8 ± 1,7	213,0 ± 14,5	43,0 ± 3,4
GRUPO 1,0 mM Pb	10,3 ± 1,6	202,6 ± 6,9	50,4 ± 3,2
GRUPO 2,0 mM Pb	10,6 ± 0,7	197,2 ± 7,9	41,2 ± 2,4
GRUPO 4,0 mM Pb	10,8 ± 0,9	210,6 ± 3,9	42,2 ± 2,2

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O peso cerebral e renal está expresso em mg. O peso renal refere-se ao par de rins.

Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de uma via.

I.3.3. Peso de cérebro anterior e de estruturas cerebrais e razão peso do tecido/peso corporal de ratos expostos ao acetato de chumbo

A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento com acetato de chumbo não afetou significativamente o peso cerebral, o peso do cerebelo ou do córtex cerebral das ratas mães, dos ratos jovens ou dos ratos de 6 meses de idade expostos ao chumbo nos períodos pré e pós-natal (Tabelas I.7., I.8. e I.9., respectivamente). Houve uma diminuição no peso cerebral nos animais jovens e de 6 meses de idade expostos ao chumbo em torno de 6 a 7%, porém esta redução não atingiu significância estatística. Também não foram observadas diferenças entre os grupos na razão peso cerebral/peso corporal, peso cerebelar/peso corporal e peso cortical/peso corporal nas ratas mães, nos ratos jovens ou nos ratos de 6 meses de idade (Tabelas I.7., I.8. e I.9., respectivamente).

Tabela I.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratas mães.

	cérebro (mg)	cérebro/corpo (mg/g)	cerebelo (mg)	cerebelo/corpo (mg/g)	córtex cerebral (mg)	córtex/corpo (mg/g)
CONTROLE	1047,4 ± 14,7 (11)	4,39 ± 0,15 (10)	214,6 ± 15,4 (11)	0,90 ± 0,04 (10)	604,0 ± 21,2 (11)	2,54 ± 0,13 (10)
GRUPO 0,5 mM Pb	1022,5 ± 16,3 (8)	4,26 ± 0,15 (8)	222,5 ± 11,2 (8)	0,92 ± 0,04 (8)	605,9 ± 27,5 (8)	2,55 ± 0,18 (7)
GRUPO 1,0 mM Pb	1053,0 ± 12,7 (8)	4,02 ± 0,06 (7)	213,9 ± 11,8 (8)	0,84 ± 0,06 (7)	587,8 ± 18,9 (8)	2,26 ± 0,10 (7)
GRUPO 2,0 mM Pb	993,1 ± 28,7 (7)	4,31 ± 0,10 (6)	216,0 ± 9,8 (7)	0,95 ± 0,04 (6)	573,6 ± 28,4 (7)	2,52 ± 0,10 (6)
GRUPO 4,0 mM Pb	1029,3 ± 17,6 (10)	4,20 ± 0,11 (10)	216,3 ± 11,0 (10)	0,88 ± 0,06 (10)	568,8 ± 18,3 (10)	2,35 ± 0,11 (10)

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. O número de ratas está indicado entre parênteses. Nem todas as ratas usadas no tratamento tiveram seus pesos cerebrais avaliados, por isso o número aqui mostrado não coincide com o número de ninhadas. O cérebro não incluía cerebelo, medula espinhal e bulbo olfatório (= cérebro anterior). Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de uma via.

Tabela I.8. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratos de 22 a 23 dias de idade.

	cérebro (mg)	cérebro/corpo (mg/g)	cerebelo (mg)	cerebelo/corpo (mg/g)	córtex cerebral (mg)	córtex/corpo (mg/g)
CONTROLE	881,9 ± 13,7 (11)	19,62 ± 0,42 (11)	169,0 ± 2,7 (11)	3,84 ± 0,15 (11)	514,5 ± 22,8 (9)	12,42 ± 0,67 (9)
GRUPO 0,5 mM Pb	851,4 ± 15,9 (8)	20,00 ± 0,58 (8)	168,3 ± 8,1 (8)	3,89 ± 0,10 (8)	507,6 ± 25,4 (7)	12,62 ± 0,35 (7)
GRUPO 1,0 mM Pb	839,2 ± 12,3 (10)	19,65 ± 0,60 (9)	156,0 ± 6,3 (9)	3,70 ± 0,12 (9)	538,1 ± 13,1 (9)	13,06 ± 0,88 (7)
GRUPO 2,0 mM Pb	815,1 ± 30,2 (7)	20,25 ± 0,72 (7)	156,1 ± 6,5 (7)	3,88 ± 0,11 (6)	501,7 ± 12,5 (7)	12,01 ± 0,55 (7)
GRUPO 4,0 mM Pb	830,6 ± 14,8 (10)	20,13 ± 0,78 (10)	157,2 ± 5,4 (10)	4,07 ± 0,26 (10)	492,8 ± 16,4 (9)	12,88 ± 0,80 (9)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O cérebro não incluía cerebelo, corda espinhal e bulbo olfatório (= cérebro anterior). O número de ninhadas está indicado entre parênteses.

Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de uma via.

Tabela I.9. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso do cérebro, cerebelo e córtex cerebral e sobre a razão peso da estrutura cerebral/peso corporal em ratos de seis meses de idade tratados com acetato de chumbo desde a concepção.

	cérebro (mg)	cérebro/corpo (mg/g)	cerebelo (mg)	cerebelo/corpo (mg/g)	córtex cerebral (mg)	córtex/corpo (mg/g)
CONTROLE	1090,2 ± 16,8 (15)	3,83 ± 0,18 (15)	250,8 ± 9,9 (15)	0,88 ± 0,05 (14)	611,7 ± 18,5 (9)	2,24 ± 0,11 (9)
GRUPO 0,5 mM Pb	1056,5 ± 13,2 (14)	4,13 ± 0,19 (11)	234,1 ± 11,9 (14)	0,90 ± 0,04 (11)	585,6 ± 10,2 (9)	2,26 ± 0,15 (9)
GRUPO 1,0 mM Pb	1039,0 ± 19,2 (14)	4,19 ± 0,09 (11)	235,0 ± 9,4 (13)	0,95 ± 0,04 (11)	592,0 ± 18,8 (9)	2,22 ± 0,12 (9)
GRUPO 2,0 mM Pb	1038,3 ± 14,9 (9)	3,99 ± 0,22 (8)	222,9 ± 8,9 (7)	0,86 ± 0,04 (8)	606,7 ± 13,1 (9)	2,34 ± 0,13 (9)
GRUPO 4,0 mM Pb	1026,2 ± 14,0 (15)	3,73 ± 0,17 (13)	242,9 ± 9,9 (15)	0,90 ± 0,05 (13)	598,7 ± 14,6 (9)	2,21 ± 0,12 (9)

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. O cérebro não incluía cerebelo, corda espinhal e bulbo olfatório (= cérebro anterior). O número de ratos está indicado entre parênteses. Não houve efeito significativo do tratamento pela ANOVA de uma via.

1.3.4. Peso renal e razão peso renal/peso corporal de ratos expostos ao acetato de chumbo

Não houve um efeito significativo do tratamento com chumbo sobre o peso úmido renal ou peso seco renal nas ratas mães (Tabela I.10.). Por outro lado, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre a razão peso úmido renal/peso corporal e sobre a razão peso seco renal/peso corporal nas ratas mães [F(4,34) = 3,70, p<0,05] e [F(4,33) = 4,39, p<0,01], respectivamente (Tabela I.10.). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve um aumento das razões peso úmido ou peso seco renal/peso corporal nos animais expostos à dose mais elevada de acetato de chumbo (4,0 mM) em relação ao grupo controle. Estes resultados indicam que não houve um aumento no conteúdo de água no rim devido ao tratamento com chumbo.

Tabela I.10. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratas mães.

	Peso úmido renal (g)	Peso seco renal (g)	Peso úmido renal/peso corporal (mg/g)	Peso seco renal/peso corporal (mg/g)
CONTROLE	1,83 ± 0,08 (8)	0,395 ± 0,018 (7)	7,76 ± 0,41 (8)	1,66 ± 0,09 (7)
GRUPO 0,5 mM Pb	1,87 ± 0,04 (8)	0,406 ± 0,011 (8)	8,06 ± 0,19 (7)	1,72 ± 0,04 (7)
GRUPO 1,0 mM Pb	1,92 ± 0,07 (8)	0,415 ± 0,019 (8)	7,88 ± 0,29 (8)	1,69 ± 0,05 (8)
GRUPO 2,0 mM Pb	1,96 ± 0,12 (8)	0,412 ± 0,021 (8)	8,63 ± 0,30 (8)	1,81 ± 0,05 (8)
GRUPO 4,0 mM Pb	2,11 ± 0,07 (8)	0,458 ± 0,017 (8)	9,19 ± 0,31* (8)	1,97 ± 0,05** (8)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O número de amostras está indicado em parênteses. O peso renal refere-se ao par de rins.

* p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

De forma semelhante ao resultado observado nas ratas mães, não ocorreu um efeito significativo do tratamento com chumbo sobre o peso úmido renal ou peso seco renal dos ratos jovens e dos ratos de 6 meses de idade (Tabelas I.11. e I.12., respectivamente). Entretanto, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre a razão peso úmido renal/peso corporal de ratos jovens e dos ratos de 6 meses de idade: [F(4, 28) = 8,70, p<0,001] e [F(3, 17) = 7,07, p<0,01], respectivamente. Um efeito significativo também foi observado sobre a razão peso seco renal/peso corporal de ratos jovens [F(4, 28) = 10,51, p<0,001], mas não em ratos de 6 meses de idade (Tabelas I.11. e I.12., respectivamente). Houve um aumento na razão peso seco renal/peso corporal nos ratos de 6 meses de idade, mas este não foi significativo. O teste de Duncan revelou que os ratos jovens dos grupos 1,0 mM, 2,0 mM e 4,0 mM apresentaram uma maior relação peso úmido ou peso seco renal/peso corporal do que os ratos do grupo controle. No caso dos ratos de 6 meses de idade, o teste de Duncan revelou que os animais dos grupos 0,5, 1,0 e 4,0 mM (este parâmetro não foi determinado no grupo 2,0 mM) apresentaram uma maior razão peso úmido renal/peso corporal do que os animais do grupo controle (pelo menos para p<0,05, vide Tabela I.12.).

Tabela I.11. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratos jovens.

	Peso úmido renal (mg)	Peso seco renal (mg)	Peso úmido renal/peso corporal (mg/g)	Peso seco renal/peso corporal (mg/g)
CONTROLE	463,0 ± 17,1 (8)	104,0 ± 5,4 (8)	10,74 ± 0,30 (8)	2,39 ± 0,05 (8)
GRUPO 0,5 mM Pb	441,8 ± 36,0 (6)	107,6 ± 4,6 (6)	10,96 ± 0,53 (6)	2,54 ± 0,10 (6)
GRUPO 1,0 mM Pb	502,5 ± 22,0 (6)	113,3 ± 5,8 (6)	12,89 ± 0,37* (6)	2,68 ± 0,05* (6)
GRUPO 2,0 mM Pb	556,9 ± 41,9 (5)	120,9 ± 6,0 (5)	12,96 ± 0,32* (5)	2,78 ± 0,04* (5)
GRUPO 4,0 mM Pb	482,5 ± 34,3 (8)	107,5 ± 5,7 (8)	13,60 ± 0,55** (8)	2,95 ± 0,08** (8)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O número de ninhadas está indicado em parênteses. O peso renal refere-se ao par de rins.

* p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

Tabela I.12. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre o peso renal e sobre a razão peso renal/peso corporal em ratos de seis meses de idade.

	Peso úmido renal (g)	Peso seco renal (mg)	Peso úmido renal/peso corporal (mg/g)	Peso seco renal/peso corporal (mg/g)
CONTROLE	1,84 ± 0,19 (5)	342,2 ± 8,0 (8)	5,56 ± 0,39 (5)	1,15 ± 0,07 (8)
GRUPO 0,5 mM Pb	1,86 ± 0,17 (5)	347,4 ± 6,5 (7)	6,76 ± 0,31*	1,34 ± 0,05 (7)
GRUPO 1,0 mM Pb	1,75 ± 0,13 (6)	322,7 ± 6,7 (7)	6,54 ± 0,22*	1,26 ± 0,08 (7)
GRUPO 4,0 mM Pb	2,15 ± 0,16 (5)	360,8 ± 8,5 (6)	7,65 ± 0,34**	1,31 ± 0,11 (6)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O número de amostras está indicado em parênteses.

* p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

I.3.5. Parâmetros hematológicos

A fim de monitorar a exposição ao chumbo foram determinados os valores de hemoglobina, hematócrito e contagem de leucócitos de ratas mães e ratos jovens expostos ao metal. A análise estatística através da ANOVA de uma via mostrou que houve um efeito significativo do tratamento sobre o teor de hemoglobina e de hematócrito das ratas mães [$F(3, 21) = 3,90, p<0,05$] e [$F(3,21) = 3,64, p<0,05$], respectivamente (Tabela I.13.). O tratamento com chumbo não alterou a contagem de leucócitos nas ratas mães. Em relação aos ratos jovens, ANOVA de uma via mostrou que não houve um efeito significativo do tratamento sobre os mencionados parâmetros hematológicos.

Tabela I.13. Parâmetros hematológicos em ratas mães e ratos de 22 a 23 dias de idade expostos ao acetato de chumbo.

	CONTROLE		GRUPO 0,5 mM Pb		GRUPO 2,0 mM Pb		GRUPO 4,0 mM Pb	
	Mãe	Rato 23 dias	Mãe	Rato 23 dias	Mãe	Rato 23 dias	Mãe	Rato 23 dias
hemoglobina (g/dl)	14,98 ± 0,44 (5)	9,80 ± 0,24 (11)	14,90 ± 0,45 (6)	9,47 ± 0,36 (6)	13,62 ± 0,51* (5)	9,63 ± 0,25 (6)	13,51 ± 0,29* (9)	9,63 ± 0,15 (10)
hematócrito (%)	46,2 ± 0,9 (5)	30,4 ± 0,8 (11)	45,2 ± 1,2 (6)	30,5 ± 1,1 (8)	43,2 ± 1,2 (5)	31,8 ± 1,0 (7)	42,0 ± 0,8* (9)	29,2 ± 0,7 (10)
leucócitos (x 10 ³ mm ⁻³)	5,80 ± 0,65 (6)	2,35 ± 0,34 (9)	5,08 ± 0,92 (4)	1,80 ± 0,11 (3)	5,56 ± 0,53 (5)	2,45 ± 0,33 (4)	5,15 ± 0,79 (6)	2,17 ± 0,13 (8)

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de amostras. O grupo de animais expostos a 1,0 mM de acetato de chumbo não foi utilizado para estas determinações.

* p<0,05 quando comparado ao grupo controle correspondente (mesma idade) pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

1.3.6. Determinação do teor de chumbo nos tecidos em ratos expostos ao acetato de chumbo

A fim de podermos avaliar o nível de intoxicação atingido nos ratos expostos ao acetato de chumbo e tornar possível a comparação com trabalhos que dosam o nível de chumbo associado a exposições a este metal, foi determinado o conteúdo de chumbo em sangue, rim e córtex cerebral de ratas mães e ratos jovens expostos ao chumbo conforme descrito em Material e Métodos. Nos ratos de 1 dia de idade, devido ao tamanho reduzido das amostras, foi determinado o teor do metal em sangue, cérebro anterior total, conteúdo estomacal (leite) e rim (este último em um número reduzido de amostras, dados não mostrados). Nos ratos de 6 meses de idade, foi determinado o teor do metal apenas em sangue e rim, por ter se evidenciado nos estudos com ratas mães e ratos jovens que a dosagem do metal nestas duas fontes torna possível a comparação com dados da literatura e serve como parâmetro adequado para avaliar o grau de intoxicação. Além disto, os resultados neuroquímicos obtidos com os ratos jovens impuseram determinações neuroquímicas também nos ratos de 6 meses de idade (capítulo III), o que acarretou a falta de material cerebral para dosar chumbo.

1.3.6.1. Chumbo nos tecidos de ratas mães

A ANOVA de 1 via revelou um efeito significativo da concentração de chumbo na água de beber sobre o conteúdo de chumbo no sangue [$F(4,38) = 56,39, p < 0,001$], no córtex cerebral [$F(4,28) = 4,27, p < 0,01$] e no rim [$F(4, 35) = 32,56, p < 0,001$]. Existiu um aumento do teor do metal nos tecidos conforme a concentração de chumbo na água de beber das ratas (Tabela I.14.). O teste *post-hoc* do raio múltiplo de Duncan revelou que o nível de Pb no sangue foi significativamente maior ($p < 0,01$) nos grupos 1,0, 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo, comparado ao grupo controle. No caso do córtex cerebral, o efeito significativo ($p < 0,05$) só foi obtido no grupo exposto à concentração mais elevada de acetato de chumbo (4,0 mM), quando comparado ao grupo controle. No rim, um aumento significativo de chumbo na estrutura ocorreu nos grupos 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Tabela I.14. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratas mães expostas ao acetato de chumbo.

	SANGUE	CÓRTEX CEREBRAL	RIM
CONTROLE	6,6 ± 0,3 ^a (10)	0,055 ± 0,004 ^a (8)	0,26 ± 0,02 ^a (9)
GRUPO 0,5 mM Pb	14,5 ± 1,0 ^a (8)	0,070 ± 0,005 ^a (6)	1,29 ± 0,09 ^a (8)
GRUPO 1,0 mM Pb	33,0 ± 4,7 ^b (8)	0,071 ± 0,005 ^a (6)	1,95 ± 0,19 ^a (6)
GRUPO 2,0 mM Pb	46,1 ± 3,2 ^c (7)	0,095 ± 0,024 ^a (7)	4,68 ± 0,45 ^b (7)
GRUPO 4,0 mM Pb	70,8 ± 5,2 ^d (10)	0,165 ± 0,042 ^b (6)	15,25 ± 2,03 ^c (10)

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de animais. A concentração de chumbo no sangue está expressa em µg/dl e no córtex cerebral e rim em µg/g peso úmido.

As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste do raio múltiplo de Duncan, pelo menos para $p < 0,05$.

1.3.6.2. Chumbo nos tecidos de ratos de 1 dia de idade

Os resultados do conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 1 dia de idade expostos indiretamente ao acetato de chumbo através de suas mães está mostrado na **Tabela I.15**. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da concentração de chumbo na água de beber das mães sobre o conteúdo de chumbo no sangue dos ratos de 1 dia [$F(4, 30) = 24,04$, $p < 0,001$] e no teor de chumbo encontrado no conteúdo estomacal (indicativo direto do teor do metal no leite) [$F(3, 12) = 17,05$, $p < 0,01$]. Não houve um efeito significativo do tratamento das mães com acetato de chumbo sobre o teor de chumbo atingido no cérebro total dos filhotes, ou seja, não foi evidenciado um acúmulo do metal no cérebro dos animais expostos no período pré-natal ao chumbo através do sangue materno. No rim, não houve um efeito aparente do tratamento sobre o acúmulo de metal no tecido, mas não foi feita análise estatística dos dados em função do número pequenos de amostras dosadas ($n = 2$) (dados não mostrados).

Tabela I.15. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 1 dia de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães durante o período pré-natal.

	SANGUE	CÉREBRO	CONTEÚDO ESTOMACAL
CONTROLE	6,6 ± 0,7 ^a (7)	0,050 ± 0,009 (4)	0,60 ± 0,01 (4)
GRUPO 0,5 mM Pb	20,3 ± 0,9 ^b (7)	0,045 ± 0,009 (5)	5,32 ± 0,28 ^b (4)
GRUPO 1,0 mM Pb	27,9 ± 4,8 ^b (8)	0,037 ± 0,008 (4)	N.D.
GRUPO 2,0 mM Pb	44,7 ± 6,2 ^c (5)	0,049 ± 0,010 (5)	6,50 ± 0,97 ^b (4)
GRUPO 4,0 mM Pb	60,3 ± 5,7 ^d (8)	0,052 ± 0,008 (7)	9,73 ± 1,39 ^c (4)

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de amostras de diferentes ninhadas. A concentração de chumbo no sangue está expressa em µg/dl, no cérebro em µg/g peso úmido e no conteúdo estomacal em µg/g peso seco. N. D. = não determinado.

As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste do raio múltiplo de Duncan, pelo menos para $p < 0,05$.

1.3.6.3. Chumbo nos tecidos de ratos jovens

Os resultados do conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 22 a 23 dias de idade (jovens) expostos indiretamente ao acetato de chumbo através de suas mães (tanto na vida pré-natal através do sangue materno como na vida pós-natal através do leite materno) estão mostrados na **Tabela I.16**. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo da concentração de chumbo na água de beber das mães sobre o conteúdo de chumbo no sangue [$F(4,18) = 36,35$, $p < 0,001$], no córtex cerebral [$F(4,24) = 3,85$, $p < 0,05$] e no rim [$F(4,41) = 22,28$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve um aumento significativo de chumbo sangüíneo apenas nos animais expostos à concentração mais elevada do metal (4,0 mM de acetato de chumbo) ($p < 0,05$), enquanto que no córtex cerebral houve um aumento do teor de chumbo no tecido de todos os grupos expostos ao metal ($p < 0,05$) e no rim, o aumento do chumbo foi significativo nos grupos 1,0 ($p < 0,05$), 2,0 e 4,0 mM ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Tabela I.16. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 23 dias de idade expostos ao acetato de chumbo através de suas mães.

	SANGUE	CÓRTEX CEREBRAL	RIM
CONTROLE	5,8 ± 0,3 ^a (5)	0,044 ± 0,013 ^a (7)	0,18 ± 0,01 ^a (11)
GRUPO 0,5 mM Pb	11,0 ± 0,7 ^a (4)	0,092 ± 0,018 ^b (6)	0,56 ± 0,04 ^b (8)
GRUPO 1,0 mM Pb	14,3 ± 0,7 ^a (4)	0,093 ± 0,014 ^b (4)	0,78 ± 0,05 ^b (10)
GRUPO 2,0 mM Pb	18,2 ± 2,1 ^a (4)	0,088 ± 0,021 ^b (6)	1,23 ± 0,20 ^c (7)
GRUPO 4,0 mM Pb	50,6 ± 5,1 ^b (6)	0,120 ± 0,014 ^b (7)	1,52 ± 0,18 ^c (10)

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de amostras de diferentes ninhadas. A concentração de chumbo no sangue está expressa em µg/dl, no córtex cerebral e no rim em µg/g peso úmido.

As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste do raio múltiplo de Duncan, pelo menos para $p < 0,05$.

1.3.6.4. Chumbo nos tecidos de ratos de 6 meses de idade

O conteúdo de chumbo em sangue e rim de ratos de seis meses de idade, expostos ao metal desde a concepção está mostrado na **Tabela I.17**. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo da concentração de chumbo sobre o conteúdo de chumbo no sangue [$F(4,26) = 35,73$, $p < 0,001$] e no rim [$F(4,28) = 150,87$, $p < 0,001$]. O teste de Duncan revelou que todos os grupos expostos ao chumbo apresentaram um aumento no teor do chumbo sanguíneo e renal (pelo menos para $p < 0,05$).

Tabela I.17. Conteúdo de chumbo nos tecidos de ratos de 6 meses de idade expostos ao acetato de chumbo cronicamente.

	SANGUE		RIM	
CONTROLE	7,6 ± 0,8 ^a	(6)	0,20 ± 0,02 ^a	(7)
GRUPO 0,5 mM Pb	41,6 ± 3,7 ^b	(5)	1,83 ± 0,17 ^b	(7)
GRUPO 1,0 mM Pb	49,4 ± 2,9 ^b	(7)	11,78 ± 0,95 ^c	(6)
GRUPO 2,0 mM Pb	108,3 ± 12,7 ^c	(5)	14,09 ± 1,15 ^c	(6)
GRUPO 4,0 mM Pb	112,3 ± 9,9 ^c	(8)	23,92 ± 1,13 ^d	(7)

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. Os números entre parênteses representam o número de ratos de diferentes ninhadas. A concentração de chumbo no sangue está expressa em µg/dl e no rim em µg/g peso úmido.

As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste do raio múltiplo de Duncan, pelo menos para $p < 0,05$.

I.3.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D e sobre o índice de reativação com DTT.

I.3.7.1. Em cérebro anterior de ratos

A ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D e sobre o índice de reativação com DTT em cérebro anterior de ratos jovens (**Figura I.5.**). Por outro lado, em ratos de 6 meses de idade a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D de cérebro anterior [$F(2,14) = 5,26$, $p < 0,05$] (**Figura I.5.**). O teste de Duncan revelou que o efeito foi significativo no cérebro anterior, porque o grupo de animais expostos a 4,0 mM de acetato de chumbo apresentou uma atividade específica da ALA-D inferior a do grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura I.5.**). Nos ratos de 6 meses de idade também houve um efeito significativo do tratamento sobre o índice de reativação com DTT [$F(2,14) = 7,62$, $p < 0,01$] (**Figura I.6.**).

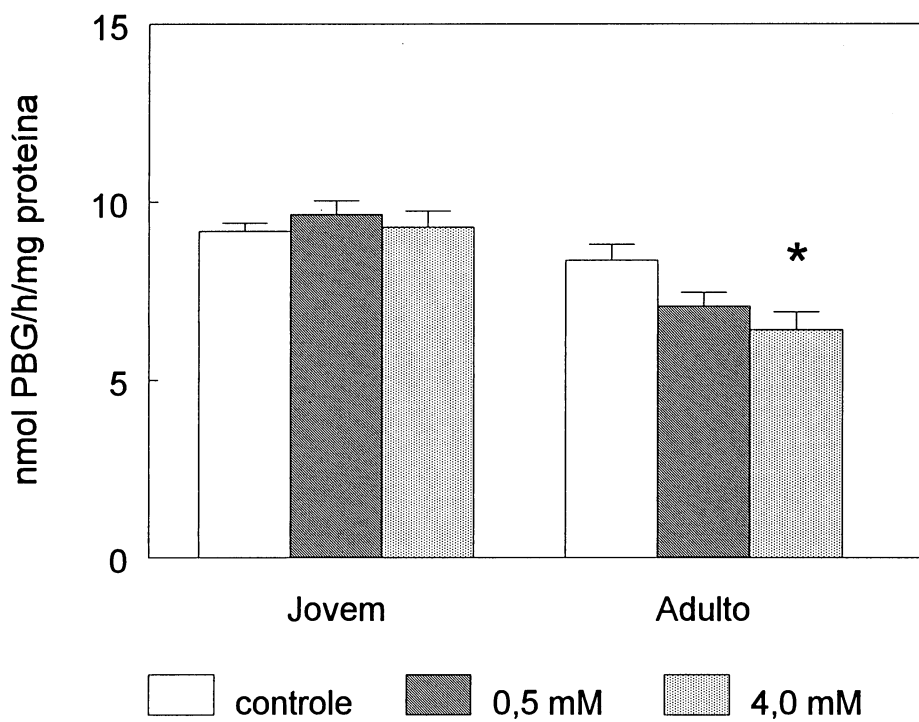


Figura I.5. Atividade da ALA-D em cérebro anterior de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (n = 5 a 8).
* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle na respectiva idade pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

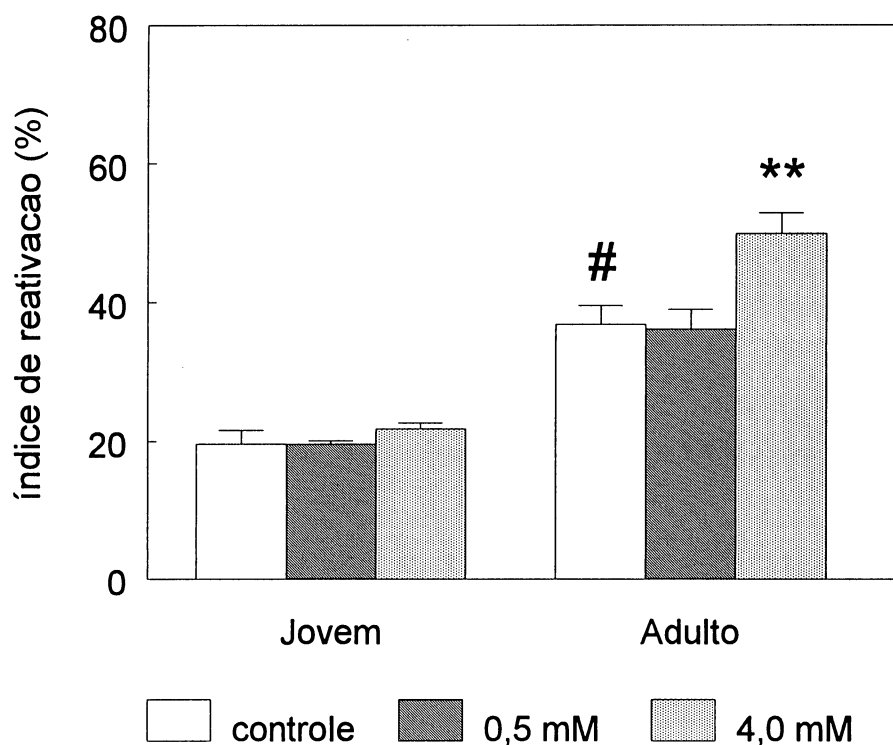


Figura I.6. Índice de reativação com DTT em cérebro anterior de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (n = 5 a 8).

** p<0,01 quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

p<0,05 quando comparado ao índice de reativação do grupo controle em rato jovem pelo teste t de Student para amostras não pareadas.

1.3.7.2. Em cerebelo de ratos

A ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D e sobre o índice de reativação com DTT em cerebelo de ratos jovens (Figura I.7.). Em ratos de seis meses de idade, a ANOVA mostrou um efeito significativo do tratamento sobre o índice de reativação [F(2,13) = 4,75, p<0,05], mas não sobre a atividade específica da enzima. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o índice de reativação com DTT no cerebelo foi maior no grupo 4,0 mM em relação ao grupo controle (p<0,05) (Figura I.8.).

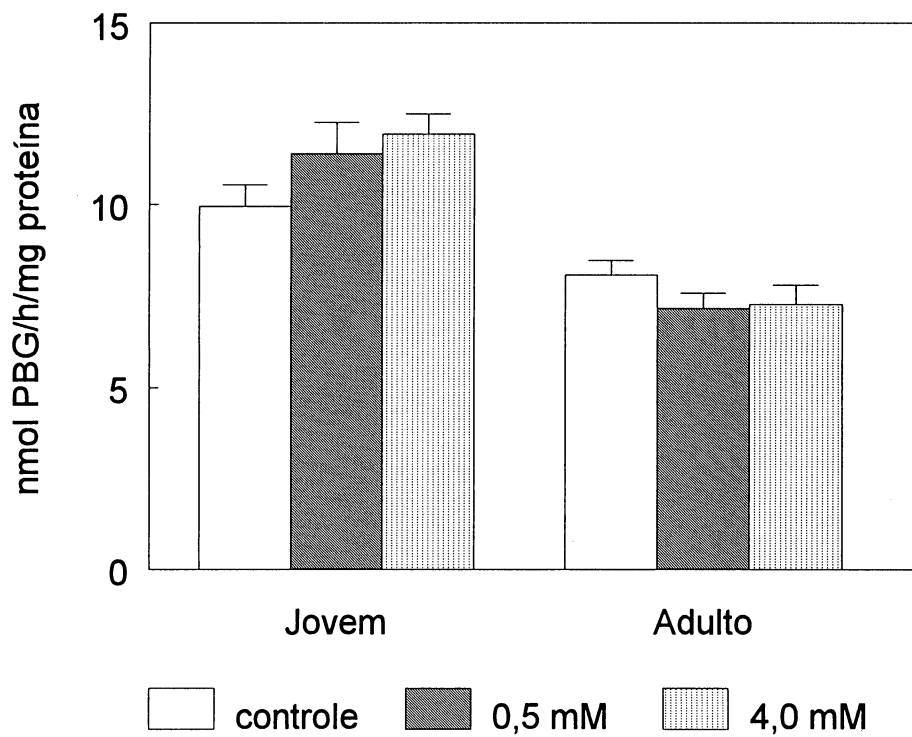


Figura 1.7. Atividade da ALA-D em cerebello de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (n = 5 a 8). Não houve diferença significativa entre os grupos pela análise de variância de uma via.

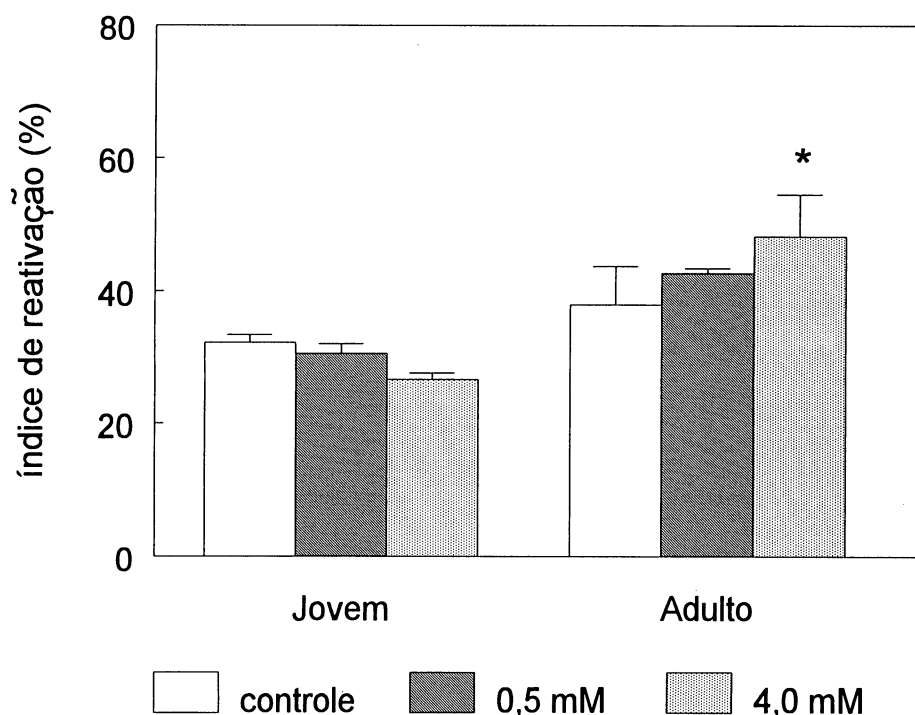


Figura I.8. Índice de reativação com DTT em cerebelo de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (n = 5 a 8).

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

1.3.7.3. Em rim de ratos

A ANOVA de uma via revelou que não houve um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre a atividade específica da ALA-D renal em ratos jovens (**Figura I.9.**). No entanto, evidenciou-se um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre o índice de reativação com DTT em rim de ratos jovens [$F(2,12) = 4,71, p < 0,05$] (**Figura I.10.**). Em ratos de seis meses de idade a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento sobre a atividade específica da ALA-D renal [$F(2,13) = 18,45, p < 0,001$]. O teste de Duncan revelou que o efeito foi significativo porque houve um decréscimo da atividade da enzima em ambos os grupos expostos ao metal ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle (**Figura I.9.**). De forma semelhante, houve um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre o índice de reativação com DTT no rim de ratos de seis meses [$F(2,13) = 11,61, p < 0,01$] (**Figura I.10.**). O teste de Duncan mostrou que este parâmetro foi maior nos grupos 0,5

e 4,0 mM em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura I.10.).

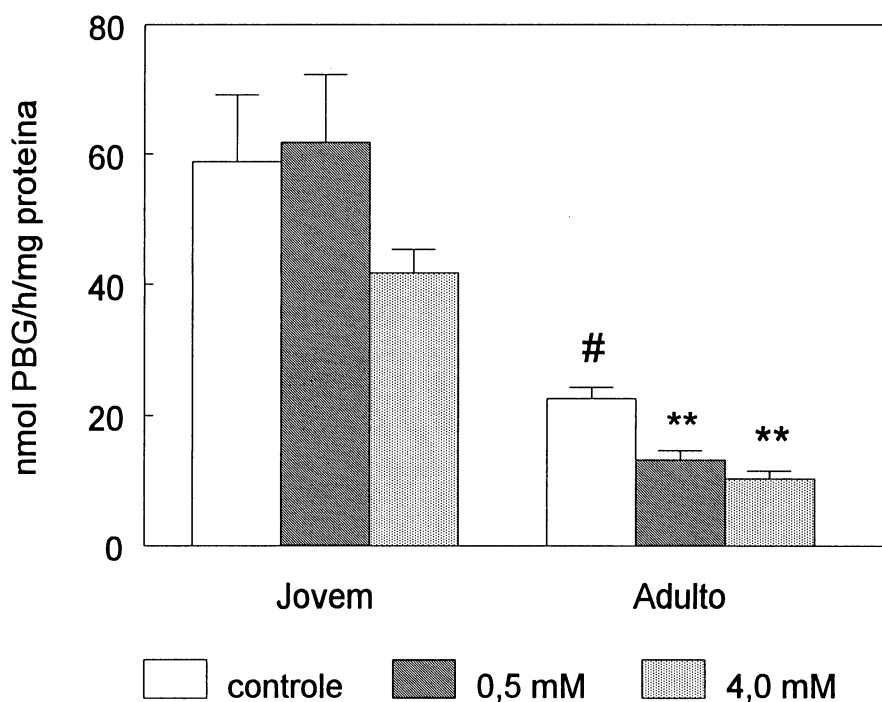


Figura I.9. Atividade da ALA-D em rim de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão ($n = 4$ a 6).

** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

$p < 0,01$ quando comparado à atividade específica do grupo controle em rato jovem pelo teste t de Student para amostras não pareadas.

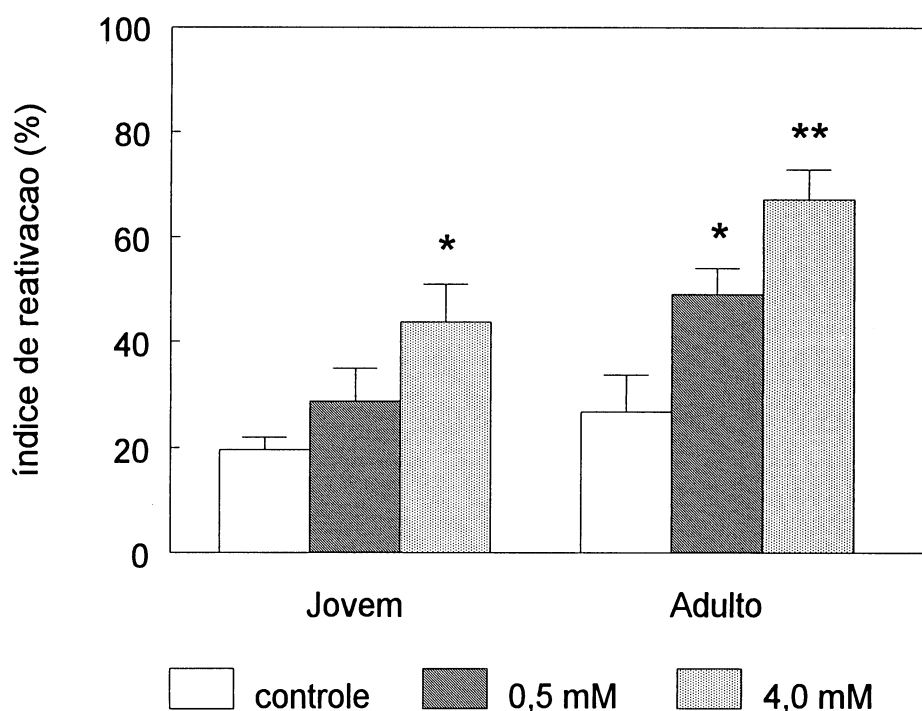


Figura I.10. Índice de reativação com DTT em rim de ratos jovens (21 a 22 dias de idade) e adultos (6 meses de idade) tratados com acetato de chumbo 0,5 mM ou 4,0 mM, conforme consta no Material e Métodos. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (n = 4 a 6). * p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

I.4. DISCUSSÃO

I.4.1. Parâmetros gerais relacionados à intoxicação dos animais

I.4.1.1. Desenvolvimento dos animais

O protocolo de exposição ao acetato de chumbo utilizado no presente trabalho não causou alterações no ganho de peso das ratas mães (nas fases pré-acasalamento, gestação e lactação) (Tabelas I.2. e I.3.) e dos seus filhotes durante a lactação (Tabela I.4.) ou dos ratos após o desmame que foram mantidos com o tratamento com acetato de chumbo até a idade adulta (Tabela I.5.). Este resultado é importante de ser considerado, uma vez que o modelo de intoxicação usado não estava associado com desnutrição dos animais. Diminuições de ganho de peso corporal associadas à exposição ao chumbo eram achados freqüentes nos trabalhos da literatura da década de 70 e 80,

quando concentrações elevadas de chumbo eram utilizadas nos modelos com animais experimentais, mas ainda ocorre com menor frequência em trabalhos mais recentes (Silbergeld & Goldberg, 1973, 1974; Mykkanen et al., 1979; Raffles et al., 1979; Lefauconnier et al., 1980; Alfano & Petit, 1981, 1985; Rosen et al., 1985; Kumar & Desiraju, 1990; Epstein et al., 1991). Contudo, atualmente tem sido dada atenção especial a exposição de animais experimentais a baixas doses de chumbo, tanto em animais jovens como em adultos. Nestes trabalhos, de forma semelhante ao nosso estudo, não são observadas alterações no ganho de peso dos animais tratados com chumbo (Munoz et al., 1989; Widmer et al., 1992; Bielarczyk et al., 1994).

A diminuição da ingesta líquida observada nas ratas expostas ao acetato de chumbo na fase do pré-acasalamento (**Tabela I.1.**) está de acordo com relatos da literatura de que o chumbo causa uma inibição do consumo hídrico em ratos (Raffles et al., 1979; Fregoneze et al., 1994). Contudo, esta redução não foi suficiente para alterar o peso das ratas (**Tabela I.2.**). O tratamento com acetato de chumbo também não provocou alteração no número de filhotes por ninhada (**Tabela I.6.**), conforme relatado em trabalhos que utilizaram baixas doses de chumbo (Baraldi et al., 1985; Widmer et al., 1992; Jett & Guilarte, 1995).

Outro parâmetro que tem sido utilizado na literatura para avaliar uma intoxicação com chumbo tem sido a avaliação do peso do cérebro total e/ou das estruturas cerebrais em animais expostos a este metal. Estes parâmetros foram afetados em estudos que empregaram doses elevadas de chumbo (Kumar & Desiraju, 1990; Epstein et al., 1991). É sabido que no rato o cerebelo apresenta uma neurogênese que se inicia na metade da gestação e se prolonga até as primeiras semanas de vida pós-natal, sendo uma estrutura bastante vulnerável a xenobióticos durante o desenvolvimento. Em nosso estudo, assim como nos estudos que usaram baixas doses de chumbo (Munoz et al., 1989; Cory-Slechta, 1990; Widmer et al., 1991), não foram afetados os pesos do cérebro anterior, córtex cerebral ou cerebelo em ratas mães, ratos jovens, ou ratos de 6 meses de idade expostos ao chumbo (**Tabelas I.7., I.8. e I.9.,** respectivamente), assim como o peso relativo das referidas estruturas (razão peso da estrutura/peso corporal) (**Tabelas I.7., I.8. e I.9.**). O peso do cérebro total de ratos de 1 dia de idade também não foi alterado pelo tratamento (**Tabela I.6.**). Estes resultados indicam que o protocolo de exposição usado é adequado, no sentido de não provocar alterações anatômicas grosseiramente mensuráveis no SNC.

Ao contrário dos resultados de ausência de alterações anatômicas grosseiras no cérebro de ratos expostos ao chumbo observadas no presente trabalho, houve um au-

mento da razão peso seco ou peso úmido renal/ peso corporal nas ratas mães, nos ratos jovens e nos ratos de 6 meses de idade (Tabelas I.10., I.11. e I.12., respectivamente), o qual sugere uma proliferação celular no rim induzida pelo chumbo (Choie & Richter, 1974), pois o referido aumento não foi devido a um aumento no conteúdo de água neste órgão. Isto pode ser devido ao grande acúmulo de chumbo observado neste tecido no presente estudo. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que o rim é um dos principais órgãos alvo para o chumbo (Nolan & Shaikh, 1992).

1.4.1.2. Parâmetros hematológicos

A ausência de alterações nos níveis de hemoglobina, hematócrito e contagem de leucócitos observada nos ratos jovens expostos pré- e pós-natalmente ao chumbo (Tabela I.13.) está de acordo com trabalhos anteriores que expuseram ratos a baixas doses de chumbo através de suas mães (Roels et al., 1977). Por outro lado, a diminuição da hemoglobina e do hematócrito observada nas ratas mães cronicamente expostas a este metal difere do trabalho de Roels et al. (1977), onde não foram relatadas alterações nestes parâmetros, mas está de acordo com o estudo de Jehan & Motlag (1994), no qual foi relatado uma redução no nível de hemoglobina em ratos adultos expostos ao chumbo. Contudo, no referido estudo existiram diferenças em relação aos resultados aqui mostrados, pois a redução observada por Jehan & Motlag (1994) neste parâmetro foi de maior ordem (em torno de 25%) do que no nosso trabalho (em torno de 10%) e também houve um aumento no número de leucócitos não observado no nosso trabalho. A redução no hematócrito e na hemoglobina pode ser devido ao fato do chumbo diminuir o tempo de vida dos eritrócitos e de afetar a biossíntese do heme na medula (Al-Saleh, 1994), causando uma anemia. Nossos resultados indicam que níveis de chumbo sanguíneos relativamente altos são necessários para afetar estes parâmetros hematológicos em ratos, uma vez que somente foram detectadas alterações hematológicas nos grupos 2,0 e 4,0 mM (ratas mães), os quais apresentaram níveis de chumbo no sangue de 46,1 µg/dl e 70,8 µg/dl, respectivamente. Os resultados obtidos com ratas mães concordam com a observação de que uma redução da hemoglobina e anemia ocorre em adultos com níveis de chumbo sanguíneos de 50 a 80 µg/dl (Philip & Gerson, 1994).

1.4.2. Conteúdo de chumbo nos tecidos

A análise do conteúdo de chumbo nos tecidos demonstrou que os ratos de 1 dia de idade não acumularam chumbo no cérebro total (Tabela I.15.). Este foi um achado interessante, pois se considerarmos que a neurotoxicidade do chumbo está relacionada

ao acúmulo deste metal no SNC, o modelo de exposição usado no presente estudo não pode ser considerado como um modelo de intoxicação cerebral pré-natal. Contudo, ainda é possível que o chumbo acumule-se somente em regiões específicas do cérebro no embrião e que a determinação do chumbo no cérebro total não revele tal acúmulo regional. Os estudos iniciais da literatura que tratavam de exposição de ratos ao chumbo, demonstraram que o chumbo acumulava-se seletivamente no hipocampo, na amígdala e no cerebelo (Fjerdingstad et al., 1974; Campbell et al., 1982). No entanto, em um estudo recente Widzowski & Cory-Slechta (1994) relataram que não havia um acúmulo seletivo de chumbo em regiões cerebrais, trabalhando com ratos adultos expostos a baixas doses deste metal na água de beber. Estes autores, inclusive, discutiram que parte do acúmulo diferencial encontrado em trabalhos anteriores podia ser devido ao fato de alguns pesquisadores expressarem seus resultados em $\mu\text{g/g}$ peso seco e não $\mu\text{g/g}$ de peso úmido como parece ser mais adequado. Inclusive, este procedimento de expressar os resultados das dosagens do metal nos tecidos em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido foi adotado no nosso estudo. Os nossos resultados demonstraram que houve um aumento específico de chumbo no sangue dos ratos de 1 dia de idade (Tabela I.15.). Isto é compatível com a observação de que o chumbo atravessa a placenta (McClain & Becker, 1975; Lauwerys et al., 1978; Schweinsberg & von Karsa, 1990) e tem uma distribuição não usual no embrião, caracterizada por um marcante acúmulo quase que exclusivamente no sangue (Danielsson et al., 1984). Os níveis de chumbo observados nos ratos de 1 dia são muito semelhantes aos níveis atingidos no sangue materno (Tabelas I.15. e I.14., respectivamente), o que está de acordo com os dados da literatura para humanos (Mayer-Popken et al., 1986; Schweinsberg & von Karsa, 1990) e para ratos (McGivern et al., 1991). Os níveis de chumbo no rim dos filhotes de 1 dia foi determinado em um pequeno número de amostras, o que impediu uma análise estatística adequada dos dados (dados não mostrados). Mesmo assim, os resultados parecem apontar para a inexistência de um acúmulo de chumbo neste tecido.

Com a término do período de lactação, o padrão de distribuição de chumbo nos tecidos foi um pouco alterado. A análise dos níveis de chumbo atingidos no sangue em ratos jovens (Tabela I.16.) indicou que os mesmos diminuíram levemente comparado aos níveis observados nos filhotes de 1 dia. Por outro lado, houve um aumento no teor do metal encontrado no cérebro (córtex cerebral) de cerca de 2 a 3 vezes, bem como um aumento no rim que variou de 3 a 8 vezes (Tabela I.16.) comparado ao teor observado em animais de 1 dia de idade (I.15.). Os altos níveis de chumbo encontrados nos tecidos dos ratos jovens parecem estar relacionados ao alto nível de chumbo observado no leite

materno (conteúdo estomacal dos ratos de 1 dia de idade) (Tabela I.15.). A transferência de chumbo da mãe para o recém-nascido durante a lactação tem sido demonstrado em humanos (Wolff, 1983; Rabinowitz et al., 1985) e animais experimentais (Bornschein et al., 1977; Hallén & Oskarsson, 1993). Esta transferência pode estar relacionada à mobilização do chumbo do tecido ósseo (Silbergeld, 1986). Os níveis de chumbo sanguíneos encontrados nos ratos de 23 dias de idade (11 a 50 µg/dl) (Tabela I.16.) estão na faixa daqueles associados com alterações comportamentais em crianças (Davis et al. 1990). Tais níveis não são incomuns em crianças de muitas comunidades urbanas dos E.U.A. e Europa (Bithoney et al., 1993, Englert & Höring, 1994, Wiley et al., 1995). O nível de chumbo sanguíneo encontrado no grupo de ratos expostos a 0,5 mM de acetato de chumbo através das mães (11µg/dl) (Tabela I.16.) é semelhante ao limite de segurança (10 µg/dl) recentemente estabelecido pelo "Center for Disease Control" para crianças (Silbergeld, 1992).

Embora seja usual a comparação entre os níveis de chumbo sanguíneo atingidos em crianças e em animais experimentais, salientamos que esta comparação deve ser feita sempre com cautela. Os ratos parecem ser mais resistentes à toxicidade provocada por altas doses de chumbo do que os humanos. Por exemplo, o nível de chumbo sanguíneo necessário para causar uma encefalopatia em crianças é cerca de 80 µg/dl, enquanto que no rato jovem a intoxicação por chumbo deve produzir um nível em torno de 300 µg/dl para causar um efeito similar (Cory-Slechta et al., 1985). Algumas evidências, contudo, mostram que exposições a baixos níveis de chumbo, as quais produziram níveis de chumbo sanguíneo equiparáveis, causaram alterações comportamentais semelhantes tanto em ratos como em humanos (Annau, 1990; Davis et al., 1990).

Foi observado um grande acúmulo de chumbo no rim das ratas mães intoxicadas com chumbo (Tabela I.14.), bem como nos ratos de seis meses de idade cronicamente expostos ao metal (Tabela I.17.), o que está em concordância com outros estudos que mostram que este órgão é um grande acumulador de chumbo (Roels et al., 1977; Cory-Slechta, 1990). Estes resultados demonstram que o modelo de exposição ao chumbo empregado foi eficaz em produzir uma intoxicação.

I.4.3. Atividade da ALA-D

Neste trabalho foi determinada a atividade da enzima ALA-D em cérebro anterior, cerebelo e rim de ratos. A atividade da ALA-D nestes tecidos parece não ser inibida pelo chumbo, no caso de exposição de animais experimentais a este metal *in vivo* (Oskarsson & Fowler, 1985,1987; DuVal & Fowler, 1989). Os objetivos eram verificar se

a referida insensibilidade ocorreria mesmo mediante uma exposição prolongada ao acetato de chumbo e se a utilização do índice de reativação da enzima com DTT poderia ser eficiente para detectar um efeito do metal.

A medida da atividade específica da ALA-D de cérebro anterior, cerebelo e rim de ratos expostos ao chumbo não pode ser considerada um eficiente parâmetro para a avaliação da toxicidade do chumbo, pois não houve um efeito consistente do metal sobre este parâmetro. Por outro lado, o índice de reativação com DTT foi um melhor parâmetro da intoxicação por chumbo. Pode-se afirmar isto, uma vez que o índice de reativação revelou um efeito do chumbo não aparente na atividade específica no cerebelo de ratos de 6 meses e no rim de ratos jovens expostos ao metal (**Figuras I.8. e I.10.**, respectivamente). Um resultado semelhante a este foi previamente relatado na literatura, em ALA-D de sangue humano, no que diz respeito a maior eficiência com DTT para avaliação da intoxicação com chumbo (Granick et al., 1973; Sakai et al., 1980).

O índice de reativação com DTT da atividade da enzima ALA-D cerebral (cérebro anterior e cerebelo) de ratos de 6 meses de idade expostos ao chumbo desde a vida pré-natal foi significativamente aumentado no grupo exposto à dose mais elevada de acetato de chumbo (4,0 mM) (**Figuras I.6. e I.8.**, respectivamente). Por outro lado, a atividade da ALA-D cerebral de ratos jovens expostos ao chumbo desde a vida pré-natal não foi significativamente alterada pelo tratamento com o metal (**Figuras I.6. e I.8.**). Podemos comparar nossos resultados com os de Oskarsson (1989), o qual verificou que ratos desmamados expostos ao chumbo através da água de beber das mães (12,0 mM de chumbo) durante os períodos de gestação e lactação não apresentaram alterações na atividade da ALA-D cerebral. No referido estudo os ratos apresentaram níveis de chumbo sangüíneos bastante elevados: 147 µg/dl de sangue. O nível da intoxicação dos ratos desmamados era superior ao atingido no nosso trabalho (faixa de aproximadamente 10 a 44 µg Pb/dl de sangue, para os grupos 0,5 e 4,0 mM respectivamente). Por outro lado, o nível de chumbo sangüíneo era similar ao nosso resultado com ratos de 6 meses de idade do grupo 4,0 mM. Desta forma, parece que uma exposição prolongada ao chumbo é necessária para causar um efeito sobre a ALA-D cerebral. Ainda podemos acrescentar que a insensibilidade da ALA-D cerebral ao chumbo relatada na literatura (Silbergeld & Lamon, 1982; Oskarsson, 1989; Rocha et al., 1995) parece ser relativa, pois no presente trabalho evidenciamos uma inibição desta enzima em um tratamento no qual os ratos apresentaram uma alta concentração de chumbo no sangue, mas não mostraram sinais evidentes de toxicidade como desnutrição. Além disto, a fonte da enzima parece ser importante no que concerne sua sensibilidade ao chumbo, pois a ALA-D

de hemisfério cerebral e cerebelo de patos intoxicados com chumbo mostrou-se bastante sensível à inibição por este metal (Dieter & Finley, 1979).

A inibição da ALA-D renal ocorreu principalmente nos ratos de 6 meses de idade cronicamente expostos ao chumbo (**Figuras I.9. e I.10.**). Este resultado está em desacordo com o estudo de Fowler et al. (1980), o qual não encontrou alterações na atividade da ALA-D renal em ratos tratados com chumbo desde a concepção até 9 meses de idade. No entanto, os níveis de chumbo renais atingidos no presente trabalho são superiores aos do estudo de Fowler et al. (1980). A ação do chumbo sobre a ALA-D renal nos ratos jovens foi evidenciada pelo aumento do índice de reativação com DTT no grupo exposto à dose mais elevada de chumbo, mas nenhum efeito foi observado no grupo 0,5 mM (**Figura I.10.**). A parcial ausência de efeito nos ratos jovens pode ser devido ao menor teor de chumbo renal nestes animais (**Tabela I.16.**) quando comparado aos valores obtidos em ratos de 6 meses de idade (**Tabela I.17.**). Além disto, existe a possibilidade da ocorrência de corpúsculos de inclusão nos rins dos animais expostos durante a gestação e lactação ao chumbo, o que diminuiria a concentração citosólica de chumbo (Goyer et al., 1970), protegendo a ALA-D da inibição pelo metal. Oskarsson & Johansson (1987) observaram que corpúsculos de inclusão foram formados nos rins de filhotes de ratos expostos ao chumbo através de suas mães durante a gestação e lactação. Por outro lado, tem sido relatado a não ocorrência destes corpúsculos em casos de exposição prolongada ao chumbo (Nolan & Shaikh, 1992).

Uma observação interessante é que o índice de reativação com DTT foi significativamente maior no cérebro anterior de ratos de seis meses de idade do grupo controle do que na respectiva estrutura nos ratos jovens (teste t de Student não pareado, $p < 0,001$, **Figura I.6.**). Também foi observado um índice de reativação com DTT um pouco maior, porém de forma não estatisticamente significativa, no cerebelo e no rim dos ratos de seis meses, em relação aos ratos jovens (**Figuras I.8. e I.10.**, respectivamente). Este conjunto de resultados pode ser devido ao fato que o DTT restaura não apenas a atividade da ALA-D inibida por chumbo, mas também a atividade da ALA-D inibida por oxidação de grupos sulfidríla, não relacionado ao efeito do metal sobre a enzima (Sakai et al., 1980). Tem sido relatado que os mecanismos de defesa antioxidante estão reduzidos com a idade, sendo relatado que o nível da glutatona no cérebro encontra-se diminuído em animais idosos (Benzi et al., 1988; Reiter, 1995). Isto poderia ajudar a explicar os nossos resultados de reativação diferencial com o DTT em função da idade dos animais controle.

A maior atividade da ALA-D renal em relação à atividade da ALA-D cerebral em ratos observada no presente trabalho (**Figura 1.9.** x **Figuras 1.5.** e **1.7.**) não entra em desacordo com a observação de que em mamíferos os tecidos que apresentam maior atividade enzimática são fígado, rim e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955). Também a maior atividade específica da ALA-D cerebelar e renal observada nos ratos jovens em relação a atividade específica dos ratos adultos (**Figuras 1.7.** e **1.9.**, respectivamente) é condizente com a observação de que a atividade específica da ALA-D em alguns tecidos de ratos jovens é maior do que em ratos adultos (Sassa, 1982).

CAPÍTULO II - ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM RATOS

II.1.INTRODUÇÃO

II.1.1. Estudos comportamentais em animais expostos ao chumbo

O sistema nervoso tem a capacidade de alterar seu funcionamento diante da repetição de situações semelhantes e da ocorrência de situações novas. O aprendizado relaciona-se ao novo padrão funcional criado no sistema nervoso como consequência de uma situação nova ou repetida (Izquierdo, 1992). O termo memória está intimamente relacionado ao aprendizado. A memória relaciona-se à habilidade de adquirir, reter e usar informações ou conhecimentos. A diferença básica entre o aprendizado e a memória reside no fato de que o termo aprendizado é usado para designar o primeiro estágio da memória, a aquisição de novas informações, enquanto a memória compreende também a retenção e a evocação de informações ou conhecimentos previamente adquiridos (Izquierdo et al., 1990, Izquierdo, 1992, 1993). Nos modelos experimentais de aprendizado e memória só pode ser medido a evocação. Os processos de aquisição e retenção devem ser presumidos (Izquierdo, 1992).

A realização de tarefas comportamentais em animais experimentais é freqüentemente utilizada para avaliar a funcionalidade do SNC e tem sido usada para estudar efeitos adversos de agentes químicos e/ou físicos sobre organismos (World Health Organization, 1986). Considerando que o comportamento é o produto final da atividade do sistema nervoso, o qual pode ser inclusive afetado pelo funcionamento de outros sistemas, alterações causadas por agentes tóxicos pode refletir-se em alterações comportamentais. Tem sido demonstrado que uma série de agressões (desnutrição, agentes tóxicos) ao SNC, especialmente durante o período perinatal, se manifesta por distúrbios de comportamento (Strupp & Levitsky, 1983; Rocha & Vendite, 1990; Souza et al., 1992; Cagiano et al., 1990; Davis et al., 1990).

Os efeitos comportamentais do chumbo têm sido extensivamente estudados ao longo das últimas três décadas, principalmente utilizando ratos como animais experimentais (Davis et al., 1990). Os primeiros estudos realizados neste sentido utilizavam doses muito elevadas de chumbo, as quais estavam sempre associadas à desnutrição e/ou

modificações morfológicas bem evidentes (Sauerhoff & Michaelson, 1973; Silbergeld & Golberg, 1973, 1974; Petit & Alfano, 1979; Alfano & Petit, 1981). Tais resultados devem, portanto ser vistos sob esta óptica, ou seja, o efeito atribuído ao tratamento com chumbo pode ser devido, pelo menos em parte, aos efeitos da desnutrição associada ao tratamento.

Nas últimas duas décadas começou-se a investigar os efeitos de doses baixas de chumbo sobre diferentes tarefas comportamentais em animais experimentais. Estes estudos envolvendo baixas doses de chumbo passaram a ser empregados tendo em vista que em crianças foram observadas alterações comportamentais associadas com um nível baixo de exposição a este metal (Davis et al., 1990).

Em animais experimentais, os estudos comportamentais associados à exposição ao chumbo têm sido realizados em uma grande variedade de modelos de exposição ao metal. Na maior parte dos estudos da literatura, a exposição ao chumbo ocorre durante a vida pré-natal (através de tratamento das mães com chumbo durante todo o período gestacional) e/ou durante o período lactacional (Grant et al., 1980; Barret & Livesey, 1985; Baraldi et al., 1988; Munoz et al., 1989; Luthman et al., 1992; Widmer et al., 1992). Nestas fases, o cérebro está sob intenso desenvolvimento (Bayer et al., 1993) e está, desta forma, mais suscetível a ser afetado por agentes neurotóxicos, incluindo o chumbo (Kostial et al., 1978; Rocha et al., 1995). Alguns estudos estendem ainda o tratamento com chumbo até a vida adulta (Dolinsky et al., 1983; Munoz et al., 1988). Em alguns trabalhos, entretanto, a exposição ao metal se inicia na vida adulta (Burrigh et al., 1983; De Luca et al., 1989; Burkey & Nation, 1994) e, em outros, a exposição inicia-se após o desmame (Cory-Slechta et al., 1981, 1983, 1985; Cohn et al., 1993; Cohn & Cory-Slechta, 1994).

Apesar da grande quantidade de estudos que estudam os efeitos comportamentais do chumbo na fase de desenvolvimento cerebral, as comparações entre os resultados relatados na literatura produzem dados conflitantes. Na verdade, em alguns casos as comparações entre os estudos ficam prejudicadas devido à falta de determinações dos níveis de chumbo sanguíneos e/ou cerebrais em alguns destes estudos (Alfano & Petit, 1981; Dolinsky et al., 1983; Baraldi et al., 1988). Além disto, as comparações não são muito adequadas quando a exposição ao chumbo está associada com desnutrição ou grandes alterações morfológicas. Isto era freqüente nos estudos iniciais que tratavam dos efeitos comportamentais do chumbo, mas ainda está presente em alguns estudos da última década (Sauerhoff & Michaelson, 1973; Rosen et al., 1985; Draski et al., 1989; Kumar & Desiraju, 1990; Hahn et al., 1991).

Um dos aspectos mais estudados é o efeito da exposição ao chumbo sobre a atividade locomotora espontânea de roedores (Davis et al., 1990). Para este fim, tem sido utilizado tanto a medida da locomoção em caixas automáticas como a avaliação do animal no campo aberto. Nas caixas automáticas o animal é observado por períodos de tempo maiores do que no campo aberto, geralmente durante 24 horas, permitindo a detecção de alterações associadas ao ritmo circadiano do animal (Collins et al., 1984). No campo aberto normalmente o tempo de observação do animal fica na faixa de 2 a 10 minutos e avalia-se principalmente a atividade locomotora horizontal, ou seja, as respostas de cruzamentos, e a atividade locomotora vertical, que são as respostas de orientação ("rearing") efetuadas pelo animal (Driscoll & Stegner, 1978; Barret & Livesey, 1985; Luthman et al., 1992). A medida das respostas de cruzamento e, principalmente, das respostas de orientação realizadas pelos animais em duas ou mais sessões idênticas, consecutivas (com intervalo de geralmente 24 horas) no campo aberto possibilita analisar a habituação do animal ao ambiente novo (Netto et al., 1986). A habituação diz respeito à diminuição da resposta comportamental após a exposição repetida ao mesmo estímulo, no caso o ambiente novo (O'Keefe & Nadel, 1978) e, por envolver um aprendizado não essencial, é considerada por alguns pesquisadores como sendo bastante adequada para avaliar déficits cognitivos sutis (Strupp et al., 1984; Dutra et al., 1991).

Em relação aos resultados de atividade locomotora apresentados pelos animais intoxicados por chumbo, tem sido relatados tanto hiperatividade (Sauerhoff & Michaelson, 1973; Silbergeld & Golberg, 1973 e 1974; Winneke et al., 1977; Driscoll & Stegner, 1978; Petit & Alfano, 1979; Jason & Kelog, 1981; Barret & Livesey, 1985; Baraldi et al., 1985), ausência de efeito do chumbo sobre este parâmetro (Rafales et al., 1979; Grant et al., 1980; Jason & Kelog, 1981; Munoz et al., 1989) ou até mesmo hipoatividade (Dolinsky et al., 1983; Luthman et al., 1992).

Muitos dos trabalhos que estudaram o comportamento de ratos expostos ao chumbo no campo aberto não realizaram a análise da memória de habituação no campo aberto nos animais expostos ao chumbo. Este ponto merece ser enfatizado, pois a memória é uma expressão das funções cognitivas (Izquierdo, 1994).

É sabido que a função cognitiva é alterada pela exposição ao chumbo. Tem sido demonstrado que animais intoxicados com este metal, principalmente durante o período perinatal, apresentam comprometimento no desempenho de várias tarefas comportamentais que avaliam aprendizado e memória, a saber: aprendizado em caixas de Skinner (condicionamento operante) (Cory-Slechta et al., 1981, 1983, 1985), comportamento de alternar espontâneo (Kostas et al., 1976; Barret & Livesey, 1985), labirinto

radial (Alfano & Petit, 1981; Munoz et al., 1988), aprendizado latente (Massaro & Massaro, 1986), esquiva passiva (Alfano & Petit, 1981) e esquiva ativa (Altmann et al., 1993). Contudo, também já foram relatados estudos em animais expostos ao chumbo, nos quais não foram observados déficits de aprendizado (Brown et al., 1971; Winneke et al., 1982; Rosen et al., 1985).

A tarefa de esquiva ativa envolve um aprendizado associativo e baseia-se nas clássicas técnicas de condicionamento inicialmente descritas por Pavlov. Esta tarefa envolve um estímulo condicionado ou neutro (aquele que normalmente não produz uma resposta por si só), tal como um tom, o qual precede um estímulo não condicionado, que normalmente é um choque elétrico nas patas do animal. Através de pareamentos repetidos, o estímulo condicionado vem a produzir uma resposta condicionada (Kupfermann & Kandel, 1995). O animal neste tipo de tarefa deve aprender a esquivar-se do choque elétrico, associando o tom com o choque. Ao contrário da tarefa de campo aberto, a tarefa de esquiva ativa é aversiva por envolver um estímulo doloroso que é o choque elétrico nas patas do animal. Alguns estudos sugerem que os efeitos comportamentais do chumbo seriam manifestados principalmente em situações aversivas, estressantes e/ou causadoras de medo (Barret & Livesey, 1985; Engellener et al., 1986). Existem poucos estudos na literatura a respeito dos efeitos da exposição ao chumbo sobre a tarefa de esquiva ativa (Sobotka & Cook, 1974; Alfano & Petit, 1981; Winneke et al., 1982; Altmann et al., 1993). Os resultados destes estudos demonstram ausência de efeito do metal (Alfano & Petit, 1981), facilitação (Winneke et al., 1982) ou déficits (Sobotka & Cook, 1974; Altmann et al., 1993) de desempenho da tarefa. Desta forma, considerando os resultados conflitantes da literatura, os efeitos do chumbo sobre o comportamento de animais experimentais nesta tarefa merece maior investigação.

A tarefa de aprendizado latente têm sido proposta como útil no sentido de detectar déficits cognitivos sutis em roedores submetidos a insultos tais como desnutrição ou exposição a metais (Mello et al., 1989). Nesta tarefa o aprendizado é manifestado sem estar associado com qualquer reforço relevante durante uma experiência de aprendizado não apetitiva prévia (Massaro & Massaro, 1986). Tipicamente, permite-se uma exploração livre de um labirinto ao animal saciado, o qual não recebe nenhum reforço durante a exposição. Após privado de alimento, o animal é reexposto ao mesmo labirinto com comida e seu desempenho é comparado com um grupo de animais que não teve experiência prévia no labirinto para demonstrar o efeito do aprendizado latente. Esta tarefa baseia-se no fato de que os roedores são capazes de adquirir e reter informação

sobre relações espaciais em labirintos e usar esta informação “latente” para aprendizados subseqüentes (World Health Organization, 1986).

II.1.2. Objetivos

Este capítulo tem o objetivo de:

1. Examinar os efeitos da exposição perinatal a baixas doses de chumbo sobre o comportamento em um campo aberto e na tarefa de esquiva ativa em ratos jovens, em face de resultados contraditórios a cerca dos efeitos do chumbo sobre estas tarefas comportamentais.
2. Verificar se a exposição prolongada ao chumbo produz alterações na tarefa de aprendizado latente em ratas adultas.

II.2.MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1. Equipamentos

Caixa de condicionamento automatizada - Albarsh

Caixa para habituação ao campo aberto

Labirinto para a tarefa de aprendizado latente

II.2.2.Tratamento dos animais

O tratamento dos animais foi realizado conforme consta na pg. 14 do capítulo I. A exposição ao chumbo através da mãe é um modelo animal adequado, uma vez que em se tratando de exposição ao chumbo no ser humano, a gestante é a fonte mais provável de contaminação por este metal em lactentes (Silbergeld, 1986). Além disto, conforme comentado no Capítulo I, o modelo de exposição com baixas doses de chumbo empregado não causou desnutrição nos animais. Isto é importante no sentido de evitar uma variável adicional que dificultaria a interpretação dos resultados comportamentais.

II.2.3.Tarefas comportamentais

II.2.3.1. Em ratos jovens

Para a avaliação comportamental dos ratos expostos no período perinatal ao chumbo, desde a concepção até o desmame ou até a idade de 28 dias, foram utilizadas duas tarefas comportamentais: habituação a um campo aberto e esquiva ativa, respecti-

vamente. Para este protocolo de estudo comportamental foram utilizados os grupos: controle, 0,5, 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo. Todas as sessões foram conduzidas no horário compreendido entre 13:00 e 16:00 h. Foram utilizados um a três ratos machos de cada ninhada e, quando mais de um rato da mesma ninhada foi usado, a média do desempenho dos animais foi utilizada para as análises estatísticas.

Habituação a um campo aberto- foi realizada em ratos Wistar machos de 21 dias de idade em uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade, sendo a parede frontal de vidro. O assoalho era recoberto com linóleo e dividido em 12 retângulos de 15 x 13 cm. Ratos controle e tratados com acetato de chumbo indiretamente através das mães foram submetidos a duas sessões de 6 min, com intervalo de 24 horas entre as mesmas. A primeira sessão é denominada treino e a segunda sessão é denominada teste. A tarefa consistia em colocar o animal, gentilmente, no canto posterior esquerdo da caixa, sendo registrados o número de respostas de orientação ("rearings" - elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco do rato) e o número de respostas de cruzamento realizados pelo animal. Foram contados também o número de bolos fecais eliminados pelo rato durante a tarefa. Uma diminuição do número de respostas de orientação apresentada pelo animal na sessão de teste em relação à sessão de treino foi considerada como medida de memória de habituação e o número de respostas de cruzamento foi utilizado como parâmetro para avaliar a atividade locomotora (Walsh & Cummins, 1976; Izquierdo et al., 1984; Netto et al., 1986).

Teste de esquiva ativa de duas vias: foi realizado em ratos Wistar machos aos 28 dias de vida que já haviam sido submetidos à tarefa de habituação ao campo aberto aos 21 dias. Após o desmame os ratos permaneceram com o mesmo tratamento que era administrado a suas mães. Esta tarefa comportamental foi realizada em uma caixa de condicionamento automatizada com dois compartimentos e com o assoalho constituído de barras de bronze paralelas com 1 mm de diâmetro, distantes 1 cm uma das outras. A caixa continha entre as duas barras centrais uma barra de acrílico medindo 1 cm de altura. As barras de bronze de cada lado da caixa eram, independentemente, conectadas a um estimulador elétrico que, ao ser acionado, permitia a passagem da corrente elétrica que oscilava de maneira irregular, para que não houvesse polarização das barras e conseqüente insensibilização ao choque elétrico. O rato era colocado em um dos lados da caixa e, após um período de 2 min, eram apresentados 30 tons (estímulo condicionado) em intervalos variáveis, ao acaso, durando de 10 a 50 seg. Cada tom era seguido de um choque nas patas de 0,4 mA (estímulo não condicionado), aplicado na metade em que

se encontrava o animal e mantido até que o mesmo cruzasse para a outra metade da caixa. Caso o animal emitisse a resposta de esquiva ao tom, o mesmo era interrompido e a emissão do choque evitada. Sendo assim, durante uma sessão duas respostas podiam ocorrer: o rato cruzar para a outra metade da caixa durante a apresentação do tom (resposta de esquiva) ou cruzar durante o choque elétrico nas patas (resposta de fuga). O número de respostas de esquiva e de cruzamentos interprova (cruzamento da caixa independentemente da apresentação do tom e do choque), assim como o tempo de fuga foram registrados automaticamente. Foi imposto um teto de 30 segundos para cada latência de fuga ao choque. Os animais foram submetidos à sessão de teste 24 h após a sessão de treino. O aumento do número de respostas de esquiva na sessão de teste em relação à sessão de treino foi tomado como medida de memória de esquiva (Pereira et al., 1988). A aquisição da resposta de fuga ao choque foi avaliada dentro da mesma sessão, através da comparação das latências de fuga ao choque entre o terceiro e o primeiro bloco de dez tentativas. Os cruzamentos interprova realizados pelo animal foram interpretados como resposta locomotora sob situação aversiva.

II.2.3.2. Em ratos adultos

Para a avaliação comportamental dos ratos expostos no período perinatal ao chumbo, desde a concepção até o desmame e que permaneceram submetidos ao mesmo tratamento com acetato de chumbo administrado a suas mães até 6 meses de idade, foi empregada a tarefa de aprendizado latente em um labirinto. Para este protocolo de estudo comportamental foram utilizados os grupos: controle, 0,5, 1,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo. Somente ratas fêmeas com 170 a 180 dias de idade foram utilizadas. Os experimentos foram realizados entre 09:00 e 16:00 h.

Tarefa comportamental: foram realizadas três sessões de treino em 3 dias consecutivos, seguidas da sessão teste no labirinto. Cada sessão teve a duração de 10 minutos e durante este tempo permitia-se que as ratas explorassem a caixa de campo aberto (controle) ou o labirinto. Ambos mediam 91 X 52 X 28 cm e seus assoalhos eram divididos em 28 quadrados que mediam 12 X 12 cm. O labirinto tinha quatro pontos de escolha, conforme mostrado na **Figura II.1**. No canto direito superior do labirinto, foi colocado um recipiente plástico translúcido de 5 cm de diâmetro, contendo 50g de ração comercial para ratos. A caixa de campo aberto tinha o recipiente de ração comercial colocado em local equivalente ao do labirinto. Foram registrados o número de respostas de orientação ("rearings" - elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco do rato) e o número de respostas de cruzamento realizados pelo animal.

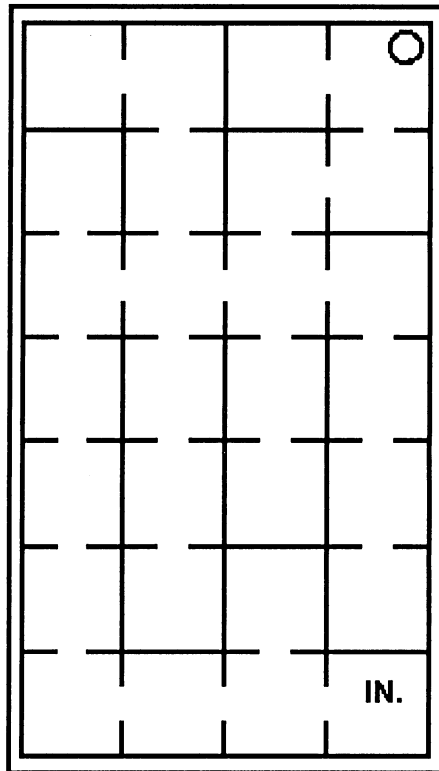


Figura II.1. Representação esquemática do labirinto utilizado para a tarefa de aprendizado latente. IN indica o local de início da tarefa (ponto de partida) e o círculo representa o ponto de chegada, onde estava colocado o recipiente de comida.

No final da terceira sessão de treino no campo aberto ou no labirinto, os ratos foram submetidos a uma deprivação de alimento por 48 horas. Após este período, todas as ratas foram submetidas a uma sessão no labirinto. Foram contados os números de erros efetuados, bem como a latência para tocar o recipiente de comida. Foi considerado erro quando o animal atravessava um quadrado na direção errada ou quando uma pata era retirada da direção correta (Mello et al., 1989).

II.2.4. Análise estatística

A ninhada foi considerada a unidade experimental em todas as análises estatísticas efetuadas (Abbey & Howard, 1973). Os resultados do campo aberto (respostas de orientação, cruzamento e defecação) e as respostas de esquiva ativa e de cruzamentos interprova dos ratos jovens foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias (4 grupos experimentais - 0; 0,5; 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo X 2 sessões) com a sessão considerada como medida repetida. A fim de atingir os requisitos

para uma análise de variância, os resultados de defecação e de cruzamentos interprova foram submetidos a transformação de raiz quadrada. Foi utilizado o teste do raio múltiplo de Duncan como teste *post-hoc* para efeito simples ou para efeito da interação, conforme o resultado da ANOVA, quando apropriado. Os resultados de latência de fuga ao choque não mostraram homogeneidade de variância através do teste de Bartlett. Desta forma, as comparações entre os grupos no que diz respeito aos resultados de latência de fuga ao choque foram feitas através do teste de análise de variância de Kruskal Wallis (não paramétrico). Com a finalidade de avaliar a aquisição do aprendizado de fuga ao choque na sessão treino ou teste, as comparações foram feitas dentro do mesmo grupo, considerando o primeiro e o último bloco de dez tentativas na mesma sessão, através do teste de Wilcoxon. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$. Os resultados da ANOVA estão fornecidos no texto quando este nível de significância foi atingido.

A análise estatística dos resultados da sessão treino dos ratos de 6 meses de idade foi feita através de uma ANOVA de duas vias (4 grupos experimentais - 0; 0,5; 1,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo X 3 sessões) com a sessão considerada como medida repetida. Os dados de campo aberto e do labirinto foram analisados separadamente. Os resultados da sessão teste foram analisados através de uma ANOVA de duas vias (4 tratamentos com chumbo - 0; 0,5; 1,0 e 4,0 mM X 2 tipos de exposição prévia: campo aberto ou labirinto). Foi utilizado o teste do raio múltiplo de Duncan como teste *post-hoc* para efeito simples ou para efeito da interação, conforme o resultado da ANOVA.

II.3.RESULTADOS

II.3.1. Efeito da exposição perinatal ao chumbo sobre o comportamento de ratos jovens.

II.3.1.1.Habituação ao campo Aberto

Os resultados do número de respostas de orientação e número de cruzamentos registrados durante 6 min de duração das sessões são mostrados na **Figura II.2 e II.3.** A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida do número de respostas de orientação no campo aberto (**Figura II.2.**) demonstrou um efeito significativo do tratamento [$F(3,30) = 0,05$, $p < 0,01$] e da interação tratamento X sessões [$F(3,30) = 7,36$, $p < 0,01$]. Não houve efeito significativo da sessão. A análise *post-hoc* da interação pelo teste do raio múltiplo de Duncan indicou que os ratos do grupo controle

apresentaram uma redução significativa no número de respostas de orientação durante a sessão teste, quando comparado à sessão treino no campo aberto. Esta redução foi cerca de 40%. Por outro lado, os ratos expostos ao chumbo não apresentaram este padrão de resposta. Isto indica que somente os ratos controle tiveram memória de habituação.

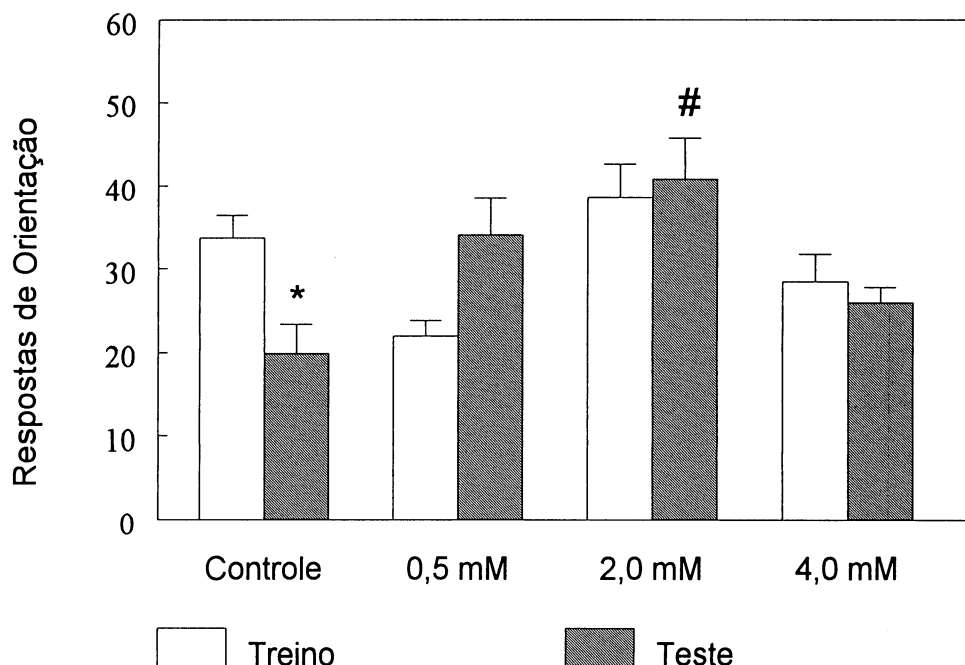


Figura II.2. Respostas de orientação de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 9 ninhadas para o grupo controle, 8 ninhadas para o grupo 0,5 mM, 7 ninhadas para o grupo 2,0 mM e 10 ninhadas para o grupo 4,0 mM.

* $p < 0,05$ comparando as respostas no teste com as respostas no treino, dentro do mesmo grupo;
 # $p < 0,01$ quando comparado à sessão teste do grupo controle.

A análise de variância de duas vias das respostas de cruzamento (Figura II.3.) revelou efeitos significativos da sessão [$F(1,30) = 37,38, p < 0,01$] e da interação tratamento X sessões [$F(3,30) = 6,87, p < 0,01$] ($p < 0,01$). Não houve efeito significativo do tratamento. A análise *post-hoc* da interação mostrou que todos os grupos expostos ao chumbo tiveram um aumento dos escores de cruzamento durante a sessão teste, comparado à sessão treino no campo aberto ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$, conforme o grupo). Entretanto, os ratos do grupo controle não tiveram alteração na ambulação entre as sessões treino e teste. Além disto, nenhuma diferença ocorreu na sessão treino entre os grupos,

enquanto na sessão teste todos os grupos expostos ao chumbo exibiram maior ambulação comparado ao grupo controle.

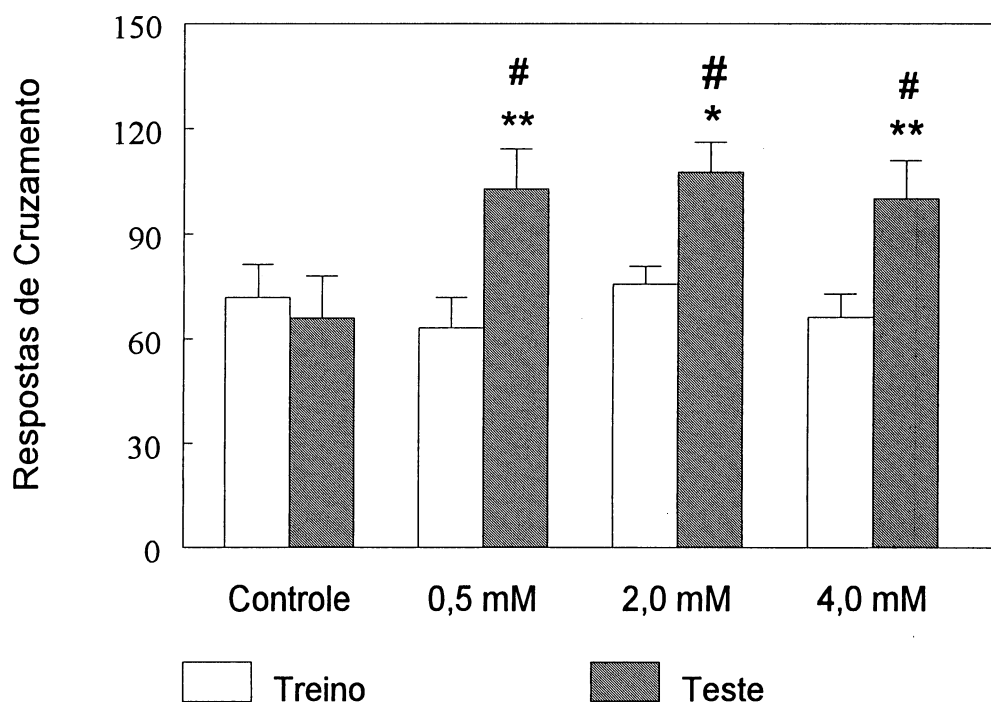


Figura II.3. Respostas de cruzamento de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 9 ninhadas para o grupo controle, 8 ninhadas para o grupo 0,5 mM, 7 ninhadas para o grupo 2,0 mM e 10 ninhadas para o grupo 4,0 mM.

* $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ comparando as respostas no teste com as respostas no treino, dentro do mesmo grupo; # $p < 0,01$ quando comparado à sessão teste do grupo controle.

Os resultados de defecação foram transformados em raiz quadrada para serem analisados estatisticamente. No entanto, com a finalidade de facilitar a visualização dos dados eles estão representados em valores não transformados na **Figura II.4**. A análise de variância dos dados transformados mostrou que não houve diferenças significativas do tratamento ou da interação tratamento X sessões. Somente foi verificado um efeito significativo das sessões [$F(1,30) = 5,21$, $p < 0,05$], porque na sessão teste o número de bolos fecais de todos os grupos foi menor quando comparado ao grupo controle.

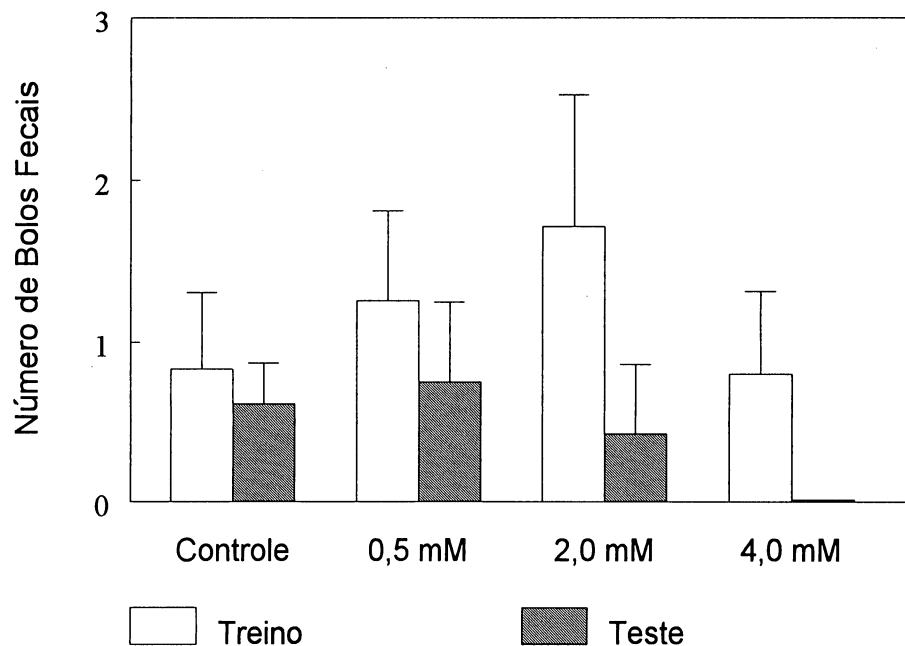


Figura II.4. Defecação de ratos jovens expostos ao chumbo no campo aberto. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 9 ninhadas para o grupo controle, 8 ninhadas para o grupo 0,5 mM, 7 ninhadas para o grupo 2,0 mM e 10 ninhadas para o grupo 4,0 mM. Não foram observadas diferenças significativas do tratamento com chumbo pela ANOVA de duas vias que considerou a sessão como medida repetida.

II.3.1.2. Esquiva ativa

Durante cada sessão de esquiva ativa foi avaliado simultaneamente o comportamento de fuga ao choque e as respostas de esquiva e de cruzamentos interprova realizados pelos animais.

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida das respostas de esquiva (Figura II.5.) mostrou uma tendência de diferença do tratamento [$F(3,30)=2,47$, $p = 0,08$]. Houve um efeito significativo das sessões [$F(1,30) = 9,75$, $p<0,01$], mas não houve um efeito significativo da interação tratamento X sessões. A comparação *post-hoc* dentro do mesmo grupo mostrou que somente o grupo controle apresentou um aumento no número de respostas de esquiva na sessão teste, comparado à sessão treino (Figura II.5.).

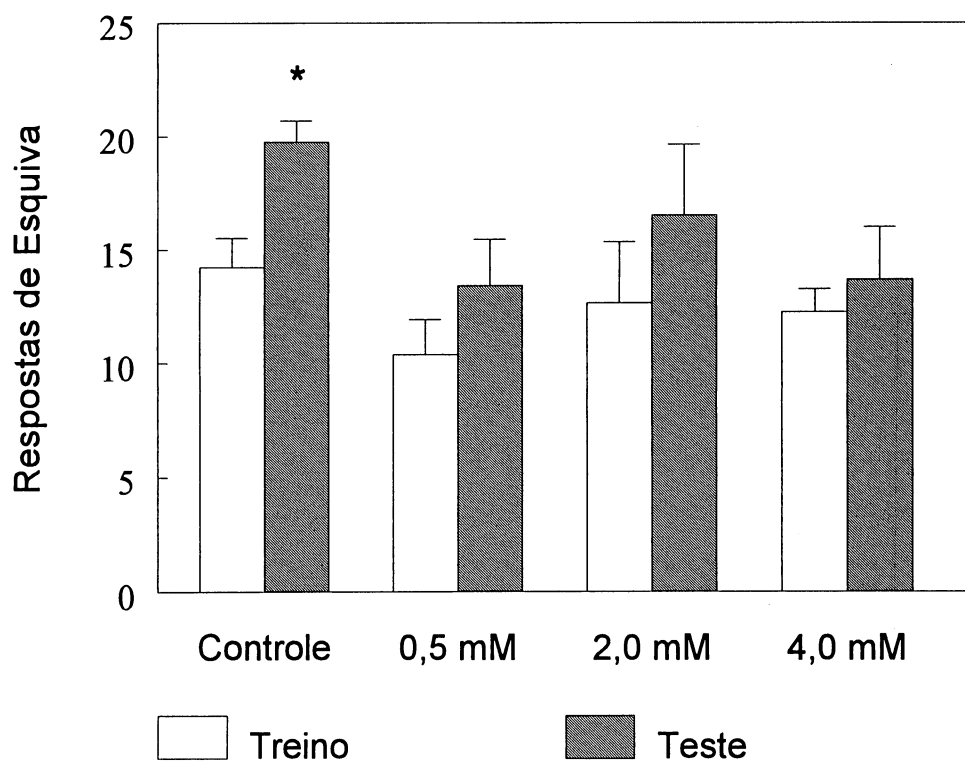


Figura II.5. Respostas de esquiva na tarefa de esquiva ativa de duas vias de ratos de 28 dias de idade expostos ao chumbo. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 10 ninhadas para o grupo controle, 8 ninhadas para o grupo 0,5 mM, 6 ninhadas para o grupo 2,0 mM e 10 ninhadas para o grupo 4,0 mM.

* $p < 0,05$ comparando as respostas no teste com as respostas no treino, dentro do mesmo grupo.

A análise de variância de duas vias dos resultados de cruzamentos interprova submetidos a uma transformação de raiz quadrada não demonstrou diferenças significativas do tratamento, sessão ou interação tratamento X sessões. A **Figura II.6.** mostra os valores de cruzamento interprova (CIP) não transformados.

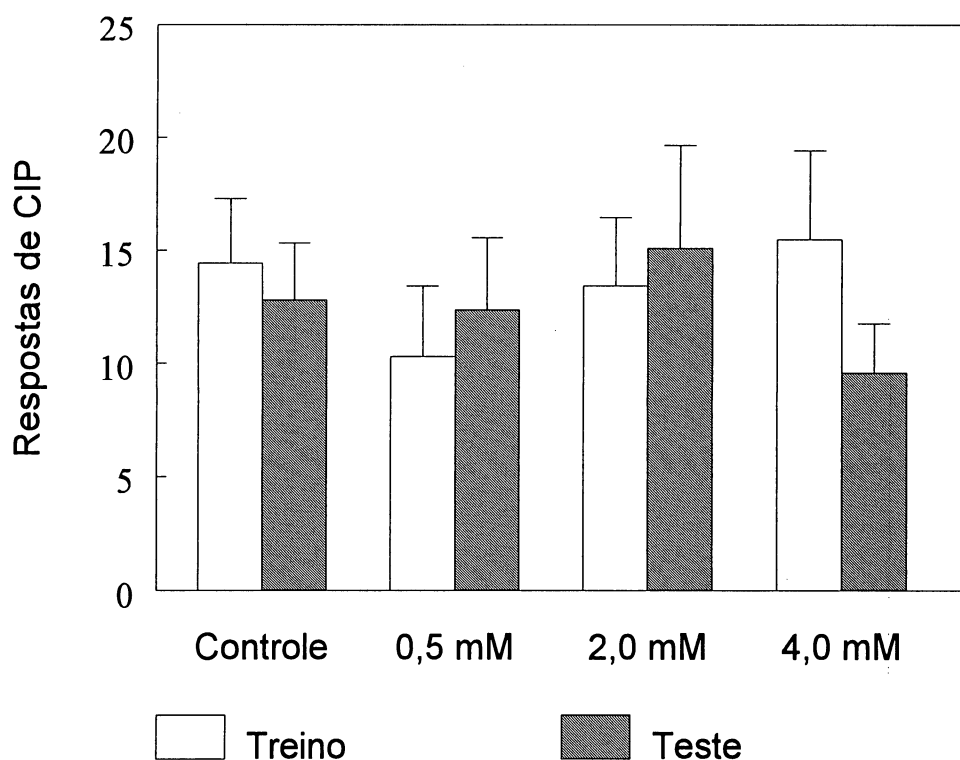


Figura II.6. Respostas de cruzamentos interprova (CIP) de ratos de 28 dias de idade expostos ao chumbo, na tarefa de esquiva ativa de duas vias. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 10 ninhadas para o grupo controle, 8 ninhadas para o grupo 0,5 mM, 6 ninhadas para o grupo 2,0 mM e 10 ninhadas para o grupo 4,0 mM. Não foram observadas diferenças significativas do tratamento com chumbo pela ANOVA de duas vias que considerou a sessão como medida repetida.

Os resultados de latência das respostas de fuga ao choque (**Tabela II.1.**) revelaram que apenas o grupo controle mostrou um aprendizado de fuga ao choque significativo na sessão teste, uma vez que a latência de fuga no terceiro bloco de 10 tentativas foi significativamente menor do que a latência de fuga no primeiro bloco de 10 tentativas na mesma sessão ($p=0,01$).

Tabela II.1. Latência de fuga ao choque em ratos de 28 dias expostos ao acetato de chumbo.

	Bloco de Dez Tentativas								
	n	Sessão Treino			p	Sessão Teste			
		1	2	3		1	2	3	p
CONTROLE	10	5,6 (2,2/8,6)	2,0 (1,3/8,9)	1,2 (0,7/5,9)	0,17	4,0 (2,2/7,3)	2,0 (1,2/2,8)	1,0 (0,6/2,3)	* 0,01
0,5 mM Pb	8	6,9 (3,7/21,0)	9,6 (4,8/22,5)	4,7 (3,8/20,5)	0,40	2,7 (1,6/14,0)	2,8 (1,1/13,0)	3,0 (0,8/11,0)	0,33
2,0 mM Pb	6	5,8 (4,3/12,1)	8,3 (2,9/11,6)	5,6 (1,5/11,2)	0,75	5,2 (1,6/7,7)	1,9 (0,9/2,1)	1,2 (0,7/2,8)	0,22
4,0 mM Pb	9	6,1 (2,1/ 13,0)	5,9 (1,1/11,4)	3,2 (1,3/9,8)	0,11	2,9 (1,4/7,8)	1,5 (0,8/12,0)	1,5 (0,5/4,1)	0,21

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo interquartil) por bloco de dez tentativas (1= primeiro bloco, 2 = segundo bloco, 3 = terceiro bloco) para as duas sessões (treino e teste). Não foram observadas diferenças entre os grupos em cada bloco de tentativas pela análise de variância Kruskal-Wallis. Os valores de p mostrados na tabela (Teste de Wilcoxon) foram obtidos comparando-se a latência de fuga ao choque no primeiro e no terceiro bloco de dez tentativas na mesma sessão.

II.3.2. Avaliação comportamental em ratos de seis meses de idade expostos ao acetato de chumbo desde a concepção

A análise do número de respostas de orientação dos ratos expostos ao campo aberto (Tabela II.2-A.) revelou um efeito significativo da sessão [$F(2,58) = 6,1, p < 0,005$] e um efeito significativo da interação tratamento X sessão [$F(6,58) = 3,3, p < 0,01$]. O teste *post-hoc* para efeito simples revelou que os animais que receberam 1,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo na água de beber modificaram seus escores ao longo das sessões [$F(2,58) = 10,35, p < 0,001$ e $F(2,58) = 3,30, p < 0,05$, respectivamente].

A análise do número de respostas de cruzamento dos ratos expostos ao campo aberto revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,32) = 4,26, p < 0,05$] e um efeito significativo da interação tratamento X sessão [$F(6,58) = 2,34, p < 0,05$]. O teste *post-hoc* para efeito simples revelou que os animais que receberam 1,0 mM e 4,0 mM de acetato de chumbo na água de beber apresentaram um maior locomoção do que os animais do grupo controle (Tabela II.2-B.). A análise *post-hoc* também demonstrou que o número de respostas de cruzamento diminuiu ao longo das sessões no grupo controle, enquanto que nos grupos expostos ao chumbo este efeito não foi observado [$F(2,58) = 3,49, p < 0,05$].

A análise do número de respostas de orientação dos ratos expostos ao labirinto revelou somente um efeito significativo da sessão [$F(2,60) = 21,24, p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que todos os grupos aumentaram seus escores de respostas de orientação ao longo das sessões (os valores de F estão mostrados na Tabela II.3.).

A análise do número de respostas de cruzamento dos ratos expostos ao labirinto revelou somente um efeito significativo da sessão [$F(2,60) = 20,35, p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que todos os grupos aumentaram seus escores de respostas de cruzamento ao longo das sessões (os valores de F estão mostrados na Tabela II.3.).

Tabela II.2. Respostas de orientação (A) e de cruzamento (B) dos ratos submetidos a três sessões no campo aberto.

	Sessão				Soma
	1	2	3		
A					
CONTROLE	29,5 ± 3,4	28,5 ± 3,6	28,6 ± 2,9	(11)	-
GRUPO 0,5 mM Pb	34,4 ± 4,2	33,7 ± 4,5	29,1 ± 3,6	(8)	-
GRUPO 1,0 mM Pb ^a	28,6 ± 4,5	44,9 ± 4,3	38,2 ± 4,9	(9)	-
GRUPO 4,0 mM Pb ^b	34,4 ± 3,6	44,8 ± 4,9	33,8 ± 3,2	(5)	-
B					
CONTROLE	216,6 ± 17,5	205,9 ± 18,2	182,3 ± 11,9		604,9 ± 42,8
GRUPO 0,5 mM Pb	237,3 ± 23,2	243,5 ± 20,6	237,3 ± 23,2		718,3 ± 63,5
GRUPO 1,0 mM Pb	251,1 ± 12,8	287,1 ± 9,2	250,5 ± 13,8		788,7 ± 27,8 *
GRUPO 4,0 mM Pb	262,6 ± 29,6	281,0 ± 25,8	299,0 ± 25,5		842,6 ± 75,2 *

Os dados estão expressos como média ± erro padrão. O número de ratos está indicado entre parênteses. A "soma" significa a soma das respostas de cruzamento nas sessões 1, 2 e 3.

(A) ^a F(2,58) = 10,35, p<0,001. ^b F(2,58) = 3,30, p<0,05.

(B) * p<0,05 em relação ao grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

Tabela II.3. Respostas de orientação (A) e de cruzamento (B) dos ratos submetidos a três sessões no labirinto.

	Sessão			
	1	2	3	
A				
CONTROLE ^a	25,6 ± 2,3	31,3 ± 3,0	35,1 ± 4,5	(10)
GRUPO 0,5 mM Pb ^b	26,8 ± 2,3	31,1 ± 2,7	36,5 ± 2,9	(7)
GRUPO 1,0 mM Pb ^c	29,1 ± 2,1	35,1 ± 1,2	42,5 ± 3,2	(10)
GRUPO 4,0 mM Pb ^d	22,2 ± 2,6	28,8 ± 2,1	35,0 ± 3,2	(7)
B				
CONTROLE ^e	194,3 ± 11,9	231,3 ± 24,2	239,2 ± 26,1	
GRUPO 0,5 mM Pb ^f	182,0 ± 11,2	220,1 ± 7,5	244,5 ± 12,8	
GRUPO 1,0 mM Pb ^g	212,5 ± 14,0	248,7 ± 7,4	261,5 ± 11,1	
GRUPO 4,0 mM Pb ^h	207,0 ± 24,3	242,2 ± 30,8	286,7 ± 19,5	

Os dados estão expressos como média ± erro padrão. O número de ratos está indicado entre parênteses.

^a F(2,60) = 4,59, p<0,05. ^b F(2,60) = 3,33, p<0,05. ^c F(2,60) = 9,04, p<0,01. ^d F(2,60) = 5,68, p<0,05.

^e F(2,60) = 4,08, p<0,05. ^f F(2,60) = 4,93, p<0,05. ^g F(2,60) = 4,13, p<0,05. ^h F(2,60) = 7,94, p<0,01.

A análise da sessão teste mostrou um efeito significativo do tipo de exposição prévia à deprivação de alimento, ou seja, campo aberto ou labirinto, no número de erros [$F(1,59) = 44,86, p < 0,001$] e na latência para tocar o recipiente de comida [$F(1,59) = 42,28, p < 0,001$]. A exposição prévia ao labirinto reduziu tanto o número de erros como a latência para tocar o recipiente de comida (Figura II.7A. e II.7B., respectivamente). O tratamento com acetato de chumbo na água de beber não teve efeito no desempenho tanto dos grupos de aprendizado latente como dos grupos do campo aberto.

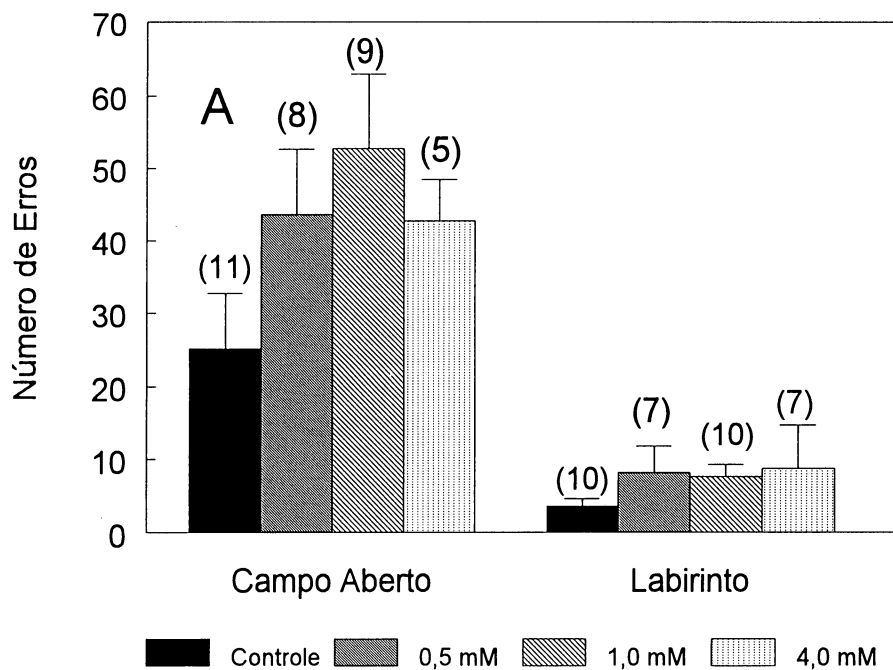


Figura II.7A. Aprendizagem latente de ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo avaliado através do número de erros. “Campo aberto” e “labirinto” referem-se à exposição prévia do animal. Os resultados estão expressos como média + erro padrão. O número de animais de cada grupo está indicado em parênteses. A análise estatística não revelou um efeito dos grupos, apenas houve um efeito da exposição prévia do animal (campo aberto ou labirinto).

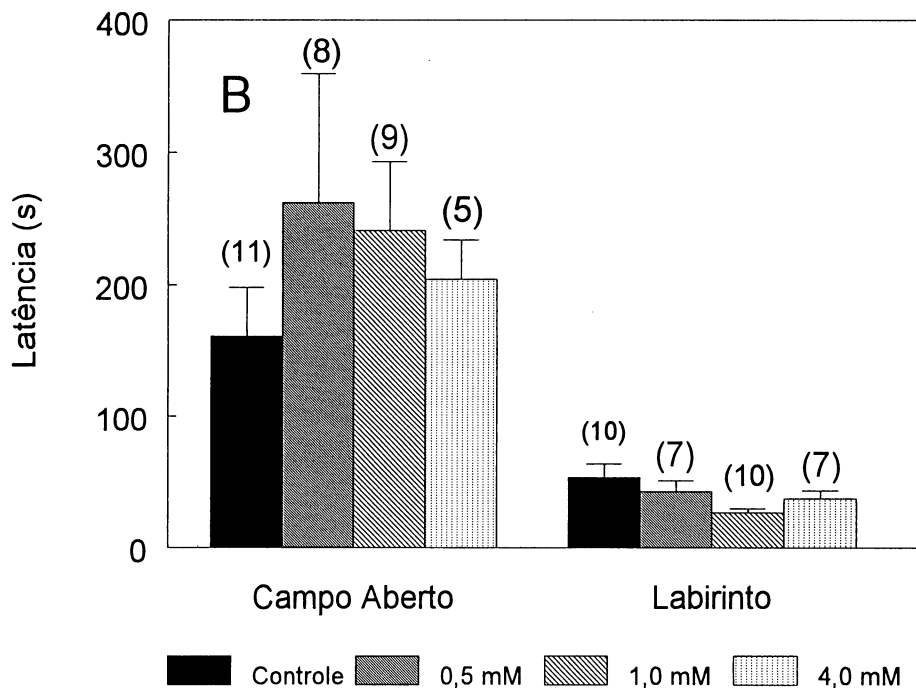


Figura II.7B. Aprendizagem latente de ratos de seis meses de idade expostos ao chumbo avaliado pela e latência para atingir o recipiente de comida. “Campo aberto” e “labirinto” referem-se à exposição prévia do animal. Os resultados estão expressos como média + erro padrão. O número de animais de cada grupo está indicado em parênteses. A análise estatística não revelou um efeito dos grupos, apenas houve um efeito da exposição prévia do animal (campo aberto ou labirinto).

II.4.DISCUSSÃO

II.4.1. Exposição perinatal ao chumbo até o desmame (campo aberto) ou até 28 dias de idade (esquiva ativa):

A tarefa do campo aberto permite uma expressão natural do comportamento do rato em um ambiente novo, presumivelmente não aversivo. Nesta tarefa os ratos apresentam um comportamento exploratório que consiste em atividade locomotora (ambulação), respostas de orientação e defecação. A habituação a um ambiente novo se expressa pela redução de tais atividades sob exposição repetida ao mesmo ambiente (O’Keefe & Nadel, 1978). As respostas de orientação parecem ser um melhor parâmetro para avaliar a atividade exploratória, uma vez que esta parece ser menos confundida com outras expressões comportamentais (Frankova & Barnes, 1968; Netto et al., 1986;

Rotta et al., 1988). Nossos resultados com os ratos de 21 dias de idade submetidos ao campo aberto corroboram esta afirmação, uma vez que os animais do grupo controle mostraram uma redução do número de respostas de orientação (**Figura II.2.**) mas não de cruzamentos (**Figura II.3.**) na sessão teste em relação à sessão treino. Os ratos expostos ao chumbo não tiveram memória de habituação. Tem sido demonstrado que a memória de habituação no campo aberto é processada pelo hipocampo (Izquierdo, 1994). Acredita-se que esta estrutura seja um dos principais alvos da ação neurotóxica do chumbo no SNC (Stoltenburg-Didinger, 1994).

O padrão de atividade locomotora dos ratos expostos ao acetato de chumbo durante a vida pré-natal e lactação diferiu significativamente do apresentado pelo grupo controle. No treino, a atividade locomotora dos ratos expostos ao chumbo não diferiu significativamente dos ratos não expostos a este metal. Contudo, na sessão teste, os animais controle apresentaram escores de cruzamentos similares aos do treino, enquanto que os animais expostos ao chumbo foram mais ativos (**Figura II.3.**). Portanto, em nosso modelo experimental de intoxicação pelo chumbo, a hiperatividade somente foi expressa na segunda sessão dos ratos no campo aberto. Isto deve ser ressaltado, uma vez que muitos trabalhos na literatura utilizam apenas uma sessão de exposição dos animais ao campo aberto ou expressam a média da ambulação de várias sessões (Jason & Kelog, 1981; Munoz et al., 1989). Caso este tivesse sido o procedimento adotado neste trabalho, nenhuma alteração na atividade locomotora seria relatada. Desta forma, os nossos resultados demonstram a importância de considerar alterações na atividade locomotora ao longo do tempo e podem contribuir para explicar algumas das discrepâncias sobre os efeitos do chumbo na atividade locomotora de roedores que existe na literatura (Sauerhoff & Michaelson, 1973; Grant et al., 1980; Dolinsky et al., 1983; Barret & Livesey, 1985; Munoz et al., 1989). Além disto, os resultados no campo aberto contradizem a afirmativa de que a hiperatividade está apenas associada com a perda de peso induzida pelo tratamento com chumbo em roedores (Munoz et al., 1989), uma vez que os tratamentos impostos no presente estudo não causaram alterações no peso corporal dos animais, conforme mostrado no Capítulo I (**Tabela I.4.**) .

Os resultados contraditórios a cerca dos efeitos do metal sobre locomoção poderiam ser devido à utilização de diferentes protocolos de exposição dos animais experimentais ao chumbo e da análise comportamental usada. Os níveis de atividade locomotora podem ser influenciados por muitas variáveis, tais como: idade, sexo, horário da tarefa, novidade do ambiente, estresse e privação de alimento (Barret & Livesey, 1985; Davis et al., 1990).

Na verdade, os nossos resultados no campo aberto (Figuras II.2., II.3. e II.4.) são similares àqueles observados em animais com lesão hipocampal (O'Keefe & Nadel, 1978) e ao estudo de Ferguson & Bowman (1990), o qual analisou os efeitos do tratamento com chumbo sobre o comportamento de macacos no campo aberto. Nestes estudos, os animais apresentaram aumento de atividade locomotora, déficit de habituação e não tiveram alterações quanto à defecação.

Existem muitos estudos na literatura que tratam a respeito do efeito do chumbo sobre o comportamento de roedores, mas estudos utilizando a tarefa de esquiva ativa são escassos (Alfano & Petit, 1981; Winneke et al. , 1982; Altmann et al., 1993). No presente trabalho não foi evidenciado uma alteração na aquisição das respostas de esquiva (Figura II.5.). Contudo, os resultados sugerem um efeito do chumbo sobre a retenção na tarefa de esquiva, especialmente no que concerne ao grupo de ratos expostos a concentração mais elevada de chumbo (grupo 4,0 mM). Desta forma, embora o tratamento com o chumbo não tenha afetado a aquisição da esquiva, ele causou diminuição na memória. Este resultado contradiz os dois primeiros estudos citados acima, nos quais o chumbo não causou efeito sobre a tarefa (Alfano & Petit, 1981) ou até mesmo causou facilitação (Winneke et al, 1982). Contudo, se tentarmos comparar nosso estudo com o de Alfano & Petit, verificaremos os seguintes aspectos diferentes aos do presente estudo: a) o tratamento com chumbo foi realizado somente no período lactacional; b) a concentração de chumbo empregada era muito elevada; c) a tarefa de esquiva ativa foi realizada na vida adulta (150 dias de idade), o qual pode ter levado a uma recuperação da função comportamental e/ou um efeito da idade; d) o procedimento comportamental usado e ainda, e) a ausência de determinações de chumbo nos tecidos naquele estudo. Em relação ao estudo de Altmann et al. (1993), encontramos alguma similaridade de resultado. No referido trabalho os autores demonstraram que ratos expostos cronicamente ao chumbo desde a concepção até o desmame ou desde a concepção até a idade adulta (70 a 210 dias) e submetidos ao treino da tarefa de esquiva ativa na idade adulta, apresentaram uma diminuição no número de respostas de esquiva no segundo dia de teste comparado ao grupo controle. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com as observações de Altmann et al. (1993). Deve-se considerar, entretanto, que existem algumas diferenças metodológicas entre os dois trabalhos, como a idade dos animais no momento da realização da tarefa comportamental, intensidade do choque (1 mA X 0,4 mA no nosso estudo). O estudo de Altmann et al. (1993) relatou um comprometimento na tarefa de esquiva ativa em ratos expostos ao chumbo no período perinatal submetidos à tarefa comportamental na idade adulta.

Na esquiwa ativa, também foi medido o comportamento de fuga ao choque dos ratos tratados, uma vez que em um estudo prévio desenvolvido por Rocha & Vendite (1990), mostrou-se que ratos jovens aprendem simultaneamente respostas de esquiwa e de fuga ao choque. Os resultados demonstraram que somente os ratos do grupo controle apresentaram um aprendizado significativo da tarefa durante a sessão teste, evidenciado pela diminuição da latência da resposta de fuga ao choque no terceiro bloco de 10 tentativas, comparado ao primeiro (**Tabela II.1.**). Todavia, uma grande variabilidade nas respostas de fuga ao choque que ocorreu em todos os grupos experimentais pode ter evitado a observação de uma diferença significativa nesta resposta nos animais expostos ao chumbo. Desta forma, a conclusão de que o tratamento com acetato de chumbo pode afetar o comportamento de fuga ao choque dos animais deve ser vista com cuidado. Este resultado, contudo, não seria surpreendente, pois alguns estudos tem mostrado que a exposição de ratos ao chumbo afeta a sensibilidade dos animais a estímulos dolorosos (Kitchen, 1993). Este resultado merece investigação futura.

Na esquiwa ativa foi avaliado paralelamente às duas respostas citadas anteriormente, também a atividade locomotora dos animais, expressa pelo número de cruzamentos interprova efetuados na sessão treino e na sessão teste. Este parâmetro não foi significativamente afetado pelo tratamento dos ratos com o chumbo (**Figura II.6.**). Este resultado está de acordo com o estudo de Altmann et al. (1993), o qual também trabalhou com esquiwa ativa em ratos expostos a baixas doses de chumbo no período perinatal. Contudo, foi demonstrado que ratos Wistar machos tratados com chumbo durante a lactação apresentaram uma hiperatividade na tarefa do campo aberto, quando submetidos ao barulho como agente estressante (Barret & Livesey, 1985). Nossos resultados na caixa de esquiwa ativa não demonstraram, entretanto, hiperatividade expressa pelo número de cruzamentos interprova, pelo menos quando o agente causador de estresse era o choque elétrico nas patas. Nossos resultados indicam que a hiperatividade em ratos expostos ao chumbo não está associada necessariamente a situações aversivas ou estressantes.

II.4.2. Exposição a chumbo desde a concepção até a idade de seis meses

Neste estudo o principal objetivo era verificar o desempenho de ratos expostos cronicamente ao chumbo em uma tarefa de aprendizado latente, comparado a ratos controle.

Durante as sessões de treino, as ratas expostas ao chumbo apresentaram maior atividade locomotora no campo aberto do que os animais controle. Além disto, o grupo

controle teve um decréscimo de atividade ao longo das sessões, diferentemente dos animais tratados com chumbo. Entretanto, o tratamento com o metal não teve efeito sobre os escores de atividade dos animais expostos ao labirinto.

Estes resultados indicam que o tratamento prolongado com chumbo provocou uma hiperatividade no campo aberto, assim como foi observado nos ratos jovens expostos perinatalmente ao chumbo. Além disto, houve um déficit de habituação no campo aberto, também já constatado nos ratos jovens.

Os resultados comportamentais com os ratos de 6 meses demonstra que tanto os animais tratados com acetato de chumbo, como os animais não tratados foram capazes de aprender sobre o ambiente quando nenhum reforço imediato estava presente. Isto foi evidenciado pelo fato que durante a sessão de teste, os ratos expostos ou não ao chumbo que tiveram experiência prévia no campo aberto fizeram mais erros e tiveram maior latência para atingir o recipiente de comida do que os animais previamente expostos ao labirinto. Contudo, os ratos expostos ou não ao chumbo que tiveram experiência prévia no labirinto, não tiveram diferenças de desempenho na sessão teste, ou seja, tiveram aprendizado latente semelhante.

Foi relatado na literatura comprometimento na aquisição no labirinto radial de 8 braços em ratos intoxicados com chumbo (Alfano & Petit, 1981; Munoz et al., 1988), de forma semelhante ao observado em animais com lesão hipocampal (Alfano & Petit, 1981). No presente estudo, entretanto, os ratos não tiveram que visitar uma seqüência de braços para ter um bom desempenho no teste. Eles apenas tiveram que lembrar a localização do recipiente de comida. Sendo assim, é possível que diferenças quanto os requisitos das tarefas sejam responsáveis pela falta de efeito do tratamento com chumbo aqui observada.

Em relação à falta de efeito do tratamento com chumbo nos animais sobre o aprendizado latente, devemos considerar ainda as seguintes possibilidades:

a) a maior atividade locomotora apresentada pelos animais expostos ao chumbo pode ter desempenhado um papel compensatório na sessão de teste e mascarado um eventual déficit de aprendizado. Considerando que os animais expostos ao chumbo tiveram um maior número de escores de exploração do que os animais do grupo controle, é possível que eles tenham sido capazes de aprender mais sobre o ambiente durante o mesmo tempo de exposição ao aparato. Esta possibilidade, entretanto, parece improvável, pois foi demonstrado que a cafeína, uma droga que aumenta a locomoção e o comportamento exploratório, não tem efeito sobre o aprendizado latente em ratos (Oliveira et al., 1990). Além disto, as diferenças observadas na exploração ocorreram somente nos

animais do grupo pré-exposto ao campo aberto. Desta forma, se os animais foram capazes de ter informações adicionais durante as sessões de treino, isto seria de valor limitado nas sessões teste, quando todos os animais foram testados no labirinto.

b) o labirinto utilizado tinha quatro pontos de escolha, o que pode não ter sido de complexidade suficiente para detectar um déficit sutil de aprendizado causado pelo tratamento com acetato de chumbo. Foi demonstrado que animais desnutridos apresentaram aprendizado latente em um labirinto simples (Mello et al., 1989), mas comprometimentos de desempenho neste tipo de tarefa foram mostrados em labirintos que possuíam padrões mais complexos (Katz et al., 1979). Portanto, é possível que fossem detectadas diferenças entre grupos se um labirinto mais complexo tivesse sido usado.

c) há uma falta de efeito do chumbo sobre o aprendizado latente dos ratos, pois o protocolo de exposição ao chumbo empregado não foi suficiente para causar um déficit nesta tarefa. O fato de os animais tratados com chumbo não terem apresentado déficits grosseiros de desenvolvimento, o que pode ser evidenciado pela ausência de perda de peso entre os grupos (Tabela 1.5.), corrobora esta hipótese.

Em resumo, a exposição a baixas doses de acetato de chumbo produziu alterações comportamentais em ratos jovens e adultos. Em ratos jovens houve déficit de habituação no campo aberto, déficit de retenção na esQUIVA ativa e um aparente comprometimento na aquisição da resposta de fuga ao choque na caixa de esQUIVA. Também foi observado um aumento da atividade locomotora no campo aberto, mas não na tarefa de esQUIVA ativa. Estas alterações comportamentais ocorreram em animais que apresentaram concentrações de chumbo no sangue e no cérebro relativamente baixas, ou seja, um acúmulo de chumbo de cerca de três vezes no cérebro e níveis de chumbo sanguíneo na faixa de 11-50 µg/dl. Estes níveis de chumbo sanguíneo são atingidos em crianças (Davis et al., 1990), sendo portanto de relevância toxicológica, conforme mencionado no Capítulo I. Além disto, estas alterações comportamentais ocorreram em animais que não apresentaram sinais visíveis de toxicidade e desnutrição (Capítulo I). Nos ratos adultos de 6 meses de idade expostos cronicamente ao chumbo desde a fase pré-natal foi observado déficit de habituação no campo aberto e hiperatividade. No entanto, os ratos adultos parecem ser mais resistentes à ação do chumbo, uma vez que não foi detectado um déficit de aprendizado latente.

CAPÍTULO III - ESTUDO DE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM RATOS

III.1.INTRODUÇÃO

Embora o chumbo seja um dos agentes neurotóxicos mais estudados, o efeito da exposição a este metal em animais experimentais sobre vários parâmetros neuroquímicos, e os mecanismos moleculares responsáveis por sua toxicidade no SNC, não se encontram bem estabelecidos (Silbergeld, 1992; Cory-Slechta, 1995^a). Em princípio, toda proteína possuidora de grupamentos sulfidríla (-SH) é um alvo em potencial para a ação do chumbo (Vallee & Ulmer, 1972). Contudo, não apenas este fator determina que uma proteína terá sua função afetada por metais pesados como o chumbo. Outros fatores, tais como competição com outros ligantes, a conformação protéica, as taxas de síntese e degradação protéica e a localização intracelular da proteína e do metal também devem ser considerados em se tratando da neurotoxicidade causada por esse metal (Goering, 1993). Foi proposto que entre os possíveis sítios de ação neurotóxica para metais pesados como o chumbo estariam receptores e enzimas envolvidas na transdução do sinal, proteínas G, proteínas quinase C e canais de cálcio (Rossi et al., 1991).

O chumbo causa várias alterações comportamentais e neuroquímicas em animais experimentais. Dentre as alterações neuroquímicas associadas à exposição a este metal estão o aumento da liberação espontânea de neurotransmissores (Minnema et al., 1988), ativação da calmodulina (Sandhir & Gill, 1994), alteração da atividade das enzimas adenilato ciclase (Nathanson & Bloom, 1975; Ewers & Erbe, 1980; Sandhir & Gill, 1994), óxido nítrico sintase (Quinn & Harris, 1995) e da proteína quinase C (Markovac & Goldstein, 1988; Murakami et al., 1993), lipoperoxidação de lipídeos da membrana (Sandhir et al., 1994) e alterações em vários sistemas de neurotransmissão, tais como sistemas dopaminérgico, adrenérgico, colinérgico, gabaérgico, opióide e glutamatérgico (Lucchi et al., 1981; Minnema et al., 1988; Rossouw et al., 1987; Drew et al., 1989; Kitchen, 1993; Cory-Slechta, 1995^a).

Assim sendo, provavelmente o chumbo exerce seu efeito neurotóxico em múltiplos sítios celulares (Pounds & Cory-Slechta, 1993) e tem-se procurado estudar estas

ações como parte da tentativa de desvendar os mecanismos que respondem pela neurotoxicidade deste metal.

Neste capítulo será dada especial atenção ao sistema de neurotransmissão glutamatérgica e à enzima adenilato ciclase, os quais são objeto de estudo deste trabalho quanto às ações do chumbo no SNC.

III.1.1. O glutamato como neurotransmissor

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, apresentando ampla distribuição no SNC, em concentrações maiores do que qualquer outro aminoácido (Fonnum, 1984; Nicholls, 1993; Greenamyre & Porter, 1994; Cotman et al., 1995).

Os estudos sobre o papel do glutamato no cérebro iniciaram-se na década de 30, quando Krebs (1935) sugeriu que o glutamato desempenhasse um papel importante neste tecido (Fonnum, 1984). Em 1950 foi apontado seu papel como precursor do ácido γ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório (Roberts & Frankel, 1950), bem como sua função na detoxificação da amônia no cérebro (Weil-Malharbe, 1950). Posteriormente Lucas & Newhouse (1957) observaram que o glutamato poderia ser neurotóxico em retina de camundongos, após administração parenteral. Estudos eletrofisiológicos realizados por Curtis & Watkins em 1961 demonstraram a ação excitatória do glutamato em neurônios da medula espinhal, sugerindo sua ação como neurotransmissor. Estudos subseqüentes na década de 1970 forneceram evidências de que este aminoácido realmente era um neurotransmissor. Além disto, foi apontado por Meister (1979) o papel do glutamato na síntese de proteínas e peptídeos, incluindo a glutatona (Fonnum, 1984). Atualmente, o glutamato além de ser reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC envolvido com a transmissão sináptica rápida, também é considerado essencial nos fenômenos de plasticidade neuronal e nos fenômenos de aprendizado e memória (Collingridge & Singer, 1991; McEntee & Crook, 1993; Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1995). A neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel importante nas funções cognitivas corticais e hipocámpais, na função motora piramidal e extrapiramidal, na função cerebelar e na função sensorial (Headley & Grillner, 1990). Por outro lado, o glutamato também está envolvido no fenômeno da neurotoxicidade, em situações nas quais há uma estimulação excessiva de seus receptores, tais como isquemia cerebral, hipóxia, hipoglicemia e epilepsia (Meldrum & Garthwaite, 1991; Lipton & Rosenberg, 1994; Nakanishi & Masu, 1994). O glutamato também exerce um papel na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, tais como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington (Rothman & Olney, 1986; Beal, 1992;

Lipton & Rosenberg, 1994). Os mecanismos precisos através dos quais a ativação excessiva dos receptores para aminoácidos excitatórios produz morte neuronal não estão bem compreendidos, embora o aumento da permeabilidade da membrana e o influxo anormal de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} desempenhem papéis importantes (Olney, 1994).

O sistema de neurotransmissão glutamatérgica está organizado em um alto grau de sofisticação. Inicialmente, os primeiros receptores glutamatérgicos estudados estavam associados a fluxos iônico através de canais (ionotrópicos) e eram classificados farmacologicamente de acordo com o agonista que produzia a resposta excitatória em: NMDA (N-metil-D-aspartato), quisqualato e cainato (Watkins & Evans, 1981; Foster & Fagg, 1984). Posteriormente, verificou-se que o quisqualato além de ativar um receptor ionotrópico também ativava um receptor acoplado à proteína G e que existia um agonista mais potente para sua ação ionotrópica que era o AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) (Bettler & Mulle, 1995). Sendo assim, o até então denominado receptor quisqualato passou a receber a denominação AMPA. Novos agonistas que exercem sua ação despolarizante via proteína G foram identificados e os receptores glutamatérgicos passaram a ser sistematicamente classificados em ionotrópicos e metabotrópicos (mGluRs). Desta forma, os receptores ionotrópicos estão associados a fluxos de cátions através de um canal iônico (NMDA, AMPA e cainato) e os metabotrópicos estão acoplados a proteínas G (quisqualato, ACPD e L-AP4) (Hollmann & Heinemann, 1994) (Figura III.1.). Os receptores ionotrópicos são permeáveis a Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Bettler & Mulle, 1995; Cotman et al., 1995). Os receptores metabotrópicos modulam a atividade de enzimas que produzem segundos mensageiros. Estas enzimas (efetores) incluem a fosfolipase C, a adenilato ciclase e a fosfolipase A2. Estes receptores estão, portanto, ligados à hidrólise de fosfatidilinositol, à produção de AMPc e à liberação de ácido araquidônico. Eles também ativam ou inibem canais iônicos, tais como os canais de cálcio sensíveis à voltagem e os canais de potássio. Além disto, eles modulam a atividade de canais iônicos, tais como GABA-A, AMPA e NMDA. A ativação dos mGluRs pode, desta forma, modular a neurotransmissão glutamatérgica no cérebro (Schoepp & Conn, 1993; Pin & Bockaert, 1995; Pin & Duvoisin, 1995).

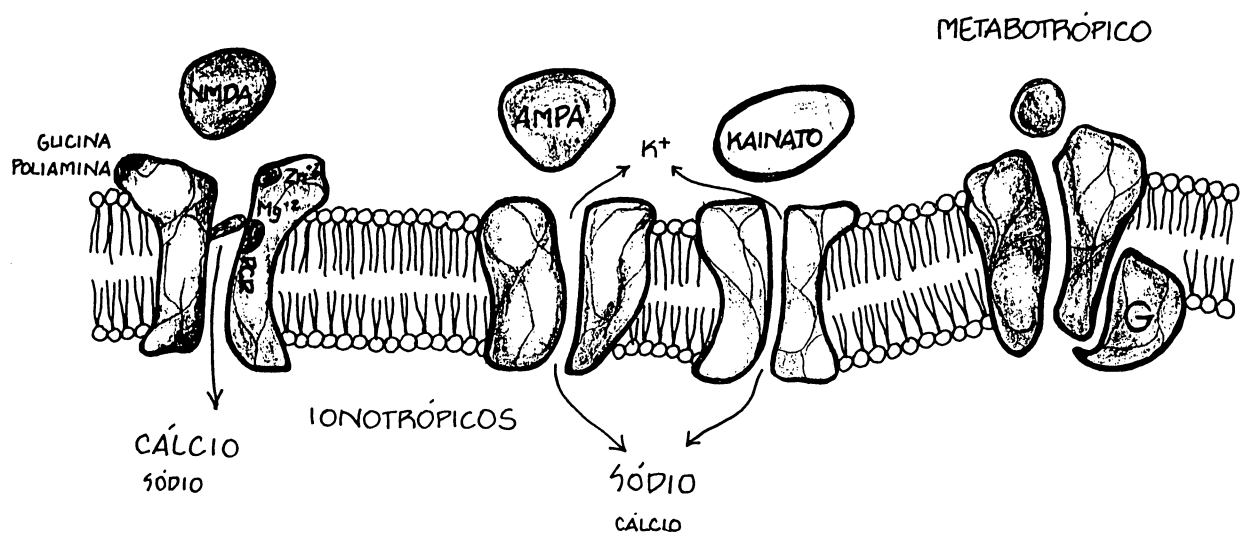


Figura III.1. Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos.
PCP = sítio para fenciclidina; G = proteína G

A síntese e o metabolismo de glutamato depende da interação entre terminais nervosos e células gliais. O glutamato é liberado pelos neurônios, exerce sua ação no terminal pós-sináptico e é captado principalmente pelas células gliais, onde é convertido a glutamina, pela ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina é captada pelo neurônio pré-sináptico, onde participa na reposição dos estoques de glutamato (Dingledine & McBain, 1994; Greenamyre & Porter, 1994). O glutamato é armazenado em vesículas sinápticas, as quais podem acumular concentrações dez vezes maior do que as encontradas no citosol (10 mM) (Nicholls & Attwell, 1991).

Os transportadores de glutamato presentes nos neurônios e nas células gliais ajudam a terminar as ações pós-sinápticas do glutamato e a manter a concentração extracelular de glutamato baixa (1 a 3 μM) (Nicholls & Attwell, 1991; Kanner, 1993; Hansson & Rönnbäck, 1995). Se a concentração de glutamato na fenda fosse elevada, haveria uma estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, particularmente do subtipo NMDA, o que levaria a danos neuronais e/ou morte neuronal (excitotoxicidade) (Greenamyre & Porter, 1994; Dawson et al., 1995).

III.1.1.1. Alterações no sistema glutamatérgico causadas pelo chumbo

Alguns agentes neurotóxicos que contaminam o meio-ambiente exercem efeitos sobre o sistema glutamatérgico. Por exemplo, foi relatado que o trimetilestano aumenta a liberação de glutamato (Dawson et al., 1995); o metilmercúrio estimula a liberação, aumenta a captação de glutamato e diminui a afinidade do receptor glutamatérgico por glutamato (Bondy et al., 1979, Cagiano et al., 1990; Dawson et al., 1995); o alumínio diminui a liberação de glutamato (Kiss & Osipenko, 1994) e o tolueno aumenta a união específica no receptor de glutamato (Dawson et al., 1995).

O papel do sistema glutamatérgico na neurotoxicidade do chumbo tem sido recentemente objeto de investigação mais intensa. Dentre os estudos que procuram avaliar a participação do sistema glutamatérgico no mecanismo de ação deste metal no SNC, constam a avaliação do efeito da exposição ao chumbo sobre a união específica de [^3H]glutamato (Regunathan & Sundaresan, 1985), sobre a união específica de [^3H]MK-801 (avalia indiretamente a ativação do receptor de NMDA) (Guilarte & Miceli, 1992, Guilarte et al., 1993, 1994, 1995; Jett & Guilarte, 1995; Schulte et al., 1995), estudos eletrofisiológicos (Alkondon et al., 1990; Ujihara & Albuquerque, 1992; Hori et al., 1993; Uteshev et al., 1993; Ishihara et al., 1995), estudos comportamentais (Cohn & Cory-Slechta, 1994; Cory-Slechta, 1995^b), estudos enzimáticos com a enzima glutamina sintetase (Sierra et al., 1989; Engle & Volpe, 1990; Sierra & Tiffany-Castiglioni, 1991) e estu-

dos da medida dos níveis de glutamato em estruturas cerebrais (Kumar & Desiraju, 1990).

Os efeitos do chumbo sobre o sistema glutamatérgico, tanto nos estudos de união específica de [³H]MK-801, quanto nos estudos eletrofisiológicos são mais pronunciados em animais jovens do que em adultos (Alkondon et al. 1990; Guilarte & Miceli, 1992; Ishihara et al., 1995). A maior parte dos estudos tem sido realizado em hipocampo, uma estrutura cerebral reconhecidamente importante para o processamento dos estágios iniciais de memória (Izquierdo & Medina, 1995; Maren & Baudry, 1995) e rica em receptores NMDA (Young & Fagg, 1991). Um número restrito de estudos foi realizado em córtex cerebral e cerebelo (Regunathan & Sundaresan, 1985; Guilarte & Miceli, 1992). Os receptores NMDA tem sido reconhecidos como essenciais para a indução da potenciação de longa duração (LTP) (McEntee & Crook, 1993; Izquierdo & Medina, 1995; Maren & Baudry, 1995). A LTP leva a um aumento específico das respostas pós-sinápticas excitatórias e tem sido amplamente reconhecida como um mecanismo envolvido no processamento da memória (Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1995). Existem relatos na literatura de que o chumbo inibe a LTP em hipocampo e córtex piriforme (Altmann et al., 1991, 1993, 1994; Lasley et al., 1993; Carpenter et al., 1994), o que parece ser por bloqueio de receptores NMDA. Sugere-se que o bloqueio do receptor de NMDA, com o conseqüente comprometimento da LTP, possa ser um dos mecanismos através dos quais o chumbo comprometa a função cognitiva em crianças e em animais jovens (Cory-Slechta, 1995^b). No entanto, foi demonstrado um efeito deste metal sobre a LTP independente de NMDA (Hori et al., 1993). Inclusive, não está bem estabelecida a ação do chumbo sobre subtipos de receptores glutamatérgicos não-NMDA, os quais também desempenham um papel importante para a LTP e memória (Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1995). Segundo Alkondon et al. (1990) e Ujihara & Albuquerque (1992) o chumbo inibe seletivamente as correntes iônicas evocadas por NMDA, sem afetar as correntes induzidas pela ativação de outros subtipos de receptores glutamatérgicos como quisqualato e cainato. Contudo, ainda não está excluída a possibilidade de que a ação deste metal sobre o sistema glutamatérgico envolva também os receptores ionotrópicos não-NMDA e/ou os receptores metabotrópicos.

III.1.2. A enzima adenilato ciclase (AC)

A adenilato ciclase (E. C. 4.6.1.1.) é uma enzima de membrana que catalisa a reação de hidrólise do ATP intracelular, gerando AMP cíclico (AMPC) e pirofosfato inor-

gênico (Figura III.2.). O substrato para a enzima é um complexo de Mg^{2+} e ATP (Gilman, 1984, 1987).

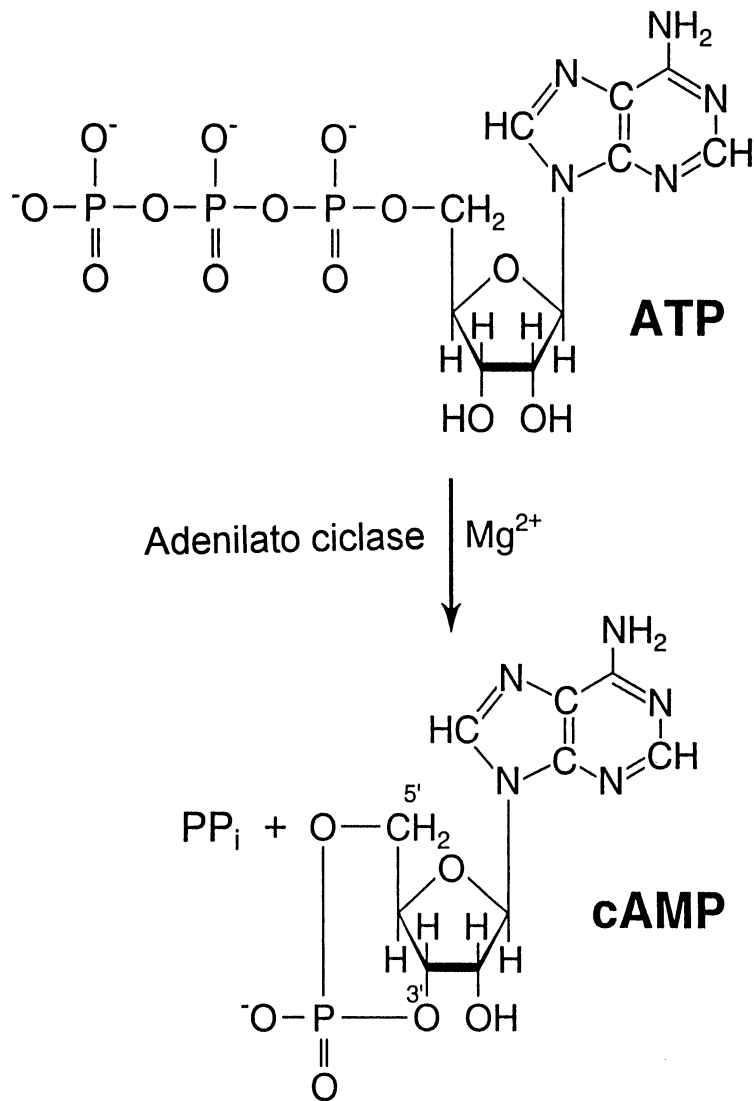


Figura III.2. Reação de síntese de AMPc a partir do ATP catalisada pela enzima adenilato ciclase (AC).

O AMPc é uma molécula regulatória ubíqua, que controla diversos processos metabólicos em organismos eucarióticos e procarióticos (Walaas & Greengard, 1991). A atividade da AC é encontrada em quase todas as células animais e, dependendo da célula, pode ser modulada por um ou vários hormônios e/ou neurotransmissores. Estes incluem aminas biogênicas, proteínas, polipeptídeos, prostaglandinas, opióides, adenosina e acetilcolina (Ross & Gilman, 1980; Levitzky, 1987^a). A ativação ou inibição da AC pode se dar por ligantes que se associam a receptores que estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs) ou inibitórias (Gi), respectivamente (Levitzky, 1987^a; Casperson & Bourne, 1987; Gilman, 1987). Receptores estimulatórios (por exemplo, receptores βadrenérgicos, receptores dopaminérgicos D1 e D5, receptores A2 para adenosina, receptor serotoninérgico 5-HT4) e receptores inibitórios (por exemplo, receptores α2adrenérgicos, receptores dopaminérgicos D2, receptores muscarínicos M2 e M4, receptores A1 para adenosina, receptores serotoninérgicos 5-HT 1B e 1D) estão associados à estimulação e inibição da AC, respectivamente (Levitzki, 1987^a). Tanto a estimulação como a inibição da AC por hormônios e/ou neurotransmissores requer GTP intracelular (Casperson & Bourne, 1987; Birbaumer, 1990). O resultado final é uma alteração nos níveis intracelulares de AMPc. Este, por sua vez, liga-se à subunidade regulatória da proteína quinase A, tornando a enzima ativa. Desta forma, modulando os níveis de AMPc, os neurotransmissores modulam o ciclo fosforilação/defosforilação de proteínas dependentes de AMPc, que é um aspecto importante no controle do metabolismo celular (Walaas & Greengard, 1991; Rodnight & Wofchuk, 1992). O término do sinal envolve a hidrólise enzimática do AMPc pela enzima fosfodiesterase que o hidrolisa a 5'AMP, bem como a desativação da proteína G pela atividade GTPásica presente na própria proteína G (Gilman, 1987). Esta última será abordada com maior detalhe no capítulo IV.

Além da regulação da AC mediada através da ação de agonistas ou de antagonistas nos receptores, algumas drogas tem ação direta sobre a subunidade catalítica desta enzima, como parece ser o caso do lítio que inibe a AC (Mork & Geisler, 1993, 1995) e do composto diterpênico forskolina que exerce um efeito estimulatório sobre a enzima (Seamon & Daly, 1981; Gehlert, 1986). No entanto, em ambos os exemplos citados, também parece ocorrer uma ação do lítio e da forskolina mediada por proteínas G (Newman & Belmaker, 1987; Avissar et al., 1988; Laurenza et al., 1989). O fluoreto também é um potente agente estimulador da AC que age através da subunidade α da proteína G estimulatória (Gs) (Nomura et al., 1985; Rodbell, 1992). Também foi relatado na literatura que a enzima adenilato ciclase de diferentes fontes é inibida por reagentes

sulfidrílicos (Storm & Gunsalus, 1974; Takats et al., 1990), indicando a necessidade de grupamentos sulfidrila para a atividade catalítica da enzima.

A AC quando determinada em preparações de membrana apresenta uma atividade basal que varia de acordo com o tecido (Ross & Gilman, 1980; Levitzki, 1987^b). A atividade basal da enzima representa a sua atividade na ausência de agentes estimulatórios ou inibitórios (agonistas) ou a sua atividade modulada por ligantes regulatórios endógenos (Levitzki, 1987^b). Em virtude de a AC fazer parte da estrutura da membrana como uma proteína intrínseca, a sua regulação por hormônios e/ou neurotransmissores *in vitro* depende da integridade do sistema de transdução de sinal composto por receptor, proteína G e AC (Ross & Gilman, 1980).

Até hoje foram clonadas oito formas de adenilato ciclase. Cada forma da enzima é diferentemente regulada e possui distribuição diferenciada nos tecidos (Cooper et al., 1995). A clonagem do primeiro gene da AC de mamíferos revelou uma estrutura bastante complexa (Krupinski et al., 1989). Esta e todas as AC subsequentemente clonadas são grandes polipeptídeos, contendo 1.080 a 1.248 aminoácidos. Elas contêm duas regiões hidrofóbicas, cada uma delas contendo seis domínios transmembrana. Cada região hidrofóbica é seguida por um longo domínio citosólico (Cooper et al., 1995). Os domínios transmembrana não são muito conservados entre as AC. Os dois domínios citosólicos são bastante homólogos entre si e entre as diferentes AC e, possivelmente, podem formar parte do sítio catalítico ligador de ATP (Pieroni et al., 1993; Cooper et al., 1995).

Além da modulação da AC pela proteína G, a clonagem e expressão dos oito tipos de AC revelou que elas são multiplamente reguladas. Não apenas as subunidades α das proteínas G regulam as AC, mas também a proteína quinase C (PKC), o Ca^{2+} e as subunidades $\beta\gamma$ das proteínas G desempenham papéis regulatórios (Tang & Gilman, 1991; Cooper et al., 1995).

III.1.2.1. Adenilato ciclase cerebral

Das oito isoformas de AC até hoje clonadas, três apresentam uma distribuição expressiva no cérebro (Mons et al., 1995). São elas as AC do tipo I, II e V. A AC do tipo I é seletivamente expressada no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (Mons et al., 1995). Esta isoforma é estimulada por concentrações fisiológicas de cálcio (0,1 a 1,0 μM), que age através da calmodulina, além de ser um pouco estimulada por Gs (Cooper et al., 1995). A AC do tipo II apresenta uma ampla distribuição, mas em quantidade limitada no SNC. A AC do tipo II não é afetada por cálcio e é estimulada por Gs e por prote-

ína quinase C (PKC). A AC do tipo V apresenta-se restrita ao estriado e é estimulada por Gs e inibida por cálcio (Cooper et al., 1995).

As adenilato ciclase estão presentes tanto em terminais nervosos pós-sinápticos como pré-sinápticos, assim como também na glia e em células do endotélio dos capilares (Musgrave et al., 1994; Mons et al., 1995).

III.1.2.2. Efeito de metais pesados sobre a adenilato ciclase

Existem estudos na literatura relatando a inibição da AC basal de diversas fontes por metais pesados. Dentre os metais inibidores da enzima estão o mercúrio inorgânico e o metilmercúrio (Storm & Gunsalus, 1974), o cádmio (Lundberg et al., 1987; Fasitsas et al., 1991) e o chumbo (Nathanson & Bloom, 1975, 1976; Ewers & Erbe, 1980; Doskeland, 1980; Biondi et al., 1989; Sandhir & Gill, 1994). Por outro lado, também foi demonstrado que o tratamento crônico com cádmio em ratos estimulou a atividade basal da AC hepática (Merali et al., 1975).

Os estudos que tratam sobre a inibição da AC cerebral pelo chumbo mostram dados variados tanto quanto à concentração do metal necessária para inibir a enzima como quanto ao possível mecanismo através do qual o metal exerce o seu efeito (Nathanson & Bloom, 1975, 1976; Ewers & Erbe, 1980; Sandhir & Gill, 1994). A AC de origem cerebral parece ser particularmente sensível ao efeito inibitório do chumbo, sendo que concentrações deste metal na faixa de μM inibiram significativamente a atividade enzimática (Nathanson & Bloom, 1975; Ewers & Erbe, 1980). Em alguns casos também têm sido demonstrado que o chumbo, dependendo da concentração, pode estimular a enzima *in vitro* (Takats et al., 1990; Sandhir & Gill, 1994). Contudo, o efeito estimulatório apenas parece estar associado à determinação da atividade da AC em presença da calmodulina (Sandhir & Gill, 1994).

III.1.2.3. Influência do glutamato na atividade da adenilato ciclase

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos clonados (mGluR1 a mGluR8) dividem-se em três grupos. Em termos gerais, os receptores do grupo 1 estão associados à hidrólise de fosfatidilinositol e os receptores dos grupos 2 e 3 estão associados à diminuição dos níveis de AMPc (Nakanishi et al., 1994; Pin & Bockaert, 1995; Pin & Duvoisin, 1995). Contudo, tem sido relatado um aumento dos níveis de AMPc induzido por glutamato em fatias de hipocampo de rato, sendo que o referido efeito estimulatório parece ser dependente de adenosina endógena (Winder & Conn, 1993; Schoepp et al., 1995). Portanto, o efeito estimulatório do glutamato sobre a AC ocorre em sistemas íntegros, como fatias de tecidos, onde a integridade do sistema purinérgico está preservada.

Além disto, o glutamato pode estimular a atividade da adenilato ciclase indiretamente por aumentar os níveis intracelulares de cálcio como consequência da despolarização da membrana. O aumento do cálcio pode juntamente com a calmodulina ativar formas da AC sensíveis a Ca^{2+} /calmodulina (Cooper et al., 1995).

Um estudo recente (Musgrave et al., 1994) sugere que a ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos pós-sinápticos resulta na estimulação da atividade da AC, enquanto que a inibição da AC parece ser mediada, pelo menos em parte, através de mecanismos pré-sinápticos.

II.1.3. Objetivos

Considerando:

- a) que existem poucos estudos que avaliam o efeito da exposição ao chumbo em animais experimentais sobre o sistema glutamatérgico e sobre a atividade da adenilato ciclase no cérebro;
- b) que os resultados parecem ser bastante influenciados pelo protocolo de exposição ao metal;
- c) que muito pouco se sabe a respeito dos efeitos de uma intoxicação crônica com chumbo em várias etapas do desenvolvimento do rato sobre os referidos parâmetros neuroquímicos;
- d) que poucos trabalhos têm examinado o efeito do chumbo em ratos tratados *in vivo* simultaneamente em mais de uma estrutura cerebral, sobre os referidos parâmetros neuroquímicos;

decidimos investigar o efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a união específica de [3 H]glutamato e sobre a atividade da enzima adenilato ciclase basal, estimulada por Gpp(NH)p 10,0 μ M e inibida por acetato de chumbo 3,0 μ M em membranas de córtex cerebral e cerebelo de ratos submetidos a três esquemas de exposição:

- a) ratas adultas (mães) que foram expostas ao metal na água de beber por um período de 16 a 17 semanas.
- b) ratos jovens de 21 a 23 dias de idade expostos ao metal indiretamente através de suas mães durante as fases pré-natal e lactacional.
- c) ratos que foram expostos ao metal desde a fase pré-natal até a idade de 6 meses, sendo até o desmame através das mães e, após o desmame, através da exposição ao metal na água de beber.

Também foi investigado o efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [3 H]glutamato e sobre a atividade basal da enzima adenilato ciclase em

membranas de córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens e adultos, a fim de verificar uma eventual diferença de sensibilidade ao chumbo dependente da idade.

III.2.MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1.Reagentes

Acetato de chumbo - Baker's Analyzed

Ácido caínico - Sigma, St. Louis, MO

Ácido clorídrico - Merck

ACPD = Trans-(+)-ACPD = trans-1-amino ácido ciclopentano-1,3-dicarboxílico -
Research Biochemicals International

Albumina de soro bovino - Sigma, St. Louis, MO

AMPA = α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato - Research Biochemicals
International

AMPc - adenosina-3',5'-monofosfato cíclico - Sigma, St. Louis, MO

[³H]AMPc = [³H]adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (23 Ci/mmol) Amershan International,
U. K.

ATP = adenosina-5'-trifosfato - Boehringer Mannheim

Carbonato de sódio - Reagen

Carvão ativado - Riedel-de-Häen

Cloreto de magnésio - Reagen

Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Sigma, St. Louis, MO

Etanol absoluto - Merck

Etilenodiaminotetracetato sódico (EDTA sódico) - Reagen

Folin-Ciocalteau - Bioensaaios

Glutamato - Sigma, St. Louis, MO

[³H]glutamato (50 Ci/mmol) - Amershan International, U. K.

Guanina imidodifosfato (5'guanililimidodifosfato ou imido guanosina 5'trifosfato) =

Gpp(NH)p - Sigma, St. Louis, MO

Hidróxido de sódio - Reagen

NMDA = N-metil-D-aspartato - Sigma, St. Louis, MO

POPOP = 1,4-bis [5-fenil-2-oxazolil] benzeno; 2,2'-p-fenileni-bis[5-feniloxazol] - Sigma,
St. Louis, MO

PPO = 2,5difeniloxazol - Sigma, St. Louis, MO

Proteína quinase de coração bovino - Sigma, St. Louis, MO

Quisqualato = β -(3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidina-2il)-L-alanina - Sigma, St. Louis, MO

Sacarose - Reagen

Sulfato de cobre - Reagen

Tartarato de sódio e potássio - Reagen

Tolueno - Reagen ou Merck

Tris(hidroximetil)aminometano - Sigma, St. Louis, MO

Triton X-100 - Reagen ou Merck

III.2.2. Equipamentos

Agitador de tubos: Phoenix

Balanças: analítica Sartorius Basic modelo BA 110 S, analítica Marte modelo AS 2000

Banho térmico: Quimis modelo Q304.164

Centrífugas: Sorvall modelo RC 5B Plus, minicentrífuga Incibrás modelo spin I

Compressor de ar

Cintiladores: Rackbeta modelo 1217, Wallac modelo 1409 ("Liquid Scintillation Counter")

Espectrofotômetros: Beckman DU 640 UV/VIS; de absorção atômica com forno de grafite (Perkin-Elmer modelo 2380)

Freezer a -20°C e Freezer a -70°C

Potenciômetro: Digimed

III.2.3. Animais experimentais

Nos estudos *in vitro* foram utilizados ratos Wistar adultos (3 a 6 meses) de ambos os sexos provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro a temperatura de 23°C \pm 2°C, com ração comercial (Purina) e água "*ad libitum*". Nos estudos para avaliação dos efeitos do acetato de chumbo *in vivo* sobre a atividade da adenilato ciclase ou sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral e cerebelo de ratos, os animais foram tratados com acetato de chumbo conforme descrito no Capítulo I, página 14.

III.2.4. Dissecção do córtex cerebral e cerebelo

A dissecção do córtex cerebral e cerebelo foi realizada conforme descrição feita no Capítulo I, página 20, exceto que o cérebro total não foi pesado e as estruturas foram dissecadas sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo picado, a qual era revestida

com papel de filtro umedecido com solução de sacarose 0,32 M contendo Tris/HCl 10 mM e MgCl₂ 1 mM, pH 7,4.

III.2.5. Preparação da membrana

As membranas lisadas e lavadas de córtex cerebral e cerebelo de rato foram preparadas conforme o método usado por Souza & Ramírez, 1991.

A estrutura cerebral depois de pesada era homogeneizada em 20 volumes de uma solução com sacarose 0,32 M, Tris/HCl 10 mM pH 7,4 e MgCl₂ 1 mM em um "potter" de vidro, contendo duas vazas: A (mais folgada) e B (mais justa), com 10 movimentos de vai e vem manuais com cada uma das vazas. O homogeneizado era centrifugado a 1.000 g por 15 minutos. O precipitado desta centrifugação, contendo a fração nuclear, "debris" celulares e mielina, era ressuspensão no mesmo volume do tampão usado inicialmente e era centrifugado novamente a 1.000 g por 15 minutos e o sobrenadante (SN1) mantido no gelo. O segundo precipitado era desprezado e o sobrenadante (SN2) misturado com o SN1. A mistura de SN1 e SN2 era centrifugada a 27.000 g durante 15 minutos. O precipitado resultante era ressuspensão em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM pH 7,4 e permanecia no gelo por, no mínimo, 30 minutos, para que fosse processada a lise das vesículas que foram formadas com sacarose. O lisado era submetido a centrifugação a 27.000 g por 15 minutos. O precipitado era lavado 3 vezes em tampão Tris/HCl 10 mM pH 7,4 (ressuspensão no tampão seguida de centrifugação a 27.000 g por 15 minutos), a fim de remover contaminantes endógenos, tais como glutamato, nucleotídeos, íons, sacarose, etc. O precipitado resultante da terceira lavagem era ressuspensão em tampão Tris/HCl 10 mM pH 7,4 de forma a obter uma concentração de 2,0 a 3,0 mg de proteína/ml.

III.2.6. Determinação da união específica de [³H]glutamato em membranas

Os ensaios para determinação da união específica de [³H]glutamato em membranas de ratos expostos ao acetato de chumbo *in vivo* foram realizados a 25°C, em um tempo de incubação de 15 minutos, em pequenos tubos de policarbonato previamente lavados com uma solução de HNO₃. Eles continham 0,1 ml de membrana, Tris/HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM e [³H]glutamato (50 Ci/mmol) 40 nM, em um volume final de 1,0 ml, com ou sem glutamato não radioativo 40 μM (para medida da união total e inespecífica, respectivamente). Os ensaios para determinação do efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas foram realizados em uma condição similar, exceto que o meio de incubação continha Tris/HCl 50 mM

pH 7,4, $MgCl_2$ 10 mM e era adicionado acetato de chumbo na faixa de concentração de 4 a 400 μM . Foram evitadas concentrações de acetato de chumbo superiores a 400 μM , a fim de evitar a precipitação de um sal insolúvel (Drew et al., 1989). A centrifugação a 27.000 g por 30 minutos foi o procedimento adotado para separar o [3H]glutamato não unido às membranas. O sobrenadante de cada tubo era descartado e imediatamente, procedia-se a uma lavagem rápida e cautelosa das paredes do tubo e do precipitado com água destilada a 4°C. O tubo era cuidadosamente secado com cotonete e adicionava-se 300 μl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% para solubilizar as proteínas do tubo. Aguardava-se no mínimo 12 horas, quando então os tubos eram colocados em estufa a 60°C durante 15 minutos e era retirada uma alíquota de 240 μl . Esta alíquota era pipetada em tubos plásticos (adaptadores de "vials"), aos quais adicionava-se 3 ml de líquido de cintilação. A radioatividade era avaliada em cintilador beta. A união específica de [3H]glutamato era calculada por diferença entre a união total e a inespecífica. Por união inespecífica entende-se a união de [3H]glutamato na presença de glutamato não radioativo em uma concentração 1.000 vezes superior ao de [3H]glutamato (Figura III.3.)

Com o objetivo de determinar os efeitos de agonistas que reconhecem subtipos de receptores glutamatérgicos específicos, as membranas foram incubadas com [3H]glutamato 40 nM na presença de NMDA, cainato, AMPA, quisqualato ou ACPD 40 μM , conforme descrito por Elisabetsky et al. (1995). Com este procedimento, o [3H]glutamato não se une a receptores já ocupados pelo excesso de agonista específico não radioativo. A diferença entre a união específica remanescente (com excesso de agonista específico não radioativo) e a união total (na ausência de qualquer tipo de agonista específico não radioativo) foi tomada como medida da união a receptores relacionados ao agonista específico usado. Os efeitos do acetato de chumbo (300 μM) sobre cada subtipo de receptor glutamatérgico específico foi avaliado incubando-se o acetato de chumbo e o [3H]glutamato juntamente com cada agonista específico. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

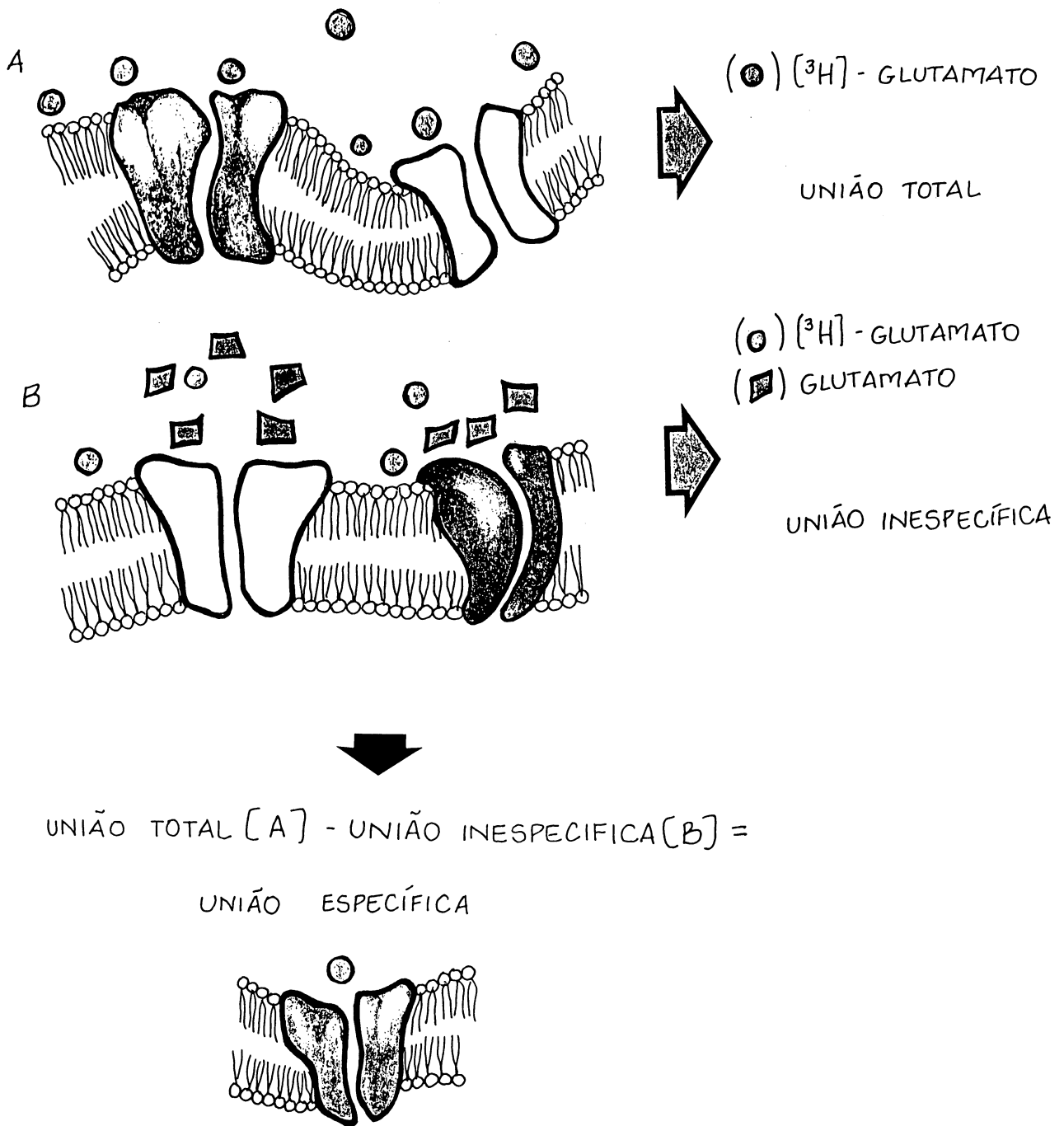


Figura III.3. Representação esquemática da união total, inespecífica e específica de [³H]glutamato em receptores na membrana.

III.2.7. Ensaio da atividade da adenilato ciclase

A atividade da adenilato ciclase em preparações de membrana era avaliada através da produção de AMPc a partir de ATP não radioativo. As amostras eram processadas de acordo com o método de Albano et al. (1974). Os ensaios eram realizados a 30°C em tubos eppendorf contendo, em um volume final de 100 µl, 30 a 60 µg de proteína da membrana, Tris/HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, 1g% de albumina de soro bovino, Gpp(NH)p 10 µM (exceto nos tubos controle e em experimentos onde apenas era avaliado o efeito do chumbo isoladamente) e acetato de chumbo (concentrações variando de 0.01 µM a 100 µM nos experimentos onde era avaliado o efeito *in vitro* do chumbo). Após 15 minutos de pré-incubação, a incubação era iniciada pela adição de ATP (concentração final de 1,0 mM) e finalizada depois de 1 minuto, através da adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado ou 5 minutos de fervura. Os tubos eram centrifugados durante 5 minutos a 12.000g e alíquotas dos sobrenadantes (que continham AMPc) eram evaporadas em um banho-maria a 50°C, com uma corrente de ar em cada tubo, através de cânulas conectadas a um compressor de ar. Os resíduos eram solubilizados em 100 µl de Tris/HCl 50 mM pH 7,4, contendo EDTA 4,0 mM.

No ensaio padrão de determinação da atividade da adenilato ciclase, foi suprimido o uso de ditioneitol (DTT) em função de sua capacidade de complexar-se ao chumbo (Gnonlonfoun e t al., 1991). Seu uso iria diminuir a concentração de Pb²⁺ no meio de incubação. Conforme enfatizado por Simons (1993), várias enzimas sulfidrílicas, as quais tem sido ensaiadas na presença de reagentes protetores sulfidrílicos, os quais também ligam chumbo, não tem sido examinadas de forma quantitativa no que tange ao efeito *in vitro* do chumbo sobre as suas atividades enzimáticas.

III.2.8. Dosagem de AMP cíclico (AMPc)

O conteúdo de AMPc produzido durante a incubação foi dosado pelo método do radioensaio de Tovey et al. (1974). Foram pipetados em tubos eppendorf 50 µl de amostra, 50 µl de [³H]AMPc e 100 µl de solução da proteína "binding" (proteína quinase A). Estes tubos eram incubados a 4°C por um período que podia variar de 2 a 18 horas. A reação era finalizada através da adição de 100 µl de uma solução de carvão ativado (2,6% contendo 2% de albumina). Estes tubos eram centrifugados por 2 minutos a 12.000 g, sendo a seguir retirada uma alíquota de 120 µl. Esta alíquota era pipetada em tubos plásticos (adaptadores de "vials"), os quais continham 240 µl de solução de do-

decil sulfato de sódio (SDS) 0,1 N / HCl 3N / NaOH 1N. Adicionava-se 3 ml de líquido de cintilação e a radioatividade era avaliada em cintilador beta. A concentração de AMPc na amostra era determinada a partir de uma curva padrão linear, realizada paralelamente, obtida com concentrações de AMPc que variavam de 1 a 16 pmol/tubo.

III.2.9. Dosagem de proteínas

A concentração protéica era determinada em alíquotas da suspensão final da preparação da membrana através do método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão protéico.

III.2.10. Dosagem de chumbo em preparações de membrana de córtex cerebral

A fim de verificar se o procedimento de preparação da membrana de ratos expostos ao chumbo *in vitro* seria capaz de remover o metal dos fragmentos de membrana, foram utilizadas membranas de ratos do grupo controle (expostos à água deionizada) e membranas de ratos expostos à concentração mais elevada de chumbo (grupo 4,0 mM de acetato de chumbo) para dosar chumbo. A dosagem do metal foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

III.2.11. Análise estatística e expressão dos resultados

Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância de uma ou de duas vias, conforme o caso, seguida pelo teste do raio múltiplo de Duncan, quando apropriado. Quando foi realizada comparação entre duas médias, a análise estatística foi feita através do teste t de Student. Foram consideradas significativas as análises nas quais $p \leq 0,05$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de determinações realizadas em triplicata. A unidade para expressão dos resultados de atividade da adenilato ciclase é pmol AMPc / mg de proteína / minuto ou os resultados estão expressos em % em relação ao controle, o qual era considerado 100%. Os resultados de união específica de [³H]glutamato estão expressos em pmol [³H]glutamato / mg de proteína ou os resultados estão expressos em % em relação ao controle, o qual era considerado 100%.

III.3.RESULTADOS

III.3.1. Efeito do tratamento com chumbo sobre o teor de proteínas na fração das membranas de cerebelo e córtex cerebral de ratos

A fim de verificar se o tratamento com acetato de chumbo administrado nos ratos havia produzido alterações no conteúdo de proteínas das membranas de córtex cerebral e cerebelo, alíquotas das preparações de membranas obtidas de ratos expostos ao metal e ratos controle foram utilizadas para dosar proteínas.

A **Figura III.4.** mostra o resultado da proteína em fração de membranas de cerebelo de ratas mães expostas ao acetato de chumbo por 16 a 17 semanas, ratos jovens expostos ao chumbo durante a gestação e lactação e ratos de 6 meses expostos ao metal desde a concepção. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre o teor de proteína na fração de membrana de cerebelo das ratas mães expostas ao acetato de chumbo por 16 a 17 semanas [$F(4,27) = 3,60$, $p < 0,050$]. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que o teor de proteína nas membranas obtidas de ratas expostas as concentrações de 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo de água de beber foi superior ao de membranas obtidas de ratas do grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas do tratamento com acetato de chumbo sobre este parâmetro em membranas obtidas de ratos jovens e de ratos de seis meses de idade.

O chumbo, não interferiu com a dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951), inclusive em concentrações cerca de quinhentas vezes superior às concentrações presentes nas membranas de ratos intoxicados (dados não mostrados).

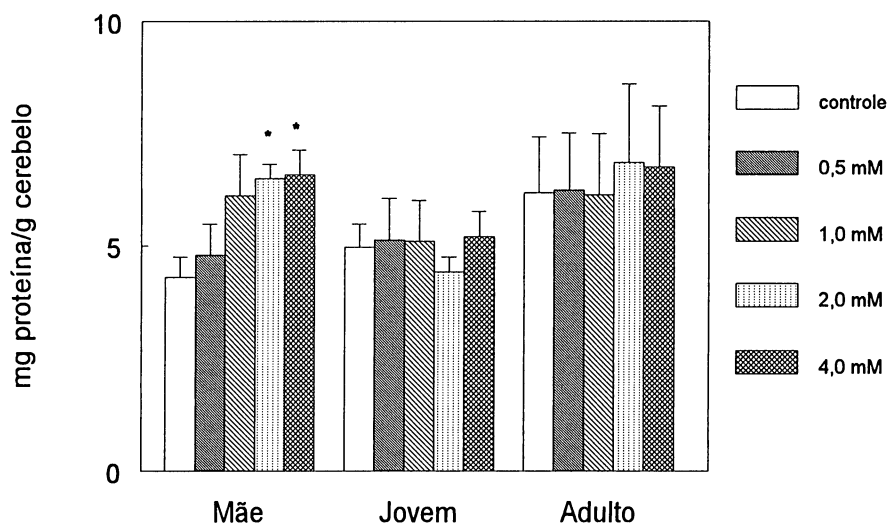


Figura III.4. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre o teor de proteínas na membrana de cerebello. Os resultados estão expressos em mg proteína / g de cerebello e representam a média + erro padrão (n = 5 a 9).

* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo controle pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

O mesmo parâmetro foi avaliado em membranas de córtex cerebral de ratos tratados conforme mencionado no parágrafo anterior. A ANOVA de uma via que avaliou o efeito do tratamento com chumbo sobre este parâmetro em córtex cerebral revelou que não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais (Figura III. 5.).

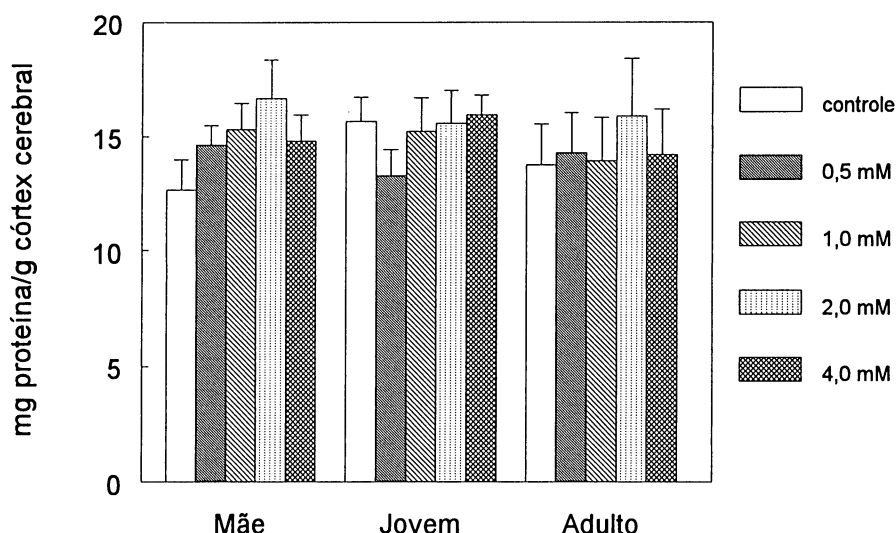


Figura III.5. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre o teor de proteínas na membrana de córtex cerebral. Os resultados estão expressos em mg proteína / g de córtex cerebral e representam a média + erro padrão (n = 5 a 9).

Não houve efeito significativo do tratamento com chumbo pela ANOVA de uma via.

III.3.2. Dosagem de chumbo remanescente nas membranas de ratos tratados com acetato de chumbo

Com o objetivo de verificar se o procedimento de preparação das membranas, o qual inclui lavagens após a lise, removia o chumbo presente no cérebro dos ratos expostos ao metal, foi dosado o chumbo remanescente em membranas de ratos expostos à concentração mais elevada de chumbo (4,0 mM na água de beber) e de ratos controle. Para este fim foram usadas membranas de córtex cerebral de ratas mães, pois as membranas de cerebelo não forneceram um volume (1,0 ml) necessário para a dosagem.

A análise estatística através do teste t de Student para amostras não pareadas mostrou que houve uma diferença no teor de metal encontrado nas membranas ($t = -3,43$, $p < 0,01$) (Figura III.6.), pois na membrana obtida dos ratos expostos ao chumbo o teor do metal foi quase três vezes superior ao teor encontrado na membrana de ratos controle. Isto significa que, mesmo após as lavagens, o chumbo permanece na preparação de membrana.

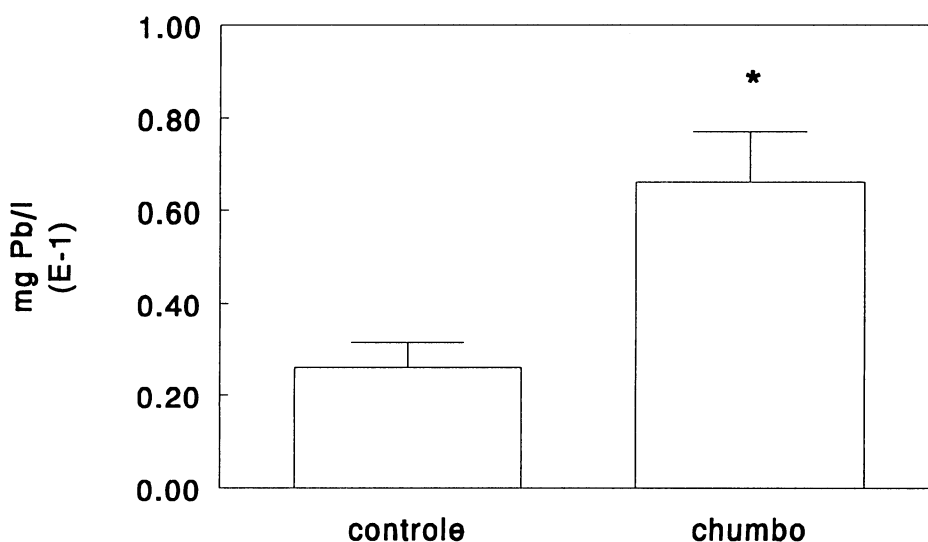


Figura III.6. Dosagem de chumbo na preparação de membrana de córtex cerebral obtida de ratas mães dos grupos controle e 4,0 mM de acetato de chumbo. Os resultados estão expressos em mg de chumbo/l (escala em expoente⁻¹) e são a média + erro padrão de 9 determinações.

* $p < 0,01$ em relação ao grupo controle pelo teste t de Student para amostras independentes.

III.3.3. Efeitos do chumbo sobre o sistema glutamatérgico

III.3.3.1. Estudos *in vivo*

III.3.3.1.1. Efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de cerebelo de ratos jovens e adultos.

O tratamento com acetato de chumbo realizado nas ratas mães e nos ratos de seis meses de idade (0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4,0 mM de acetato de chumbo na água de beber) não afetou significativamente a união específica de [³H]glutamato em membrana de cerebelo (ANOVA de uma via) (Figura III.7.). Entretanto, A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com o metal nos ratos jovens expostos ao chumbo durante a gestação e lactação [$F(4,17) = 3,20, p < 0,05$]. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que os ratos do grupo 4,0 mM apresentaram uma menor união específica de [³H]glutamato quando comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$) (Figura III.7.).

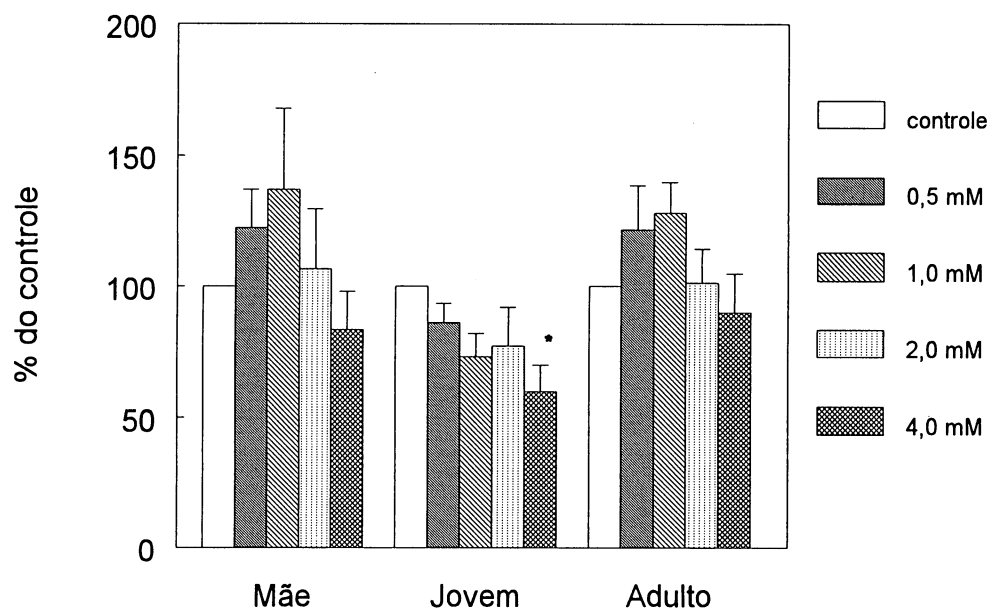


Figura III.7. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a união específica de [^3H]glutamato em membranas de cerebelo. Os resultados estão expressos como média dos valores em porcentagem em relação grupo controle + erro padrão ($n = 4$ a 9). A união específica de [^3H]glutamato (média \pm erro padrão) no grupo controle foi de $3,93 \pm 0,82$; $1,65 \pm 0,47$; $1,80 \pm 0,34$ para as ratas mães, ratos jovens e ratos de seis meses, respectivamente.

* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.1.1.2. Efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a união específica de [^3H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e adultos.

A ANOVA de uma via que avaliou o efeito do tratamento com acetato de chumbo sobre a união específica de [^3H]glutamato em membrana de córtex cerebral mostrou que não houve um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo sobre este parâmetro em ratas mães e ratos adultos de 6 meses de idade (**Figura III.8.**). Por outro lado, houve um efeito significativo do tratamento nos ratos jovens expostos ao metal durante a gestação e lactação sobre este parâmetro [$F(4,21) = 3,80$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que os ratos do grupo 4,0 mM apresentaram uma menor união específica de [^3H]glutamato quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura III.8.**). Este resultado foi semelhante ao observado em membrana de cerebelo de ratos jovens (**Figura III.7.**).

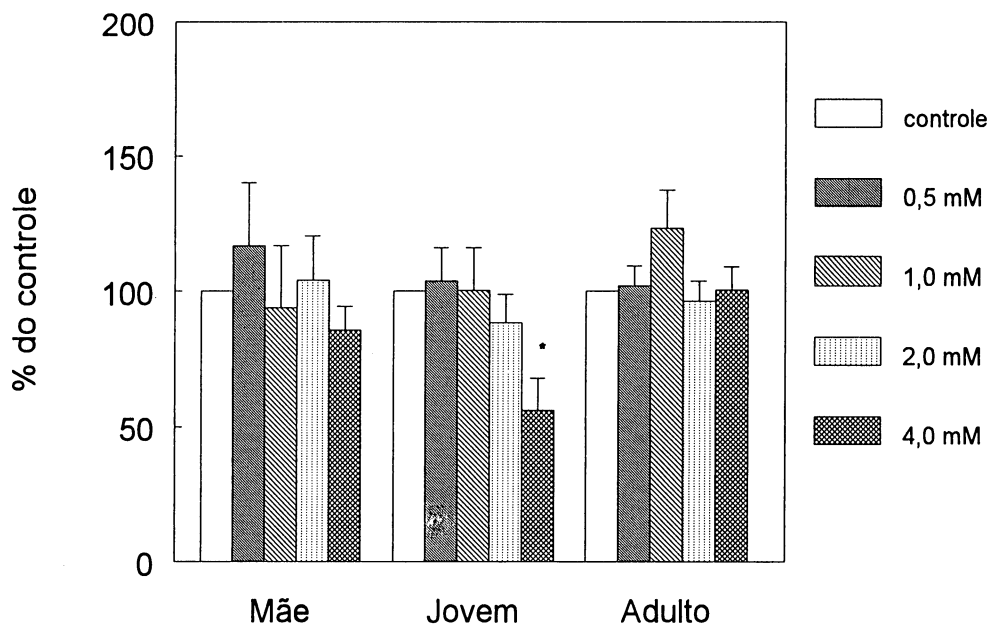


Figura III.8. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos como média dos valores em porcentagem em relação grupo controle + erro padrão (n = 4 a 9). A união específica de [³H]glutamato (média ± erro padrão) no grupo controle foi de 2,43 ± 0,38; 1,20 ± 0,27; 3,27 ± 0,59 para as ratas mães, ratos jovens e ratos de seis meses, respectivamente.

*p<0,05 quando comparado ao respectivo grupo controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.3.2. Estudos *in vitro*

III.3.3.2.1. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de cerebelo de ratos jovens e adultos.

A ANOVA de duas vias que avaliou o efeito do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de cerebelo (controle e 5 concentrações de chumbo = 0,4,10, 40 100, 400 μM X 2 idades = 21 dias e 6 meses de idade) (**Figura III.9.**) mostrou que não houve um efeito significativo do chumbo, da idade e também não existiu interação significativa entre concentração de chumbo X idade.

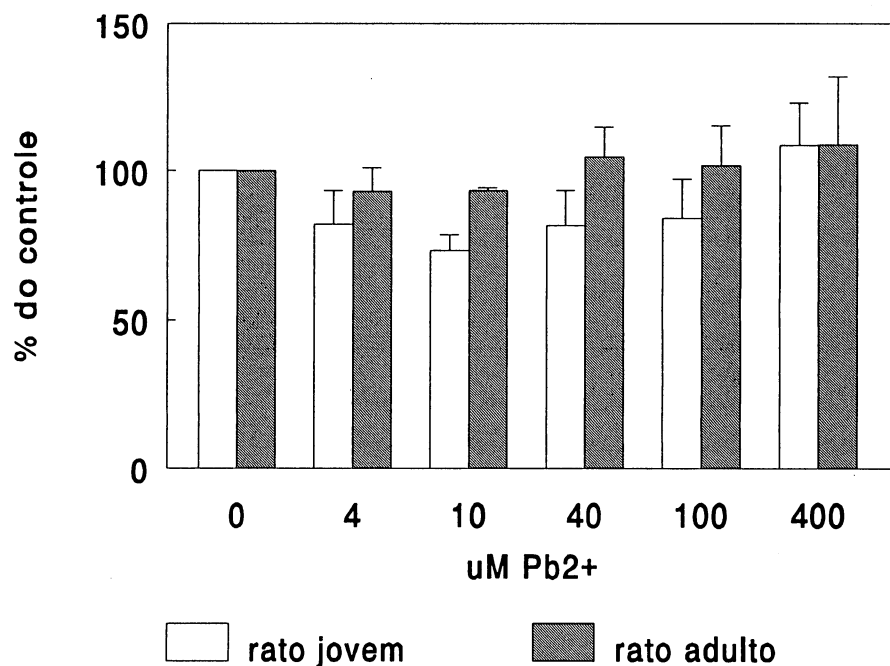


Figura III.9. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em preparação de membrana de cerebelo de rato jovem (21 a 23 dias de idade) e rato adulto (6 meses de idade). Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 6 determinações. Os valores referentes à união específica de [³H]glutamato na ausência de Pb²⁺ (controle) apresentaram uma média ± erro padrão de 0,75 ± 0,09 em rato jovem e de 0,99 ± 0,07 em rato adulto. Não houve efeito significativo do chumbo pela ANOVA de duas vias.

III.3.3.2.2. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e adultos.

O efeito do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e adultos está ilustrado na **Figura III.10**. A ANOVA de duas vias (controle e 5 concentrações de chumbo = 0,4, 10, 40, 100, 400 μM X 2 idades = 21 dias e 6 meses de idade) mostrou efeitos significativos da idade [F(1,54) = 4,93, p<0,05] e da concentração de chumbo [F(5,54) = 11,77, p<0,001]. O teste *post-hoc* de Duncan do efeito da idade mostrou um efeito inibitório mais acentuado na preparação de membrana de ratos jovens do que na preparação de membrana de ratos adultos (p<0,05). O teste de Duncan que avaliou o efeito do chumbo mostrou que houve um efeito inibitório de todas as concentrações de acetato de chumbo em relação ao controle (p<0,01 em todos os casos). Analisando isoladamente os resultados em relação a cada idade, através da ANOVA de uma via, verificou-se um efeito significativo do chumbo

tanto na membrana de ratos jovens [$F(5,30) = 7,22, p < 0,001$], como na membrana de ratos adultos [$F(5,24) = 6,32, p < 0,001$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve um efeito inibitório do chumbo na membrana de ratos jovens nas concentrações de 4 μM , 10 μM , 40 μM , 100 μM de acetato de chumbo ($p < 0,05$) e 400 μM de acetato de chumbo ($p < 0,01$) (Figura III.10.). No caso da membrana de ratos adultos, o efeito inibitório ocorreu nas concentrações de 40 μM ($p < 0,05$), 100 μM ($p < 0,05$) e 400 μM de acetato de chumbo ($p < 0,01$) (Figura III.10.).

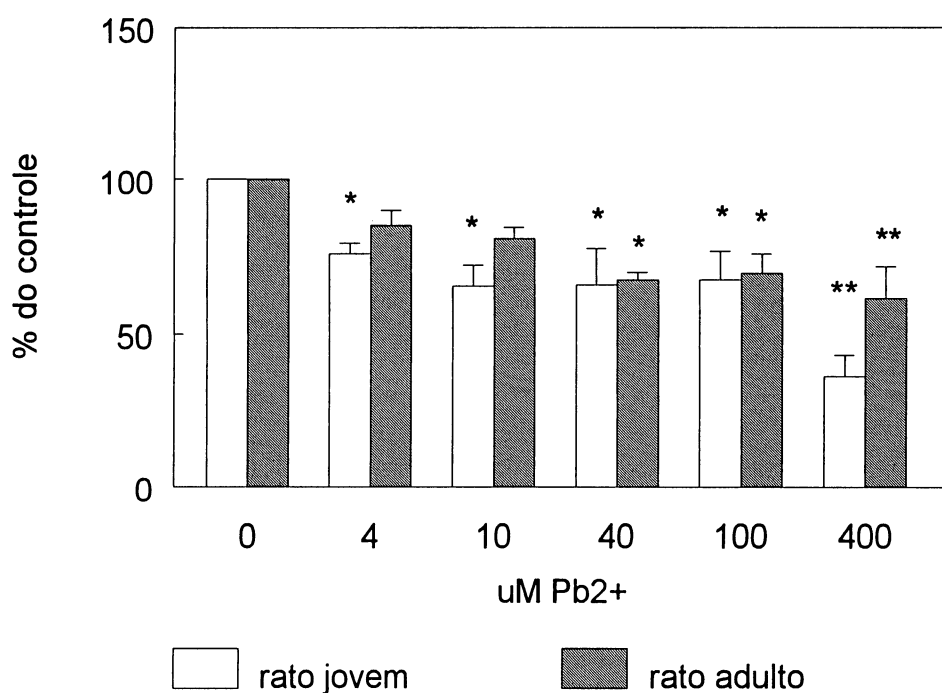


Figura III.10. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de $[^3\text{H}]$ glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovem (21 a 23 dias de idade) e rato adulto (6 meses de idade). Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 5 a 6 determinações. Os valores referentes à união específica de $[^3\text{H}]$ glutamato na ausência de Pb^{2+} (controle) apresentaram uma média \pm erro padrão de $0,71 \pm 0,06$ em rato jovem e de $0,91 \pm 0,06$ em rato adulto.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao ensaio na ausência de chumbo pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.3.2.3. Estudo da dependência de magnésio para o efeito do chumbo *in vitro* sobre a união específica de $[^3\text{H}]$ glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e adultos.

Uma vez verificado que o acetato de chumbo inibia *in vitro* a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de ratos jovens e adultos em concentrações relativamente baixas (**Figura III.10.**), decidimos verificar se o efeito inibitório do metal era dependente da presença de magnésio no meio de incubação. Sendo assim, o acetato de chumbo foi adicionado no meio de incubação em concentrações variando de 1 a 400 μM, na presença de 10 mM de cloreto de magnésio ou sem cloreto de magnésio, para avaliar a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e ratos adultos (**Figuras III.11. e III.12.**, respectivamente).

A ANOVA de duas vias que avaliou os resultados obtidos da membrana de ratos jovens revelou um efeito significativo da concentração de chumbo [$F(6,42) = 13,65$, $p < 0,001$]. Não houve efeito significativo do magnésio e nem da interação concentração de chumbo X magnésio. Uma avaliação através da ANOVA de uma via dos resultados na presença de magnésio [$F(6,21) = 8,99$, $p < 0,001$], seguida do teste do raio múltiplo de Duncan mostrou que a união específica de [³H]glutamato na presença de 10 μM de chumbo ($p < 0,05$), 40, 100 e 400 μM de chumbo difere do resultado obtido sem chumbo ($p < 0,01$). Um resultado semelhante foi obtido para os resultados na ausência de magnésio [$F(6,21) = 5,29$, $p < 0,01$], pois também a união específica de [³H]glutamato na presença de 10, 40, 100 e 400 μM de chumbo difere do resultado obtido na ausência de chumbo ($p < 0,05$ em todos os casos) (**Figura III.11.**).

A ANOVA de duas vias que avaliou os resultados obtidos da membrana de rato adulto revelou um efeito significativo da concentração de chumbo [$F(6,44) = 7,16$, $p < 0,001$]. Não houve efeito significativo do magnésio e nem da interação concentração de chumbo X magnésio. Uma avaliação através da ANOVA de uma via dos resultados na presença de magnésio [$F(6,22) = 4,04$, $p < 0,01$], seguida do teste do raio múltiplo de Duncan mostrou que a união específica de [³H]glutamato na presença de 400 μM de chumbo difere do resultado obtido sem chumbo ($p < 0,05$). Um resultado semelhante foi obtido para os resultados na ausência de magnésio [$F(6,22) = 3,36$, $p < 0,05$], pois também a união específica de [³H]glutamato na presença de 400 μM de chumbo difere do resultado obtido na ausência de chumbo ($p < 0,05$) (**Figura III.12.**). Talvez devido à variabilidade dos resultados, não foi possível observar um efeito inibitório significativo do chumbo nas concentrações de 40 e 100 μM, conforme observado na **Figura III.10**. De qualquer forma, este experimento parece claro no sentido de demonstrar que o efeito inibitório sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos adultos independe do magnésio.

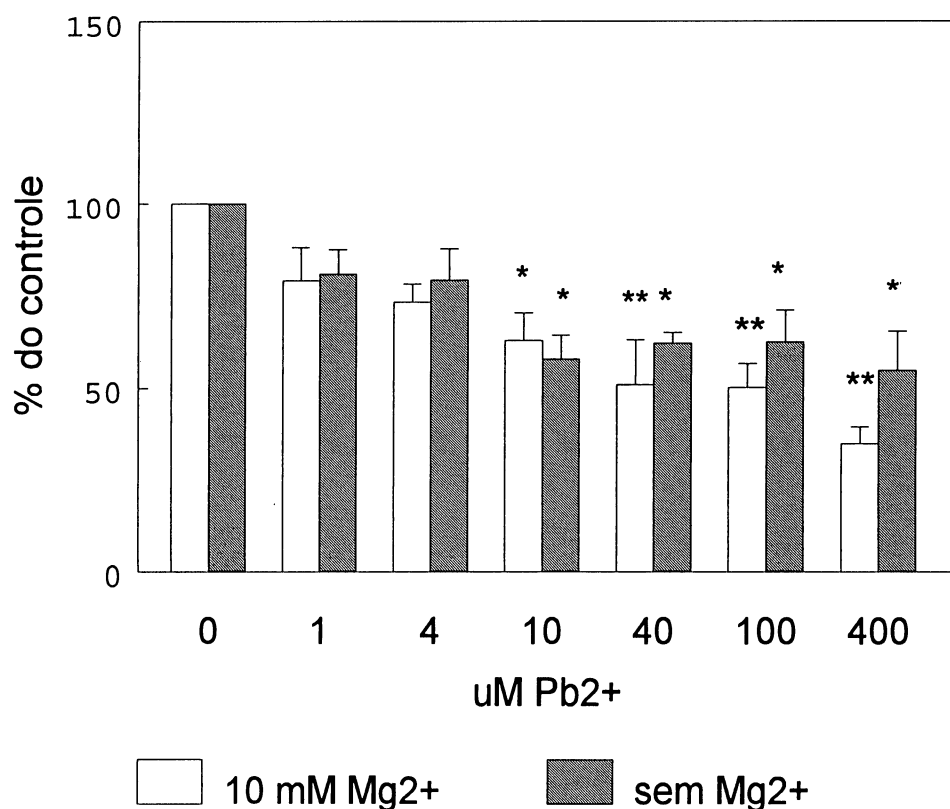


Figura III.11. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovem (21 dias de idade) na presença de 10 mM de magnésio ou na ausência de magnésio no meio de incubação. O controle (100%) refere-se ao ensaio realizado na ausência de acetato de chumbo. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 4 determinações. Os valores referentes à união específica de [³H]glutamato no controle apresentaram uma média + erro padrão de 0,71 ± 0,08 na presença de magnésio e 0,47 ± 0,09 na ausência de magnésio.
 * p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao ensaio na ausência de chumbo pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

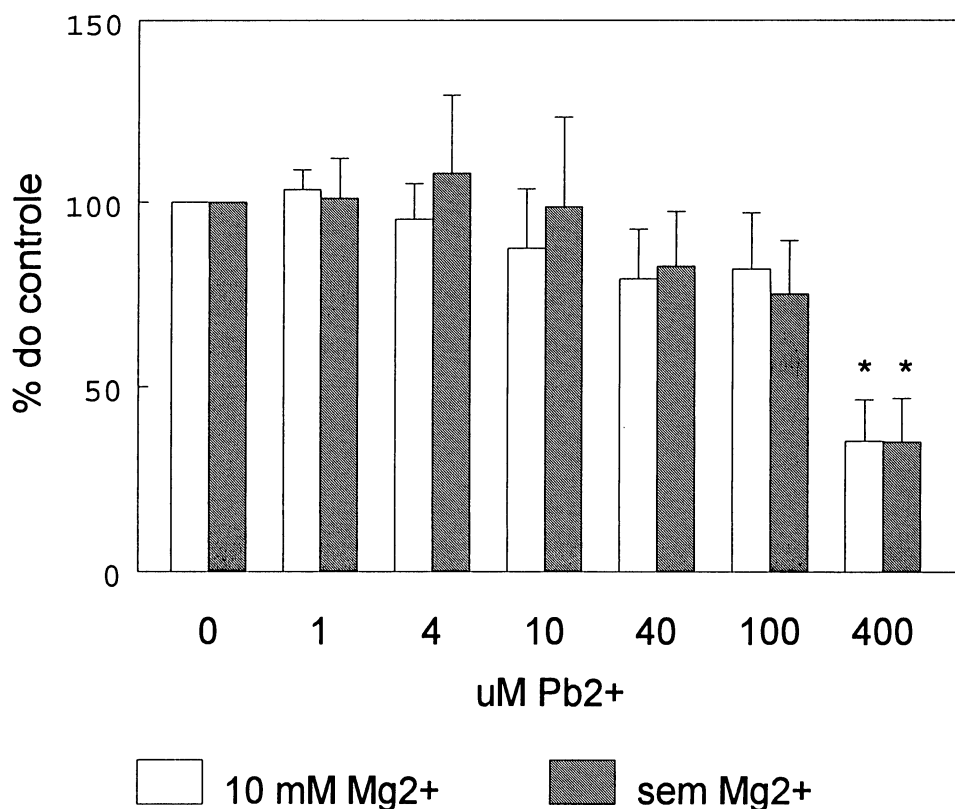


Figura III.12. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto na presença de 10 mM de magnésio ou na ausência de magnésio no meio de incubação. O controle (100%) refere-se ao ensaio realizado na ausência de acetato de chumbo. Os resultados estão expressos como média + erro padrão de 3 a 5 determinações para cada concentração. Os valores referentes à união específica de [³H]glutamato no controle apresentaram uma média + erro padrão de $1,93 \pm 0,30$ na presença de magnésio e $1,62 \pm 0,13$ na ausência de magnésio.

* $p < 0,05$ quando comparado ao ensaio na ausência de chumbo pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.3.2.4. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos adultos em receptores glutamatérgicos sensíveis a agonistas específicos.

A fim de investigar quais os tipos de receptores glutamatérgicos estariam envolvidos no efeito inibitório do acetato de chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos adultos, foi realizado um estudo no qual foram adicionados ao meio de incubação agonistas glutamatérgicos específicos na sua forma não radioativa em concentração 1.000 vezes maior que a de [³H]glutamato

(Figura III.13.). Paralelamente foram feitos ensaios nos quais adicionou-se 300 μ M de acetato de chumbo na presença de cada agonista específico (Figura III.13.). O resultado da análise estatística através de ANOVA que comparou a união específica na presença de cada agonista com a união específica na ausência do agonista, (considerando os agonistas como medida dependente) mostrou um efeito significativo dos agonistas sobre este parâmetro [$F(5,15) = 9,11, p < 0,001$]. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que a união específica na presença de NMDA, cainato, AMPA, quisqualato e ACPD foi inferior ao valor obtido na ausência do agonista ($p < 0,05$ no caso do NMDA e do cainato e $p < 0,01$ no caso do AMPA, quisqualato e ACPD). Isto mostra que as preparações de membrana de córtex cerebral de ratos adultos usadas neste estudo contêm receptores sensíveis a todos os tipos de agonistas glutamatérgicos estudados. A análise estatística através de teste t de Student para amostras dependentes que comparou os níveis de união específica na presença de cada agonista glutamatérgico com ou sem acetato de chumbo, mostrou que a união específica na presença do agonista + chumbo é inferior em todos os casos ao valor da união específica na presença do agonista isoladamente (Figura III.13., $p < 0,01$). Estes resultados indicam que o chumbo interfere com a união específica de [3 H]glutamato em membrana de córtex cerebral de ratos adultos através de interação com NMDA, cainato, AMPA, quisqualato e ACPD.

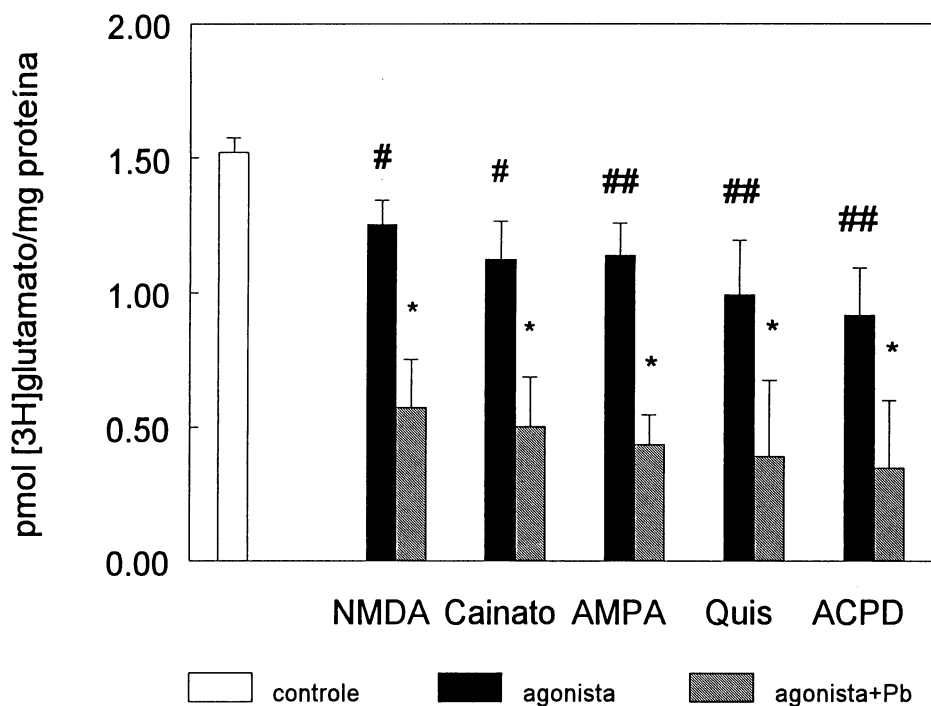


Figura III.13. Efeito do acetato de chumbo 300 μ M *in vitro* sobre a união específica de [3 H]glutamato deslocada por agonistas glutamatérgicos. Os valores estão expressos em pmol / mg de proteína. Cada valor representa a média de 3-4 experimentos.

#: $p < 0,05$, # #: $p < 0,01$ quando foi comparada a união específica na presença de cada agonista glutamatérgico com a união específica na ausência de agonista (controle) pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

* $p < 0,05$ quando comparado a união específica na presença de cada agonista glutamatérgico com e sem acetato de chumbo pelo teste t de Student.

III. 3. 4. Efeitos do chumbo sobre a adenilato ciclase (AC)

Tendo em vista que a adenilato ciclase é uma enzima essencial nas funções cerebrais por catalisar a produção do segundo mensageiro AMPc, uma alteração neste parâmetro neuroquímico poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos tóxicos do chumbo. Sendo assim, decidimos estudar os efeitos do chumbo tanto *in vivo* como *in vitro* sobre a atividade da AC em preparações de membrana lavadas e lisadas de córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens e adultos.

III.3.4.1. Estudos *in vivo*

III.3.4.1.1. Efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a atividade basal da adenilato ciclase em membrana de cerebelo de ratos jovens e adultos.

O tratamento com acetato de chumbo realizado nas ratas mães (0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4,0 mM de acetato de chumbo na água de beber por 16 a 17 semanas) afetou significativamente a atividade da AC em cerebelo [$F(4,19) = 5,60$, $p < 0,01$]. O teste de Duncan mostrou que os grupos expostos às concentrações de 2,0 e 4,0 mM de acetato de chumbo apresentaram uma menor atividade da enzima em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura III.14.**). Contudo, a ANOVA revelou que em se tratando da atividade da AC em ratos jovens expostos ao chumbo durante a gestação e lactação, bem como nos ratos adultos que permaneceram com a exposição ao chumbo após o desmame até a idade de 6 meses não houve um efeito significativo do tratamento (**Figura III.14.**). Desta forma, o efeito do chumbo *in vivo* sobre a atividade da AC basal em cerebelo parece ser bastante dependente do modelo de exposição ao metal.

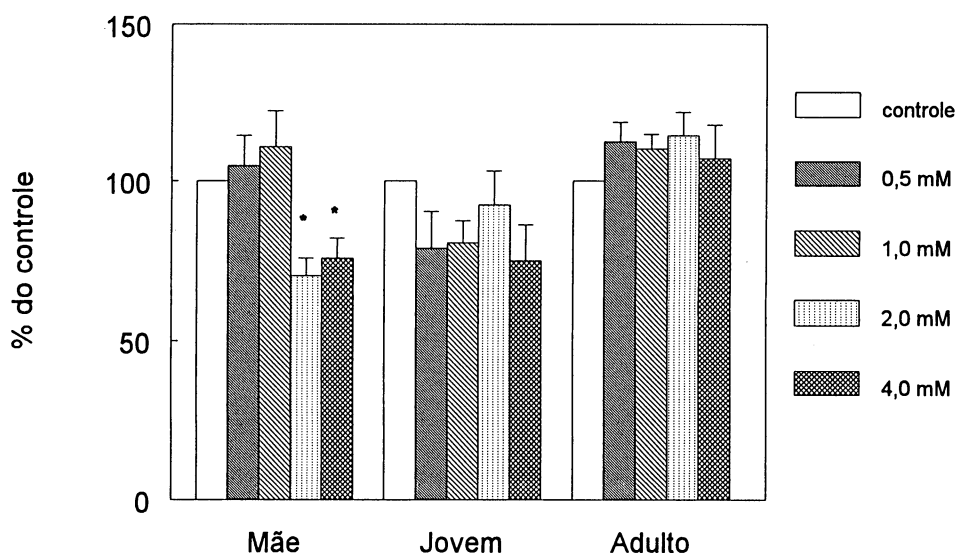


Figura III.14. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade basal da AC em membranas de cerebelo. Os resultados estão expressos como média dos valores em porcentagem em relação grupo controle + erro padrão (n = 4 a 9). O valor médio da atividade basal da AC em pmol AMPc / mg de proteína / min \pm erro padrão no grupo controle de ratas mães, ratos jovens e ratos de 6 meses foi, respectivamente: $217,3 \pm 26,4$; $533,8 \pm 60,8$; $247,2 \pm 42,1$. * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.4.1.2. Efeito da exposição ao acetato de chumbo em ratos sobre a atividade basal da adenilato ciclase em membrana de córtex cerebral de ratos jovens e adultos.

O tratamento com acetato de chumbo realizado nas ratas mães (0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4,0 mM de acetato de chumbo na água de beber por 16 a 17 semanas) afetou significativamente a atividade da AC em córtex cerebral [$F(4,27) = 4,10$, $p < 0,01$]. O teste de Duncan mostrou que os animais do grupo 0,5 mM apresentaram uma menor atividade basal da enzima quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura III.15.). A ANOVA de uma via também revelou um efeito significativo do tratamento com chumbo sobre a atividade basal da enzima de ratos jovens expostos indiretamente ao chumbo durante a gestação e lactação [$F(4,22) = 4,78$, $p < 0,01$]. O teste de Duncan mostrou que os animais do grupo 1,0 mM ($p < 0,05$), 2,0 mM e 4,0 mM ($p < 0,01$) apresentaram uma atividade inferior aos animais do grupo controle (Figura III.15.). Não houve um efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo nos ratos que após o desmame permaneceram sob exposição ao metal até seis meses de idade (Figura III.15.). Estes re-

sultados indicam que a atividade basal da AC de córtex cerebral de ratos é bastante sensível à inibição por chumbo, mas que conforme a concentração do metal e/ou o tempo de exposição ao mesmo, pode haver uma recuperação da atividade enzimática.

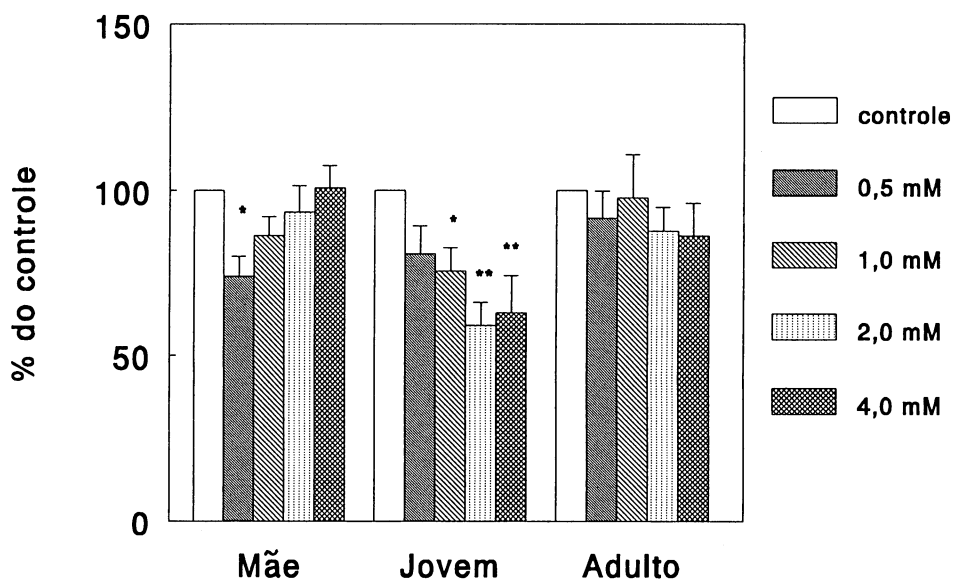


Figura III.15. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade basal da AC em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos como média dos valores em porcentagem em relação ao grupo controle + erro padrão (n = 4 a 9). O valor médio da atividade basal da AC em pmol AMPc / mg de proteína / min \pm erro padrão, no grupo controle de ratas mães, ratos jovens e ratos de 6 meses foi, respectivamente: $161,7 \pm 23,3$; $288,5 \pm 36,8$; $147,8 \pm 25,3$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao respectivo grupo controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.4.1.3. Efeito da exposição ao acetato de chumbo em ratos sobre a atividade da adenilato ciclase em membranas de cerebelo e córtex cerebral estimuladas por Gpp(NH)p $10 \mu\text{M}$.

É conhecido que o Gpp(NH)p, um análogo não hidrolisável do GTP, na concentração de $10 \mu\text{M}$ estimula a atividade da adenilato ciclase por saturar proteínas Gs (Newman & Belmaker, 1987; Paz et al., 1994; Tasca et al., 1995). Com a finalidade de investigar se o tratamento com acetato de chumbo *in vivo* teria interferido na sensibilidade da adenilato ciclase à modulação por proteínas G, decidimos verificar se membra-

nas preparadas a partir de animais dos diferentes grupos expostos ao chumbo teriam a mesma resposta da membrana proveniente de animais do grupo controle, em relação à adição do Gpp(NH)p ao meio de incubação. A ANOVA de uma via mostrou que a porcentagem de estimulação da atividade basal da AC produzida pela adição de Gpp(NH)p ao meio de incubação não diferiu entre as membranas oriundas de ratos de diferentes grupos experimentais. Este resultado é válido tanto para ratas mães, como para ratos jovens e ratos adultos de 6 meses e idade em membranas de cerebelo e córtex cerebral (Figura III. 16. e III.17.).

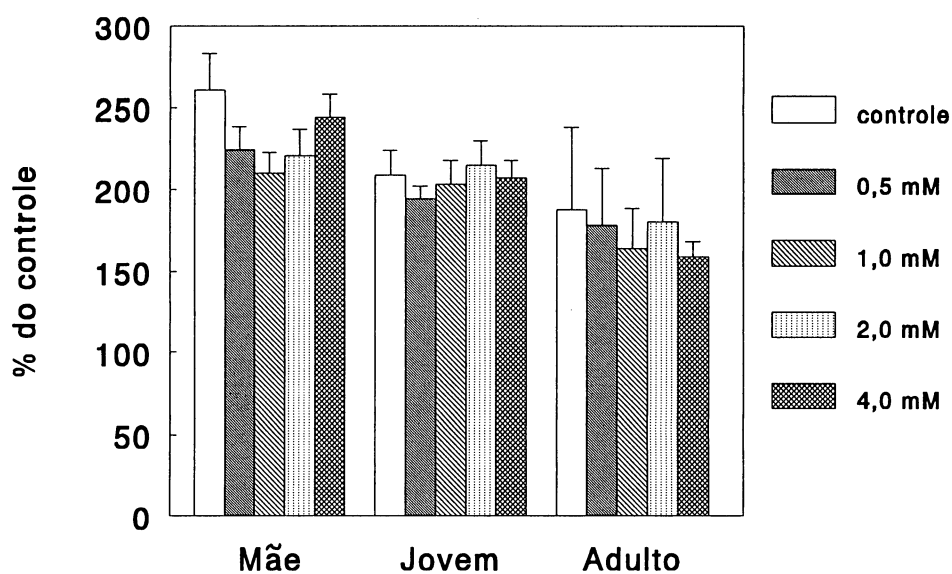


Figura III.16. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC estimulada por Gpp(NH)p 10 μ M em membranas de cerebelo. Os resultados estão expressos em porcentagem do controle (na ausência de Gpp(NH)p no meio de incubação = 100%).

Não houve efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo pela ANOVA de uma via.

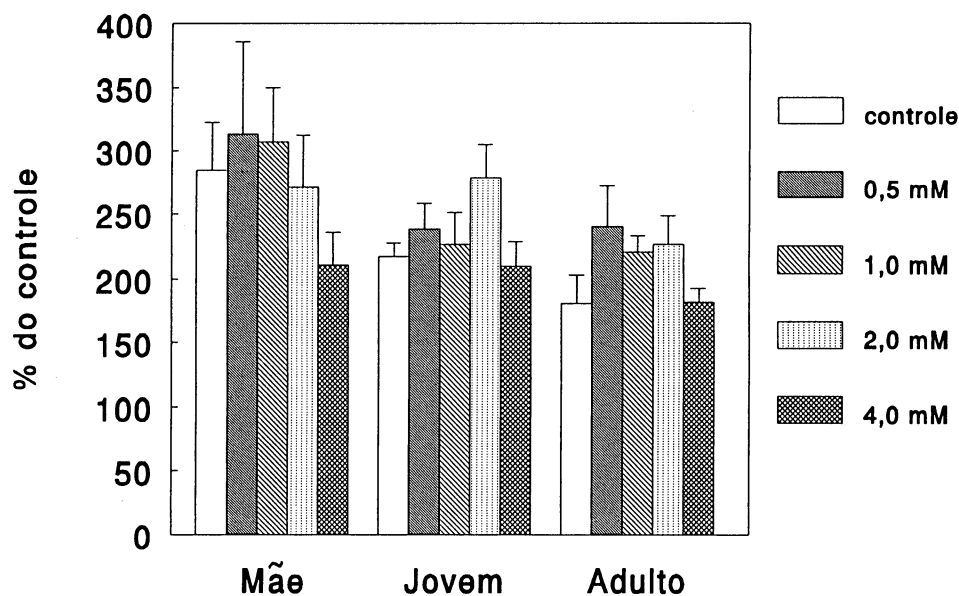


Figura III.17. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC estimulada por Gpp(NH)p 10 μ M em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos em porcentagem do controle (na ausência de Gpp(NH)p no meio de incubação = 100%). Não houve efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo pela ANOVA de uma via.

III.3.4.1.4. Efeito da exposição ao acetato de chumbo em ratos sobre a atividade da adenilato ciclase em membranas de cerebelo e córtex cerebral inibida por 3,0 μ M de acetato de chumbo.

Com o objetivo de investigar se o tratamento com acetato de chumbo *in vivo* teria afetado a sensibilidade da enzima adenilato ciclase à inibição por acetato de chumbo adicionado na incubação, foi utilizado uma concentração de acetato de chumbo que havia inibido significativamente (produzindo aproximadamente 50 % de inibição da atividade) as AC de córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens ou adultos: 3,0 μ M (Figuras III.18. e III.19.). A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças significativas do tratamento com acetato de chumbo em relação à sensibilidade da AC à inibição pelo metal, tanto para ratas mães, como para ratos jovens e ratos adultos de 6 meses e idade em membranas de cerebelo e córtex cerebral (Figuras III.18. e III.19.).

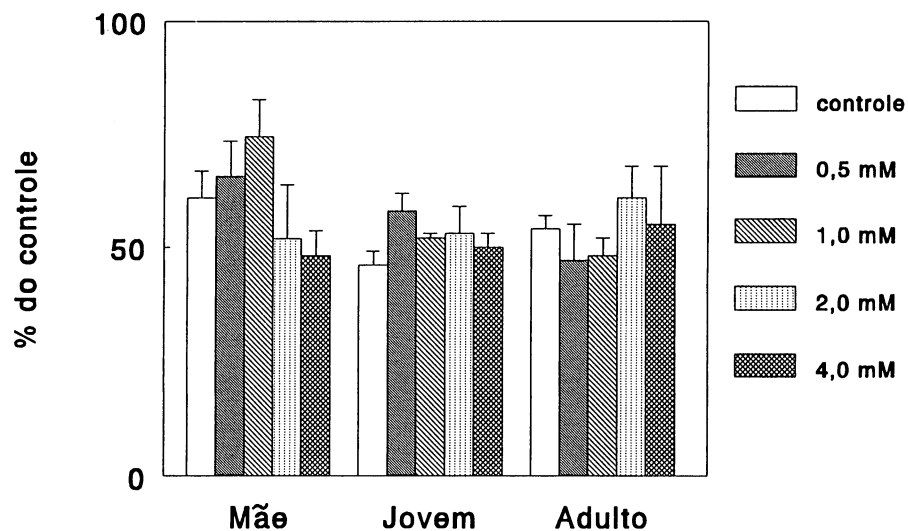


Figura III.18. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC inibida por acetato de chumbo $3,0 \mu\text{M}$ em membranas de cerebelo. Os resultados estão expressos em porcentagem do controle (na ausência de acetato de chumbo no meio de incubação). Não houve efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo pela ANOVA de uma via.

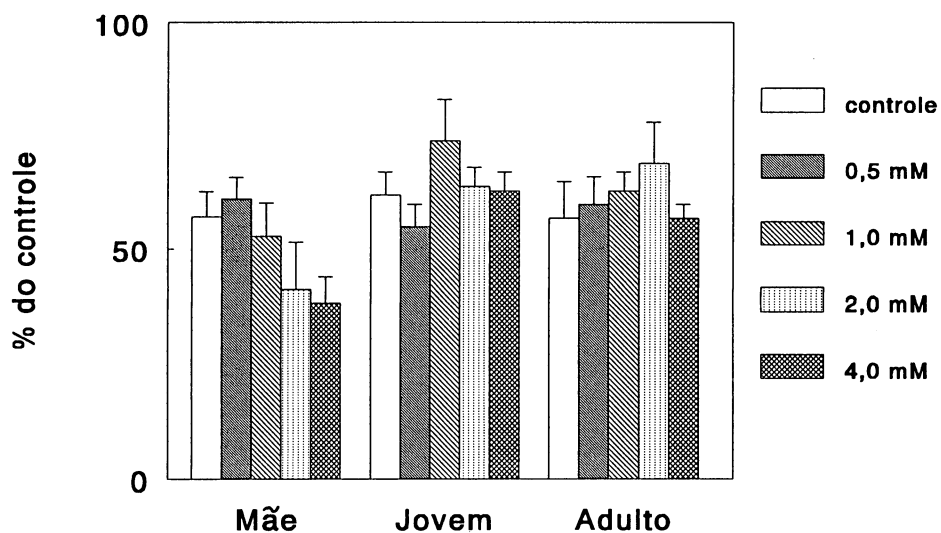


Figura III.19. Efeito do tratamento com acetato de chumbo das mães, ratos jovens (21 a 23 dias de idade), e ratos adultos (6 meses de idade) sobre a atividade da AC inibida por acetato de chumbo $3,0 \mu\text{M}$ em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos em porcentagem do controle (na ausência de acetato de chumbo no meio de incubação). Não houve efeito significativo do tratamento com acetato de chumbo pela ANOVA de uma via.

III.3.4.2. Estudos *in vitro*

III.3.4.2.1. Efeito de concentrações crescentes de magnésio no meio de incubação sobre a atividade basal da AC.

A essencialidade do magnésio para a atividade catalítica da AC está bem estabelecida na literatura (Gilman, 1987). O gráfico da **Figura III.20.** mostra o efeito de concentrações crescentes de magnésio sobre a atividade basal da AC em membranas de córtex cerebral e cerebelo de ratos adultos. Na concentração de 10 mM de cloreto de magnésio, a qual havia sido previamente utilizada pelo grupo (Souza & Ramírez, 1991), já foi evidenciado um efeito estimulatório máximo sobre a atividade da enzima.

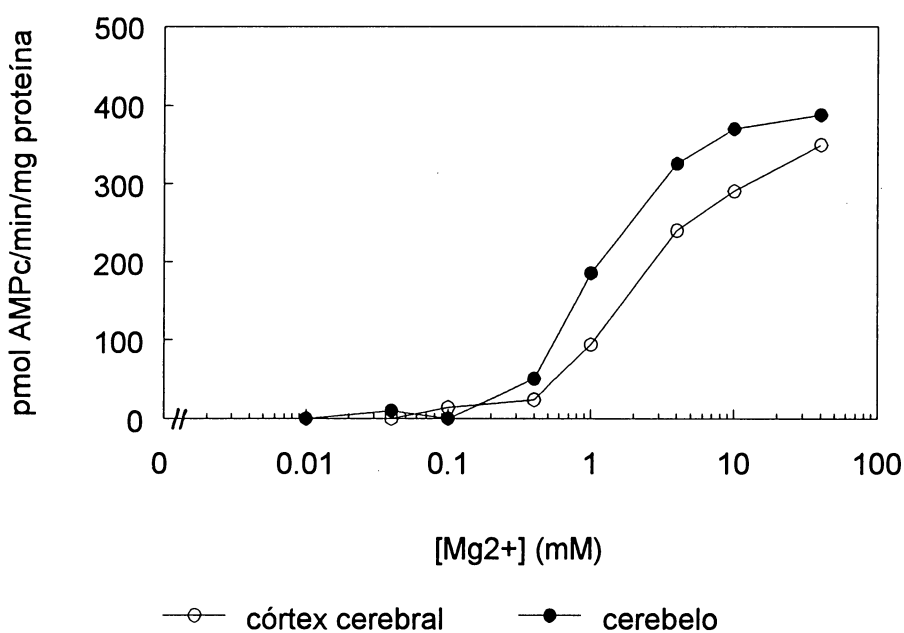


Figura III.20. Efeito de concentrações crescentes de cloreto de magnésio sobre a atividade basal da AC em membranas de cerebelo e córtex cerebral de rato adulto. O gráfico mostra os valores de um experimento representativo. A atividade da AC está expressa em pmol AMPc / mg de proteína / min.

III.3.4.2.2. Avaliação do efeito da presença do DTT no meio de incubação sobre o efeito do chumbo sobre a AC.

Em estudos realizados pelo grupo, foi utilizado DTT no meio de incubação para dosagem da atividade da AC (Souza & Ramírez, 1991; Paz et al., 1994; Rocha & Souza, 1994; Elisabetsky et al., 1995; Tasca et al., 1995), sendo este também o procedimento adotado em alguns outros estudos (Ozawa & Rasenick, 1991). Em virtude da capacidade quelante deste composto (Gnonlonfoun et al., 1991), foi testado se a sua presença no meio de incubação interferiria com o efeito do chumbo sobre a atividade da AC (Figura III. 21.). Utilizou-se a membrana de córtex cerebral de rato adulto como representativa para a realização deste experimento.

A ANOVA de duas vias (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μM de acetato de chumbo) X DTT (0 ou 1 mM) revelou efeitos significativos do chumbo [$F(6,28) = 13,89$, $p < 0,001$], do DTT no meio de incubação [$F(1,28) = 55,37$, $p < 0,001$] e da interação chumbo X DTT no meio de incubação [$F(6,28) = 2,44$, $p < 0,050$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve um efeito da interação porque o efeito do chumbo sobre a atividade basal da AC apenas ocorreu na membrana incubada na ausência de DTT, nas concentrações de 10 μM e 100 μM de acetato de chumbo. Estes resultados demonstram que o DTT impediu a ação inibitória do chumbo sobre a AC, provavelmente devido a sua capacidade quelante (Gnonlonfoun et al., 1991). Em ensaios que avaliam a ação de metais sobre a AC, a presença de DTT impede uma avaliação quantitativa da capacidade inibitória do metal em questão sobre a enzima.

Também observamos que não ocorreu um efeito estimulatório do chumbo sobre a atividade da AC em nenhuma das concentrações de chumbo testadas.

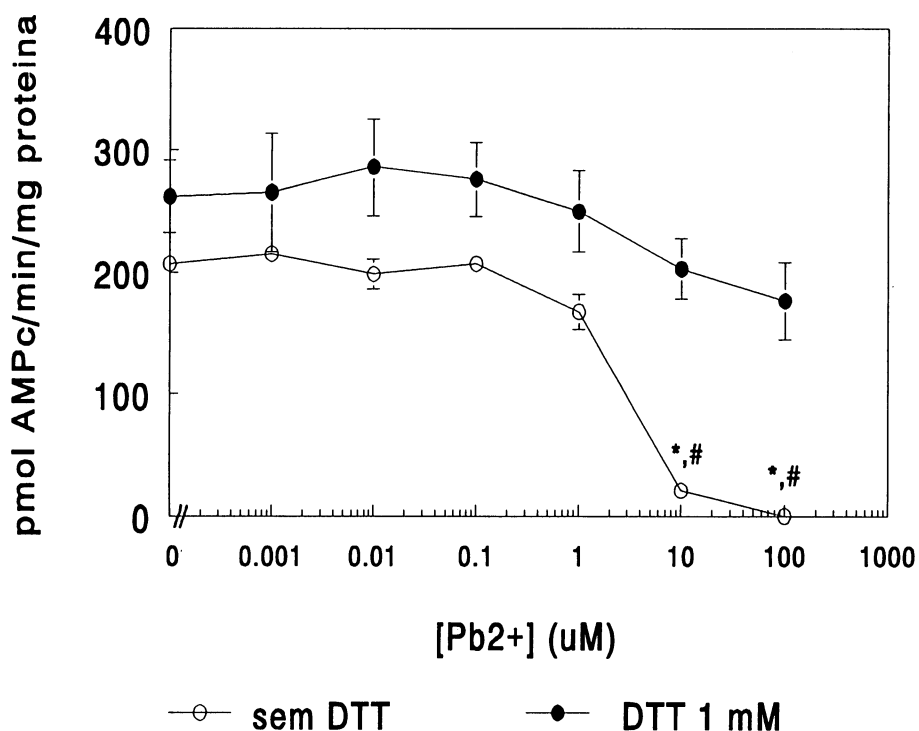


Figura III.21. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a atividade basal da AC em preparação de membrana de córtex cerebral de ratos adultos na presença de 1 mM de ditioneitol (DTT) ou na ausência de DTT no meio de incubação. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão de 3 experimentos. Os valores estão expressos em pmol AMPc / min / mg proteína. *,# $p < 0,01$ em relação ao controle sem chumbo da membrana sem DTT e $p < 0,01$ em relação à respectiva concentração de chumbo na membrana com DTT pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

III.3.4.2.3. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a atividade basal da adenilato ciclase em membranas de cerebelo e córtex cerebral de ratos jovens e adultos.

A **Figura III.22.** mostra o efeito da adição de concentrações crescentes de acetato de chumbo *in vitro* sobre a atividade basal da AC.

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do chumbo sobre a atividade da AC em membranas de cerebelo de ratos jovens e adultos [$F(8,27) = 11,54$, $p < 0,001$] e [$F(8,15) = 10,18$, $p < 0,001$], respectivamente. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que em cerebelo de ratos jovens e de ratos adultos houve uma menor atividade da AC nas concentrações de acetato de chumbo de 3; 5; 7; 10 e 100 μM ($p < 0,05$ para

todas as concentrações em ratos jovens e, $p < 0,05$ para as concentrações de 3; 5; 7 e 10 μM e $p < 0,01$ para a concentração de 100 μM em ratos adultos).

Uma inibição quase completa da atividade da AC ocorreu com uma concentração de chumbo de 100 μM em todas as preparações de membrana testadas (**Figura III.22.**).

De forma semelhante, houve um efeito significativo do chumbo sobre a atividade da AC em membranas de córtex cerebral de ratos jovens e adultos [$F(8,27) = 23,01$, $p < 0,001$] e [$F(8,20) = 54,51$, $p < 0,001$], respectivamente. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que em córtex cerebral de ratos jovens e de ratos adultos houve uma menor atividade da AC nas concentrações de acetato de chumbo de 3; 5; 7; 10 e 100 μM em relação ao controle ($p < 0,05$ para todas as concentrações em ratos jovens e $p < 0,01$ para todas as concentrações em ratos adultos).

Os valores de IC_{50} para inibição da AC por acetato de chumbo, calculados pelo método de Dixon & Webb (1964) está apresentado na **Tabela III.1.**

Tabela III.1. IC₅₀ para inibição da AC de cerebelo e córtex cerebral de de ratos jovens e de ratos adultos por acetato de chumbo.

Membrana	IC ₅₀ (μM)
Cerebelo de rato jovem	2,1 ± 0,1 ^a
Cerebelo de rato adulto	3,9 ± 0,5 ^b
Córtex cerebral de rato jovem	4,0 ± 0,3 ^b
Córtex cerebral de rato adulto	2,5 ± 0,1 ^c

Os valores de IC₅₀ estão expressos como média ± erro padrão de 3 a 4 determinações. As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes entre si pelo teste do raio múltiplo de Duncan (p<0,05).

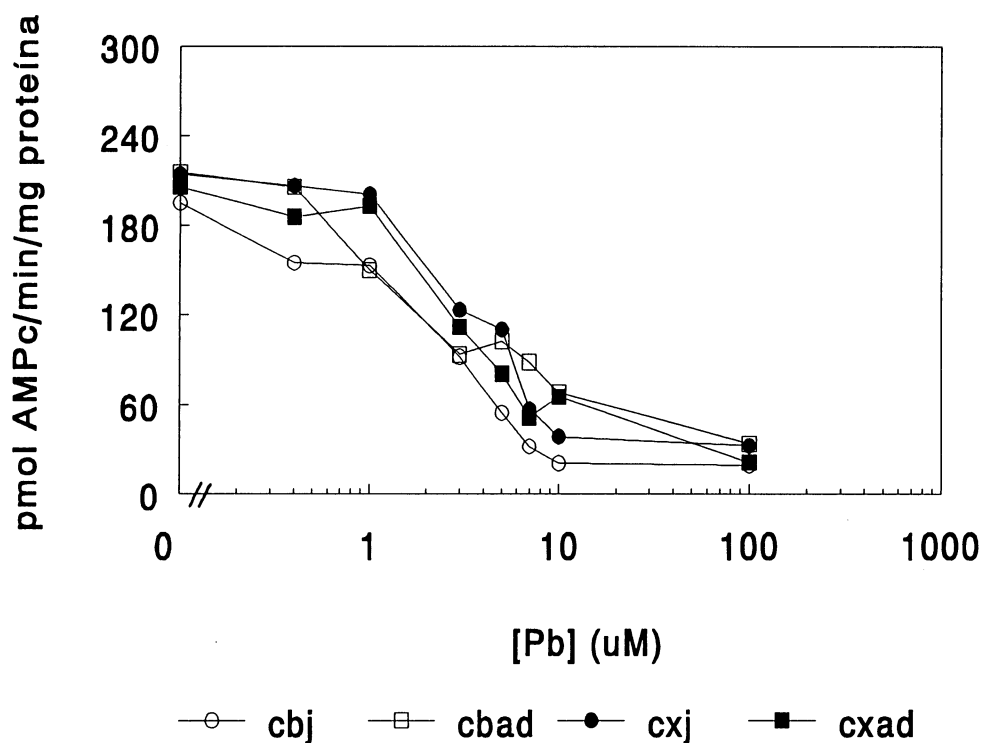


Figura III.22. Efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a atividade basal da AC em preparação de membrana de córtex cerebral de rato jovens = 21 dias (cxj), de córtex cerebral de ratos adultos = 3 a 6 meses (cxad), de cerebelo de ratos jovens = 21 dias (cbj) e de cerebelo de ratos adultos = 3 a 6 meses (cbad). Os resultados são a média de 4 experimentos no caso de cxj e cbj e de 3 experimentos no caso de cxad e cbad e estão expressos em pmol AMPc / min / mg proteína. O erro padrão foi inferior à 10% do valor da média. As significâncias pelo teste do raio múltiplo de Duncan estão indicadas no texto.

III.4.DISCUSSÃO

A membrana celular é teoricamente a primeira barreira encontrada pelo chumbo. Considerando que ela é muito acessível, e dada a afinidade de metais pesados como o chumbo por grupamentos funcionais de proteínas, tais como sulfidril, carboxila e imidazol, não é surpreendente que muitos efeitos deste metal ocorram mediante interação deste com proteínas da membrana (Aschner et al., 1991; Goering, 1993).

O estudo da união específica de neurotransmissores e de seu acoplamento com efetores celulares específicos está entre os parâmetros neuroquímicos utilizados para caracterizar os efeitos bioquímicos responsáveis pela neurotoxicidade de alguns agentes tóxicos (Baraldi et al., 1988; Drew et al., 1989; Cagiano et al., 1990). Agentes neurotóxicos podem exercer seu efeito alterando a síntese, a liberação ou a recaptação de glutamato ou ainda, estimulando o efluxo inespecífico de glutamato de compartimentos citosólicos de neurônios e glia (Dawson et al., 1995). Todos estes mecanismos de ação devem alterar a neurotransmissão glutamatérgica. Ainda, a transmissão glutamatérgica pode ser afetada através de união de um dado agente no sítio de reconhecimento do agonista no receptor ou em sítios alostéricos modulando positiva ou negativamente a afinidade pelo agonista, através de alteração no acoplamento entre agonista e efetor e no caso dos receptores ionotrópicos também por união no canal iônico ou na proximidade deste, inibindo os fluxos iônicos através do canal (Wroblewski & Danysz, 1989). Levando em consideração que o glutamato pode estimular a produção de AMPc em sistemas íntegros, possivelmente envolvendo o estímulo da liberação de adenosina (Winder & Conn, 1993; Schoepp et al., 1995), alterações no sistema glutamatérgico provocadas pela ação de agentes tóxicos podem levar a alterações na produção de AMPc. O estudo de alterações na neurotransmissão provocadas pelo chumbo podem ajudar a elucidar a base molecular para as alterações comportamentais associadas à exposição a este agente neurotóxico. No presente capítulo descrevemos os efeitos inibitórios do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas cerebrais de ratos e sobre a atividade da enzima adenilato ciclase (AC). Foram estudados os efeitos *in vitro* e *in vivo* deste metal sobre estes parâmetros em córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens e adultos. Nos estudos de exposição ao chumbo *in vivo* um dos principais objetivos era verificar se eventuais alterações manifestadas nos ratos jovens persistiriam mediante exposição prolongada dos animais ao metal. Isto é importante, dada a reversibilidade de algumas ações de agentes neurotóxicos relatadas na literatura, devido a mecanismos compensatórios (World Health Organization, 1986).

III.4.1. União específica de [³H]glutamato

A fim de avaliar os efeitos do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas cerebrais de ratos, foi utilizada uma metodologia de união específica na ausência de sódio no meio de incubação. Nestas condições, a união específica de [³H]glutamato ocorre em sítios pré- e pós-sinápticos e não deve ocorrer em sítios de captação de glutamato dependentes de sódio (Foster & Fagg, 1984; Collingridge & Lester, 1989). Além disto, as células gliais também contém sítios de união de [³H]glutamato independente de sódio (Bridges et al., 1987; Hansson & Rönnbäck, 1995).

III.4.1.2. Estudos *in vivo*

O estudo da união específica de [³H]glutamato em cerebelo e córtex cerebral de ratos jovens expostos ao metal durante a fase de gestação e lactação mostrou uma alteração no sistema glutamatérgico em ratos que apresentavam uma concentração de chumbo sangüínea em torno de 50 µg/dl (Tabela I.16., Capítulo I), as quais são relevantes em termos de exposição ambiental. A referida alteração foi uma diminuição da união específica de [³H]glutamato nestas duas estruturas (Figuras III.7. e III.8.). Contudo, no presente estudo não foi avaliado se esta redução foi devido a uma alteração no número de receptores ou na afinidade entre o receptor e o glutamato. Ainda, é interessante observar que houve uma recuperação deste efeito inibitório em cerebelo e córtex cerebral mediante manutenção da exposição dos ratos ao chumbo após o desmame, até seis meses de idade (Figuras III.7. e III.8.). O estudo de Guilarte et al. (1993) mostrou que ratos expostos ao chumbo durante a gestação, lactação e após o desmame apresentaram um aumento do número de sítios de união de [³H]MK-801 sem alteração na constante de afinidade em preparação de membrana de cérebro anterior. Também cabe ressaltar o fato de as ratas mães expostas ao metal por 16 a 17 semanas não terem apresentado uma alteração significativa na união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral ou cerebelo. Este resultado é semelhante ao observado por Guilarte & Miceli (1992) em relação à união de [³H]MK-801 em córtex cerebral de ratos cuja exposição ao chumbo se iniciou na idade adulta.

Alterações na plasticidade sináptica podem ser conseqüência da exposição do SNC a agentes neurotóxicos (Stoltenburg-Didinger, 1994). Dentre as alterações que podem ocorrer, alterando a eficiência sináptica, podemos citar a dessensibilização de receptores. A dessensibilização envolve uma perda de resposta da célula a um determinado agonista, mediante exposição prévia a este agonista. Ela pode ocorrer por altera-

ção conformacional do receptor, por seqüestro do receptor por organelas endocitóticas e, se a exposição ao agonista for prolongada, pode haver uma degradação proteolítica do receptor, diminuindo o número de receptores na célula ("down-regulation") (Sibley & Lefkowitz, 1987; Klein et al., 1989; Ruiz et al., 1996). Estas alterações na plasticidade sináptica afetam, por exemplo, a geração de AMPc (Harden, 1983; Sibley & Lefkowitz, 1987). O efeito inibitório do chumbo observado em córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens poderia envolver uma dessensibilização do receptor glutamatérgico. No caso da neurotoxicidade por mercúrio foi proposto que este metal exerce sua ação tóxica indiretamente através do acúmulo de glutamato na fenda sináptica (Brookes, 1992). Pode-se presumir que se o chumbo exerce um efeito neurotóxico por um mecanismo semelhante ao mercúrio, o acúmulo de glutamato na fenda sináptica produzido pela exposição ao metal provavelmente afetaria a união específica de [³H]glutamato em seus receptores específicos, através de um fenômeno de dessensibilização. Contudo, uma exposição dos ratos a um período de tempo mais prolongado (ratos de seis meses de idade que permaneceram com o tratamento com acetato de chumbo após o desmame) reverteu a inibição da união específica de glutamato evidenciada nos animais jovens. Este fato pode ser devido a um mecanismo compensatório desencadeado mediante a presença prolongada do chumbo no SNC, que pode envolver uma alteração do número ou afinidade do receptor glutamatérgico e/ou uma menor disponibilidade de chumbo na sua forma livre capaz de interagir com o receptor, por ação de proteínas quelantes de chumbo (Egle & Shelton, 1986; Opanashuk & Finkelstein, 1995).

III.4.1.2. Estudos *in vitro*

Considerando que houve um efeito inibitório sobre a união específica de [³H]glutamato em ratos jovens expostos ao acetato de chumbo, tanto em cerebelo como em córtex cerebral (**Figuras III.7. e III.8.**, respectivamente), ao contrário do observado em animais adultos (**Figuras III.7. e III.8.**), tornou-se importante verificar a eventual ocorrência de uma sensibilidade diferencial ao acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em ratos jovens e adultos.

O estudo do efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral e cerebelo de ratos de 21 dias de idade e de 6 meses de idade mostrou uma diferença de sensibilidade deste parâmetro quanto à inibição por chumbo, conforme a estrutura cerebral analisada (**Figuras III.9. e III.10.**). Esta diferença é devido ao fato de o chumbo não ter afetado significativamente a união específica de [³H]glutamato em membranas de cerebelo de ratos de 21 dias ou de 6

meses de idade (Figura III.9.), mas ter inibido significativamente a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de ratos de 21 dias e de 6 meses de idade (Figura III.10.). No que se refere a membranas de córtex cerebral, foi demonstrado um efeito significativo da idade na inibição da união específica de [³H]glutamato. No caso da inibição ocorrida na preparação de membrana cortical de rato jovem, o efeito já foi significativo na concentração de acetato de chumbo de 4 μM (Figura III.10.), a qual é comparável com outros estudos da literatura que relatam que o chumbo inibe o receptor NMDA em concentrações na faixa de μM (Ujihara & Albuquerque, 1992; Guilarte et al., 1994; Schulte et al., 1995). Na membrana cortical de ratos adultos o efeito do chumbo só foi significativo a partir de 40 μM de acetato de chumbo (Figura III.10.).

A maior sensibilidade dos receptores glutamatérgicos em ratos jovens está de acordo com a literatura que trata dos efeitos do chumbo sobre o receptor de NMDA (Guilarte & Miceli, 1992; Ishihara et al., 1995). Contudo, parece inexistir estudos que mostrem um efeito inibitório do chumbo *in vitro* usando o ligante [³H]glutamato em membranas de cérebro de ratos. No estudo de Regunathan & Sundaresan (1985) foi relatado uma ausência de efeito do acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal. Mena et al. (1985) relataram que a união específica de [³H]glutamato independente de sódio em membranas sinápticas de cérebro anterior de ratos foi inibida *in vitro* por alguns metais pesados: cobalto, níquel, cobre, zinco e cádmio. Entretanto, o chumbo não foi estudado neste trabalho. Em outros estudos, também foi relatado um efeito inibitório do zinco, cobre e cádmio sobre a união específica de [³H]glutamato (Slevin & Kasarkis, 1985; Monahan & Michel, 1987). Foi relatado na literatura a participação de grupos sulfidril na função dos receptores glutamatérgicos (Kiskin et al., 1986). O efeito inibitório do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral pode envolver o bloqueio destes grupamentos. Contudo, é difícil entender porque o cerebelo não apresenta sensibilidade à ação inibitória do chumbo *in vitro*.

A união específica de [³H]glutamato é bastante influenciada pela composição iônica do meio (Baudry & Lynch, 1979; Foster & Fagg, 1984). Além do bem estudado efeito do magnésio sobre as respostas iônicas ao NMDA (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984; Wong & Kemp, 1991; Strecker et al., 1994), o magnésio foi descrito como um cátion estimulador da união específica de [³H]glutamato (Baudry & Lynch, 1979; Foster & Fagg, 1984). Sendo assim, testamos se o efeito inibitório do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de ratos jovens e adultos

seria influenciada pela presença de magnésio no ensaio. Os resultados mostraram que o magnésio não influenciou a capacidade de o chumbo produzir um efeito inibitório sobre este parâmetro.

A partir da verificação de que o chumbo produzia um efeito inibitório *in vitro* sobre a união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral (**Figura III.10.**), decidiu-se estudar o efeito deste metal sobre os subtipos de receptores de glutamato (**Figura III.13.**). Os resultados da literatura parecem apontar para uma ação do chumbo exclusiva sobre receptores NMDA (Alkondon et al., 1990; Ujihara & Albuquerque, 1992; Guilarte et al., 1993, 1994, 1995).

Os nossos resultados de deslocamento da união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de ratos adultos por agonistas específicos, foram semelhantes aos obtidos por Elisabetsky et al. (1995). Em ambos os estudos, os quais utilizaram uma metodologia semelhante, demonstrou-se que as preparações de membrana de córtex cerebral de ratos adultos continham receptores sensíveis a todos os tipos de agonistas glutamatérgicos estudados (**Figura III.13.**).

Verificou-se que o chumbo na presença de cada agonista glutamatérgico inibiu significativamente a união específica de [³H]glutamato. Isto significa que o chumbo, na concentração de 300 µM, parece ter atuado em todos os subtipos de receptores de glutamato testados. Este resultado traz uma nova informação para a literatura, da inibição não apenas do receptor de NMDA pelo chumbo, e merece uma maior investigação futura, como por exemplo em animais jovens. Uma abordagem adequada seria a utilização dos agonistas específicos na sua forma radioativa. Deve-se levar em consideração que a abordagem experimental usada de deslocar a união de [³H]glutamato pela adição do agonista em uma concentração 1.000 vezes superior ao glutamato é criticável do ponto de vista quantitativo. Podemos facilmente perceber isto se somarmos as porcentagens de união específica de [³H]glutamato quando da adição de cada agonista. O somatório das porcentagens ultrapassa 100%. Isto se deve ao fato de agonistas de glutamato em altas concentrações poderem ligar-se de maneira não tão específica, unindo-se a outros subtipos de receptores para glutamato (Wroblewski & Danysz, 1989). De qualquer forma, estas considerações não invalidam a interpretação de que não apenas o receptor NMDA é sensível ao chumbo, uma vez que aparentemente todos os subtipos de receptores glutamatérgicos usados foram sensíveis ao chumbo.

III.4.2. Atividade da adenilato ciclase

Alguns agentes com ação neurotóxica, tais como metais pesados e inseticidas, inibem a atividade da AC cerebral (Storm & Gunsalus, 1974; Nathanson & Bloom, 1975, 1976; Ewers & Erbe, 1980; Kodavanti et al., 1989). No presente estudo verificamos que a atividade da AC basal em córtex cerebral e cerebelo foi inibida *in vivo* e *in vitro* por baixas concentrações de chumbo.

III.4.2.1. Estudos *in vivo*

Foi objetivo deste trabalho verificar as ações do chumbo sobre os níveis de AMPc em córtex cerebral e cerebelo de ratos expostos a este metal, considerando a importância do AMPc como regulador das funções neuronais. É possível que a diminuição da atividade da AC, com a conseqüente diminuição nos níveis de AMPc, possa contribuir para as alterações comportamentais nos animais expostos ao chumbo. Ando et al. (1987) relataram que déficits de memória foram evitados com forskolina, um ativador da AC.

Os nossos resultados mostraram que a atividade basal da AC de cerebelo e córtex cerebral foi sensível aos efeitos do chumbo *in vivo* (Figuras III.14. e III.15.). O efeito inibitório do metal sobre a atividade da AC mostrou ser dependente do modelo de exposição ao chumbo utilizado.

Cabe ressaltar que parte do efeito inibitório do chumbo *in vivo* que foi observado na atividade específica da AC em cerebelo das ratas mães nos grupos 2,0 e 4,0 mM (Figura III.14.) pode ter sido influenciado pelo maior teor de proteínas nestas preparações (Figura III.4.) Alterações no teor de proteínas nas membranas de córtex cerebral não foram observadas (Figura III.5.) e, desta forma, não podem responder pelas alterações na atividade da AC cortical obtidas *in vivo*.

A recuperação da atividade específica basal da AC de córtex cerebral de ratos de seis meses de idade dos grupos expostos ao chumbo, quando comparado à atividade enzimática dos ratos jovens, pode ser devido a:

- a) um aumento da expressão da AC no córtex cerebral após administração prolongada ao chumbo, conforme já foi relatado no caso da exposição crônica ao lítio (Colin et al., 1991).
- b) uma menor disponibilidade de chumbo livre acessível à enzima, que pode ter ocorrido devido a uma quelação do chumbo por proteínas quelantes deste metal no cérebro, em resposta ao tratamento prolongado. É sabido que pode ocorrer uma indução da síntese de algumas proteínas cerebrais mediante exposição ao chumbo (Opanashuk &

Finkelstein, 1995), o qual presume-se que possam conferir uma adaptação à presença do chumbo.

c) uma alteração conformacional da enzima que a tenha tornado menos sensível ao efeito inibitório do chumbo.

Na literatura parece inexistir um estudo da atividade da AC após administração prolongada ao chumbo, como realizado no presente trabalho. No entanto, foi relatado uma inibição da atividade da AC, seguida de uma recuperação da atividade após tratamento agudo com cádmio em ratos (Fasitsas et al., 1991).

Foi proposto que a inibição da AC pelo chumbo não envolva a proteína G (Sandhir & Gill, 1994), assim como também que a inibição não envolva a interação do metal com o sítio do magnésio (Doskeland, 1980). Os resultados que tratam do efeito estimulatório do Gpp(NH)p em membranas de ratos expostos ao chumbo não demonstraram alterações na estimulação da atividade da enzima por este nucleotídeo dependente do tratamento dos ratos com o metal (Figuras III.16. e III.17.).

A exposição dos ratos ao chumbo *in vivo* não afetou significativamente a sensibilidade da AC ao chumbo *in vitro* (Figuras III.18. e III.19.).

III. 4.2.2. Estudos *in vitro*

A fim de padronizar a técnica de determinação da atividade da AC em relação à presença de magnésio e de DTT no meio de incubação, foram realizados os experimentos mostrados nas Figuras III.20. e III.21. A Figura III.20. mostra a essencialidade do magnésio para a atividade da AC. A Figura III.21. mostra que o efeito inibitório do chumbo só é evidenciado na ausência de DTT. Sendo, assim concluiu-se que o DTT não deveria ser usado na incubação.

Tendo em vista as diferenças de sensibilidade da AC ao chumbo *in vivo* observadas entre ratos jovens e ratos adultos (Figuras III.14. e III.15.), tornou-se importante verificar se existiria uma diferença ontogenética na sensibilidade da AC quanto à inibição pelo chumbo *in vitro*. Sendo assim, o efeito do chumbo sobre a AC basal foi verificado em membranas de ratos de 21 dias de idade e de ratos adultos (3 a 6 meses de idade). O chumbo inibiu *in vitro* a atividade basal da AC em membrana de córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens e adultos com IC₅₀ que ficou na faixa de 2,1-4,0 µM de chumbo (Tabela III.1. e Figura III.22.). Nosso resultado em membranas de cerebelo está em concordância com o trabalho de Nathanson & Bloom (1975) e de Ewers & Erbe (1980) que relatam um IC₅₀ de 3,0 µM e de 1,9 µM para a AC de cerebelo, respectivamente. Nosso resultado em membranas de córtex cerebral difere do obtido por Sandhir

& Gill (1994), no qual o chumbo inibiu *in vitro* a atividade basal da AC sem calmodulina com IC₅₀ de aproximadamente 50 µM em membrana sináptica de córtex cerebral de rato jovem.

III.4.3. Considerações gerais sobre os efeitos *in vivo* e *in vitro* do chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato e sobre a atividade da AC em cerebelo e córtex cerebral

Não pode ser descartada a possibilidade de que o efeito do chumbo *in vivo* sobre a união específica de [³H]glutamato no cérebro seja indireto (Figuras III.7. e III.8.). Esta possibilidade parece ser especialmente plausível em se tratando do efeito inibitório provocado pelo tratamento com chumbo sobre a união específica de [³H]glutamato em cerebelo de ratos jovens (Figura III.7.). Esta união não foi afetada *in vitro* significativamente pelo chumbo até a concentração de 400 µM (Figura III.9.).

Embora tenham sido detectadas diferenças significativas no valor de IC₅₀ de chumbo que causou inibição da AC em cerebelo e córtex cerebral de ratos jovens e adultos *in vitro* (Tabela III.1. e Figura III.22), estas foram de pequena magnitude. Sendo assim, as diferenças de inibição da enzima nos estudos *in vivo* (Figuras III.14. e III.15.) podem ser atribuídas, pelo menos em parte, a efeitos indiretos do metal. O chumbo pode ter atuado em sistemas de neurotransmissores que afetaram a atividade da enzima e, no caso, da exposição prolongada ao chumbo, também deve-se considerar a possibilidade do desenvolvimento de mecanismos de adaptação à presença do chumbo. A ausência de efeito do chumbo sobre a estimulação da AC causada por Gpp(NH)p em concentrações saturantes sugere que a inibição da atividade da AC pelo chumbo independe da proteína G. Estudos *in vitro* com preparações de membrana de cerebelo e tectum óptico de pintos também demonstraram que o efeito estimulatório do Gpp(NH)p não é afetado pelo chumbo (dados não mostrados).

CAPÍTULO IV - EFEITOS DO CHUMBO *IN VITRO* SOBRE A UNIÃO ESPECÍFICA DE Gpp(NH)p EM MEMBRANAS DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS ADULTOS

IV.1.INTRODUÇÃO

IV.1.1. Proteínas G

As células especializadas em um organismo vivo comunicam-se com o ambiente externo através de mecanismos de transdução do sinal, no qual moléculas extracelulares como hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento ligam-se a receptores específicos na superfície celular e ativam segundo mensageiros associados à membrana. Elas recebem a maior parte das suas informações através de sistemas que utilizam proteínas G (proteínas ligadoras de nucleotídeos da guanina) como transdutoras do sinal extracelular para proteínas efetoras, gerando respostas intracelulares (Offermanns & Schultz, 1994).

As proteínas G são uma família de proteínas homólogas, que se encontram amplamente distribuídas nos seres vivos. Elas são encontradas em vários tecidos de células animais, em leveduras e em vegetais superiores (Kaziro et al., 1991).

As proteínas G são heterotriméricas, ou seja, contêm três subunidades: α , β e γ , com massas moleculares de aproximadamente 39-52, 35-36 e 6-8 kDa, respectivamente (Müller & Lohse, 1995). Elas pertencem à superfamília de proteínas ligadoras de GTP ou GTPases e são extremamente conservadas ao longo do reino animal (Bourne et al., 1991; Nürnberg et al., 1995). A superfamília de proteínas ligadoras de GTP consiste em várias famílias, incluindo fatores translacionais, proteínas G, proteínas protooncogénicas ras, outras proteínas ligadoras de GTP de baixo peso molecular e tubulinas. Também existem enzimas metabólicas que interagem com o GTP, tais como succinato tioquinase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Kaziro et al., 1991).

No seu estado basal, as proteínas G existem na sua forma oligomérica, com o GDP firmemente ligado à subunidade α (forma inativa). A união do agonista com seu receptor específico leva a uma alteração conformacional do receptor que induz a troca de GDP da subunidade α da proteína G por GTP presente em uma concentração celular relativamente alta (Casey & Gilman, 1988; Birnbaumer, 1990). Forma-se, então o complexo subunidade α -GTP e o dímero $\beta\gamma$. A união do GTP traz duas importantes conseqüências. A primeira é a diminuição da afinidade do receptor pelo agonista. A

segunda, é a ativação da proteína G, de forma que ela passa a interagir com um efetor específico. Este processo leva à modulação da atividade de efetores, isto é, uma enzima ou um canal iônico. Existe uma atividade GTPásica intrínseca que hidrolisa o GTP ligado, gerando GDP e, desta forma, inativando o sistema (Casey & Gilman, 1988; Offermanns & Schultz, 1994; Gudermann et al., 1995) (Figura IV.1.). As células contêm aproximadamente 100 μM de GTP e aproximadamente 10 μM de GDP e uma constante de associação com G_{α} na faixa de nanomolar. Sendo assim, o GTP e o GDP existem em concentrações saturantes na célula e provavelmente não limitam a troca GTP/GDP (Bourne et al., 1991). O magnésio é importante tanto para a união do GTP na proteína G, quanto para a atividade GTPásica estimulada pela união do neurotransmissor ou agonista (Gilman, 1987; Birbaumer et al., 1990).

Dois proeminentes sistemas de segundo mensageiro acoplados a proteínas G são a produção de AMPc pela enzima adenilato ciclase e a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato catalisada pela fosfolipase C. Esta última reação forma diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP3). Outros sistemas de efetores que funcionam sob a regulação de proteínas G incluem fosfodiesterase GMPc específica, fosfolipase A2 e canais iônicos. A modulação da atividade destes efetores leva a alterações metabólicas e/ou iônicas dentro da célula (Offermanns & Schultz, 1994). Acrescenta-se que alguns canais iônicos possivelmente são regulados por proteínas G diretamente, independentemente do agonista (Clapham, 1994; Offermanns & Schultz, 1994; Wickman & Clapham, 1995). Entre os canais que se incluem nesta categoria, presentes no cérebro, estão o canal de cálcio do tipo L e o canal de potássio sensível à toxina pertussis, o qual é ativado por receptores m1 muscarínicos, D2 dopaminérgicos, α_2 adrenérgicos e receptores para serotonina, histamina, opióides e somatostatina, para produzir potenciais pós-sinápticos inibitórios (Clapham, 1994; Wickman & Clapham, 1995).

Existem vários relatos de que um receptor pode ativar mais do que uma proteína G. Além disto, uma proteína G pode interagir com vários efetores, ou ainda, várias proteínas G podem regular um único efetor (Birbaumer, 1990; Offermanns & Schultz, 1994). Desta forma, a resposta celular mediada por proteína G pode ser bastante complexa.

Recentes evidências, tais como a interação entre proteínas G e o citoesqueleto e a mobilidade limitada de receptores e proteínas G, sugerem que o sistema de receptores, proteínas G e efetores podem ter um grau de organização maior que o previamente aceito, formando complexos supramoleculares, os quais aumentam a especificidade da interação proteína - proteína (Neubig, 1994).

TRANSDUÇÃO DO SINAL EXTRACELULAR

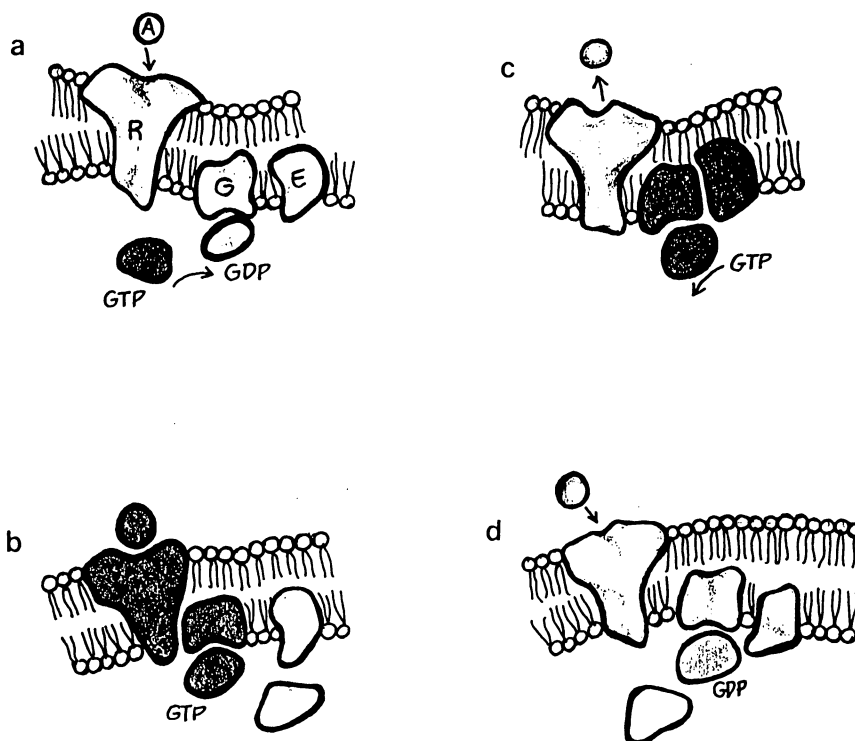


Figura IV.1. Ciclo de ativação e desativação das proteínas G.

- No estado basal a proteína G apresenta o GDP ligado à subunidade α .
 - Como resultado da interação com o seu agonista, o receptor se acopla à proteína G, a qual troca o GDP por GTP.
 - A ligação do GTP à proteína G diminui a afinidade do receptor pelo agonista e leva à ativação da proteína G, que passa a interagir com o efetor.
 - A hidrólise do GTP pela subunidade α desativa a proteína G, que volta ao seu estado basal.
- A = agonista; R = receptor; G = proteína G; E = efetor.

Até hoje são conhecidas 23 subunidades α de proteínas G diferentes, as quais são agrupadas em 4 subfamílias: G_s , G_i , G_q e G_{12} de acordo com a similaridade em aminoácidos da subunidade α (Nürnberg et al., 1995). As subunidades α possuem um sítio de união de alta afinidade para nucleotídeos da guanina (GTP ou GDP) e uma atividade GTPásica endógena, mencionada anteriormente, a qual permite o acoplamento funcional reversível entre o complexo receptor-agonista e o efetor (Casey & Gilman, 1988; Rodbell, 1992). Esta subunidade também contém um sítio para ADP-ribosilação dependente de NAD, catalisada por toxinas bacterianas. A subunidade α da G_s ($G_{s\alpha}$) pode ser ADP-ribosilada pela toxina colérica, enquanto a subunidade α da G_i pode ser ADP-ribosilada pela toxina pertussis (Casey & Gilman, 1988; Birnbaumer et al., 1990; Nürnberg et al., 1995). Já foram identificadas 5 subunidades β e 7 subunidades γ das proteínas G. As subunidades $\beta\gamma$ formam um heterodímero altamente associado. Nos últimos anos tem sido dada atenção ao dímero $G\beta\gamma$, ao qual era atribuída anteriormente apenas a função de ancorar a subunidade α à membrana (Nürnberg et al., 1995). Há evidências de que não apenas as subunidades α das proteínas G determinem uma especificidade na interação receptor-proteína G. As subunidades β parecem determinar o acoplamento ao receptor e as subunidades γ parecem especificar a interação com o efetor, porém fisiologicamente apenas funcionam como dímero. Desta forma, tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ transmitem um sinal por interagir com efetores (Iñiguez-Lluhi et al., 1993; Gudermann et al. 1995). Efetores regulados pelo dímero $G\beta\gamma$ incluem adenilato ciclase, fosfolipase C, canais de potássio, fosfolipase A2 e fosfoinosítideo 3 quinase. Adicionalmente os dímeros $G\beta\gamma$ parecem participar na regulação de receptores (Offermanns & Schultz, 1994; Sternweis, 1994; Müller & Lohse, 1995; Nürnberg et al., 1995).

Recentes estudos apontam para um papel das proteínas G nos processos de formação e consolidação da memória, sendo proposto que a G_s esteja envolvida na consolidação da memória e a G_o na formação da memória no hipocampo de ratos (Chou & Lee, 1995).

IV.1. 1. 1. Modificação covalente das proteínas G

Acilação por ácidos graxos

As proteínas G estão sujeitas a uma série de modificações covalentes. As modificações covalentes de subunidades de proteínas G por lipídeos parecem facilitar sua associação à membrana, bem como sua interação com outros componentes do

sistema de transdução de sinal (Casey, 1994; Mumby & Muntz, 1995). As subunidades α de algumas proteínas G são miristoiladas e palmitoiladas. O ácido mirístico liga-se através de uma união amida a um resíduo N-terminal de glicina da subunidade α . Demonstrou-se que a palmitoilação de uma série de proteínas G ocorre próximo a um resíduo N-terminal de cisteína (Pennington, 1994). A reversibilidade da palmitoilação sugere que ela possa desempenhar um papel regulatório na transdução do sinal (Mumby & Muntz, 1995).

Prenilação ou isoprenilação

A prenilação é um tipo de modificação covalente por lipídeos isoprenóides que ocorre nas subunidades γ das proteínas G. Este tipo de modificação envolve a união de um farnesil ou de um geranylgeranil a resíduos de cisteína na porção C-terminal das proteínas (Casey, 1995). As subunidades γ das proteínas G contêm uma região C-terminal : CAAX (onde C = cisteína, A = aminoácido alifático e X = qualquer aminoácido). Esta região atua como um sítio de reconhecimento para isoprenilação (Pennington, 1994, Casey, 1995). Foi demonstrado que uma mutação de um resíduo de cisteína da região CAAX da subunidade γ não bloqueia a expressão das subunidades β , mas evita a união à membrana do complexo $\beta\gamma$ (Simonds et al., 1991).

Fosforilação

As funções das proteínas G parecem ser reguladas através de fosforilação (Sagi-Eisenberg, 1989). As subunidades α das proteínas G contêm sítios de consenso para fosforilação por uma série de proteínas quinase (Pennington, 1994). Foi demonstrado que a ativação funcional da proteína quinase C por ésteres de forbol leva à inativação funcional da $G_{i\alpha}$ (Sainz & Gutierrez, 1989, Gordeladze et al., 1989).

ADP-ribosilação

A toxina colérica produzida pelo vibrião da cólera é uma proteína de 87 kDa. Ela catalisa a transferência de uma unidade de ADP-ribose do NAD para uma cadeia lateral de uma arginina específica da subunidade α da G_s . Esta ADP-ribosilação da G_s bloqueia sua capacidade de hidrolisar o GTP ligado. A toxina pertussis, produzida pela bactéria *Bordetella pertussis*, catalisa a ADP-ribosilação de uma cadeia lateral de uma cisteína específica da subunidade α da G_i (Birbaumer et al., 1990). Além da ADP-ribosilação das subunidades α das proteínas G pelas toxinas colérica e pertussis, existem enzimas endógenas (ADP-ribosiltransferases) capazes de catalisar a mono-ADP-ribosilação. Presume-se que este seja um mecanismo de regulação da função das proteínas G *in vivo* (Willians et al., 1992).

Modificação de grupos sulfidríla

Estudos com a transducina, que é uma proteína G que acopla a rodopsina à regulação das células fotorreceptoras, mostraram que os dímeros $\beta\gamma$ contêm um total de seis grupos sulfidríla, mas apenas dois deles, os quais se localizam nas subunidades β , são modificados por N-etilmaleimida (NEM), um reagente alquilante sulfidrílico (Ho & Fung, 1984). Contudo, esta modificação não causou efeito na função da transducina. Dos três grupos sulfidríla da subunidade α , a modificação de um levou à redução da atividade GTPásica e redução da união de Gpp(NH)p e de rodopsina. Também foi demonstrado que a modificação da subunidade α da proteína G por NEM bloqueou a sua união à rodopsina fotoexcitada (Reichert & Hofmann, 1984; Hofmann & Reichert, 1985). Em relação à Go, dois grupos sulfidríla reativos a NEM foram identificados, sendo que um deles era o da Cys351, o sítio da ADP-ribosilação (Hoshino et al. 1990). A alquilação evitou a associação das subunidades α com os dímeros $\beta\gamma$ e inibiu a ADP-ribosilação por toxina pertussis de Gi e Go purificadas (Asano & Ogasawara, 1986) e inibiu a ADP-ribosilação de Gi em membranas de fígado (Wong et al., 1985).

Lin et al. (1980) propuseram que compostos mercuriais orgânicos interagem com proteínas G, afetando a atividade da enzima adenilato ciclase. Hess et al. (1994) demonstraram que o tratamento de membranas sinaptossomais com mercúrio impediu a subsequente ADP-ribosilação por toxina pertussis. Neste mesmo estudo, verificou-se que o óxido nítrico (NO) modificou resíduos de cisteína da Go purificada de cérebro bovino. Isto foi evidenciado uma vez que o NO impediu a união subsequente do reagente alquilante iodoacetamida, bem como a ADP-ribosilação catalisada por toxina pertussis.

IV.1. 1. 2. Receptores acoplados a proteínas G

Existe um grande número de agonistas que se ligam aos receptores acoplados à proteína G no SNC. Entre eles podemos citar: dopamina, noradrenalina, histamina, serotonina, acetilcolina, opióides, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e adenosina (Offermanns & Schultz, 1994).

Atualmente mais de 300 receptores acoplados a proteínas G foram clonados e presume-se que o número total exceda 1.000 (Clapham, 1994; Gudermann et al. 1995). Os receptores acoplados a proteínas G apresentam uma grande homologia estrutural. Eles têm uma única cadeia polipeptídica com grande similaridade de seqüência de aminoácidos, a qual forma 7 domínios hidrofóbicos transmembrana, ou seja, os receptores são heptahelicoidais (Baldwin, 1994; Strader et al., 1995; Naylor et al. 1995).

Por outro lado, as regiões N-terminal e C-terminal, localizadas extra e intracelularmente, respectivamente e as alças conectores intra e extracelulares são distintos dentro desta grande superfamília de proteínas (Strader et al., 1995). As alças extracelulares contêm sítios de glicosilação (Strader et al., 1995).

Os receptores acoplados a proteínas G podem ser classificados em três subfamílias, a saber: família de receptor para rodopsina/ β adrenérgico, família de receptor para secretina/ peptídeo vasointestinal (VIP) e família de receptor glutamatérgico metabotrópico (Baldwin, 1994; Strader et al., 1995).

A família de receptor para rodopsina/ β adrenérgico inclui também receptores para dopamina, serotonina, substância P, bradicinina, angiotensina, somatostatina e lutropina (Strader et al., 1995).

A família de receptor para secretina/ peptídeo vasointestinal (VIP) inclui receptores para secretina, hormônio paratireoideo (PTH), peptídeo vasointestinal (VIP), glucagon, peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), peptídeo inibidor gástrico, calcitonina, polipeptídeo da pituitária ativador da adenilato ciclase (PACAP) e hormônio liberador do hormônio de crescimento (Strader et al., 1995).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos estão presentes nos sistemas nervoso central e periférico, onde regulam uma série de funções em resposta ao agonista glutamato. Eles são consideravelmente maiores do que os receptores das outras subfamílias de receptores acoplados a proteínas G (Strader et al., 1995). Além dos sete domínios hidrofóbicos transmembrana, estes receptores são caracterizados por possuírem longas regiões N-terminal extracelular e C-terminal intracelular (Strader et al., 1995). Eles contêm resíduos de cisteína conservados no domínio extracelular, sugerindo um papel estrutural para esta região (Strader et al., 1995).

IV.1.1.3. Uso de nucleotídeos rígidos como ferramenta para o estudo de proteínas G

Existem vários agentes disponíveis que permitem o estudo da ativação das proteínas G na ausência de ativação do receptor. As proteínas G são permanentemente ativadas por análogos do GTP resistentes à hidrólise (análogos rígidos), tais como Gpp(NH)p (5'-guanililimidodifosfato), Gpp(CH₂)p (5'-guanililmetileno-difosfato) e GTP γ S (guanosina 5'(γ -tio) trifosfato) (Rodbell, 1992). A ativação é lenta comparada à ativação do receptor, freqüentemente necessitando de vários minutos (Burch, 1989). Estes agentes não atravessam a membrana celular e devem ser usados em células permeabilizadas ou *in vitro* (Burch, 1989). Estes análogos permanecem ligados à

subunidade α , mantendo-a no estado ativo. Devido a esta propriedade, eles podem ser usados como ferramenta para avaliação das funções das proteínas G. O uso destes análogos na sua forma radioativa também têm sido empregados para ligar covalentemente estes nucleotídeos à subunidade α das proteínas G com várias finalidades, tais como para a medida da atividade da proteína G e identificação de proteínas G que interagem com receptores específicos (Rodbell, 1992).

IV.1.2. Possível sítio de união extracelular para nucleotídeos da guanina relacionado com o receptor glutamatérgico

Conforme comentado no capítulo III, o glutamato é o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso central. Os receptores glutamatérgicos dividem-se em duas grandes classes: ionotrópicos (NMDA, AMPA, cainato) e metabotrópicos (ACPD, ibotenato, L-AP4). Os receptores ionotrópicos estão associados a canais iônicos, enquanto os metabotrópicos estão acoplados à proteína G (Bettler & Mulle, 1995; Cotman et al., 1995; Pin & Duvoisin, 1995).

Relatos da literatura tem demonstrado que os nucleotídeos da guanina GTP e GDP, bem como seus análogos, inibem a união de agonistas, mas não de antagonistas a receptores acoplados a proteínas G. Entre eles incluem-se os receptores dopaminérgicos D2 (Senogles et al., 1987), substância P (Smith & Hoss, 1985), opióides (Szücs et al., 1987), receptores β -adrenérgicos (Maguive et al., 1970), purinérgicos (Klotz et al., 1990), GABAérgicos (Ohmori et al., 1990), muscarínicos (Haga et al., 1986) e serotoninérgicos (Peroutka et al., 1979). Atribui-se que a referida ação seja mediada através da união de GTP na proteína G, com a conseqüente diminuição da afinidade do receptor pelo agonista. No entanto, alguns relatos também têm demonstrado que não apenas os nucleotídeos da guanina GTP e GDP, mas também GMP, GMPc e guanosina regulam a união específica de agonistas e antagonistas glutamatérgicos, de forma a diminuir esta união (Sharif & Roberts, 1981; Butcher et al., 1986; Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Hood et al., 1990; Souza & Ramírez, 1991; Barnes et al., 1993; Gorodinsky et al., 1993; Paz et al., 1994; Ibarra & Ortega, 1995). O conjunto destes estudos tem sugerido fortemente que esta ação dos nucleotídeos da guanina sobre os receptores glutamatérgicos se dá de uma forma não usual, através de um efeito independente da proteína G. Tem sido sugerido que os nucleotídeos da guanina liguem-se na porção extracelular do próprio receptor de glutamato (ionotrópico ou

metabotrópico) e, possivelmente desempenhem um papel modulador sobre o sistema glutamatérgico. As evidências neste sentido são as seguintes:

- Em preparações de membrana lisadas de tectum óptico e cerebelo de pinto, bem como em preparações de vesículas, GTP, GDP, GMP e análogos não hidrolisáveis deslocaram a união específica de cainato, enquanto que apenas o GTP estimulou a atividade da adenilato ciclase nestas preparações (Souza & Ramírez, 1991). Vale ressaltar que os nucleotídeos não atravessam a membrana celular e que o resultado ocorreu também em preparações de vesículas de membrana, onde as proteínas G estão oclusas. Este resultado sugere que o efeito dos nucleotídeos da guanina não é dependente da interação entre o receptor e o sistema efetor mediado pela proteína Gs. No caso das preparações de membrana de tectum óptico de pinto, foi verificado posteriormente que a união específica de cainato ocorreu sob condições nas quais a participação da proteína G pode ser virtualmente excluída (Paz et al., 1994).

- GMP, GMPc e guanosina não se ligam a proteínas G e mesmo assim tiveram efeito inibitório sobre a união específica de [³H]glutamato e agonistas em preparações de membrana de cérebro de rato (Monahan et al., 1988).

- A união específica de [³H]cainato em preparações de membrana de cérebro de peixe dourado foi diminuída por nucleotídeos da guanina em condições nas quais a modulação por proteína G foi minimizada (Barnes et al., 1993).

- Os nucleotídeos GTP, GDP, GMP, Gpp(NH)p e Gpp(CH₂)p inibiram a união específica do antagonista de NMDA [³H]1-[1-(2-tienil)-ciclohexil]piperidina = [³H]TCP em membranas sinápticas de cérebro anterior, córtex cerebral e hipocampo de rato (Baron et al. 1989; Hood et al., 1990). A diminuição da união específica de antagonistas de glutamato pelos nucleotídeos da guanina indica um mecanismo de ação independente da proteína G, pois está bem estabelecido que a afinidade de união do receptor pelo antagonista não é alterada quando o GTP liga-se à subunidade α da proteína G, ou seja, a ativação da proteína G não interfere com a união de antagonistas (Casey & Gilman, 1988). Não há evidências de que os referidos antagonistas tenham uma ação como agonistas glutamatérgicos, o que poderia justificar a ação inibitória dos nucleotídeos da guanina através da proteína G.

- A fosforilação da GFAP (proteína glial fibrilar ácida), proteína marcadora de astrócito, é uma medida da ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Wofchuk & Rodnight, 1994). O efeito do glutamato de aumentar a fosforilação da GFAP em fatias de hipocampo de rato jovem foi revertido por 5'-guanililimidodifosfato (Gpp(NH)p), guanosina-5'-O-(2-tiodifosfato) (GDP-β-S) e GMP (Tasca et al., 1995). Presume-se que

os nucleotídeos da guanina adicionados tiveram acesso apenas a face externa da membrana, pois as células são impermeáveis a nucleotídeos da guanina. Além disto, GMP que não liga-se à proteína G mostrou também o mesmo efeito de reverter a ação do glutamato. Este estudo indica, portanto, que os nucleotídeos da guanina podem inibir a fosforilação estimulada por glutamato em hipocampo de rato jovem interagindo com um receptor metabotrópico na superfície celular.

- O pré-tratamento de membranas sinápticas com as toxinas colérica ou pertussis não teve efeito significativo sobre a inibição causada pelo GTP da união específica de [³H]glutamato em receptores NMDA (Baron et al., 1989). Ainda, neste estudo, o GTP diminuiu a afinidade do receptor pelo NMDA através de uma diminuição na constante de associação, ao contrário de estudos nos quais os nucleotídeos agem através da proteína G onde fica aumentada a constante de dissociação receptor-agonista.

- GMP (Maraschin et al., 1996) e GDPβS (Baron et al., 1989) bloquearam convulsões induzidas por ácido quinolínico (agonista de NMDA) após administração i.c.v. em camundongos. Adicionalmente, GDPβS foi capaz de inibir três respostas funcionais provocadas pela ativação do receptor de NMDA: aumento de GMPc em fatias de cerebelo de rato jovem, estímulo da liberação de noradrenalina em fatias de hipocampo de rato e estímulo do influxo de cálcio em cultura de neurônios de cérebro anterior de rato (Baron et al., 1989). Adicionalmente, GMP foi capaz de evitar lesões no estriado de ratos induzidas por ácido quinolínico (Malcon et al., 1996). Estas ações destes nucleotídeos são semelhantes às ações de antagonistas clássicos de receptor de NMDA.

- O GDPβS antagonizou o fluxo iônico através da membrana induzido por NMDA, cainato e quisqualato em células íntegras através de um efeito extracelular (Budson et al., 1991).

- Os nucleotídeos da guanina ligam-se a uma região das subunidades α das proteínas G que apresenta uma seqüência rica em resíduos de glicina (GXGXXG) (G = glicina; X = qualquer aminoácido) (Bockaert, 1991). Atualmente, a partir do conhecimento da seqüência de aminoácidos dos receptores de glutamato metabotrópicos clonados (O'Hara et al., 1993), sabe-se que o mGluR2 e o mGluR3 possuem igualmente uma seqüência rica em resíduos de glicina no domínio extracelular do receptor (GDGI-G e GDGM-G, para o mGluR2 e o mGluR3, respectivamente). (G = glicina; D = ácido aspártico; I = isoleucina; M = metionona). Uma seqüência semelhante, rica em resíduos de glicina, também é encontrada na proteína ligadora de cainato em pintos (Teichberg et al., 1993) e no receptor para cainato GluK2 em mamíferos (Nakanishi et al., 1990).

IV.1.3. Interações do chumbo com o sistema glutamatérgico e com nucleotídeos da guanina

O chumbo é um metal que apresenta uma elevada toxicidade para o sistema nervoso central, contudo os mecanismos moleculares responsáveis por esta ação tóxica não se encontram bem estabelecidos. Possíveis sítios de ação neurotóxica para metais incluem receptores e enzimas envolvidas na transdução do sinal, proteínas G, proteínas quinase C e canais de cálcio (Rossi et al., 1991).

Tem sido proposto o envolvimento de vários sistemas de neurotransmissores na ação tóxica do chumbo. Os sistemas mais estudados tem sido o colinérgico (Carrol et al., 1977; Shih & Hanin, 1978; Minnema et al., 1988; Widmer et al., 1992; Bielarczyk et al., 1994; Cory-Slechta & Pokora, 1995; Tian et al., 1995), adrenérgico (Winder, 1982; Rossouw et al., 1987), dopaminérgico (Lucchi et al., 1981; Lasley & Lane, 1988; Lasley, 1992; Widzowski et al., 1994) e gabaérgico (Silbergeld et al., 1980; Spence et al., 1985; Drew et al., 1989).

Conforme comentado no Capítulo III, a ação do chumbo sobre o sistema glutamatérgico tem sido objeto de investigação mais recente, no qual vários estudos tem demonstrado a ação inibitória deste metal sobre os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (Alkondon et al., 1990; Guilarte & Miceli, 1992; Uteshev et al., 1993; Guilarte et al. 1993, 1994; Jett & Guilarte, 1995; Schulte et al., 1995). Em um estudo mais antigo Regunathan & Sundaresan (1985) observaram que a exposição crônica de ratos ao chumbo inorgânico alterou a união específica de glutamato independente de sódio em membranas sinápticas de córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal. Foi notado um aumento do número de sítios de união (B_{max}) e uma diminuição da afinidade do receptor pelo glutamato (maior K_d) nestas preparações de membrana. Contudo, estes pesquisadores relataram (dados não mostrados) uma ausência de efeito do chumbo adicionado *in vitro* sobre a união específica de glutamato independente de sódio nestas estruturas cerebrais. Estas observações sugerem um efeito indireto do chumbo sobre os receptores de glutamato quando da exposição dos ratos a este metal. Os nossos resultados (apresentados no capítulo III) demonstraram que a adição de acetato de chumbo *in vitro* inibiu a união específica de glutamato independente de sódio em membranas de córtex cerebral de ratos jovens ou adultos (Figura III.12.), mas não alterou significativamente este parâmetro em membranas de cerebelo de rato (Figura III.11.). Observamos também que a exposição perinatal ao acetato de chumbo resultou em uma diminuição da união específica de glutamato em córtex cerebral e cerebelo de

ratos jovens que apresentaram um nível de Pb sanguíneo de 50,6 µg/dl e aproximadamente 0,6 µM de Pb no córtex cerebral (Capítulo I). Considerando que o efeito inibitório observado nos animais expostos *in vivo* ao metal é presumivelmente através de uma ação indireta sobre os receptores de glutamato, alterações na estrutura da membrana e/ou outro mecanismo indireto deve estar envolvido. Uma das possibilidades é que o chumbo atue em algum mecanismo que module a união de glutamato em seus receptores.

A enzima adenilato ciclase de cérebro é inibida por concentrações de chumbo na ordem de µM, conforme demonstrado no Capítulo III e previamente relatado na literatura (Nathanson & Bloom, 1975; Ewers & Erbe, 1980). Foi relatado que os nucleotídeos da guanina protegem a AC da inibição pelo chumbo em fígado de rato (Doskeland, 1980). Não está descartada a possibilidade de que a ação inibitória deste metal ocorra através de um mecanismo indireto que envolva proteínas G.

IV.1.4. Objetivos

Considerando:

- a) o papel essencial das proteínas G na transdução do sinal no SNC e conseqüentemente na manutenção das funções neuronais e gliais;
 - b) o possível papel dos nucleotídeos da guanina na modulação dos receptores glutamatérgicos;
 - c) que grupamentos sulfidríla, os quais são um alvo em potencial para a ação de metais pesados como o chumbo, tem se mostrado essenciais para a função das proteínas G;
 - d) que a inibição da união específica de [³H]glutamato por exposição ao chumbo *in vivo* provavelmente é indireta, podendo ser exercida através de um sistema modulador dos receptores glutamatérgicos;
 - e) que a inibição da adenilato ciclase causada pelo chumbo pode ser, pelo menos em parte, devido a uma alteração na função da proteína G;
 - f) a falta de estudos a respeito da ação do chumbo sobre a proteína G e sobre a modulação exercida pelos nucleotídeos da guanina nos receptores glutamatérgicos;
- decidimos verificar o efeito do chumbo *in vitro* sobre a proteína G e sobre o possível sítio independente da proteína G (supostamente a porção extracelular do receptor de glutamato), através da avaliação da união específica de [³H]Gpp(NH)p em preparação de membrana de córtex cerebral de ratos adultos.

IV.2. MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1. Reagentes

Acetato de chumbo - Baker's Analyzed

Ácido clorídrico - Merck

Carbonato de sódio - Reagen

Cloreto de magnésio - Reagen

Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Sigma, St. Louis, MO

Folin-Ciocalteu - Bioensaios

Hidróxido de sódio - Reagen

Ímido [8-³H]guanosina 5'trifosfato ([³H]Gpp(NH)p ou [³H]GMP-PNP: 19,1 ou 20,0 Ci/mmol) - Amersham International, U. K.

Guanina imidodifosfato (5'guanilimidodifosfato ou ímido guanosina 5'trifosfato) = Gpp(NH)p - Sigma, St Louis, MO

POPOP- (1,4 di)-5-fenil-2-oxazolil-benzeno; 2-2'-p-fenileni-bis [5-feniloxazol] - Sigma, St. Louis, MO

PPO - 2,5difeniloxazol - Sigma, St. Louis, MO

Sacarose - Reagen

Sulfato de cobre - Reagen

Tartarato de sódio e potássio - Reagen

Tolueno - Reagen ou Merck

Tris(hidroximetil)aminometano - Sigma, St. Louis, MO

Triton X-100 - Reagen ou Merck

IV.2.2. Equipamentos

Agitador de tubos: Phoenix

Balanças: analítica Sartorius Basic modelo BA 110 S, analítica Marte modelo AS 2000

Banho térmico: Quimis modelo Q304.164

Centrífugas: Sorvall modelo RC 5B Plus, minicentrífuga Incibrás spin I

Cintiladores: Rackbeta modelo 1217, Wallac modelo 1409 ("Liquid Scintillation Counter")

Espectrofotômetro: Beckman DU 640 UV/VIS

Freezer a -20°C

Potenciômetro: Digimed

IV.2.3. Animais experimentais

Ratos Wistar adultos (3 meses de idade) de ambos os sexos provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS foram utilizados. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ração comercial (Purina) e água "ad libitum".

IV.2.4. Dissecção do córtex cerebral dos animais

A dissecção do córtex cerebral dos ratos foi realizada conforme consta nas páginas 20 do Capítulo I e 94 do Capítulo III.

IV.2.5. Preparação da membrana

A preparação das membranas lisadas e lavadas de córtex cerebral foi realizada conforme procedimento descrito no capítulo III, página 95. As membranas foram congeladas a -20°C por um período de no máximo 45 dias até sua utilização para os ensaios de medida da união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$.

IV.2.6. Ensaio de união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$

IV.2.6.1. Pré-incubação das membranas

Após lento descongelamento da membrana, esta era reomogeneizada com Tris-HCl 10 mM, centrifugada a 27.000 g durante 15 minutos e o precipitado da centrifugação ressuspensão em tampão Tris-HCl 25 mM / MgCl_2 5 mM pH 7,4. Esta membrana era pré-incubada nas condições a seguir descritas, conforme o experimento. Em todas os casos a pré-incubação era realizada a 30°C durante 15 minutos.

- membranas pré-incubadas com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM : com o objetivo de saturar e, desta forma, bloquear os sítios de união de GTP nas proteínas G, procedeu-se uma pré-incubação da membrana com uma concentração saturante de $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$, um análogo não hidrolisável do GTP. Com esta finalidade, era adicionado $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$, na concentração final de 10 μM à membrana ressuspensa em tampão (Paz et al., 1994).
- membranas pré-incubadas com acetato de chumbo 100 μM : era adicionado acetato de chumbo, na concentração final de 100 μM à membrana ressuspensa em tampão. Esta concentração foi escolhida com base nos resultados do presente trabalho, os quais demonstraram que esta concentração produz uma inibição na proteína G.

- membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p 10 μ M + acetato de chumbo 100 μ M: adicionava-se Gpp(NH)p, na concentração final de 10 μ M e também acetato de chumbo, na concentração final de 100 μ M à membrana ressuspensa em tampão. O objetivo era verificar uma eventual interação de ambos os reagentes.
- membranas pré-incubadas em condição controle: era sempre realizada nos experimentos nos quais qualquer uma das condições acima descrita foram efetuadas. À membrana ressuspensa em tampão Tris-HCl 25 mM/ MgCl₂ 5 mM pH 7,4, era adicionado um volume de água milli-Q equivalente ao usado nas outras condições de pré-incubação. Nos experimentos nos quais nenhuma das três condições acima descritas era realizada, a membrana era igualmente submetida a esta pré-incubação a 30°C durante 15 minutos.

IV.2.6.2. Medida da união específica de [³H]Gpp(NH)p em membranas

Após a pré-incubação da membrana, independentemente da condição de pré-incubação utilizada, seguia-se um período de repouso por 15 minutos no gelo, e posterior centrifugação a 27.000g por 15 minutos. O precipitado resultante era submetido a 3 lavagens sucessivas com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 / MgCl₂ 5 mM com centrifugações a 27.000 g por 15 minutos. No caso da membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μ M, estas lavagens tinham a finalidade de remover o Gpp(NH)p não ligado na proteína G ou em outros sítios, bem como o Gpp(NH)p ligado labilmente. Foi demonstrado em um estudo prévio do grupo, que o Gpp(NH)p ligado labilmente corresponde ao sítio extra-proteína G (Paz et al., 1994). Por outro lado, o Gpp(NH)p ligado na proteína G permanece ligado mesmo sob lavagens exaustivas a 4°C (Avisar et al., 1988; Paz et al., 1994). No caso da pré-incubação com acetato de chumbo, as lavagens tinham por finalidade remover todo o metal que não se encontrava firmemente ligado a sítios protéicos. Após a terceira lavagem, a membrana era ressuspensa no mesmo tampão da lavagem, estando pronta para ser incubada.

A incubação para medida da união total de [³H] Gpp(NH)p era realizada segundo o método de Paz et al. (1994) com pequenas modificações. Eram usados tubos eppendorf, em um meio de incubação contendo os seguintes componentes nas respectivas concentrações finais: Tris-HCl 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, membrana (0,15 a 0,30 mg de proteína), [³H]Gpp(NH)p 40 nM e acetato de chumbo com a concentração final variando com o experimento (faixa de 1 a 400 μ M). O volume final de incubação era 500 μ l. A incubação para medida da união inespecífica de [³H]Gpp(NH)p era realizada em um meio similar ao citado acima, exceto que Gpp(NH)p na concentração final de 40

μM era adicionado. A incubação era iniciada pela adição da membrana e durava 5 minutos, ou 2 a 60 minutos em experimentos nos quais o tempo foi uma variável considerada. Após a incubação, os tubos eram colocados no gelo e submetidos a uma centrifugação por 3 minutos a 12.000 g. O sobrenadante era removido com pipeta "Pasteur". As paredes dos tubos e a superfície dos precipitados eram lavadas rápida e cuidadosamente com água destilada a 4°C. As paredes do eppendorf eram cuidadosamente secadas com cotonetes e adicionava-se 300 μl de solução de SDS 0,1%. Os tubos ficavam em repouso por no mínimo 12 horas, quando então eram agitados e era retirada uma alíquota de 240 μl . Esta alíquota era pipetada em tubos plásticos (adaptadores para "vials"), onde adicionava-se 3,0 ml de líquido de cintilação (Tolueno 2 l: Triton X-100 1l: PPO 16 g: POPOP 0,25g). A medida da radioatividade era feita em cintilador beta. A união específica de [^3H]Gpp(NH)p era calculada por subtração da união total e da inespecífica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A **Figura IV.2.** mostra uma representação esquemática da união específica de [^3H]Gpp(NH)p após a pré-incubação com Gpp(NH)p ou na ausência de Gpp(NH)p (controle).

IV.2.6.3. Medida da união específica de [^3H]Gpp(NH)p na proteína G

Após lento descongelamento da membrana, esta era homogeneizada com Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e centrifugada a 27.000 g durante 15 minutos. O precipitado era ressuspenso em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4/ MgCl_2 5 mM e a membrana incubada a 30°C durante 15 minutos. A incubação para medida da união total de [^3H]Gpp(NH)p era realizada em tubos eppendorf em um meio contendo os seguintes componentes nas respectivas concentrações finais: Tris-HCl 25 mM pH 7,4, MgCl_2 5 mM, membrana (0,2 a 0,3 mg de proteína), [^3H]Gpp(NH)p 40 nM e acetato de chumbo com a concentração final variando com o experimento (5, 20 ou 100 μM). O volume final de incubação era 500 μl . A incubação para medida da união inespecífica de [^3H]Gpp(NH)p era realizada em um meio similar ao usado acima, exceto que Gpp(NH)p na concentração final de 400 μM era adicionado. Após a incubação, os tubos eppendorf eram centrifugados a 12.000g por 3 minutos. O sobrenadante desta centrifugação era analisado quanto a radioatividade em cintilador beta. A membrana era lavada 3 vezes a 4°C após a incubação. As lavagens nos tubos controle (sem acetato de chumbo) eram feitas com tampão Tris-HCl 25 mM / MgCl_2 5 mM pH 7,4, seguidas de centrifugação a 12.000 g por 3 minutos. As lavagens nos tubos contendo acetato de chumbo foram realizadas apenas com o tampão Tris-HCl 25 mM / MgCl_2 5 mM pH 7,4 ou alternativamente, com o referido

tampão contendo uma concentração de acetato de chumbo equivalente ao usada no meio de incubação. Os sobrenadantes das centrifugações que seguiam as lavagens também eram analisados quanto a radioatividade para controle da eficácia das lavagens. O precipitado final era lavado com água gelada e processado para medida da radioatividade conforme consta no item “medida da união específica de [³H] Gpp(NH)p em membranas”. A **Figura IV.3.** é uma representação esquemática do conjunto de procedimentos descritos neste item (união específica de [³H] Gpp(NH)p na proteína G).

PRÉ-INCUBAÇÃO - PROTEÍNA G

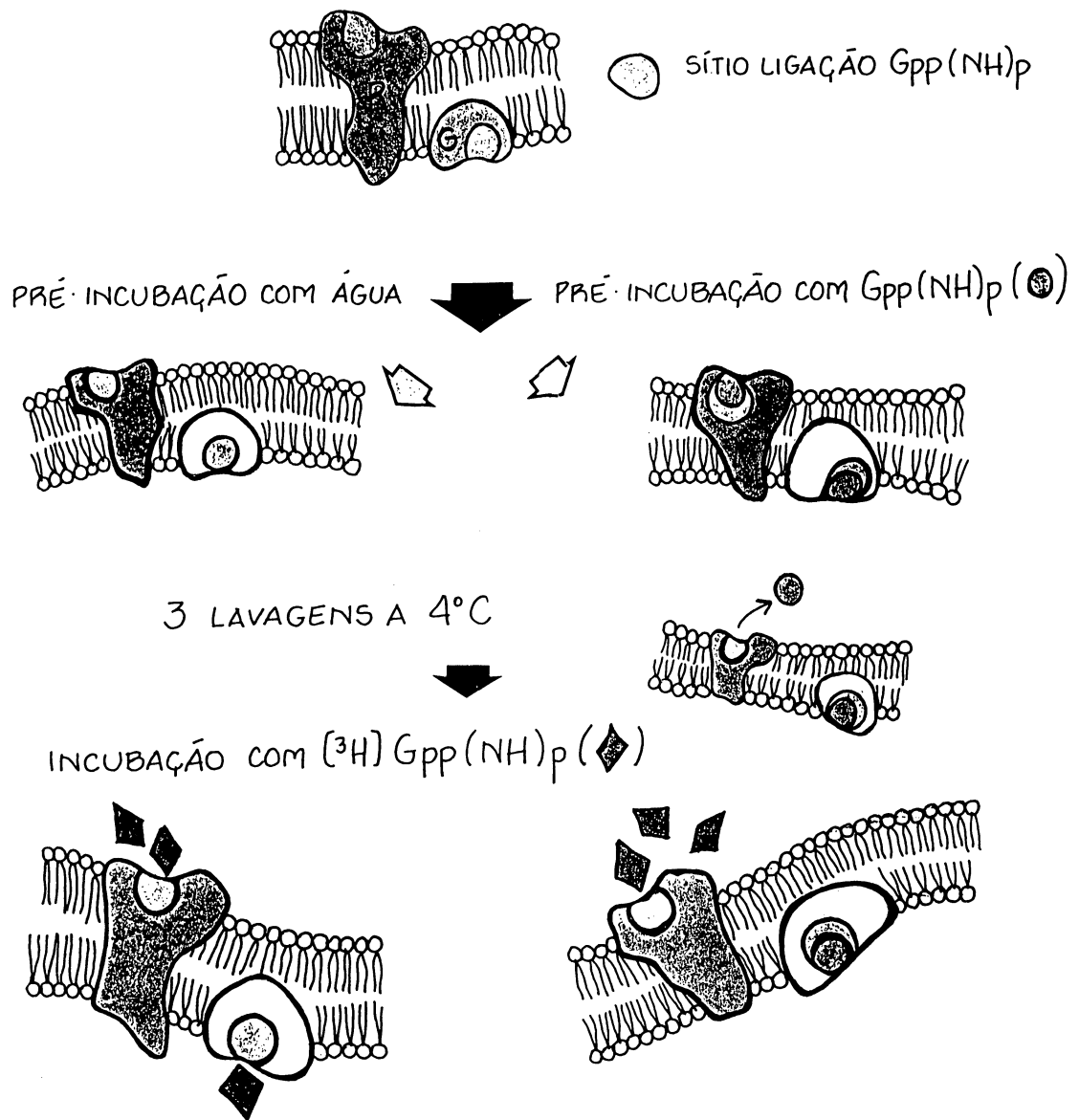


Figura IV.2. Representação esquemática da união específica de [³H]Gpp(NH)p após pré-incubação da preparação de membrana com Gpp(NH)p ou na ausência de Gpp(NH)p (controle).

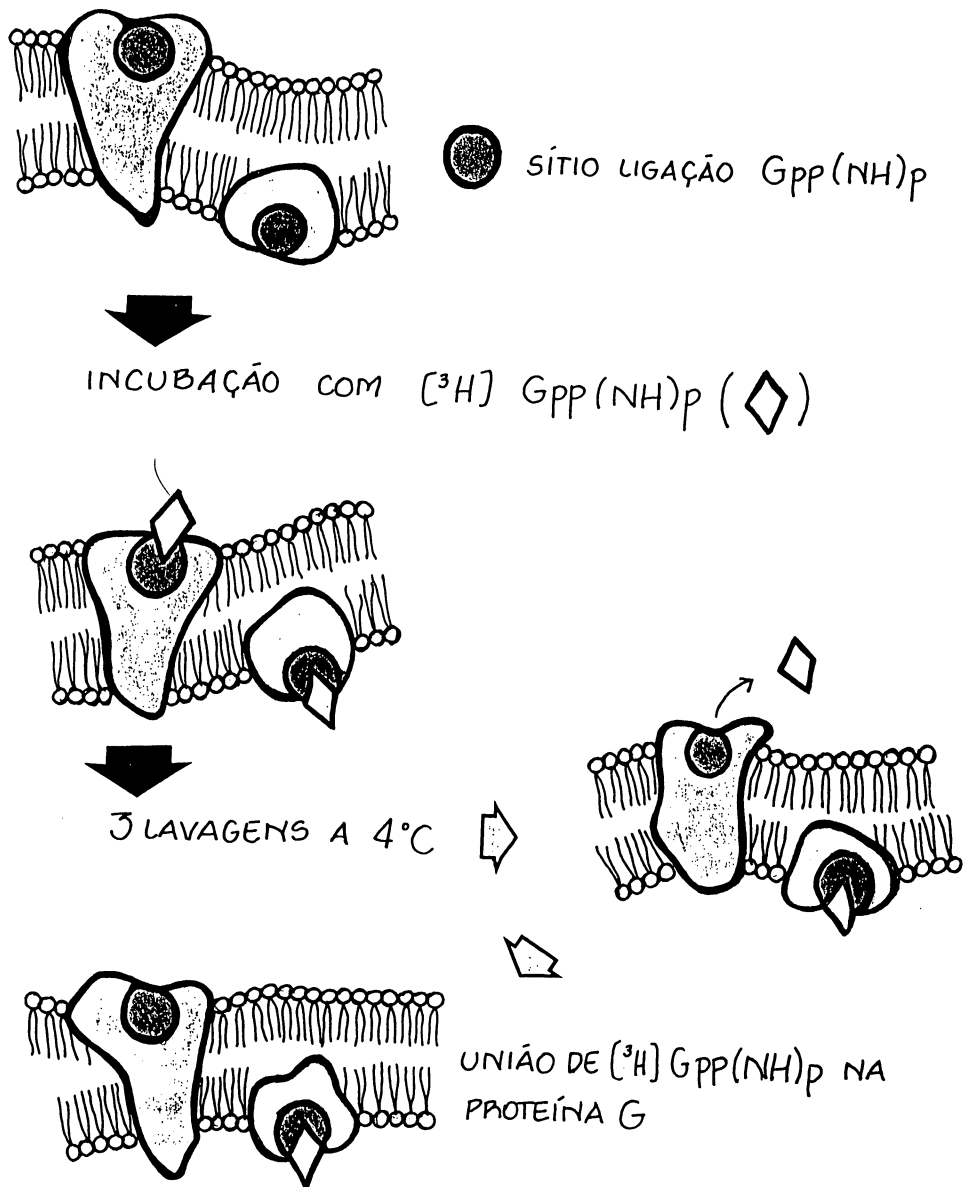


Figura IV.3. Representação esquemática da união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp(NH)p}$ na proteína G.

Paralelamente a este experimento, um conjunto de três tubos contendo tampão, membrana e água milli-Q até o volume final de 500 µl era incubado e submetido ao procedimento experimental acima descrito. Após as lavagens, adicionava-se 300 µl de solução de SDS 0,1% e após cerca de 12 h, alíquotas da membrana solubilizada em SDS eram retiradas para dosagem de proteínas. Este cuidado era tomado devido ao fato de as lavagens implicarem em uma perda protéica, a qual podia ser mensurada usando o referido controle.

IV.2.7. Dosagem de proteínas

A proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

IV.2.8. Análise estatística e expressão dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância de uma via ou de duas vias, conforme o experimento, seguida quando apropriado pelo teste *post-hoc* do raio múltiplo de Duncan (Sokal & Rohlf, 1981). Foram consideradas significativas as análises nas quais *p* foi igual ou menor que 0,05. Os valores de *F* são fornecidos na descrição dos resultados quando o nível de significância foi atingido. Os resultados são expressos em pmol [³H]Gpp(NH)p/mg proteína ou em % de união específica em relação ao controle (100%). Eles estão expressos como média ± erro padrão da média de determinações ensaiadas em triplicata. O número de experimentos variou de 3 a 6 e está especificado em cada figura.

IV.3.RESULTADOS

IV.3.1. Efeito do chumbo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p

O acetato de chumbo foi adicionado ao meio de incubação em concentrações que variaram de 1 a 400 µM, a fim de verificar seu efeito sobre a união específica de [³H] Gpp(NH)p em membrana de córtex cerebral de rato adulto pré-incubada em condição controle (sem Gpp(NH)p) (Figura IV.4.). Com o procedimento experimental usado neste experimento, a união de [³H]Gpp(NH)p ocorre tanto em sítios da proteína G, como em sítios extra-proteína G (Paz et al., 1994). Experimentos prévios haviam demonstrado que 400 µM de acetato de chumbo era a máxima concentração que podia ser usada, pois em concentrações maiores ocorria precipitação do chumbo. A ANOVA

de uma via revelou que o tratamento com acetato de chumbo *in vitro* causou um efeito significativo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p. [F(9,48) = 37,41, p<0,001] (Figura IV.4.). O efeito observado foi bifásico. O teste *post-hoc* mostrou que houve um efeito inibitório significativo na concentração de chumbo de 5 μM (p<0,05). Por outro lado, foi observado um efeito estimulatório significativo nas concentrações de 70, 100, 200 e 400 μM do metal (p<0.01). Estes resultados sugerem diferentes sítios de ação do chumbo.

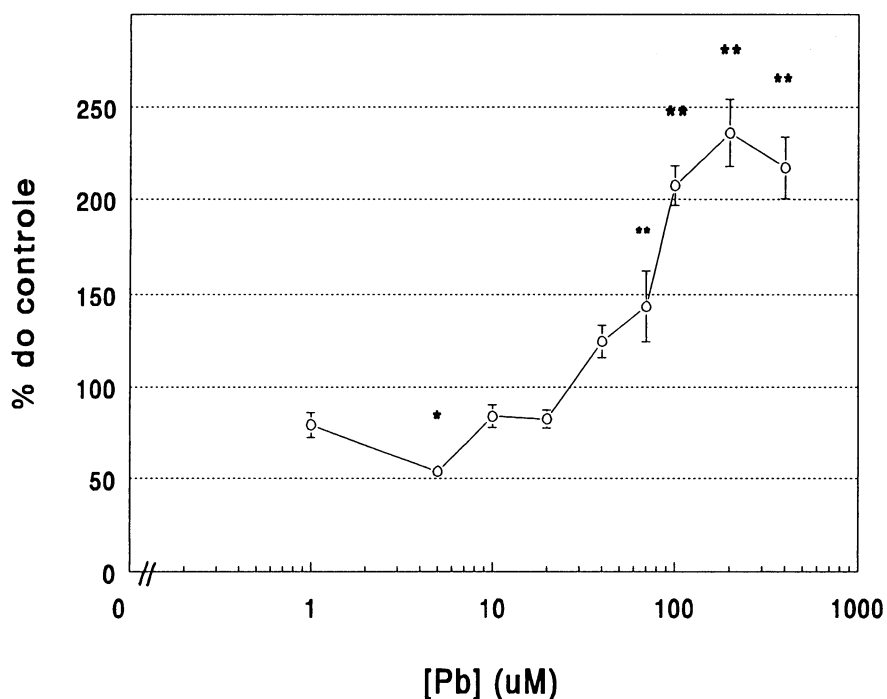


Figura IV.4. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto. A membrana foi incubada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem acetato de chumbo = 100%) e são a média ± erro padrão de 6 experimentos, ensaiados em triplicata. O valor absoluto da união específica de [³H]Gpp(NH)p na ausência de acetato de chumbo apresentou média ± erro padrão de 13,6 ± 0,8. * p<0,05 e ** p<0,01 em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.2. Efeito do chumbo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em proteínas G

Com base nos resultados da Figura IV.4., decidimos testar o efeito da adição de acetato de chumbo *in vitro* sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em proteínas G (Figura IV.5.). O experimento foi realizado sem a adição de acetato de chumbo

(controle) e com 5 μM , 20 μM ou 100 μM de acetato de chumbo no meio de incubação. Para a realização das lavagens após a incubação foi usado tampão Tris-HCl 25 mM / MgCl_2 5 mM pH 7,4 ou, alternativamente, este mesmo tampão contendo acetato de chumbo 5 μM , 20 μM ou 100 μM , para os tubos incubados com acetato de chumbo 5 μM , 20 μM ou 100 μM , respectivamente. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do acetato de chumbo [$F(3, 16) = 68,87, p < 0,001$]. Por outro lado, não houve efeito significativo do tampão ou da interação chumbo X tampão. O teste *post-hoc* mostrou que o metal provocou uma inibição da união específica de [^3H]Gpp(NH)p na proteína G, independentemente da concentração usada ($p < 0,01$) (**Figura IV.5.**). O efeito inibitório foi da ordem de 50% na concentração de 5 μM de chumbo e permaneceu semelhante nas concentrações de 20 e 100 μM do metal. Este resultado não foi influenciado pela adição de acetato de chumbo (na mesma concentração usada na incubação) no tampão de lavagem. Isto indica que o resultado inibitório do metal sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p demonstrado na **Figura IV.4.** é um efeito sobre a proteína G (união estável com as lavagens). Por outro lado, o efeito estimulatório do chumbo mostrado na **Figura IV.4.** seria possivelmente fora da proteína G. Cogitamos tratar-se de um efeito sobre os sítios que ligam nucleotídeos da guanina fora da proteína G.

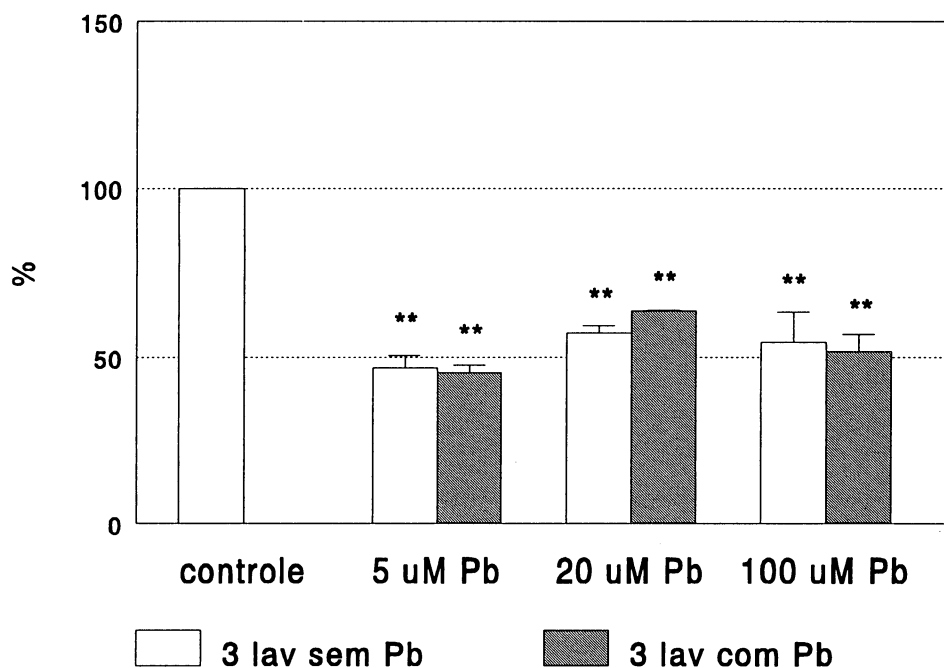


Figura IV.5. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p em sítios na proteína G em preparação de membrana de córtex cerebral de rato adulto. A membrana foi incubada conforme descrito em Material e Métodos, sendo utilizado o tampão de lavagem sem acetato de chumbo (Tris/HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM pH 7,4) ou o tampão de lavagem contendo a concentração de acetato de chumbo correspondente à usada na incubação (Tris/HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM pH 7,4 com 5, 20 ou 100 μM de acetato de chumbo). Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem acetato de chumbo = 100%) e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata. O valor absoluto da união específica de [^3H]Gpp(NH)p no controle apresentou média \pm erro padrão de $33,2 \pm 4,5$. ** $p < 0,01$ em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.3. Efeito da pré-incubação com Gpp(NH)p, acetato de chumbo ou Gpp(NH)p + acetato de chumbo sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p fora das proteínas G

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da pré-incubação da membrana em uma das seguintes condições: com Gpp(NH)p 10 μM ; com acetato de chumbo 100 μM ; com Gpp(NH)p 10 μM + acetato de chumbo 100 μM ; sem o nucleotídeo e/ou acetato de chumbo (controle) sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p [$F(3,10) = 12,35$, $p < 0,01$] (Figura IV.6.). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que qualquer uma das três primeiras condições acima citada foi significativamente inferior ($p < 0,01$) à da

membrana pré-incubada em condição controle (100%), ou seja, aquela que possui sítios na proteína G e fora da proteína G disponíveis para a união de [³H]Gpp(NH)p (Figura IV.6.). Por outro lado, o teste *post-hoc* revelou que as diferentes pré-incubações (excetuando o controle) não diferiram significativamente entre si. A diminuição da união específica de [³H]Gpp(NH)p quando da pré-incubação com Gpp(NH)p deve-se ao fato de a mesma ter saturado as proteínas G, de forma que o [³H]Gpp(NH)p adicionado durante a incubação teve acesso somente ao sítio para nucleotídeo da guanina fora da proteína G. No caso do efeito inibitório do chumbo, verificou-se que este permaneceu estável a 3 lavagens sucessivas. Este resultado é semelhante ao observado na Figura IV.5. Este resultado sugere que o chumbo adicionado durante a pré-incubação uniu-se estavelmente em proteínas G e isto inibiu a união de [³H]Gpp(NH)p nelas. Aparentemente o chumbo que durante a pré-incubação (30°C durante 15 minutos) ligou-se em sítios fora da proteína G foi removido durante as lavagens subseqüentes a 4°C, de forma similar ao que ocorre com o Gpp(NH)p adicionado na pré-incubação. A pré-incubação com Gpp(NH)p + acetato de chumbo não causou efeito somatório ou sinérgico sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p, ou seja, o efeito dos dois é semelhante ao efeito de cada um isoladamente. Este resultado sugere que ambos possam atuar de forma semelhante, ou seja, na proteína G.

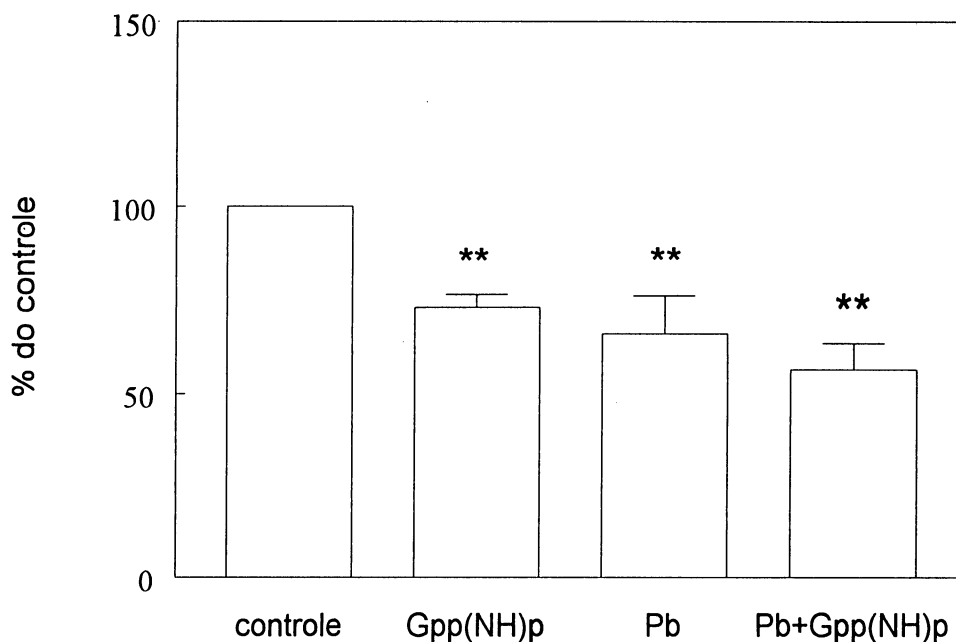


Figura IV.6. Efeito do pré-tratamento da membrana com Gpp(NH)p 10 μ M, acetato de chumbo 100 μ M ou Gpp(NH)p 10 μ M + acetato de chumbo 100 μ M sobre a união específica de [3 H]Gpp(NH)p. As membranas de córtex cerebral de rato foram pré-incubadas com os reagentes acima citados por 15 min. a 30°C. No final da pré-incubação, elas foram centrifugadas e o precipitado lavado como descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (membrana pré-incubada em condição controle, ou seja, sem o nucleotídeo e/ou acetato de chumbo) e são a média \pm erro padrão de 4 experimentos, ensaiados em triplicata. O valor absoluto da união específica de [3 H]Gpp(NH)p no controle apresentou média \pm erro padrão de $17,5 \pm 0,8$.

** $p < 0,01$ em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.4. Efeito da adição de acetato de chumbo 100 μ M na incubação sobre a união específica de [3 H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada em condição controle, com Gpp(NH)p, com acetato de chumbo ou com Gpp(NH)p + acetato de chumbo

Neste experimento, o objetivo era verificar se o chumbo, adicionado na incubação em condições nas quais as proteínas G estavam previamente oclusas, teria um efeito estimulatório sobre a união específica de [3 H]Gpp(NH)p, o que seria esperado a partir dos resultados anteriores (Figuras IV.4., IV.5. e IV.6.). A adição de acetato de chumbo na concentração de 100 μ M durante a incubação em membranas pré-incubadas em condição controle, com Gpp(NH)p 10 μ M, com acetato de chumbo 100 μ M ou ainda com acetato de chumbo 100 μ M + Gpp(NH)p 10 μ M causou efeito estimulatório sobre a

união específica de [³H]Gpp(NH)p (Figura IV.7.). A ANOVA de uma via, considerando o ensaio realizado na ausência de chumbo adicionado durante a incubação como 100%, mostrou um efeito significativo da condição de pré-incubação empregada [F(3,12) = 8,67, p<0,01]. Isto ocorreu porque o efeito foi de intensidade diferente conforme a condição de pré-incubação utilizada. Na condição controle ele ficou em torno de 200%, sendo que nas demais condições ele foi significativamente superior ao controle (Teste *post-hoc*, pelo menos para p<0,05). Contudo, as membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p, acetato de chumbo ou ambos não diferiram significativamente entre si. Este resultado também sugere fortemente que o efeito estimulatório do chumbo se dê por interação em sítios fora da proteína G, sendo de maior intensidade quando a proteína G não está inibida pelo chumbo.

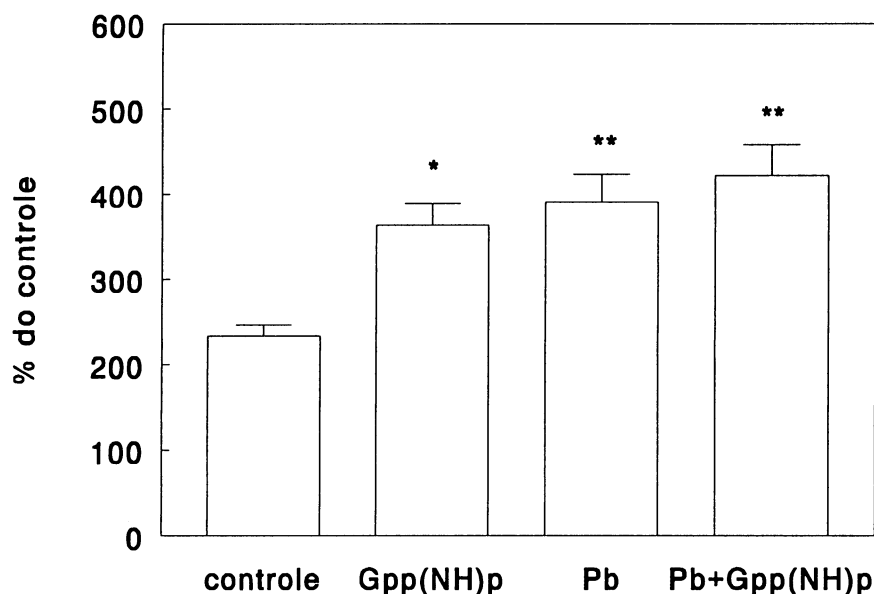


Figura IV.7. Efeito da adição de acetato de chumbo 100 μM sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em membranas pré-incubadas com Gpp(NH)p 10 μM, acetato de chumbo 100 μM ou Gpp(NH)p 10 μM + acetato de chumbo 100 μM. As membranas foram pré-incubadas conforme descrito na legenda da Figura IV.6. Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem acetato de chumbo = 100%) e são a média + erro padrão de 4 experimentos, ensaiados em triplicata. O valor absoluto da união específica de [³H]Gpp(NH)p na membrana pré-incubada na condição controle, com Gpp(NH)p 10 μM, com acetato de chumbo 100 μM e com Gpp(NH)p 10 μM + acetato de chumbo 100 μM apresentou média ± erro padrão de: 17,5 ± 0,8; 13,0 ± 1,0; 11,2 ± 1,3 e 10,1 ± 1,3, respectivamente.

* p<0,05 e ** p<0,01 em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.5. Estudo comparativo do efeito de concentrações crescentes de chumbo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM X membrana pré-incubada em condição controle

Foi testado paralelamente o efeito do acetato de chumbo adicionado nas concentrações de 1, 5, 20, 100 e 400 μM sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p em membrana de córtex cerebral de rato pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM e pré-incubada em condição controle (**Figura IV.8.**). A análise estatística através de teste t de Student para amostras dependentes considerando cada concentração de acetato de chumbo, mostrou que na membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM, a união específica de [³H]Gpp(NH)p foi diferente em relação à membrana pré-incubada em condição controle, para as concentrações de 5, 20, 100 e 400 μM de acetato de chumbo. Apenas em relação à concentração de 1 μM de acetato de chumbo não houve diferença entre as duas condições de pré-incubação. Desta forma, a inibição da união específica de [³H]Gpp(NH)p ocorreu apenas na membrana pré-incubada em condição controle com a concentração de 5 μM de acetato de chumbo. Conclui-se que na condição na qual os sítios das proteínas G foram previamente saturados com Gpp(NH)p o chumbo não causou inibição, por não ter acesso às proteínas G. Observamos que a estimulação da união específica de [³H]Gpp(NH)p provocada pela adição de acetato de chumbo 20 μM ocorreu apenas na membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM. Nas concentrações de acetato de chumbo 100 e 400 μM, a estimulação foi maior na membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM, de forma semelhante ao resultado observado na **Figura IV.7.** (acetato de chumbo 100 μM). Estes dados reforçam a conclusão de que a estimulação da união específica de [³H]Gpp(NH)p provocada pelo chumbo se dá em sítios para nucleotídeo(s) da guanina fora das proteínas G.

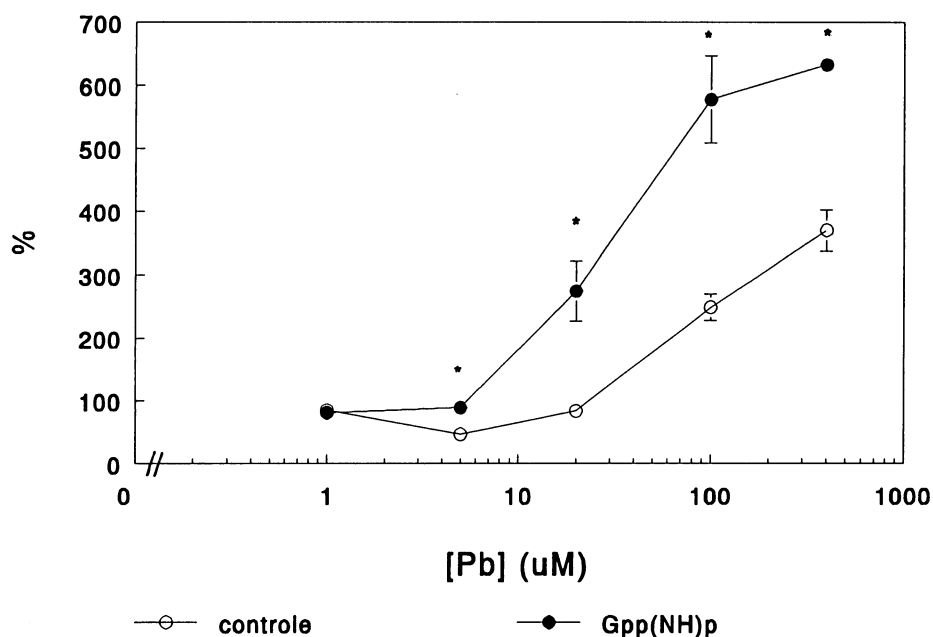


Figura IV.8. Efeito do acetato de chumbo sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em preparação de membrana pré-incubada em condição controle (o) ou em membranas pré-incubadas com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $10\ \mu\text{M}$ (*). As membranas foram pré-incubadas conforme descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (sem acetato de chumbo = 100%) e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata. O valor absoluto da união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ na membrana pré-incubada na condição controle, ou com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $10\ \mu\text{M}$ apresentou média \pm erro padrão de: $14,0 \pm 0,9$ e $9,0 \pm 0,9$, respectivamente.

* $p < 0,05$ em relação à respectiva concentração de acetato de chumbo na membrana controle por teste t de Student para amostras dependentes.

IV.3.6. Efeito do tempo de incubação sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $10\ \mu\text{M}$.

Após proceder-se a pré-incubação da membrana de córtex cerebral com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $10\ \mu\text{M}$, a mesma foi submetida a 3 lavagens sucessivas a 4°C para remoção do $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ não ligado, bem como o ligado fora das proteínas G (conforme consta em material e Métodos) e a seguir incubadas em tempos de 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos a temperatura de 30°C . Nesta condição, teoricamente toda a união específica obtida no final do experimento, independentemente do período de incubação empregado, seria devida à união do nucleotídeo radioativo em sítios fora da proteína G. Contudo, existia a possibilidade de que o $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ unido à proteínas G durante a pré-incubação sofresse um desligamento quando da realização da incubação a temperatura de 30°C (a

estabilidade da união do Gpp(NH)p à proteínas G dá-se a temperaturas <20°C). Sendo assim, os objetivos deste experimento eram: a) verificar a diferença da união específica de [³H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM em relação à membrana pré-incubada sem Gpp(NH)p (controle) ao longo do tempo (**Figura IV.9A.**) e, b) verificar se a porcentagem da união específica de [³H]Gpp(NH)p obtida com a membrana pré-incubada com Gpp(NH)p 10 μM comparada à membrana pré-incubada em condição controle permaneceria constante com o tempo de incubação (**Figura IV.9B.**).

A ANOVA de duas vias, considerando o tempo como medida repetida, revelou um efeito significativo da condição de pré-incubação usada (com ou sem Gpp(NH)p) [$F(1,10) = 6,61, p < 0,05$] e também do tempo de incubação [$F(5,50) = 103,99, p < 0,001$]. Não houve efeito significativo da interação entre a condição de pré-incubação usada e o tempo. O teste *post-hoc* de Duncan revelou que a união específica de [³H]Gpp(NH)p em membrana pré-incubada com Gpp(NH)p foi inferior à condição controle ($p < 0,05$). O teste de Duncan também mostrou que a união específica de [³H]Gpp(NH)p aumenta com o tempo de incubação, sendo que os resultados da união diferem entre si para cada tempo estudado ($p < 0,01$) (**Figura IV.9A.**).

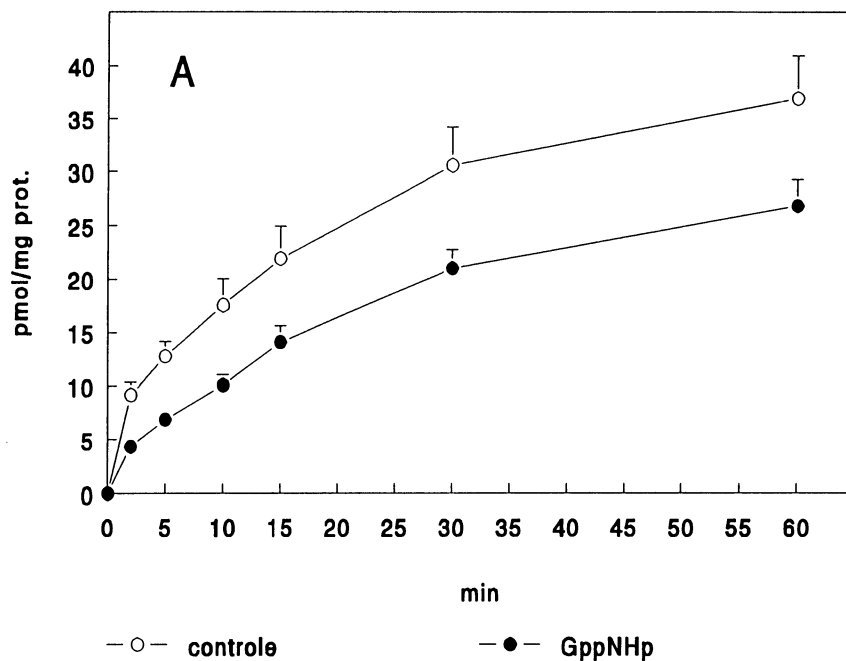


Figura IV.9A. Efeito do tempo de incubação sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em preparação de membrana pré-incubada em condição controle (○) ou em membranas pré-incubadas com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM (●). As membranas foram pré-incubadas conforme descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ / mg proteína e são a média \pm erro padrão de 6 experimentos, ensaiados em triplicata.

A **Figura IV.9B.** mostra os valores da união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ na membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$, expressos em porcentagem do controle (sem $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ = 100%). A ANOVA de uma via mostrou que existe um efeito significativo do tempo de incubação sobre esta porcentagem [$F(5,53) = 6,01$, $p < 0,001$]. **Figura IV.9B.** mostra que a porcentagem da união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ obtida com a membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM é em torno de 50% nos tempos de 2 e 5 minutos (união específica fora da proteína G), mas aumenta significativamente a partir do tempo 15 minutos, quando comparado ao tempo de 2 minutos de incubação (Teste *post-hoc* do raio múltiplo de Duncan). Este último resultado sugere que pode ter ocorrido um desligamento do $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ que saturava as proteínas G com o aumento do período de incubação. Contudo, tal hipótese necessita maior investigação.

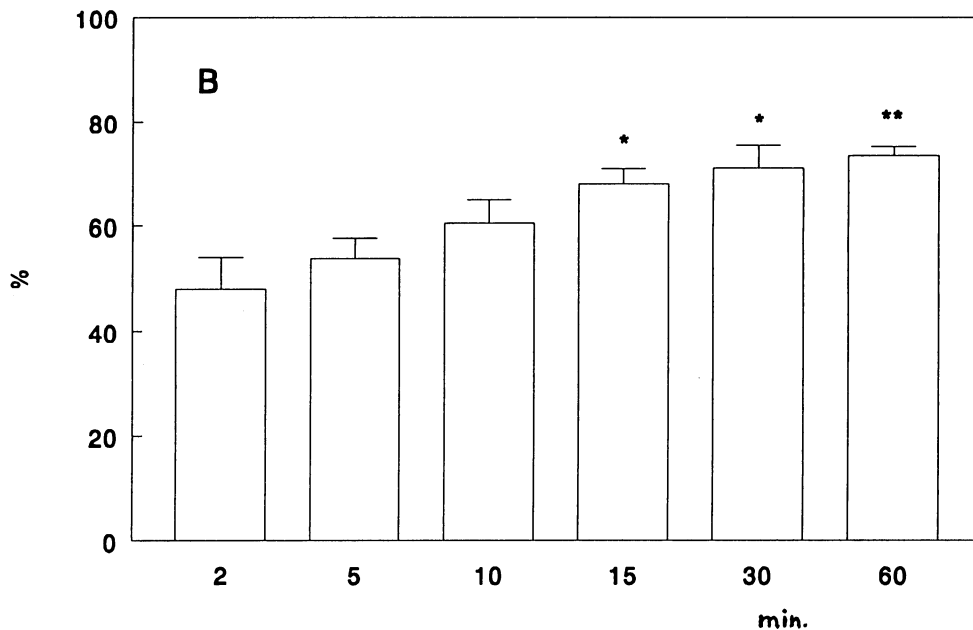


Figura IV.9B. Efeito do tempo de incubação sobre a porcentagem de união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $10 \mu\text{M}$ em relação à membrana pré-incubada em condição controle (100%). Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (membrana pré-incubada em condição controle) e são a média + erro padrão de 6 experimentos, ensaiados em triplicata.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao tempo de 2 minutos, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.7. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do chumbo na união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em membrana pré-incubada em condição controle

Com a finalidade de verificar o efeito do tempo de incubação sobre a ação do chumbo na união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$, foram escolhidas duas concentrações de acetato de chumbo: uma inibitória = $5 \mu\text{M}$ e uma estimulatória = $100 \mu\text{M}$. A Figura IV.10. mostra a curva de tempo realizada com a membrana pré-incubada em condição controle.

A ANOVA de duas vias, considerando o tempo como medida repetida, revelou um efeito significativo do chumbo [$F(2,10) = 21,31$, $p < 0,001$], do tempo de incubação [$F(4,40) = 17,26$, $p < 0,001$] e da interação entre chumbo e tempo [$F(8,40) = 11,90$, $p < 0,001$].

O teste *post-hoc* da interação mostrou que, na ausência de acetato de chumbo, a união específica de [³H]Gpp(NH)p aumenta com o tempo de incubação, sendo que todos os tempos diferem entre si, com exceção dos tempos de incubação de 2 minutos e 5 minutos (Figura IV.10.). Na presença de acetato de chumbo 5 μM, a medida da união do nucleotídeo radioativo só difere significativamente entre os tempos de 2 minutos (p<0,01) ou 5 minutos (p<0,05) de incubação em relação ao tempo de 30 minutos. Observou-se um perfil diferente na presença de acetato de chumbo 100 μM, no qual a união específica de [³H]Gpp(NH)p não difere significativamente entre os vários tempos empregados, ou seja, um "plateau" foi atingido desde o tempo de incubação de 2 minutos.

Ainda, o resultado do teste *post-hoc* da interação mostrou um efeito inibitório exercido por acetato de chumbo 5 μM sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p, o qual foi significativo nos tempos de 5 minutos (p<0,05), 10 minutos (p<0,01), 15 e 30 minutos (p<0,001). Também foi mostrado um efeito estimulatório do chumbo na concentração de 100 μM em relação à membrana controle. Este efeito foi significativo em todos os tempos de incubação empregados (p<0,01).

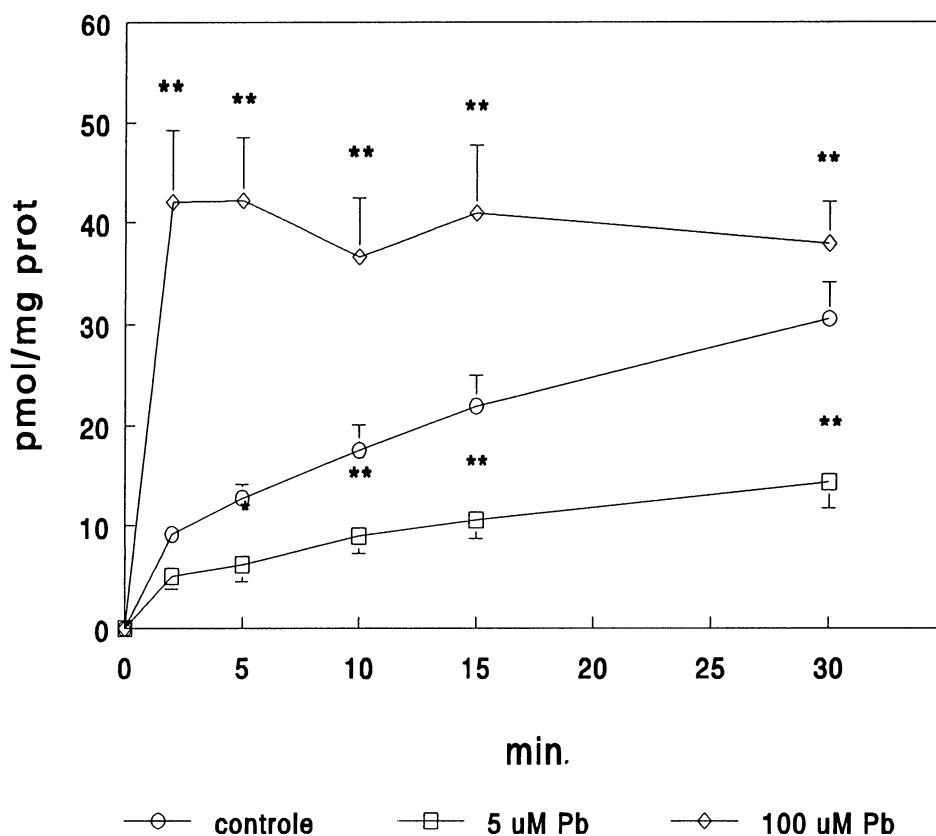


Figura IV.10. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do acetato de chumbo 5,0 μM (\square) e 100 μM (\diamond) sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em preparação de membrana pré-incubada em condição controle. A membrana foi incubada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}/\text{mg}$ proteína e são a média \pm erro padrão de 4 (com acetato de chumbo 5 μM) ou 3 experimentos (com acetato de chumbo 100 μM), respectivamente), ensaiados em triplicata.
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.8. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do chumbo na união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM .

A Figura IV.11. mostra a curva de tempo de incubação realizada com a membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM , na presença de acetato de chumbo 5 μM ou 100 μM ou ainda, na ausência de acetato de chumbo na incubação.

A ANOVA de duas vias, considerando o tempo como medida repetida, revelou um efeito significativo do chumbo [$F(2,10) = 190,86$, $p < 0,001$], do tempo de incubação

[F(4,40) = 22,13, $p < 0,001$] e da interação entre chumbo e tempo [F(8,40) = 5,46, $p < 0,001$].

O teste *post-hoc* da interação mostrou que, na ausência de acetato de chumbo, a união específica de [^3H]Gpp(NH)p é significativamente maior no tempo 15 minutos em relação aos tempos 2 e 5 minutos e é significativamente maior no tempo 30 minutos em relação a todos os demais tempos (**Figura IV.11.**). Na presença de acetato de chumbo 5 μM , a medida da união do nucleotídeo radioativo só difere significativamente entre os tempos de 2 ou 5 minutos de incubação em relação ao tempo de 30 minutos ($p < 0,05$), de forma semelhante à observada na **Figura IV.10**. Na presença acetato de chumbo de 100 μM , a união do nucleotídeo não difere significativamente entre os vários tempos estudados.

Se analisarmos o efeito do chumbo em relação à membrana incubada na ausência do metal, o resultado do teste *post-hoc* da interação mostra resultados um pouco diferentes dos apresentados na **Figura IV.10**. Na presença de 5 μM de acetato de chumbo, não houve efeito inibitório significativo do metal sobre a união específica de [^3H]Gpp(NH)p nos tempos de incubação de 2, 5, 10 ou 15 minutos (teste *post-hoc* do raio múltiplo de Duncan) (**Figura IV.11.**). No tempo de 15 minutos, deve ser ressaltado que houve uma tendência de efeito inibitório ($p = 0,08$), utilizando o teste *post-hoc* do raio múltiplo de Duncan (se o teste *post-hoc* empregado fosse o Student-Newman Keuls p seria 0,03). Contudo, uma união do nucleotídeo radioativo significativamente menor do que na ausência do chumbo ocorreu no tempo de incubação de 30 minutos ($p < 0,001$). Este resultado sugere que nos tempos de 2, 5, 10 minutos de incubação, a saturação da proteína G pelo Gpp(NH)p impediu a interação do chumbo com a proteína G. Além disto, pode-se sugerir que com o aumento do período de incubação, o chumbo passa a atuar sobre proteínas G que tiveram parte do Gpp(NH)p que as saturava desligado (conforme já sugerido pela **Figura IV.9B.**). O teste *post-hoc* da interação ainda mostrou que o acetato de chumbo adicionado na concentração de 100 μM causou um efeito estimulatório significativo em relação à membrana sem o metal, para todos os tempos de incubação ($p < 0,01$).

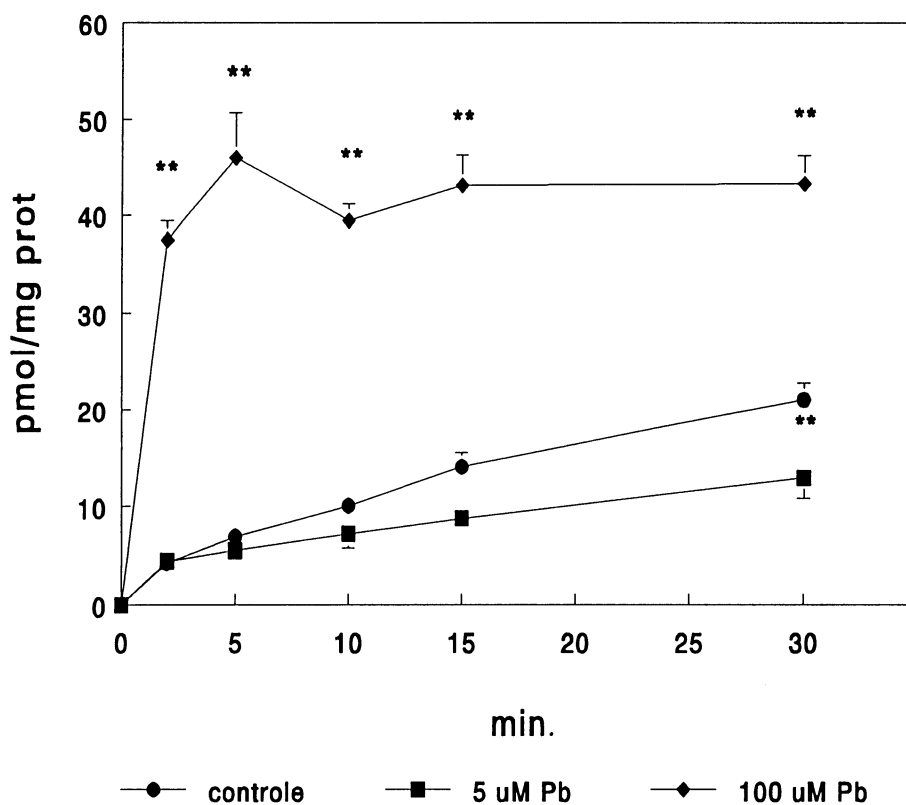


Figura IV.11. Efeito do tempo de incubação sobre a ação do acetato de chumbo 5,0 μM (■) e 100 μM (◆) sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ em preparação de membrana pré-incubada com $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM . A pré-incubação foi realizada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}/\text{mg}$ proteína e são a média \pm erro padrão de 4 experimentos (com acetato de chumbo 5 μM) ou 3 experimentos (com acetato de chumbo 100 μM), respectivamente), ensaiados em triplicata. ** $p < 0,01$ em relação ao controle, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.3.9. Avaliação do desligamento de $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ ligado a proteínas G, durante a incubação

Com a finalidade de verificar se o $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ que se une às proteínas G durante a pré-incubação sofre um desligamento quando a membrana é incubada a temperatura de 30°C, realizou-se um experimento no qual a membrana foi pré-incubada com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 200 nM (experimento a) ou com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 2,0 μM (experimento b), lavada três vezes a 4°C (para remoção do $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ não ligado e também do ligado labilmente fora das proteínas G) e então incubada a 30°C em tempos crescentes. Estas concentrações de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ foram escolhidas tendo em vista a impossibilidade da realização de um experimento com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 10 μM (não haveria

união específica de [³H]Gpp(NH)p na proteína G), a qual seria a concentração equiparável à usada nos experimentos de pré-incubação com Gpp(NH)p.

Como controle da eficiência das lavagens acima mencionadas, foram realizadas medidas da radioatividade de alíquotas de sobrenadantes das lavagens, tanto no experimento a como no b. Como representativo deste controle, a **Tabela IV.1.** mostra os valores de [³H]Gpp(NH)p em cada sobrenadante após a pré-incubação com [³H]Gpp(NH)p 2,0 μM. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo das lavagens sobre os níveis de [³H]Gpp(NH)p [$F(4,10) = 130,46, p < 0,01$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os valores de pmol de [³H]Gpp(NH)p nos sobrenadantes 2 (SN2), 3 (SN3), 4 (SN4) e 5 (SN5) são inferiores ao valor obtido no sobrenadante 1 (SN1) ($p < 0,01$ em todos os casos). O resultado mostra que após a terceira lavagem (SN4), a quantidade de radioatividade remanescente corresponde a apenas 0,4% da radioatividade inicial e após a quarta lavagem (SN5) corresponde a 0,3% da radioatividade inicial.

Tabela IV.1. Determinação de [³H]Gpp(NH)p liberado por ciclos de lavagem após a pré-incubação.

Sobrenadante (SN)	pmol [³ H]Gpp(NH)p
SN1	21.842 ± 1891
SN2	500 ± 99**
SN3	121 ± 54**
SN4	92 ± 43**
SN5	64 ± 30**

Após a pré-incubação com [³H]Gpp(NH)p 2,0 μM, conforme descrito em Material e Métodos, as membranas foram centrifugadas a 27.000 g e a radioatividade foi medida em 1,0 ml de sobrenadante (SN1). Este procedimento foi repetido 4 vezes, com lavagens adicionais e remoção de 1,0 ml dos sobrenadantes (SN2 a SN5) para medida da radioatividade. Os valores estão expressos em pmol [³H]Gpp(NH)p e representam a média ± erro padrão de três experimentos.

** $p < 0,01$ quando comparado ao valor obtido no SN1 pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

Experimento a: pré-incubação com [³H]Gpp(NH)p 200 nM

Foram retiradas alíquotas nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos de incubação e com a medida da radioatividade nos sobrenadantes das centrifugações (vide detalhes em Material e Métodos), foram obtidos os resultados mostrados na **Figura IV.12A.** A ANOVA de uma via, considerando o tempo de incubação como medida

dependente, revelou um efeito significativo do tempo [$F(5,10) = 29,10, p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que a medida da radioatividade nos sobrenadantes nos tempos de incubação de 10, 15 e 30 minutos é significativamente maior do que nos tempos 0 e 2 minutos ($p < 0,05$ para tempo 10 min., $p < 0,01$ para tempo 15 min. e $p < 0,001$ para tempo 30 min, todos em comparação com tempo 0 ou 2 min.). A medida da radioatividade na membrana está mostrada na **Figura IV.12B**. A ANOVA de uma via, considerando o tempo de incubação como medida dependente, revelou um efeito significativo do tempo [$F(5,10) = 9,74, p < 0,01$]. O resultado do teste *post-hoc* mostrou que a medida da união de [^3H]Gpp(NH)p na membrana é significativamente menor no tempo de incubação de 30 minutos em relação a todos os demais tempos ($p < 0,01$ para todos os casos).

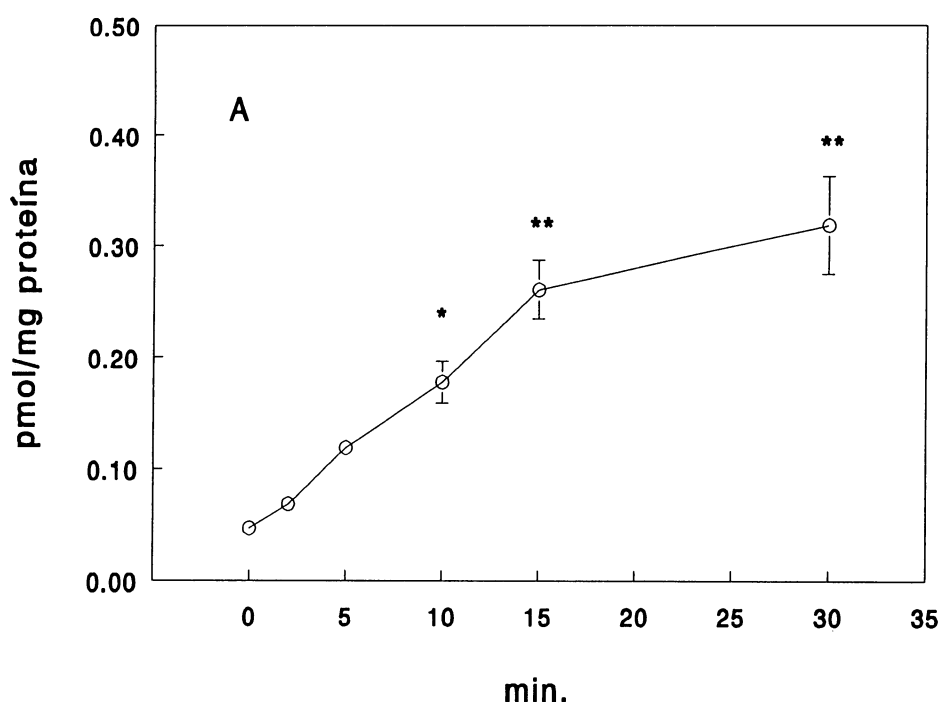


Figura IV.12A. Determinação de [^3H]Gpp(NH)p liberado durante a incubação a 30°C. A membrana foi pré-incubada com [^3H]Gpp(NH)p 200 nM, centrifugada e lavada 4 vezes, conforme descrito em Material e Métodos. Foi medido a radioatividade em alíquotas de membrana retiradas nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos de incubação e centrifugadas a 12.000g por 3 min., conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em pmol [^3H]Gpp(NH)p/ mg proteína e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao tempo 0 ou 2 minutos, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

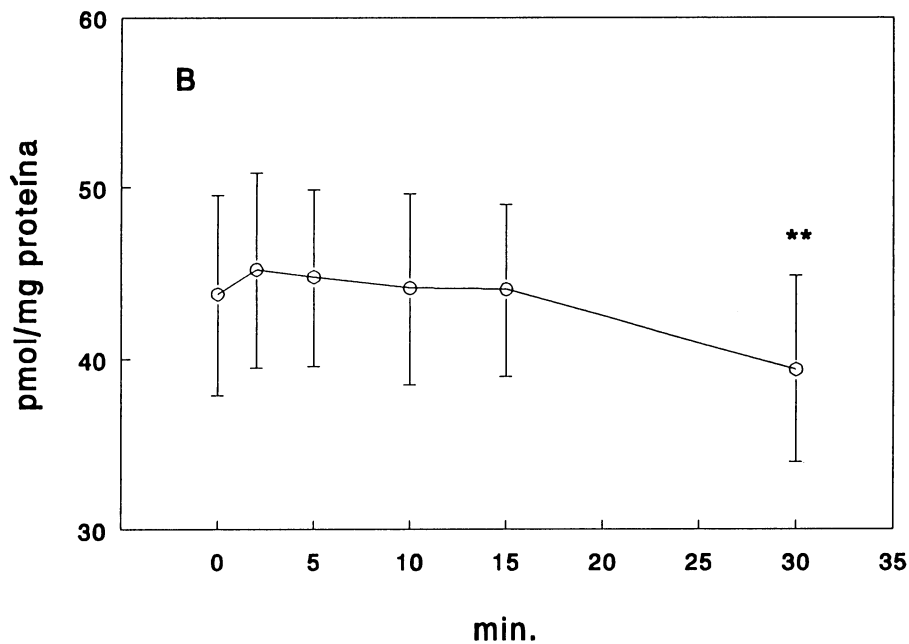


Figura IV.12B. Determinação de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ que permaneceu nas membranas durante a incubação a 30°C . A membrana foi pré-incubada conforme descrito acima. Foi medido a radioatividade remanescente nas membranas nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos de incubação. Os resultados estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}/\text{mg}$ proteína e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata.

** $p < 0,01$ em relação ao tempo 0, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

Experimento b: pré-incubação com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $2,0 \mu\text{M}$

A ANOVA de uma via, considerando o tempo de incubação como medida dependente, revelou um efeito significativo do tempo [$F(6,12) = 34,83$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que a medida da radioatividade nos sobrenadantes nos tempos de incubação de 10, 15, 30 e 60 minutos é significativamente maior do que nos tempos 0 e 2 minutos ($p < 0,05$ para tempo 10 min., $p < 0,01$ para tempo 15 min. e $p < 0,001$ para tempo 30 e 60 min, todos em comparação com tempo 0 ou 2 min.) (Figura IV.13A.). Este resultado é semelhante ao observado quando da pré-incubação com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ 200 nM , relatado anteriormente. A medida da união de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ à membrana após os vários tempos de incubação está mostrada na Figura IV.13B. A ANOVA de uma via, considerando o tempo de incubação como medida dependente, revelou um efeito significativo do tempo [$F(3,6) = 18,64$, $p < 0,01$]. O resultado do teste *post-hoc* mostrou que a medida da união de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ na membrana é significativamente menor no

tempo de incubação de 30 e de 60 minutos em relação aos tempos 0 e 2 minutos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

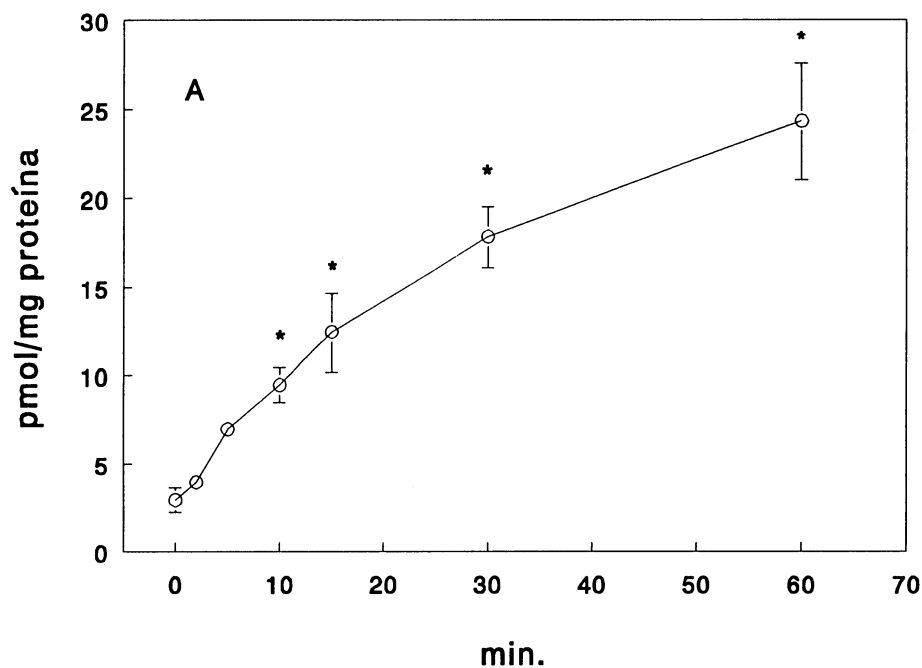


Figura IV.13A. Determinação de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ liberado durante a incubação a 30°C . A membrana foi pré-incubada com $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ $2\ \mu\text{M}$, centrifugada e lavada 4 vezes, conforme descrito em Material e Métodos. Foi medido a radioatividade em alíquotas de membrana retiradas nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos de incubação e centrifugadas a 12.000g por 3 min., conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ / mg proteína e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao tempo 0, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

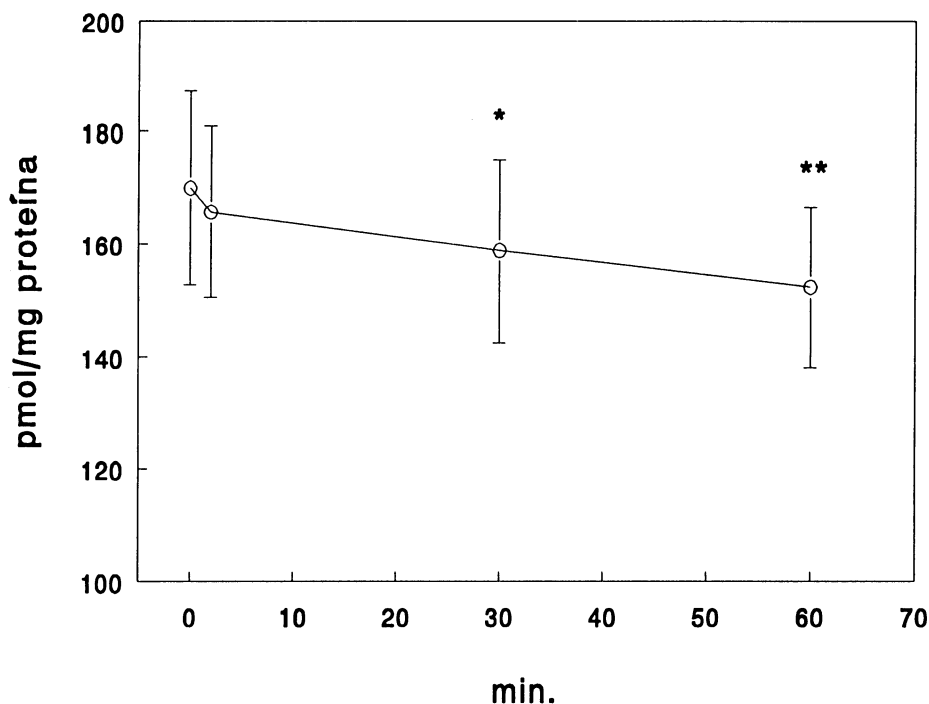


Figura IV.13B. Determinação de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ que permaneceu nas membranas durante a incubação a 30°C . Foi medido a radioatividade remanescente nas membranas nos tempos de 0, 2, 30 e 60 minutos de incubação. Os resultados estão expressos em pmol $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}/\text{mg}$ proteína e são a média \pm erro padrão de 3 experimentos, ensaiados em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao tempo 0 e 2 minutos, pelo teste do raio múltiplo de Duncan.

IV.4. DISCUSSÃO

O chumbo, adicionado sob forma de acetato de chumbo, causou um efeito bifásico sobre a união específica de $[^3\text{H}]\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ (Figura IV.4.). Os resultados mostrados nas Figuras IV.5. e IV.6. demonstraram que o efeito na proteína G é de natureza inibitória. O efeito inibitório é estável, pois ocorre mesmo mediante a realização das lavagens a 4°C e, provavelmente, corresponda à união do chumbo em grupos sulfidril na subunidade α das proteínas G. Toda proteína que possui grupamentos sulfidril pode ser um alvo em potencial para a ação do chumbo (Goering, 1993). No caso das proteínas G, existem relatos da ocorrência de várias modificações covalentes que afetam grupos $-\text{SH}$ específicos, as quais podem comprometer a função destas proteínas. Entre estes, pode-se incluir o estudo de Ho & Fung (1984) que demonstrou que a modificação de grupos $-\text{SH}$ por NEM reduziu a união de $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ à proteína G.

Adicionalmente, este trabalho mostrou que a união de Gpp(NH)p à subunidade α da transducina bloqueou dois grupos sulfidril da alquilação, sugerindo que estes grupos são importantes para a união do nucleotídeo. Isto sugere que os grupos sulfidril na subunidade α de proteínas G podem ser sítios nos quais reagentes alquilantes sulfidrílicos ou metais pesados exercem seu efeito inibitório. Sendo assim, não parece surpreendente que o chumbo, o qual deve formar mercaptídeos estáveis na proteína G (**Figuras IV.5. e IV.6.**), possa bloquear a união específica de [3 H]Gpp(NH)p.

O efeito na proteína G ocorreu numa ampla faixa de concentração (de 5 a 100 μ M de chumbo), sendo significativo já na concentração de 5,0 μ M de chumbo. Esta concentração pode ser atingida no cérebro de animais expostos a este metal (Jett & Guilarte, 1995). Em nosso estudo (**Tabela I.14.**, pg. 40) o teor de chumbo no córtex cerebral chegou a atingir 0,8 μ M. Desta forma, este efeito pode ser de grande relevância neurotoxicológica em intoxicações por chumbo, por envolver um sistema de transdução de sinal amplamente utilizado pelas células do SNC (Offermanns & Schultz, 1994). Isto impõe um futuro estudo do efeito *in vivo* do chumbo sobre este parâmetro neuroquímico.

A conclusão de que o acetato de chumbo, mesmo em altas concentrações inibe a proteína G, leva à inferência de que o efeito estimulatório observado na **Figura IV.4.**, pode dar-se fora da proteína G.

O efeito estimulatório do chumbo sobre a união específica de [3 H]Gpp(NH)p mostrado na **Figura IV.4.** ocorreu em concentrações relativamente elevadas do metal. A partir da suposição de que o referido efeito ocorresse por união do chumbo com o sítio que liga nucleotídeos da guanina fora da proteína G, realizamos experimentos nos quais a proteína G foi saturada com Gpp(NH)p, de forma que toda a união específica de [3 H]Gpp(NH)p que ocorresse na incubação poderia ser atribuída à união do nucleotídeo em sítios fora da proteína G (Paz et al., 1994). Nesta condição, a intensidade do efeito estimulatório produzido pelo chumbo foi maior do que na condição controle (**Figuras IV.7. e IV.8.**). Este resultado sugere fortemente que o efeito estimulatório observado se dá por interação do metal fora da proteína G. Este último efeito, presumivelmente, dá-se sobre o receptor glutamatérgico, tendo em vista que vários trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Souza & Ramirez, 1991; Paz et al, 1994; Tasca et al., 1995; Malcon et al., 1996; Maraschin et al., 1996) e de outros (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Barnes et al., 1993; Ibarra & Ortega, 1995) têm apontado para um sítio de união de nucleotídeos da guanina relacionado com o receptor glutamatérgico,

independentemente da proteína G. Nossos resultados como um todo não só corroboram trabalhos anteriores da literatura, os quais propõem uma união específica de Gpp(NH)p em um sítio fora da proteína G, mas também dão um passo adiante no sentido de apontar um possível alvo para a ação do chumbo. A referida ação teria um potencial neurotóxico, na medida em que poderia trazer conseqüências para a modulação do sistema glutamatérgico. Desta forma, estes resultados sugerem uma possível relevância neurotoxicológica também para o sítio independente da proteína G, até então não existente na literatura, em se tratando de neurotoxicidade por metais pesados.

O tempo de incubação mostrou ser um fator crítico na avaliação do efeito do chumbo sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p, especialmente em se tratando da avaliação da união do nucleotídeo na proteína G. Se tivéssemos avaliado, por exemplo, o efeito de 5 µM de acetato de chumbo no tempo de incubação de 30 minutos sobre a união específica de [³H]Gpp(NH)p com a membrana pré-incubada com Gpp(NH)p, chegaríamos a conclusão equivocada de que este metal inibe a união do nucleotídeo fora da proteína G (**Figura IV.11.**). No entanto, experimentos que avaliaram o desligamento do nucleotídeo durante a incubação (**Figuras IV.12. e IV.13.**), mostraram que, de fato, ocorre um desligamento do mesmo. Este é significativo a partir do tempo de 15 minutos. Isto possibilita ao chumbo ter acesso à proteína G nestas condições experimentais. Esta união, inclusive, parece ser de alta afinidade, como já relatado para o mercúrio (Hess et al., 1994). Além disto, observando o efeito inibitório e estimulatório do chumbo em função do tempo de incubação (**Figuras IV.10. e IV.11.**), notamos que a cinética dos efeitos é distinta, pois o efeito estimulatório é extremamente rápido, atingindo um pico aos 2 minutos, ao contrário do efeito inibitório. Este é mais um elemento que indica que o efeito estimulatório pode ser fora da proteína G. Tem sido relatado que a ativação da proteína G por Gpp(NH)p é lenta, necessitando de vários minutos (Burch, 1989).

Temos a considerar que o efeito estimulatório referido anteriormente ocorreu em concentrações de chumbo já na ordem de 20 µM (**Figura IV.8.**), o que sustenta a sua possível importância do ponto de vista neurotoxicológico. No entanto, esta só poderá ser avaliada conclusivamente através de experimentos de exposição de animais ao chumbo. Em casos de encefalopatia causadas pela administração de altas doses de chumbo, o teor deste metal no cérebro chega a atingir em torno de 10 a 20 µM (Mykkänen et al., 1979; Lefauconnier et al., 1980; Sandhir & Gill, 1994; Singh, 1995). No entanto, em se tratando de exposição de animais experimentais a baixas doses de

chumbo, sua concentração no cérebro situa-se na faixa de 0,4 - 5,0 μM (Ewers & Erbe, 1980; Cory-Slechta et al., 1981; Livesey et al., 1986; Lasley, 1992; Guilarte & Miceli, 1992; Flora et al., 1994; Widzowski et al., 1994; Altmann et al., 1994; Jett & Guilarte, 1995). Contudo, deve-se levar em consideração que as referidas concentrações dizem respeito ao conteúdo total do metal no cérebro ou numa dada estrutura cerebral, e é sabido que o chumbo pode concentrar-se em determinados microambientes celulares (Goering, 1993). Além disto, existem vários exemplos na literatura nos quais não se verifica um paralelismo entre os efeitos observados *in vitro* e *in vivo* para um dado agente neurotóxico, sendo que um dado efeito pode ocorrer *in vitro*, mas não *in vivo* ou vice-versa (Guilarte et al., 1994; Oliveira et al., 1994; Jett & Guilarte, 1995). No caso do efeito do chumbo sobre o receptor NMDA, avaliado através da união específica de [^3H]MK-801 em membrana de córtex cerebral de rato adulto, é relatado que este metal *in vitro* inibiu esta união, com IC_{50} de 78 μM (Guilarte et al., 1994). Neste mesmo estudo, animais adultos intoxicados com chumbo, os quais apresentaram um teor de Pb em torno de 0,8 μM no córtex, não tiveram uma inibição do receptor de NMDA, avaliado através da medida da união específica de [^3H]MK-801. Ainda, neste estudo, somente em ratos jovens (14 dias), o chumbo apresentou um efeito inibitório sobre o receptor de NMDA. Por outro lado, no caso do efeito do chumbo sobre a união específica de [^3H]glutamato, uma alteração foi observada *in vivo* mas não *in vitro* (Regunathan & Sundaresan, 1985). Existem ainda, exemplos nos quais o metal pode apresentar um efeito *in vitro* em concentrações semelhantes às atingidas em um intoxicação, como parece ser o caso da inibição da enzima adenilato ciclase, descrita no capítulo III.

Um questionamento que surge a partir das evidências de um sítio de união para nucleotídeos da guanina no receptor glutamatérgico, diz respeito a sua relevância fisiológica. Não existem evidências da presença destes nucleotídeos no espaço extracelular sob condições normais de funcionamento do SNC. No entanto, existe a possibilidade da presença de nucleotídeos da guanina no espaço extracelular em situações de lesão do SNC (Tatham & Lindau, 1990). Tal fato, leva à hipótese de que nestas condições, os nucleotídeos da guanina desempenhem um papel modulador das funções glutamatérgicas.

Uma das possibilidades que se tem a cerca da ação do chumbo sobre a união específica de glutamato, é que o metal cause um comprometimento da estrutura da membrana, ao invés de uma ação direta no receptor. Existem relatos na literatura de que a exposição de animais ao chumbo cause lipoperoxidação de lipídeos de membrana no cérebro (Sandhir et al., 1994), o que levaria à formação de poros, os quais poderiam

permitir o extravasamento de nucleotídeos da guanina. Nesta condição, estes nucleotídeos poderiam interferir no sistema glutamatérgico. Uma das possibilidades é que neste caso, a presença de chumbo no espaço extracelular potencialize a ação destes nucleotídeos sobre o receptor de glutamato. Esta possibilidade impõe uma nova linha de investigação a cerca da neurotoxicidade do chumbo e também chama a atenção para uma relevância da união dos nucleotídeos da guanina em sítios independentes da proteína G.

3.CONCLUSÕES

Os resultados desta Tese nos permitem concluir que:

3.1. QUANTO AO MODELO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO UTILIZADO:

- O modelo de exposição ao chumbo utilizado mostrou-se adequado em causar uma intoxicação com baixas doses, uma vez que não foram observadas alterações de peso corporal ou de estruturas cerebrais nos animais, mas foi eficaz em causar aumento dos níveis de chumbo no sangue e nos tecidos. Isto é importante porque todos os parâmetros que foram estudados em animais expostos ao chumbo não podem ser atribuídos a um efeito indireto de desnutrição dos animais. Desta forma, as alterações comportamentais, bioquímicas e neuroquímicas observadas nos ratos expostos ao chumbo são importantes do ponto de vista toxicológico.
- O modelo de exposição ao chumbo empregado, o qual incluiu exposição gestacional e lactacional, não causou aumento do teor de chumbo no cérebro de ratos de um dia de idade.
- Os níveis de chumbo sanguíneos nos ratos de um dia de idade são semelhantes aos níveis obtidos nas ratas mães, o que demonstra que este metal atravessou a placenta. Este resultado tem importância toxicológica tendo em vista que filhos de mães expostas ao chumbo durante a fase gestacional acumulam este metal no sangue.
- Os níveis de chumbo sanguíneos observados nos ratos jovens do grupo 0,5 mM (11,0 µg/dl) são comparáveis aos níveis de chumbo sanguíneos de crianças com exposição subclínica ao chumbo. Os níveis de chumbo sanguíneos observados nos ratos jovens dos grupos 2,0 e 4,0 mM (18,2 µg/dl e 50,6 µg/dl, respectivamente) são comparáveis a níveis de chumbo sanguíneos de crianças que segundo os critérios do "Center for Disease Control" merecem cuidados médicos (Davis et al., 1993). O modelo de exposição ao chumbo que produziu estes níveis de chumbo no sangue está associado a alterações comportamentais nos ratos.

3.2. QUANTO AOS RESULTADOS *IN VIVO*:

3.2.1. ALA-D:

- A atividade específica da enzima ALA-D e o índice de reativação com DTT mostraram um efeito inibitório do chumbo sobre a atividade desta enzima em cérebro e em rim de ratos de seis meses de idade expostos ao metal desde a concepção. Desta forma, estes parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar uma exposição prolongada ao chumbo.
- A atividade específica da enzima ALA-D em cérebro e em rim não é adequada para o monitoramento de uma exposição por baixas doses de chumbo em ratos jovens expostos ao metal durante os períodos de gestação e lactação. Apenas o índice de reativação da ALA-D renal em ratos jovens, que apresentaram 1,5 ppm de chumbo no rim (grupo 4,0 mM), mostrou um efeito inibitório do chumbo sobre a síntese de heme renal.
- A insensibilidade da ALA-D renal e cerebral aos efeitos inibitórios do chumbo relatada na literatura torna-se questionável, pois em nosso modelo de exposição crônica ao chumbo utilizado foi capaz de detectar alterações na atividade da ALA-D nestes tecidos associada à exposição de chumbo em ratos.

3.2.2. Comportamento

- A exposição ao chumbo em ratos jovens causou alterações comportamentais, tais como déficit de habituação no campo aberto, déficit de retenção na esQUIVA ativa e um aparente déficit de aprendizado de fuga ao choque na tarefa de esQUIVA ativa. Tais alterações comportamentais parecem refletir um déficit cognitivo associado com uma dose baixa de chumbo.
- Alterações na atividade locomotora de ratos expostos ao chumbo são dependentes da tarefa comportamental usada. Em ratos jovens foi observada uma hiperatividade no campo aberto e não ocorreu alteração na atividade locomotora na caixa de esQUIVA ativa. Nos ratos de seis meses de idade expostos ao metal desde a concepção também houve uma hiperatividade no campo aberto.

- A exposição prolongada a baixas doses de acetato de chumbo desde a concepção até a idade de seis meses não foi suficiente para produzir déficit no aprendizado latente em labirinto em ratas fêmeas.

3.2.3. Sistema glutamatérgico

- O sistema glutamatérgico foi afetado pela exposição perinatal ao chumbo, tendo em vista que uma diminuição na união específica de [³H]glutamato em cerebelo e córtex cerebral ocorreu em ratos jovens expostos ao chumbo (grupo 4,0 mM) durante a gestação e lactação.
- O efeito do chumbo *in vivo* sobre a união específica de [³H]glutamato, pelo menos em cerebelo de ratos jovens, parece ser devido a um mecanismo indireto do metal.
- Não foi observado um efeito significativo do chumbo *in vivo* sobre a união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral e cerebelo de ratos adultos. Este resultado se observa tanto em se tratando de ratos que foram expostos ao metal já na idade adulta (ratas mães) como em ratos que foram expostos ao metal desde a concepção até a idade de seis meses. Este resultado indica que o SNC de ratos adultos é mais resistente aos efeitos do chumbo.

3.2.4. Adenilato ciclase

- A atividade basal da adenilato ciclase (AC) de cerebelo e córtex cerebral foi sensível aos efeitos do chumbo *in vivo*. O efeito inibitório do chumbo variou conforme a dose do chumbo, a idade do animal e o período de exposição ao chumbo.
- A ausência de efeito inibitório do chumbo sobre a atividade basal da AC em cerebelo e córtex cerebral de ratos expostos ao chumbo desde a concepção até seis meses de idade sugere que em ratos expostos cronicamente ao metal é desencadeado um mecanismo compensatório protetor em relação aos efeitos do chumbo. Este resultado reforça a observação de que o SNC de ratos adultos é mais resistente às ações do chumbo do que o SNC de ratos jovens.

- A exposição dos ratos ao chumbo não afetou os efeito estimulatório do Gpp(NH)p 10 μM e inibitório do chumbo 3,0 μM adicionados *in vitro* sobre a atividade da AC em cerebelo e córtex cerebral.

3.3. QUANTO AOS RESULTADOS *IN VITRO*:

3.3.1. Sistema glutamatérgico

- O efeito do chumbo *in vitro* sobre a união específica de [^3H]glutamato mostrou ser dependente da estrutura cerebral analisada e da idade do animal. Em córtex cerebral, o chumbo na faixa de μM inibiu a união específica de [^3H]glutamato, sendo o efeito mais pronunciado em ratos jovens. Isto concorda com os nossos resultados *in vivo*. Por outro lado, este parâmetro não foi afetado em cerebelo de ratos jovens ou adultos. Este resultado sugere que a inibição da união específica de [^3H]glutamato observada em cerebelo de ratos jovens do grupo 4,0 mM deve-se a um mecanismo indireto de ação do chumbo sobre o sistema glutamatérgico.
- O efeito inibitório do chumbo *in vitro* sobre o sistema glutamatérgico em córtex cerebral de ratos adultos parece ser por interação não apenas com o receptor NMDA, como sugerido na literatura, mas também com os receptores cainato, AMPA, quisqualato e ACPD.

3.3.2. Adenilato ciclase

- A atividade basal da AC de cerebelo e córtex cerebral foi sensível aos efeitos do chumbo *in vitro*. O IC_{50} do metal ficou na faixa de 2,1 a 4,0 μM , conforme a estrutura cerebral (cerebelo ou córtex cerebral) e a idade do animal.

3.3.3. União específica de [^3H]Gpp(NH)p

- Os estudos *in vitro* em córtex cerebral de ratos adultos indicaram que o chumbo na concentração de 5,0 μM diminuiu a união específica de [^3H]Gpp(NH)p por interação com proteínas G.
- Os estudos *in vitro* em córtex cerebral de ratos adultos indicaram que o chumbo a partir da concentração de 20,0 μM estimulou a união específica de [^3H]Gpp(NH)p em

sítios fora da proteína G. Presume-se que estes sítios sejam os sítios de união de nucleotídeos da guanina relacionados com receptores glutamatérgicos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEY, H. & HOWARD, E. Statistical procedures in developmental studies on species with multiple offspring. Developmental Psychobiology v. 6, p. 329-335, 1973.
- ALBANO, J. D. M., BARNES, G. D., MAUDSLEY, D. V., BROWN, B. L., EKINS, R. P. Factors affecting the saturation assay of cyclic AMP in biological systems. Analytical Biochemistry v. 60, p. 130-141, 1974.
- ALFANO, D. P. & PETIT, T. L. Behavioral effects of postnatal lead exposure: Possible relationship to hippocampal dysfunction. Behavioral and Neural Biology v. 32, p. 319-333, 1981.
- ALFANO, D. P. & PETIT, T. L. Postnatal lead exposure and the cholinergic system. Physiology and Behavior v. 34, p. 449-455, 1985.
- ALKONDON, M., COSTA, A. C. S., RADHAKRISHMAN, V., ARONSTAM, R.S. & ALBUQUERQUE, E. X. Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. FEBS Letters v. 261, p. 124-130, 1990.
- AL-SALEH, I. A. S. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. Medical Research Review v.14, p. 415-486, 1994.
- ALTMANN, L., SVEINSSON, K. & WIEGAND, H. Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. Neuroscience Letters v. 128, p. 109-112, 1991.
- ALTMANN, L., WEINSBERG, F., SVEINSSON, K., LILIENTHAL, H., WIEGAND, H. & WINNEKE, G. Impairment of long-term potentiation and learning following chronic lead exposure. Toxicology Letters v. 66, p. 105-112, 1993.
- ALTMANN, L., GUTOWSKI, M. & WIEGAND, H. Effects of maternal lead exposure on functional plasticity in the visual cortex and hippocampus of immature rats. Developmental Brain Research v. 81, p. 50-56, 1994.
- ANDO, S., KAMETANI, H., OSADA, H., IWAMOTO, M. & KIMURA, N. Delayed memory dysfunction by transient hypoxia and its prevention with forskolin. Brain Research v. 405, p. 371-374, 1987.
- ANNAU, Z. Behavioral toxicology and risk assessment. Neurotoxicology and Teratology v.12, p. 547-551, 1990.
- ASANO, T. & OGASAWARA, N. Uncoupling of gamma-aminobutyric acid B receptors from GTP-binding proteins by N-ethylmaleimide: effect of N-ethylmaleimide on purified GTP-binding proteins. Molecular Pharmacology v. 29, p. 244-249, 1986.
- ASCHNER, M., CHEN, R. & KIMELBERG, H. K. Effects of mercury and lead on rubidium uptake and efflux in cultured rat astrocytes. Brain Research Bulletin v. 26, p. 639-642, 1991.

- AVISSAR, S., SCHREIBER, G., DANON, A. & BELMAKER, R. H. Lithium inhibits adrenergic and cholinergic increases in GTP binding in rat cortex. Nature v. 331, p. 440-442, 1988.
- BALDWIN, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. Current Opinion in Cell Biology v. 6, p. 180-190, 1994.
- BARALDI, M., ZANOLI, P., ROSSI, T., BORELLA, P., CASELGRANDI, E. & PETRAGLIA, F. Neurobehavioral and neurochemical abnormalities of pre- and postnatally lead-exposed rats: zinc, copper and calcium status. Neurobehavioral Toxicology and Teratology v. 7, p. 499-509, 1985.
- BARALDI, M., ZANOLI, P., ROSSI, T. & FACCHINETTI, F. Alteration of opioid peptide and receptor ontogeny in the brain of pre- and postnatally low-level lead-exposed rats. Neurotoxicology and Teratology v.10, p. 453-459, 1988.
- BARNARD, F. G., ITOH, R., HOHBERGER, L. H. & SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase - Possible role of essential thiol groups. The Journal of Biological Chemistry v. 252, p. 8965-8974, 1977.
- BARNES, J.M., MURPHY, P.A., KIRKHAM, D. & HENLEY, J.M. Interaction of guanine nucleotides with [³H]kainate and 6-[³H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. Journal of Neurochemistry v. 61, p. 1685-1691, 1993.
- BARON, B.N., DUDLEY, M.W., MCCARTY, D.R., MILLER, F.P., REYNOLDS, I.J. & SCHMIDT, C.J. Guanine nucleotides are competitive inhibitors of NMDA at its receptor site both *in vitro* and *in vivo*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 250, p. 162-169, 1989.
- BARRET, J. & LIVESEY, P. J. Low level lead effects on activity under varying stress conditions in the developing rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior v. 22, p. 107-118, 1985.
- BATLLE, A. M. DEL C., FERRAMOLA, A. M. & GRINSTEN, M. Purification and general properties of δ -aminolaevulinatase from cow liver. Biochemical Journal v. 104, p. 244-249, 1967.
- BAUDRY, M. & LYNCH, G. Regulation of glutamate receptors by cations. Nature v. 282, p. 748750, 1979.
- BAYER, S. A., ALTMAN, J., RUSSO, R. J. & ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. Neurotoxicology v. 14, p. 83-144, 1993.
- BEAL, F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? Annal Neurology v. 31., pp 119-130, 1992.
- BECHARA, E. J. H., MEDEIROS, M. H. G., MONTEIRO, H. P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C. A., ABDALLA, D. S. P. , ONUKI, J., WENDEL, C. M. A. , MASCIO, P. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. Química Nova v. 16, p. 385-392, 1993.

- BELLINGER, D., LEVITON, A., WATERNAUX, C., NEEDLEMAN, H. & RABINOWITZ, M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. New England Journal of Medicine v. 316, p. 1037-1043, 1987.
- BELLINGER, D.C., STILES, K.M. & NEEDLEMAN, H.L. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. Pediatrics v. 90, p. 855-861, 1992.
- BELLINGER, D., LEVITON, A., ALLRED, E. & RABINOWITZ, M. Pre- and postnatal lead exposure and behavior problems in school-aged children. Environmental Research v. 66, p.12-34, 1994.
- BENZI, G., PASTORIS, O., MARZATICO, F. & VILLA, R. F. Influence of aging and drug treatment on the cerebral glutathione system. Neurobiology of Aging v. 9, p. 371-375, 1988.
- BETTLER, B. & MULLE, C. Neurotransmitter receptors II: AMPA and kainate receptors. Neuropharmacology v. 34, p. 123-139, 1995.
- BEVAN, D. R., BODLAENDER, P.& SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase - Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. The Journal of Biological Chemistry v. 255, p. 2030-2035, 1980.
- BIELARCZYK, H., TOMSIG, J. L. & SUSZKIW, J. B. Perinatal low-level lead exposure and the septo-hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and cholineacetyltransferase in the rat septum. Brain Research v. 643, p. 211-217, 1994.
- BIONDI, C., FABBRI, M.E., SONETTI, D. & FANTIN, A. M. B. Effects of lead exposure on cAMP and correlated enzymes in *Viviparus ater* (Mollusca gastropoda) nervous system. Comparative Biochemistry and Physiology v. 94C, p. 327-333, 1989.
- BIRNBAUMER, L. G proteins in signal transduction. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 30, p. 675-705, 1990.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J. & BROWN, A. M. Receptor-effector coupling by G proteins. Biochimica et Biophysica Acta v. 1031, p. 163-224, 1990.
- BITHONEY, W. G., VANDEVEN, A. M. & RYAN, A. Elevated lead levels in reportedly abused children. Journal of Pediatrics v. 122, p. 719-720, 1993.
- BOCKAERT, J. G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions. Current Opinion in Neurobiology v. 1, p. 32-42, 1991.
- BODGEN, J. D., GERTNER, S. B., CHRISTAKOS, S., KEMP, F. W., YANG, Z., KATZ, S. & CHU, C. Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. Journal of Nutrition v. 122, p. 1351-1360, 1992.
- BONDY, S. C., ANDERSON, C. L., HARRINGTON, M. E. & PRASAD, K. N. The effects of organic and inorganic lead and mercury on neurotransmitter high affinity transport and release mechanisms. Environmental Research v. 19, p. 102-111, 1979.

- BORNSCHEIN, R. L., FOX, D. A. & MICHAELSON, A. Estimation of daily exposure in neonatal rats receiving lead via dam's milk. Toxicology and Applied Pharmacology v. 40, p. 577-587, 1977.
- BOURNE, H. R., SANDERS, D. A. & McCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature v. 349, p. 117-127, 1991.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENNAN, M. J. W., CANTRILL, R. C. & KRAMER, S. Effect of delta-aminolevulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membrane. International Journal of Biochemistry v. 12, p. 833-835, 1980.
- BRESSLER, J. P. & GOLDSTEIN, G. W. Mechanisms of lead neurotoxicity. Biochemical Pharmacology v. 41, p. 479-484, 1991.
- BRIDGES, R. J., NIETO-SAMPEDRO, M., KADRI, M. & COTMAN, C. W. A novel chloride-dependent L-[³H]glutamate binding site in astrocyte membranes. Journal of Neurochemistry v. 48, p. 1709-1715, 1987.
- BROOKES, N. *In vitro* evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. Toxicology v. 76, p. 245-256, 1992.
- BROWN, S., DRAGANN, N. & VOGEL, W. H. Effects of lead acetate on learning and memory in rats. Archives of Environmental Health v. 22, p. 370-372, 1971.
- BUDSON, A. E., JACKSON, P. S. & LIPTON, S. A. GDPβS antagonizes whole-cell responses to excitatory aminoacids. Brain Research v. 548, p. 346-348, 1991.
- BURCH, R. M. G protein regulation of phospholipase A2. Molecular Neurobiology v. 3, p. 155-171, 1989.
- BURKEY, R. T. & NATION, J. R. Brain stimulation reward following chronic lead exposure in rats. Behavioral Neuroscience v. 108, p. 532-536, 1994.
- BURRIGHT, R. G., ENGELLENER, W. J. & DONOVICK, P. J. Lead exposure and agonistic behavior of adult mice of two ages. Physiology and Behavior v. 30, p. 285-288, 1983.
- BUTCHER, S. P., ROBERTS, P. J. & COLLINS, J. F. Purine nucleotides inhibit the binding of D,L [³H]2-amino-4-phosphonobutyrate (D,L [³H]APB) to L-glutamate-sensitive sites on rat brain membranes. Biochemical Pharmacology v. 35, p. 991-994, 1986.
- CAGIANO, R., DE SALVIA, M.A., RENNA, G., TORTELLA, E., BRAGHOROLI, D., PARENTI, C., ZANOLI, P., BARALDI, M., ANNAU, Z. & CUOMO, V. Evidence that exposure to methyl mercury during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. Neurotoxicology and Teratology v. 12, p. 23-28, 1990.

- CAMPBELL, J. B., WOOLLEY, D. E., VIJAYAN, V. K. & OVERMANN, S. R. Morphometric effects of postnatal lead exposure on hippocampal development on the 15-day-old rat. Developmental Brain Research v. 3, p. 595-612, 1982.
- CARPENTER, D. O., MATTHEWS, M. R., PARSONS, P. J. & HORI, N. Long-term potentiation in the piriform cortex is blocked by lead. Cellular and Molecular Neurobiology v. 14, p. 723-733, 1994.
- CARROL, P. T., SILBERGELD, E. K. & GOLDBERG, A. M. Alteration of central cholinergic function by chronic lead acetate exposure. Biochemical Pharmacology v. 26, p. 397-402, 1977.
- CASEY, P. J. & GILMAN, A. G. G protein involvement in receptor-effector coupling. The Journal of Biological Chemistry v. 263, p. 2577-2580, 1988.
- CASEY, P. J. Lipid modifications of G proteins. Current Opinion in Cell Biology v. 6, p. 219-225, 1994.
- CASEY, P. J. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. Biochemical Society Transactions v. 23, p. 161-166, 1995.
- CASPERSON, G. F. & BOURNE, H. R. Biochemical and molecular genetic analysis of hormone-sensitive adenylyl cyclase. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 27, p. 371-384, 1987.
- CHOIE D. D. , RICHTER G. W. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead I. Synthesis of deoxyribonucleic acid. Laboratory Investigation v. 30, p. 647-651, 1974.
- CHOU, J. C. & LEE, E. H.Y. Differential involvement of hippocampal G-proteins subtypes in the memory process of rats. Neuroscience v. 64, p. 5-15, 1995.
- CLAPHAM, D. E. Direct G protein activation of ion channels? Annual Review of Neuroscience v. 17, p. 441-464, 1994.
- CLELAND, W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochemistry v. 3, p. 480-482, 1963.
- COHN J, COX C. & CORY-SLECHTA, D. A. The effects of lead exposure on learning in a multiple repeated acquisition and performance schedule. Neurotoxicology v.14, p. 329-346, 1993.
- COHN, J. & CORY-SLECHTA, D. A. Lead exposure potentiates the effects of NMDA on repeated learning. Neurotoxicology and Teratology v. 16, p. 455-465, 1994.
- COLIN, S. F., CHANG, H., MOLLNER, S., PFEUFFER, T., REED, R. R., DUMAN, R. S. & NESTLER, E. J. Chronic lithium regulates the expression of adenylyl cyclase and Gi-protein α subunit in rat cerebral cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 88, p. 10634-10637, 1991.
- COLLINGRIDGE, G. L. & LESTER, R. A. J. Excitatory aminoacid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacological Reviews v. 40, p. 143-210, 1989.

- COLLINGRIDGE, G. L. & SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. Trends in Pharmacological Sciences. A Special Report p. 42-48, 1991.
- COLLINS, M. F., WHITTLE, E. & SINGHAL, R. L. The effects of low-level lead exposure in developing rats: changes in circadian locomotor activity and hippocampal noradrenaline turnover. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology v. 62, p. 430-435, 1984.
- COOPER, D. M. F., MONS, N. & KARPEN, J. W. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. Nature v. 374, p. 421-424, 1995.
- CORY-SLECHTA, D. A., BISSEN, S. T., YOUNG, A. M. & THOMPSON, T. Chronic postweaning lead exposure and response duration performance. Toxicology and Applied Pharmacology v.78, p. 78-84, 1981.
- CORY-SLECHTA, D. A., WEISS, B. & COX, C. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicology and Applied Pharmacology v.71, p. 342-352, 1983.
- CORY-SLECHTA, D. A., WEISS, B. & COX, C. Performance and exposure indices of rats exposed to low concentrations of lead. Toxicology and Applied Pharmacology v.78, p. 291-299, 1985.
- CORY-SLECHTA, D. Alterations in tissue Pb distribution and hematopoietic indices during advanced age. Archives of Toxicology v. 64, p. 31-37, 1990.
- CORY-SLECHTA, D. Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 35, p. 391-415, 1995^a
- CORY-SLECHTA, D. A. MK-801 subsensitivity following postweaning lead exposure. Neurotoxicology v. 16, p. 83-96, 1995.^b
- CORY-SLECHTA, D. A. & POKORA, M.J. Lead-induced changes in muscarinic cholinergic sensitivity. Neurotoxicology v. 16, p. 337-348, 1995.
- COTMAN, C. W., KAHLE, J. S., MILLER, S. E., ULAS, J. & BRIDGES, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. In Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress. Ed. Bloom, F.E. & Kupfer, D. J. p. 75-85, Raven Press, New York, 1995.
- CURTIS, D. R. & WATKINS, J. C. The chemical excitation of spinal neurons by certain amino acids. Journal of Physiology v.166, p.1-14, 1961.
- DANIELSSON, B. R. G., OSKARSSON, A. & DENCKER, L. Placental transfer and fetal distribution of lead in mice after treatment with dithiocarbamates. Archives of Toxicology v. 55, p. 27-33, 1984.
- DAVIS, M. & SVENDSGAARD, D.J. Lead and child development. Nature v. 329, p. 297-300, 1987.

- DAVIS, J. M., OTTO, D.A., WEIL, D.E & GRANT, L. D. The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. Neurotoxicology and Teratology v. 12, p. 215-229, 1990.
- DAVIS, M., ELIAS, R. & GRANT, L. D. Current issues in human lead exposure and regulation of lead. Neurotoxicology v. 14, p. 15-28, 1993.
- DAWSON, R., BEAL, M. F., BONDY, S. C., DIMONTE, D. A. & ISOM, G. E. Excitotoxins, aging, and environmental neurotoxins: implications for understanding human neurodegenerative diseases. Toxicology and Applied Pharmacology v. 134, p. 1-17, 1995.
- DELUCA, J., DONOVICK, P. J. & BURRIGHT, R. G. Lead exposure, environmental temperature, nesting and consummatory behavior of adult male mice of two ages. Neurotoxicology and Teratology v. 11, p. 7-11, 1989.
- DIETER, M. P. & FINLEY, M. T. δ -Aminolevulinic acid dehydratase enzyme activity in blood, brain, and liver of lead-dosed ducks. Environmental Research v. 19, p. 127-135, 1979.
- DIETRICH, K. N., BERGER, O. G. & SUCCOP, P. A. Lead exposure and the motor developmental status of urban six-year-old children in the Cincinnati prospective study. Pediatrics v. 91, p. 301-307, 1993.
- DINGLELINE, R. & McBAIN, C. J. Excitatory amino acid transmitters. In Basic Neurochemistry. Eds G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Alberts & P. B. Molinoff. 5th ed, Raven Press, New York, 1994. Cap. 17, p. 367-387.
- DIXON, M. & WEBB, E. C. Enzymes. 2nd Ed., Longmans, London & Colchester, 1964.
- DOLINSKY, Z.S., BURRIGHT, R.G. & DONOVICK, P.J. Behavioral changes in mice following lead administration during several stages of development. Physiology & Behavior v. 30, p. 583-589, 1983.
- DOSKELAND, S. O. Guanine nucleotides protect adenylate cyclase against inhibition by Pb^{2+} . Biochimica et Biophysica Acta v. 630, p. 15-21, 1980.
- DRASKI, L. J., BURRIGHT, R. G. & DONOVICK, P. J. The influence of prenatal and/or postnatal exposure to lead on behavior of preweanling mice. Physiology & Behavior v. 45, p. 711-715, 1989.
- DREW, C. A., I. SPENCE & G. A. R. JOHNSTON: Effects of lead salts on the uptake, release, and binding of γ -aminobutyric acid: the importance of buffer composition. Journal of Neurochemistry v. 52, p. 433-440, 1989.
- DRISROLL, J. W. & STEGNER, S.E. Lead-produced changes in the relative rate of open-field activity of laboratory rats. Pharmacology Biochemistry & Behavior v. 8, p. 743-747, 1978.
- DUTRA, J. C., WAJNER, M., WANNMACHER, C. M. D., WANNMACHER, L. E., PIRES, R.F. & ROSA-JUNIOR, A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult

- rat behavior. Brazilian Journal of Medical and Biological Research v. 24, p. 595-605, 1991.
- DUVAL, G. & FOWLER, B. A. Preliminary purification and characterization studies of a low molecular weight, high affinity cytosolic lead-binding protein in rat brain. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 159, p. 177-184, 1989.
- EGLE, P. M. & SHELTON, K. R. Chronic lead intoxication causes a brain-specific nuclear protein to accumulate in the nuclei of cells lining kidney tubules. The Journal of Biological Chemistry v. 261, p. 2294-2298, 1986.
- ELISABETSKY, E., MARSCHNER, J. & SOUZA, D. O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. Neurochemical Research v. 20, p. 461-465, 1995.
- ENGELLENER, W. J., BURRIGHT, R. G. & DONOVICK, P. J. Lead, age and aggression in male mice. Physiology and Behavior v. 36, p. 823-838, 1986.
- ENGLE, M. J. & VOLPE, J. J. Glutamine synthetase activity of developing astrocytes is inhibited in vitro by very low concentrations of lead. Development Brain Research v. 55, p. 283-287, 1990.
- ENGLERT, N. & HÖRING, H. Lead concentration in tap-water and in blood of selected schoolchildren in Southern Saxonia. Toxicology Letters v. 72, p. 325-331, 1994.
- EPSTEIN, H. T., FENTON, K. & SHIMPACH, S. Lead acetate delays rapid postnatal mouse brain and body growth. Life Sciences v. 49, p. 1169-1172, 1991.
- EWERS, U. & ERBE, R. Effects of lead, cadmium and mercury on brain adenylate cyclase. Toxicology v. 16, p. 227-237, 1980.
- FASITSAS, C. D., THEOCHARIS, E., ZOULAS, D., CHRISSIMO, S. & DELICONSTANTINOS, G. Time-dependent cadmium-neurotoxicity in rat brain synaptosomal plasma membranes. Comparative Biochemistry and Physiology v. 100C, p. 271-275, 1991.
- FERGUSON, S.A. & BOWMAN, R.E. Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. Neurotoxicology and Teratology v. 12, p. 91-97, 1990.
- FJERDINGSTAD, E.J., DANSCHER, G. & FJERDINGSTAD, E. Hippocampus: selective concentration of lead in the normal rat brain. Brain Research v. 80, p. 350-354, 1974.
- FLORA, S. J. S., BHATTACHARYA & SACHAN, S. R. S. Dose-dependent effects of zinc supplementation during chelation of lead in rats. Pharmacology & Toxicology v. 74, p. 330-333, 1994.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. Journal of Neurochemistry v. 42, p. 1-11, 1984.

- FOSTER, A. C. & FAGG, G. E. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. Brain Research v. 7, p. 103-164, 1984.
- FOWLER, B. A., KIMMEL, C. A., WOODS, J. S., MCCONNELL, E. E. & GRANT, L. D. Chronic low-level lead toxicity in the rat. III. An integrated assessment of long-term toxicity with special reference to the kidney. Toxicology and Applied Pharmacology v.56, p. 59-77, 1980.
- FRANKOVA, S. & BARNES, R. H. Influence of malnutrition in early life on exploratory behavior of rats. Journal of Nutrition v. 96, p. 477-484, 1968.
- FREGONEZE, J. B., CUNHA, M., BULCÃO, C., FERREIRA, H. & CASTRO E SILVA, E. Acute effect of intracerebroventricular administration of lead on the drinking behavior of rats induced by dehydration or central cholinergic and angiotensinergic stimulation. Physiology & Behavior v. 56, p. 129-133, 1994.
- GEHLERT, D. R. Regional modulation of [³H]forskolin binding in the rat brain by guanylyl-5'-imidodiphosphate and sodium fluoride: comparison with the distribution of guanine nucleotide binding sites. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 239, p. 952-958, 1986.
- GIBSON, K. D., NEUBERGER, A. & SCOTT, J. J. The purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase. Biochemical Journal v. 61, p. 618-629, 1955.
- GILMAN, A. G. G proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell v. 36, p. 577-579, 1984.
- GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annual Review of Biochemistry v. 56, p. 615-649, 1987.
- GNONLONFOUN, N., FILELLA, M. & BERTHON, G. Lead(II)-dithiothreitol equilibria and their potential influence on lead inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase in *in vitro* assays. Journal of Inorganic Biochemistry v. 42, p. 207-215, 1991.
- GOERING, P. L., MISTRY, P. & FOWLER, B. A. A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase: comparison with a renal lead-binding protein. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 237, p. 220-225, 1986.
- GOERING, P. L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology v.14, p. 45-60, 1993.
- GONZALEZ, M., TEJEDOR, M. C. δ -ALAD activity variations in red blood cells in response to lead accumulation in rock doves (*Columba livia*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology v. 49, p. 527-534, 1992.
- GORDELADZE, J. O., BJORO, T., TORJESEN, P. A., OSTBERG, B. C., HAUG, E. & GAUTVIK, K. M. Protein kinase C stimulates adenylate cyclase activity in prolactin-secreting rat adenoma (GH4C1) pituicytes by inactivating the inhibitory GTP-binding protein Gi. European Journal of Biochemistry v. 183, p. 397-406, 1989.

- GORODINSKY, A., PAAS, Y. & TEICHBERG, V.I. A ligand binding study of the interaction of guanine nucleotides with non-NMDA receptors. Neurochemistry International v. 23, p. 285-291, 1993.
- GOTTLIEB, A., KEYDAR, I. & EPSTEIN, H. T. Rodent brain growth stages: An analytical review. Biology of the Neonate. v. 32, p. 166-176, 1977.
- GOYER, R. A., LEONARD, D. L., MOORE, J. F., RHYNE, B. & KRIGMAN, M. R. Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body: an experimental study. Archives of Environmental Health v. 20, p. 705-712, 1970.
- GOYER, R. A. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. Toxicology Letters v. 46, p. 153-157, 1989.
- GRANDJEAN, P. International perspectives of lead exposure and lead toxicity. Neurotoxicology v. 14, p. 9-14, 1993.
- GRANICK, J. L., SASSA, S., GRANICK S., LEVERE, R. D., KAPPAS, A. Studies in lead poisoning II. Correlation between the ratio of activated to inactivated δ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. Biochemical Medicine v. 8, p.149-159, 1973.
- GRANT, L. D., KIMMEL, C. A., WEST, G. L., MARTINEZ-VARGAS, C. M. & HOWARD, J. L. Chronic low-level lead toxicity in the rat. II. Effects on postnatal physical and behavioral development. Toxicology and Applied Pharmacology v. 56, p. 42-58, 1980.
- GREENAMYRE, J. T. & PORTER, R. H. P. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology v. 44 (Suppl 8), p. S7-S13, 1994.
- GUDERMANN, T., NÜRNBERG, B. & SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. Journal of Molecular Medicine v. 73, p. 51-63, 1995.
- GUILARTE, T. R. & MICELI, R. C. Age-dependent effects of lead on [3 H]MK-801 binding to the NMDA receptor-gated ionophore: *in vitro* and *in vivo* studies. Neuroscience Letters v.148, p. 27-30, 1992.
- GUILARTE, T. R, MICELI, R.C., ALTMANN, L., WEINSBERG, F., WINNEKE, G. & WIEGAND, H. Chronic prenatal and postnatal Pb^{2+} exposure increases [3 H]MK801 binding sites in adult rat forebrain. European Journal of Pharmacology - Environmental Toxicology and Pharmacology Section v. 248, p. 273-275, 1993.
- GUILARTE, T. R, MICELI, R.C. & JETT, D. A. Neurochemical aspects of hippocampal and cortical Pb^{2+} neurotoxicity. Neurotoxicology v.15, p. 459-466, 1994.
- GUILARTE, T. R, MICELI, R.C. & JETT, D. A. Biochemical evidence of an interaction of lead and zinc allosteric sites of the NMDA receptor complex: effects of neuronal development. Neurotoxicology v. 16, p. 63-72,1995.

- GULSON, B. L., DAVIS, J. J., MIZON, K. J., KORSCH, M. J., LAW, A. & HOWARTH, D. Lead bioavailability in the environment of children: blood lead levels in children can be elevated in a mining community. Archives of Environmental Health v. 49, p. 326-331, 1994.
- GUPTA, G. S., SINGH, J. & PARKASH, P. Renal toxicity after oral administration of lead acetate during pre- and post-implantation periods: effects on trace metal composition, metallo-enzymes and glutathione. Pharmacology & Toxicology v. 76, p. 206-211, 1995.
- HAGA, K., HAGA, T. & ICHLYAMA, A. Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. The Journal of Biological Chemistry v. 261, p. 10133-10140, 1986.
- HAHN, M. E., BURRIGHT, R. G. & DONOVICK, P. J. Lead effects on food competition and predatory aggression in Binghamton HET mice. Physiology and Behavior v. 50, p. 757-764, 1991.
- HALLÉN, I. P. & OSKARSSON, A. Dose dependent transfer of ²⁰³lead to milk and tissue uptake in suckling offspring studied in rats and mice. Pharmacology and Toxicology v. 73, p. 174-179, 1993.
- HANSSON, E. & RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. FASEB Journal v. 9, p. 343-350, 1995.
- HARDEN, T. K. Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. Pharmacological Reviews v. 35, p. 5-32, 1983.
- HASAN, F., COOKMAN, G. R., KEANE, G. J., BANNIGAN, J. G., KING, W. B. & REGAN, C. M. The effect of low level lead exposure on the postnatal structuring of the rat cerebellum. Neurotoxicology and Teratology v. 11, p. 433-440, 1989.
- HASNAIN, S. S., WARDELL, E. M., GARNER, C. D., SCHLÖSSER, M. & BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochemical Journal v. 230, p. 625-633, 1985.
- HEADLEY, P. M. & GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. Science v. 11, p. 205-211, 1990.
- HERMES-LIMA, M., CASTILHO, R. F., VALLE, V. G. R., BECHARA, E. J. H. & VERCESI, A. E. Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. Biochimica et Biophysica Acta v. 1180, p. 201-206, 1992.
- HESS, D. T., LIN, L., FREEMAN, J. A. & NORDEN, J. J. Modification of cysteine residues within Go and other neuronal proteins by exposure to nitric oxide. Neuropharmacology v. 33, p. 1283-1292, 1994.
- HINDMARSH, J.T. The porphyrias: recent advances. Clinical Chemistry v. 32, p. 1255-1263, 1986.
- HO, Y. K. & FUNG, B. K. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. The role of sulfhydryl groups. The Journal of Biological Chemistry v. 259, p. 6694-6699, 1984.

- HOFMANN, K. P. & REICHERT, J. Chemical probing of the light-induced interaction between rhodopsin and G-protein. Near-infrared light-scattering and sulfhydryl modifications. The Journal of Biological Chemistry v. 260, p. 7990-7995, 1985.
- HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. Annual Review of Neuroscience v. 17, p. 31-108, 1994.
- HOOD, W.F., THOMAS, J.W., COMPTON, R.P. & MONAHAN, J.B. Guanine nucleotide modulation of [³H]TCP binding to the NMDA receptor complex. European Journal of Pharmacology - Molecular Pharmacology Section v. 188, p. 43-49, 1990.
- HORI, N., BUSSELBERG, D., MATTHEWS, M. R., PARSONS, P. J. & CARPENTER, D. O. Lead blocks LTP by an action not at NMDA receptors. Experimental Neurology v. 119, p. 192-197, 1993.
- HOSHINO, S., KIKKAWA, S., TAKAHASHI, K., ITOH, H., KAZIRO, Y., KAWASAKI, H., SUZUKI, K., KATADA, T. & UI, M. Identification of sites for alkylation by N-ethylmaleimide and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation on GTP-binding proteins. FEBS Letters v. 276, p. 227-231, 1990.
- HUTTON, M. The effects of environmental lead exposure and *in vitro* zinc on tissue delta-aminolevulinic acid dehydratase in urban pigeons. Comparative Biochemistry and Physiology v. 74C, p. 441-446, 1983.
- IBARRA, C. & ORTEGA, A. Interaction of guanine nucleotides with the kainate binding protein from chick cerebellum. Neuroreport v. 6, p. 1149-1152, 1995.
- ÍÑIGUEZ-LLUHI, J., KLEUSS, C. & GILMAN, A. G. The importance of G-protein $\beta\gamma$ subunits. Trends in Cell Biology v. 3, p. 230-236, 1993.
- ISHIHARA, K., ALKONDON, M., MONTES, J. G. & ALBUQUERQUE, E. X. Ontogenically related properties of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons and the age-specific sensitivity of developing neurons to lead. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 273, p. 1459-1470, 1995.
- IZQUIERDO, I., SOUZA, D. O., DIAS, R. D., CARRASCO, M. A., VOLKMER, N. , PERRY, M. L. S. & NETTO, C. A. Effect of various behavioral training and testing procedures on brain β -endorphin-like immunoreactivity, and the possible role of β -endorphin in behavioral regulation. Psychoneuroendocrinology v. 9, p. 381-389, 1984.
- IZQUIERDO, I., NETTO, C. A. & QUILLFELDT, J. A. Memory modulation. In Neural networks and spin glasses. Eds. W. K. Theumann & R. Köberle, p. 259-286. World Scientific Publishing, Singapore, 1990.
- IZQUIERDO, I. Qué es la memoria? Breviarios de Ciencia Contemporánea. Fondo de Cultura Económica de Argentina & Asociación Ciencia Hoy, Argentina, 1992.
- IZQUIERDO, I. Neurotransmitter systems involved in memory consolidation: the role of GABA_A receptors. In Naturally Occurring Benzodiazepines: structure, distribution and

- function. Eds I. Izquierdo & J. Medina, p. 53-64. Ellis Horwood Limited, Melksham, 1993.
- IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. FASEB Journal v. 8, p. 1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. Neurobiology of Learning and Memory v. 63, p. 19-32, 1995.
- JASON, K. M. & KELLOGG, C. K. Neonatal lead exposure: effects on development of behavior and striatal dopamine neurons. Pharmacology Biochemistry & Behavior v. 15, p. 641-649, 1981.
- JEHAN, Z. S. & MOTLAG, D. B. Biochemical changes in the blood and liver of metal-treated rats. Medical Science Research v. 22, p. 499-501, 1994.
- JETT, D. A. & GUILARTE, T. R. Developmental lead exposure alters N-methyl-D-aspartate and muscarinic cholinergic receptors in rat hippocampus: an autoradiographic study. Neurotoxicology v.16, p. 7-18, 1995.
- JORDAN, P. M., GORE, M. G. & CHAUDHRY, A. G. Subunit modification of 5-aminolevulinatase involving cysteine residues. Biochemical Society Transactions v. 4, p. 762-763, 1976.
- KANNER, B. I. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. FEBS Letters v. 325, p. 95-99, 1993.
- KATZ, H. B., ROSSET, R. E. & OSTWALD, R. The compensatory role of food-motivation in the maze learning performance of lactationally undernourished rats. Developmental Psychobiology v. 12, p. 305-315, 1979.
- KAZIRO, Y., ITOH, H., KOZASA, T., NAKAFUKU, M. & SATOH, T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. Annual Review of Biochemistry v. 60, p. 349-400, 1991.
- KELLER, C. A. & DOHERTY, R. A. Bone lead mobilization in lactating mice and lead transfer to suckling offspring. Toxicology and Applied Pharmacology v. 55, p. 220-228, 1980.
- KISKIN, N. I., KRISHTAL, O. A., TSYNDRENKO, A. Y. & AKAIKE, N. Are sulfhydryl groups essential for function of the glutamate-operated receptor-ionophore complex? Neuroscience Letters v. 66, p. 305-310, 1986.
- KISS, T. & OSIPENKO, O. N. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. Pharmacological Reviews v. 46, p. 245-267, 1994.
- KITCHEN, I. Lead toxicity and alterations in opioid systems. Neurotoxicology v. 14, p. 115-124, 1993.

- KLAASSEN, C. D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eds J. G. Hardman, A. G. Gilman & L. E. Limbird, p. 1649-1671. McGraw-Hill, New York, 1996.
- KLEIN, W. L., SULLIVAN, J., SKORUPA, A. & AGUILAR, J. S. Plasticity of neuronal receptors. FASEB Journal v. 3, p. 2132-2140, 1989.
- KLOTZ, K., KEIL, R., ZIMMER, F. J. & SCHWABE, U. Guanine nucleotide effects on 8-cyclopentyl-1,3- [³H]dipropylxanthine binding to membrane-bound and solubilized A₁ adenosine receptors of rat brain. Journal of Neurochemistry v. 54, p. 1988-1994, 1990.
- KODAVANTI, P. R. S., MEHROTRA, B. D., CHETTY, S. C. & DESAIAH, D. Inhibition of calmodulin activated adenylate cyclase in rat brain by selected insecticides. Neurotoxicology v. 10, p. 219-228, 1989.
- KOSTAS, J., MCFARLAND, D. J. & DREW, W. G. Lead induced hyperactivity: chronic exposure during the neonatal period in the rat. Pharmacology v. 14, p. 435-442, 1976.
- KOSTIAL, K., KELLO, D., JUGO, S., RABAR, I. & MALJKOVIC, T. Influence of age on metal metabolism and toxicity. Environmental Health Perspectives v. 25, p. 81-86, 1978.
- KOTZ, L., G. KAISER & G. TOLG: Aufschluss biologischer matrices für die Bestimmung sehr niedriger Spurenelementgehalte bei begrenzter Einwaage mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefass. Zeitschrift für Analytische Chemie v. 260, p. 207-209, 1972.
- KREBS, H. A. Metabolism of aminoacids. IV. Synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissue. Biochemical Journal v. 29, p. 1951-1969, 1935.
- KRUPINSKI, J., COUSSEN, F., BAKALYAR, H. A., TANG, W. J., FEINSTEIN, P. G., ORTH, K., SLAUGHTER, C., REED, R. R. & GILMAN, A. G. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. Science v. 244, p. 1558-1564, 1989.
- KUMAR, M.V. & DESIRAJU, T. Regional alterations of brain biogenic amines and GABA/glutamate levels in rats following chronic lead exposure during neonatal development. Archives of Toxicology v. 64, p. 305-314, 1990.
- KUPFERMANN, I. & KANDEL, E. Learning and memory. In Essentials of Neural Science and Behavior. Eds Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M., p. 651-666. Prentice Hall International, Inc., New Jersey, 1995.
- LASLEY, S. M. & LANE, J. D. Diminished regulation of mesolimbic dopaminergic activity in rat after chronic inorganic lead exposure. Toxicology and Applied Pharmacology v. 95, p. 474-483, 1988.

- LASLEY, S. M. Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure. Neurotoxicology v. 13, p. 625-636, 1992.
- LASLEY, S. M., POLAN-CURTAIN, J. & ARMSTRONG, D. L. Chronic exposure to environmental levels of lead impairs *in vivo* induction of long-term potentiation in rat hippocampal dentate. Brain Research v. 614, p. 347-351, 1993.
- LAURENZA, A., SUTKOWSKI, E. M. & SEAMON, K. B. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? Trends in Pharmacological Sciences v. 10, p. 442-447, 1989.
- LAUWERYS, R., BUCHET, J. P., ROELS, H. & HUBERMONT, G. Placental transfer of lead, mercury, cadmium and carbon monoxide in women. Environmental Research v. 15, p. 278-289, 1978.
- LEFAUCONNIER, J. M., LAVIELLE, E., TERRIEN, N., BERNARD, G. & FOURNIER, E. Effect of various lead doses on some cerebral capillary functions in the suckling rat. Toxicology and Applied Pharmacology v. 55, p. 467-476, 1980.
- LEVITZKI, A. Regulation of adenylate cyclase by hormones and G-proteins. FEBS Letters v. 211, p. 113-118, 1987.^a
- LEVITZKI, A. Coupling of β -adrenoceptors to adenylate cyclase and the role of the GTP binding protein in signal transduction. Perspectives on Receptor Classification v. , p. 87-94, 1987.^b
- LIN, M. C., COOPER, D. M. F. & RODBELL, M. Selective effects of organic mercurials on the GTP-regulatory proteins of adenylate cyclase. The Journal of Biological Chemistry v. 255, p. 7250-7254, 1980.
- LIPTON, S. A. & ROSENBERG, P. A. Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. New England Journal of Medicine v. 330, p. 613-622, 1994.
- LIVESEY, D. J., DAWSON, R. G., LIVESEY, P. J., BARRETT, J. & SPICKETT, T. J. Lead retention in blood and brain after preweaning low-level lead exposure in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior v. 25, p. 1089-1094, 1986.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry v. 193, p. 265-275, 1951.
- LORTON, D. & ANDERSON, W. J. The effects of postnatal lead toxicity on the development of cerebellum in rats. Neurobehavioral Toxicology and Teratology v. 8, p. 51-59, 1986.
- LUCAS, D. R. & NEWHOUSE, J. P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. Archives of Ophthalmology v. 58, p. 193-201, 1957.

- LUCCHI, L., MEMO, M., AIRAGHI, M.L., SPANO, P. F. & TRABUCCHI, M. Chronic lead treatment induces in rat a specific and differential effect on dopamine receptors in different brain areas. Brain Research v. 213, p. 397-404, 1981.
- LUNDBERG, U., MILANES, C. L., PERNALETE, N., WEISINGER, J. R., CONTRERAS, N. E. I. R., PAZ-MARTINEZ, V. & BELLORIN-FONT, E. Effects of cadmium on canine renal cortical adenylate cyclase. American Journal of Physiology v. 253, p. F401-F407, 1987.
- LUTHMAN, J., OSKARSSON, A. & HOFFER, B. Postnatal lead exposure affects motor skills and exploratory behavior in rats. Environmental Research v. 58, p. 236-252, 1992.
- MAGUIVE, M. E., VAN ARSDALE, P. M. & GILMAN, A. G. An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta adrenergic receptor. Molecular Pharmacology v. 12, p. 335-339, 1970.
- MALCON, C., ACHAVAL, M., KOMLOS, F., PARTATA, W., SAUERESSIG, M., RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. GMP prevents excitotoxic quinolinic acid-induced striatal lesions in rats. Submetido ao Neuroscience, 1996.
- MARASCHIN, J.F., PERLA, A.S., RAMÍREZ, G. & SOUZA, D.O.G. Anticonvulsant properties of guanine nucleotides in a quinolinic acid seizure model. Submetido ao Neuroreport, 1996.
- MAREN, S. & BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. Neurobiology of Learning and Memory v. 63, p. 1-18, 1995.
- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G. W. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. Nature v. 334, p. 71-73, 1988.
- MASSARO, E. J. & MASSARO, T. F. The effects of lead exposure during development on higher order cognitive functioning in the rat. Neurotoxicology v. 7, p. 515-526, 1986.
- MAUZERALL, D. & GRANICK, S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. The Journal of Biological Chemistry v. 219, p. 435-446, 1956.
- MAYER, M. L., WESTBROOK, G. L. & GUTHRIE, P. B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature v. 309, p. 261-263, 1984.
- MAYER-POPKEN, O., DENKHAUS, W. & KONIETZKO, H. Lead content of fetal tissues after maternal intoxication. Archives of Toxicology v. 58, p. 203-204, 1986.
- McCLAIN, R. M. & BECKER, B. A. Teratogenicity, fetal toxicity, and placental transfer of lead nitrate in rats. Toxicology and Applied Pharmacology v. 31, p. 72-82, 1975.
- McENTEE, W. J. & CROOK, T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. Psychopharmacology v. 111, p. 391-401, 1993.

- McGIVERN, R. F., SOKOL, R. Z. & BERMAN, N. G. Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: Long-term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. Toxicology and Applied Pharmacology v. 110, p. 206-215, 1991.
- MELDRUM, B. & GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends in Pharmacological Sciences. A Special Report p. 54-62, 1991.
- MELLO, C. F., ROTTA, F. T., SOUZA, D. O. G. & ROCHA, J. B. T. Undernutrition during suckling and latent learning ability of rehabilitated adult male rats. Behavioral and Neural Biology v. 52, p. 39-51, 1989.
- MENA, E. E., MONAGHAN, D. T., WHITTEMORE, S. R. & COTMAN, C. W. Cations differentially affect subpopulations of L-glutamate receptors in rat synaptic plasma membranes. Brain Research v. 329, p. 319-322, 1985.
- MEISTER, A. Biochemistry of glutamate, glutamine and glutathione. In Advances in Biochemistry and Physiology: Glutamic acid. Eds L. J. Keler, S. Garattini, M. R. Kane, W. A. Reynolds, R. J. Wurtman, p. 64-84. Raven Press, New York, 1979.
- MERALI, Z., KACEW, S. & SINGHAL, R. L. Response of hepatic carbohydrate and cyclic AMP metabolism to cadmium treatment in rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology v. 53, p. 174-184, 1975.
- MINNEMA, D. J., MICHAELSON, I. A. & COOPER, G. P. Calcium efflux and neurotransmitter release from rat hippocampal synaptosomes exposed to lead. Toxicology and Applied Pharmacology v. 92, p. 351-357, 1988.
- MISTRY, P., LUCIER, G. W. & FOWLER, B. A. High-affinity lead binding proteins in rat kidney cytosol mediate cell-free nuclear translocation of lead. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 232, p. 462-469, 1985.
- MITCHELL, R. A., DRAKE, J. E., WITTLIN, L. A. & REJENT, T. A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolaevulinatase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. Clinical Chemistry v. 23, p. 105-111, 1977.
- MONAHAN, J. B. & MICHEL, J. Identification and characterization of an N-methyl-D-aspartate-specific-L-[³H]glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. Journal of Neurochemistry v. 48, p. 1699-1708, 1987.
- MONAHAN, J.B., HOOD, W.F., MICHEL, J. & COMPTON, R.P. Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. Molecular Pharmacology v. 34, p. 111-116, 1988.
- MONS, N., HARRY, A., DUBOURG, P., PREMONT, R. T., IYENGAR, R. & COOPER, D. M. F. Immunohistochemical localization of adenylyl cyclase in rat brain indicates a highly selective concentration at synapses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v. 92, p. 8473-8477, 1995.

- MORK, A. & GEISLER, A. Effects of minocycline on accumulation of cyclic AMP in cerebral cortex of rat: A comparison with lithium. Neuropharmacology v. 32, p. 793-798, 1993.
- MORK, A. & GEISLER, A. A comparative study on the effects of tetracyclines and lithium on the cycle AMP second messenger system in rat brain. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry v. 19, p. 157-169, 1995.
- MÜLLER, S. & LOHSE, M. J. The role of G-protein $\beta\gamma$ subunits in signal transduction. Biochemical Society Transactions v. 23, p. 141-148, 1995.
- MUMBY, S. M. & MUNTZ, K. H. Receptor regulation of G protein palmitoylation. Biochemical Society Transactions v. 23, p. 156-160, 1995.
- MUNOZ, C., GARBE, K., LILIENTHAL, H. & WINNEKE, G. Significance of hippocampal dysfunction in low lead exposure of rats. Neurotoxicology and Teratology v.10, p. 245-253, 1988.
- MUNOZ, C., GARBE, K., LILIENTHAL, H. & WINNEKE, G. Neuronal depletion of the amygdala resembles the learning deficits induced by low level lead exposure in rats. Neurotoxicology and Teratology v.11, p. 257-264, 1989.
- MURAKAMI, K., FENG, G. & CHEN, S. G. Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.v. 264, p. 757-761, 1993.
- MURASE, T., HORIBA, N., GOTO, I., YAMATO, O., IKEDA, T. & SATO, K. Erythrocyte ALA-d activity in experimentally lead-poisoned ducks and its change during treatment with disodium calcium EDTA. Research in Veterinary Science v. 55, p. 252-257, 1993.
- MUSGRAVE, M. A., MADIGAN, M. A., BENNETT, B.M. & GOH, J. W. Stimulation of postsynaptic and inhibition of presynaptic adenylyl cyclase activity by metabotropic glutamate receptor activation. Journal of Neurochemistry v. 62, p. 2316-2324, 1994.
- MUSHAK, P., DAVIS, J. M., CROCKETTI, A. F. & GRANT, L. D. Prenatal and postnatal effects of low-level lead exposure: integrated summary of a report to the U.S. Congress on childhood lead poisoning. Environmental Research v. 50, p. 11-36, 1989.
- MYKKÄNEN, H. M., DICKERSON, J. W. T. & LANCASTER, M. Effect of age on the tissue distribution of lead in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology v. 51, p. 447-454, 1979.
- MYKKÄNEN, H. M., DICKERSON, J. W. T. & LANCASTER, M. Strain differences in lead intoxication in rats. Toxicology and Applied Pharmacology v. 52, p. 414-421, 1980.
- NAKANISHI, N., SCNEIDER, N. A. & AXEL, R. A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. Neuron v. 5, p. 569-581, 1990.

- NAKANISHI, S. & MASU, M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. Annual Review in Biophysics and Biomolecular Structure. v. 23, p. 319-348, 1994.
- NAKANISHI, S., MASU, M., BESSHO, Y., NAKAJIMA, Y., HAYASHI, Y., NOMURA, A. & SHIGEMOTO, R. Molecular diversity and physiological functions of glutamate receptors. Neuropsychopharmacology v. 10, p. 8S-13S, 1994.
- NATHANSON, J. A. & BLOOM, F. E. Lead-induced inhibition of brain adenylyl cyclase. Nature v. 255, p. 419-420, 1975.
- NATHANSON, J. A. & BLOOM, F. E. Heavy metals and adenosine 3'5'-monophosphate metabolism: Possible relevance to heavy metal toxicity. Molecular Pharmacology v. 12, p. 390-398, 1976.
- NAYLOR, L., WOODWARD, R., DANIELL, S., COLEY, C. & STRANGE, P. G-protein-linked receptors: functional domains. Determinants of ligand binding at the D2 dopamine receptor. Biochemical Society Transactions v. 23, p. 87-91, 1995.
- NETTO, C. A., DIAS, R. D. & IZQUIERDO, I. Training in an open-field: Simultaneous learning of habituation and of a water finding task, and differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock on the retention of both tasks. Psychoneuroendocrinology v. 11, p. 437-446, 1986.
- NEUBIG, R. R. Membrane organization in G-protein mechanisms. FASEB Journal v. 8, p. 939-946, 1994.
- NEWMAN, M. E. & BELMAKER, R. H. Effects of lithium *in vitro* and *ex vivo* on components of the adenylyl cyclase system in membranes from the cerebral cortex of the rat. Neuropharmacology v. 26, p. 211-217, 1987.
- NICHOLLS, D. & ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. Trends in Pharmacological Sciences. A Special Report p. 68-73, 1991.
- NICHOLLS, D. G. The glutamatergic nerve terminal. European Journal of Biochemistry v. 212, p. 613-631, 1993.
- NOLAN, C. V. & SHAIKH, Z. A. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. Toxicology v. 73, p. 127-146, 1992.
- NOMURA, Y., MAKIHATA, J. & SEGAWA, T. Activation of adenylyl cyclase by dopamine, GTP, NaF and forskoline in striatal membrane of neonatal, adult and senescent rats. European Journal of Pharmacology v. 106, p. 437-440, 1985.
- NOWAK, L., BREGESTOVSKI, P., ASCHER, P., HERBET, A. & PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature v. 307, p. 462-465, 1984.
- NÜRNBERG, B., GUDERMANN, T. & SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. Journal of Molecular Medicine v. 73, p. 123-132, 1995.

- OFFERMANN, S. & SCHULTZ, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology v. 350, p. 329-338, 1994.
- O'HARA, P. J., SHEPPARD, P. O., THOGERSEN, H., VENEZIA, D., HALDEMAN, B. A., McGRANE, V., HOUAMED, K. M., THOMSEN, C., GILBERT, T. L. & MULVIHILL, E. R. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. Neuron v. 11, p. 41-52, 1993.
- OHMORI, Y., HIROUCHI, M., TAGUCHI, J. & KURIYAMA, K. Functional coupling of the γ -aminobutyric acid_B receptor with calcium ion channel and GTP-binding protein and its alteration following solubilization of the γ -aminobutyric acid_B receptor. Journal of Neurochemistry v. 54, p. 80-85, 1990.
- O'KEEFE, J. & NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford, Clarendon Press 1978.
- OLIVEIRA, E. M., RUBIN, M. A., BELLOI, C. R. B., BELLOI, M. H. B. & ROCHA, J. B. T. Effect of caffeine administration on latent learning ability of male rats in a simple maze task. Brazilian Journal of Medical and Biological Research v. 23, p. 975-980, 1990.
- OLIVEIRA, E. M., ROCHA, J. B. T. & SARKIS, J.J.F. *In vitro* and *in vivo* effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from cerebral cortex of developing rats. Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique v. 102, p. 251-254, 1994.
- OLNEY, J. W. New mechanism of excitatory transmitter neurotoxicity. Journal of Neural Transmission v. 43 (Suppl), p. 47-51, 1994.
- OPANASHUK, L. A. & FINKELSTEIN, J. N. Induction of newly synthesized proteins in astroglial cells exposed to lead. Toxicology and Applied Pharmacology v. 131, p. 21-30, 1995.
- OSKARSSON, A., SQUIBB, K. S. & FOWLER, B. A. Intracellular binding of lead in the kidney: The partial isolation and characterization of postmitochondrial lead binding components. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 104, p. 290-298, 1982.
- OSKARSSON, A. & FOWLER, B. A. Effects of lead on heme biosynthetic pathway in rat kidney. Experimental and Molecular Pathology v. 43, p. 409-417, 1985.
- OSKARSSON, A. & FOWLER, B. A. Alterations in renal heme biosynthesis during metal nephrotoxicity. Annals of New York Academy of Sciences v. 514, p. 268-277, 1987.
- OSKARSSON, A. & JOHANSSON, A. Lead-induced inclusion bodies in rat kidney after perinatal treatment with lead and disulfiram. Toxicology v. 44, p. 61-72, 1987.
- OSKARSSON, A. Effects of perinatal treatment with lead and disulfiram on ALAD activity in blood, liver and kidneys and urinary ALA excretion in rats. Pharmacology & Toxicology v. 64, p. 344-348, 1989.

- OZAWA, H. & RASENICK, M.M. Chronic electroconvulsive treatment augments coupling of the GTP-binding protein Gs to the catalytic moiety of the adenylyl cyclase in a manner similar to that seen with chronic antidepressant drugs. Journal of Neurochemistry v. 56, p. 330-338, 1991.
- PAZ, M.M., RAMOS, M., RAMÍREZ, G., SOUZA, D. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylyl cyclase activity in chick optic tectum. FEBS Letters v. 355, p. 205-208, 1994.
- PENNINGTON, S. R. GTP-binding proteins: heterotrimeric G proteins. Covalent modification of G proteins. Protein Profile v. 1, p. 208-215, 1994.
- PENTSCHKEW, A. & GARRO, F. Lead encephalo-myelopathy of suckling rat and its implications on the porphyriopathic nervous diseases. Acta Neuropathologica v. 6, p. 266-278, 1966.
- PEREIRA, M. E., DALMAZ, C., ROSAT, R. & IZQUIERDO, I. Diazepam blocks the interfering effect of post-training behavioral manipulations on retention of a shuttle avoidance task. Psychopharmacology v. 94, p. 402-404, 1988.
- PEROUTKA, J. J., LEOVITZ, R. M. & SNYDER, S. H. Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides. Molecular Pharmacology v. 16, p. 700-708, 1979.
- PETIT, T. L. & ALFANO, D. P. Differential experience following developmental lead exposure: Effects on brain and behavior. Pharmacology Biochemistry and Behavior v. 11, p. 165-171, 1979.
- PHILIP, A. T. & GERSON, B. Lead poisoning - Part II. Effects and assay. Clinics in Laboratory Medicine v. 14, p. 651-670, 1994.
- PIERONI, J. P., JACOBOWITZ, O., CHEN, J. & IYENGAR, R. Signal recognition and integration by Gs-stimulated adenylyl cyclases. Current Opinion in Neurobiology v. 3, p. 345-351, 1993.
- PIN, J. & BOCKAERT, J. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. Current Opinion in Neurobiology v. 5, p. 342-349, 1995.
- PIN, J. & DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology v. 34, p. 1-26, 1995.
- POUNDS, J. G. & CORY-SLECHTA, D. A. New dimensions of lead neurotoxicity: redefining mechanisms and effects. Neurotoxicology v. 14, p. 4-6, 1993.
- QUINN, M. R. & HARRIS, C. L. Lead inhibits Ca²⁺-stimulated nitric oxide synthase activity from rat cerebellum. Neuroscience Letters v. 196, p. 65-68, 1995.
- RABINOWITZ, M. A., LEVITON, A. & NEEDLEMAN, H. Lead in milk and infant blood: a dose-response model. Archives of Environmental Health v. 40, p. 283-286, 1985.

- RAFALES, L. S., BORNSCHEIN, R. L., MICHAELSON, A., LOCH, R. K. & BARKER, G. F. Drug induced activity in lead-exposed mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior v. 10, p. 95-104, 1979.
- REGUNATHAN, S. & SUNDARESAN, R. Effects of organic and inorganic lead on synaptosomal uptake, release, and receptor binding of glutamate in young rats. Journal of Neurochemistry v. 44, p. 1642-1646, 1985.
- REICHERT, J. & HOFMANN, K. P. Sulfhydryl group modification of photoreceptor G-protein prevents its light-induced binding to rhodopsin. FEBS Letters v. 168, p. 121-124, 1984.
- REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. FASEB Journal v. 9, p. 526-533, 1995.
- ROBERTS, E. & FRANKEL, D. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. The Journal of Biological Chemistry v. 187, p. 55-63, 1950.
- ROCHA, J. B. T. & VENDITE, D. Effects of undernutrition and handling during suckling on shuttle avoidance and footshock behavior and on plasma glucose levels of young rats. Developmental Psychobiology v. 23, p. 157-168, 1990.
- ROCHA, J. B. T., FREITAS, A. J., MARQUES, M. B., PEREIRA, M. E. , EMANUELLI, T. & SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research v. 26, p. 1077-1083, 1993.
- ROCHA, J. B. T. & SOUZA, D. O. Effects of undernutrition during suckling and early postweaning on the inhibition by met-enkephalin of striatal adenylate cyclase activity in adult rats. Pharmacology and Toxicology v. 75, p. 321-323, 1994.
- ROCHA, J. B. T., PEREIRA, M. E. , EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R. S. & SOUZA, D. O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology, v. 100, p. 27-37, 1995.
- RODBELL, M. The role of GTP-binding proteins in signal transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex. Current Topics in Cellular Regulation. v. 32, p. 1-44, 1992.
- RODNIGHT, R. & WOFCHUK, S. T. Roles for protein phosphorylation in synaptic transmission. Essays in Biochemistry v. 27, p. 91-102, 1992.
- RODRIGUES, A. L. , BELLINASSO, M. L. & DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). Comparative Biochemistry and Physiology v. 94B, p. 65-69, 1989.
- ROELS, H., LAUWERYS, R., BUCHET, J. & HUBERMONT, G. Effects of lead on lactating rats and their sucklings. Toxicology v. 8, p. 107-113, 1977.

- ROSEN, J. B., BERMAN, R. F., BEUTHIN, F. C. & LOUIS-FERDINAND, R. T. Age of testing in the behavioral effects of early lead exposure in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior v. 23, p. 49-54, 1985.
- ROSEN, J.F. Effects of low levels of lead exposure. Science. v. 256, p.294, 1992.
- ROSS, E. M. & GILMAN, A. G. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Annual Review of Biochemistry v. 49, p. 533-564, 1980.
- ROSSI, A., MANZO, L., ORRENIUS, S., VAHTER, M. & NICOTERA, P. Modifications of cell signalling in the cytotoxicity of metals. Pharmacology and Toxicology v. 68, p. 424-429, 1991.
- ROSSOUW, J., OFFERMEIER, J. & VAN ROOYEN, J. M. Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology v. 91, p.132-139, 1987.
- ROTHMAN, S. M. & OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. Annal Neurology v. 19, p. 105-111, 1986.
- ROTTA, F. T., MELLO, C. F., ROCHA, J. B. T. & SOUZA, D. O. G. Early undernutrition blocks the effect of naltrexone on rat exploratory behavior. Brazilian Journal of Medical and Biological Research v. 21, p. 305-312, 1988.
- RUIZ, A., SANZ, J., GONZÁLEZ-CALERO, G., FERNÁNDEZ, M., ANDRÉS, A., CUBERO, A. & ROS, M. Desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in rat brain by *in vivo* treatment with R-PIA: involvement of coated vesicles. Biochimica et Biophysica Acta No prelo, 1996.
- SAGI-EISENBERG, R. GTP-binding proteins as possible targets for protein kinase C action. Trends in Biochemical Sciences v. 14, p. 355-357, 1989.
- SAINZ, J. A. G. & GUTIERREZ, V. Activation of protein kinase C alters the interaction of alpha 2-adrenoceptors and the inhibitory GTP-binding protein (Gi) in human platelets. FEBS Letters v. 257, p. 427-430, 1989.
- SAKAI, T., YANAGIHARA, S. & USHIO, K. Restoration of lead-inhibited 5-aminolevulinatase activity in whole blood by heat, zinc ion, and (or) dithiothreitol. Clinical Chemistry v. 26, p. 625-628, 1980.
- SAKAI, T., YANAGIHARA, S., KUNUGI, Y. & USHIO, K. Mechanisms of ALA-D inhibition by lead and of its restoration by zinc and dithiothreitol. British Journal of Industrial Medicine v. 40, p. 61-66, 1983.
- SANDHIR, R. & GILL, K. D. Lead perturbs calmodulin dependent cyclic AMP metabolism in rat central nervous system. Biochemistry and Molecular Biology International v. 33, p. 729-742, 1994.
- SANDHIR, R., JULKA, D. & GILL, K. D. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. Pharmacology and Toxicology v. 74, p. 66-71, 1994.

- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme v. 28, p. 133-145, 1982.
- SAUERHOFF, M. W. & MICHAELSON, I. A. Hiperactivity and brain catecholamines in lead-exposed developing rats. Science v. 182, p. 1022-1024, 1973.
- SCHOEPP, D. D. & CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. Trends in Pharmacological Sciences v. 14, p. 13-20, 1993.
- SCHOEPP, D. D., JOHNSON, B. G., SALHOFF, C. R., WRIGHT, R. A., GOLDSWORTHY, J. S. & BAKER, S. R. Second-messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. Journal of Neuroscience Methods v. 59, p. 105-110, 1995.
- SCHULTE, S., MÜLLER, W. E. & FRIEDBERG, K. D. *In vitro* and *in vivo* effects of lead on specific ³H-MK-801 binding to NMDA-receptors in the brain of mice. Neurotoxicology v. 16, p. 309-318, 1995.
- SCHWEINSBERG, F. & VON KARSA, L. Heavy metal concentrations in humans. Comparative Biochemistry and Physiology v. 95C, p. 117-123, 1990.
- SEAMON, K. B. & DALY, J. W. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulator protein. The Journal of Biological Chemistry v. 256, p. 9799-9801, 1981.
- SENOGLES, S. E., BENOVIC, J. L., AMLAIKY, N., UNSON, C., MILLIGAN, G., VINITSKY, R., SPIEGEL, A. M. & CARON, M. G. The D₂-dopamine receptor of anterior pituitary is functionally associated with a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein. The Journal of Biological Chemistry v. 262, p. 4860-4867, 1987.
- SHARIF, N. A. & ROBERTS, P. J. Regulation of cerebellar L-[³H]glutamate binding: influence of guanine nucleotides and Na⁺ ions. Biochemical Pharmacology v. 30, p. 3019-3022, 1981.
- SHIH, T. M. & HANIN, I. Effects of chronic lead exposure on levels of acetylcholine and choline and acetylcholine turnover rate in rat brain areas *in vivo*. Psychopharmacology v. 58, p. 263-269, 1978.
- SIBLEY, D. R. & LEFKOWITZ, R. J. β-Adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase. Molecular Neurobiology v. 1, p. 121-152, 1987.
- SIERRA, E. M., ROWLES, T. K., MARTIN, J., BRATTON, G. R., WOMAC, C. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Low level lead neurotoxicity in a pregnant guinea pig model: neuroglial enzyme activities and brain trace metal concentrations. Toxicology v. 59, p. 81-96, 1989.
- SIERRA, E. M. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Reduction of glutamine synthase activity in astroglia exposed in culture to low levels of inorganic lead. Toxicology v. 65, p. 295-304, 1991.

- SILBERGELD, E. K. & GOLDBERG, A. M. A lead-induced behavioral disorder. Life Sciences v. 13, p. 1275-1283, 1973.
- SILBERGELD, E. K. & GOLDBERG, A. M. Lead-induced behavioral dysfunction: An animal model of hyperactivity. Experimental Neurology v. 42, p. 146-157, 1974.
- SILBERGELD, E. K., HRUSKA, R. E., MILLER, L. P. & ENG, N. Effects of lead *in vivo* and *in vitro* on GABAergic neurochemistry. Journal of Neurochemistry v. 34, p. 1712-1718, 1980.
- SILBERGELD, E. K. & LAMON, J. M. Effects of altered porphyrin synthesis on brain neurochemistry. Neurobehavioral Toxicology and Teratology v. 4, p. 635-642, 1982.
- SILBERGELD, E. K. Maternally mediated exposure of the fetus: in utero exposure to lead and other toxins. Neurotoxicology v. 7, p. 557-568, 1986.
- SILBERGELD, E. K., SCHWARTZ, J. & MAHAFFEY, K. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. Environmental Research v. 47, p. 79-94, 1988.
- SILBERGELD, E. K. Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. FASEB Journal v. 6, p. 3201-3206, 1992.
- SIMONDS, W. F., BUTRYNSKI, J. E., GAUTAM, N., UNSON, C. G. & SPIEGEL, A. M. G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain. The Journal of Biological Chemistry v. 266, p. 5363-5366, 1991.
- SIMMONDS, P. L., LUCKHURST, C. L., WOODS, J. S. Quantitative evaluation of heme biosynthetic pathway parameters as biomarkers of low-level lead exposure in rats. Journal of Toxicology and Environmental Health v. 44, p. 351-367, 1995.
- SIMONS, T. J. B. Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. Neurotoxicology v. 14, p. 77-86, 1993.
- SINGH, A. K. Neurotoxicity in rats chronically exposed to lead ingestion: measurement of intracellular concentrations of free calcium and lead ions in resting or depolarized brain slice. Neurotoxicology v.16, p.133-138,1995.
- SLEVIN, J. T. & KASARKIS, E. J. Effects of zinc on markers of glutamate and aspartate neurotransmission in rat hippocampus. Brain Research v. 334, p. 281-286, 1985.
- SMITH, K. E. & HOSS, W. P. Guanine nucleotides regulate [³H]substance P binding in rat small intestine. Regulatory Peptides v. 11, p. 275-285, 1985.
- SOBOTKA, T. J. & COOK, M. P. Postnatal lead acetate exposure in rats: possible relationship to minimal brain dysfunction. American Journal of Mental Deficiencies v. 79, p. 5-9, 1974.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. Biometry, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1981

- SOUZA, D.O. & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. Journal of Molecular Neuroscience v. 3, p. 39-45, 1991.
- SOUZA, D.O., VENDITE, D., MELLO, C. F. & ROCHA, J. B. T. Effects of undernutrition during suckling on footshock escape behavior and of post-training β -endorphin administration on inhibitory avoidance task of young rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research v. 25, p. 275-280, 1992.
- SPENCE, I., DREW, C., JOHNSTON, G. A. R. & LODGE, D. Acute effects of lead at central synapses *in vitro*. Brain Research v. 333, p. 103-109, 1985.
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. Biochemical Journal v. 290, p. 279-287, 1993.
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochemical Journal v. 300, p. 373-381, 1994.
- SPURGEON, A. Occupational lead exposure. Do current exposure standards protect workers from harm? A review of neurobehavioral findings since 1978. Indoor Environment v. 3, p. 112-118, 1994.
- STERNWEIS, P. C. The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. Current Opinion in Cell Biology v. 6, p. 198-203, 1994.
- STOLTENBURG-DIDINGER, G. Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. Neurotoxicology v. 15, p. 445-450, 1994.
- STORM, D. R. & GUNSALUS, R. P. Methylmercury is a potent inhibitor of membrane adenylyl cyclase. Nature v. 250, p. 778-779, 1974.
- STRADER, C. D., FONG, T. M., GRAZIANO, M. P. & TOTA, M. R. The family of G-protein-coupled receptors. FASEB Journal v. 9, p. 745-754, 1995.
- STRECKER, G. J., JACKSON, M. B. & DUDEK, F. E. Blockade of NMDA-activated channels by magnesium in the immature rat hippocampus. Journal of Neurophysiology v. 72, p. 1538-1548, 1994.
- STRUPP, B. J. & LEVITSKY, D. A. Early brain insult and cognition: a comparison of malnutrition and hypothyroidism. Developmental Psychobiology v. 16, p. 535-549, 1983.
- STRUPP, B. J., LEVITSKY, D. A. & BLAUMSTEIN, L. PKU, learning, and models of mental retardation. Developmental Psychobiology v. 17, p. 109-120, 1984.
- SZÜCS, M., SPAIN, J. W., OETTING, A., MOUDY, A. M. & COSEIA, C. J. Guanine nucleotide and cation regulation of μ , δ and κ opioid receptor binding: evidence for differential postnatal development in rat brain. Journal of Neurochemistry v. 48, p. 1165-1170, 1987.

- TAKATS, A., BINH, V. H. & BERTOK, L. Potential role of SH groups in the radiosensitivity of adenylate cyclase. Acta Physiologica Hungarica v. 76, p. 265-272, 1990.
- TANG, W. & GILMAN, A. G. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. Science v. 254, p. 1500-1503, 1991.
- TASCA, C.I., WOFCHUCK, S.T., SOUZA, D.O., RAMÍREZ, G. & RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. Neuroreport v. 6, p. 249-252, 1995.
- TATHAM, P. E. R. & LINDAU, M. ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. Journal of General Physiology v. 95, p. 459-476, 1990.
- TEICHBERG, V.I., MANO, I. & PAPERNA, T. & PAAS, Y. The chick Bergmann glia kainate binding protein: an update on function. Journal of Neurochemistry v. 61 (Suppl.), p. S60D, 1993.
- TIAN, X., BOURJEILY, N. BIELARCZYK, H. & SUSZKIW, J. B. Reduced densities of sodium-dependent [3 H]hemicholinium-3 binding sites in hippocampus of developmental rats following perinatal low-level lead exposure. Developmental Brain Research v. 86, p. 268-274, 1995.
- TOVEY, K. C., OLDHAM, K. G., WHELAN, J. A. M. A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. Clinica Chimica Acta v. 56, p. 221-234, 1974.
- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T. & SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in δ -aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochemica et Biophysica Acta v. 570, p. 167-178, 1979.
- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T. & SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver δ -aminolevulinic acid dehydratase. International Journal of Biochemistry v. 12, p. 751-756, 1980.
- UJIHARA, H. & ALBUQUERQUE, E. X. Developmental change of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 263, p. 868-875, 1992.
- UTESHEV, V., BÜSSELBERG, D. & HAAS, H. L. Pb^{2+} modulates the NMDA-receptor-channel complex. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology v. 347, p. 209-213, 1993.
- VALLEE, B. L. & ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. Annual Review of Biochemistry v. 41, p. 91-128, 1972.
- VAN KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.C. Standardization of hemoglobimetry. II. The hemoglobin cyanide method. Clinical Chemical Acta v. 6, p. 538-544, 1961.
- VITIELLO, F. & GOMBOS, G. Cerebellar development and nutrition. Current Topics in Nutrition and Disease v. 16 p. 99-130. In Basic and Clinical Aspects of Nutrition and

- Brain Development. Ed. D. K. Rassin, B. Haber & B. Durjan, Alan R. Liss, Inc. New York, 1987.
- WALAAS, S. I. & GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. Pharmacological Reviews v. 43, p. 300-349, 1991.
- WALKER, R. F., GUERRIERO, F. J., TOSCANO, T. V. & WEIDEMAN, C. A. Relative cerebellar weight: a potential indicator of developmental neurotoxicity. Neurotoxicology and Teratology v. 11, p. 251-255, 1989.
- WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. Psychology Bulletin v. 83, p. 482-504, 1976.
- WATKINS, J. C. & EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 21, p. 165-204, 1981.
- WEIL-MALHARBE, H. Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue. Physiological Reviews v. 30, p. 549-568, 1950.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Geneva : WHO, 1986, 180 p. (Environmental Health Criteria, 60).
- WICKMAN, K. D. & CLAPHAM, D. E. G-protein regulation of ion channels. Current Opinion in Neurobiology v. 5, p. 278-285, 1995.
- WIDMER, H. R., BÜTIKOFER, E. E., SCHLUMPF, M. & LICHTENSTEIGER, W. Pre- and postnatal lead exposure affects the serotonergic system in the immature rat brain. Experientia v. 47, p. 463-469, 1991.
- WIDMER, H. R., VEDDER, H., SCHLUMPF, M. & LICHTENSTEIGER, W. Concurrent changes in regional cholinergic parameters and nest odor preference in the early postnatal rat after lead exposure. Neurotoxicology v. 13, p. 615-624, 1992.
- WIDZOWSKI, D. V. & CORY-SLECHTA, D. A. Homogeneity of regional brain lead concentrations. Neurotoxicology, v. 15, p. 295-308, 1994.
- WIDZOWSKI, D. V., FINKELSTEIN, J. N., POKORA, M. J. & CORY-SLECHTA, D. A. Time course of postnatal lead-induced changes in dopamine receptors and their relationship to changes in dopamine sensitivity. Neurotoxicology, v. 15, p. 853-866, 1994.
- WILEY, J. F., BELL, L. M., ROSENBLUM, L. S., NUSSBAUM, J., TOBIN, R. & HENRETIG, F. M. Lead poisoning: Low rates of screening and high prevalence among children seen in inner-city emergency departments. The Journal of Pediatrics v. 126, p. 392-395, 1995.
- WILLIAMS, M. B., LI, X., GU, X. & JOPE, R. S. Modulation of endogenous ADP-ribosylation in rat brain. Brain Research v. 592, p. 549-556, 1992.

- WILSON, E. L., BURGER, P.E. & DOWLE, E. B. Beef- liver 5-aminolevulinic acid dehydratase - Purification and properties. European Journal of Biochemistry v. 29, p. 563-571, 1972.
- WINDER, C. The interaction between lead and catecholaminergic function. Biochemical Pharmacology v. 23, p. 3717-3721, 1982.
- WINDER, D. G. & CONN, P. J. Activation of metabotropic glutamate receptors increases cAMP accumulation in hippocampus by potentiating responses to endogenous adenosine. Journal of Neuroscience v. 13, p. 38-44, 1993.
- WINNEKE, G., BROCKHAUS, A. & BALTISSEN, R. Neurobehavioral and systemic effects of longterm blood lead-elevation in rats. I. Discrimination learning and open-field behavior. Archives of Toxicology v. 37, p. 247-263, 1977.
- WINNEKE, G., LILIENTHAL, H. & WERNER, W. Task dependent neurobehavioral effects of lead in rats. Archives of Toxicology Supplement, v. 5, p. 84-93, 1982.
- WOFCHUK, S. T. & RODNIGHT, R. Glutamate stimulates the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of immature rat hippocampus via a metabotropic receptor. Neurochemistry International v. 24, p. 517-523, 1994.
- WOLFF, M. S. Occupationally derived chemicals in breast milk. American Journal of Industrial Medicine v. 4, p. 259-281, 1983.
- WONG, S. K. F. , MARTIN, B. R. & TOLKOVSKY, A. M. Pertussis toxin substrate is a guanosine 5'-[β -thio]diphosphate-, N-ethyl-maleimide-, Mg^{2+} - and temperature-sensitive GTP-binding protein. Biochemical Journal v. 232, p.191-197, 1985.
- WONG, E. H. F. & KEMP, J. A. Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 31, p. 401-425, 1991.
- WROBLEWSKI, J. T. & DANYSZ, W. Modulation of glutamate receptors: molecular mechanisms and functional implications. Annual Review of Pharmacology and Toxicology v. 29, p. 441-474, 1989.
- YOUNG, A. B. & FAGG, G. E. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. Trends in Pharmacological Sciences. A Special Report p. 18-24, 1991.