

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA  
E  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

EFEITO DA INTOXICAÇÃO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE DIVERSOS  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS ADULTOS E  
JOVENS: INTERAÇÃO COM O SISTEMA COLINÉRGICO

MARIA ESTER PEREIRA

Orientador

Prof. IVAN ANTÔNIO IZQUIERDO

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

1994

Ao amor que eu e o Joao  
estamos vivendo!

## RESUMO

Solventes orgânicos hexacarbonados são compostos usados extensivamente na indústria, sendo responsáveis por um quadro de neuropatia em indivíduos expostos ocupacionalmente. O principal metabólito destes solventes encontrado no organismo de humanos e animais experimentais é a 2,5-hexanodiona, a qual parece mediar o quadro neurotóxico induzido por seus compostos progenitores. Animais experimentais tratados com a 2,5-hexanodiona apresentam fraqueza motora e diminuição no ganho de peso corporal. Alguns estudos demonstram ainda inibição da atividade de enzimas glicolíticas e alteração da atividade da acetilcolinesterase. Neste trabalho de tese, estudou-se o efeito do tratamento crônico em ratos adultos e jovens sobre diversos parâmetros bioquímicos, físicos e comportamentais. Estudou-se ainda o efeito do tratamento agudo sobre alguns parâmetros comportamentais e nocicepção. Outro aspecto abordado foi o estudo do efeito da 2,5-hexanodiona sobre a atividade de colinesterases "in vitro" e "in vivo".

Observou-se que tanto ratos jovens como ratos adultos intoxicados cronicamente com a 2,5-hexanodiona apresentaram diminuição no ganho de peso corporal e menor peso de cérebro que os animais controle. Peso de fígado só foi afetado em ratos jovens. Os animais adultos intoxicados apresentaram ingestão alimentar semelhante aos animais controle e beberam ligeiramente mais que estes últimos. Tanto os animais adultos como os animais jovens tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram glicemia e glicogênio muscular e hepático semelhante aos animais tratados com veículo, com exceção dos ratos jovens tratados por 8 dias com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona, que apresentaram menor glicemia, e dos ratos adultos tratados com 1,6-hexanodiol, que apresentaram maior conteúdo de glicogênio hepático que os demais grupos. Este último efeito deve estar relacionado à maior ingestão de comida apresentada por este grupo. Das enzimas estudadas, apenas a atividade da LDH de fígado de ratos jovens foi inibida (22%) pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona.

Os animais adultos tratados cronicamente com 2,5-hexanodiona apresentaram na tarefa de habituação ao campo aberto uma diminuição do número de respostas de orientação e de cruzamentos, mas habituaram-se à tarefa. Na tarefa de esquiva inibitória, o tratamento com o hexacarbono também não interferiu na retenção da mesma. Entretanto, na tarefa de esquiva ativa de duas vias, observou-se um acentuado envolvimento locomotor (também verificado no campo aberto) prejudicando o número de respostas de esquiva e de cruzamentos interprovas nas sessões de treino e teste. Diferentemente do tratamento crônico, o tratamento agudo de ratos adultos com a droga prejudicou sensivelmente a retenção das tarefas de habituação ao campo aberto e esquiva inibitória, sem afetar a atividade locomotora. Os animais jovens tratados prolongadamente com a 2,5-hexanodiona demonstraram prejuízo no comportamento de alternar espontâneo e na tarefa de esquiva inibitória, enquanto que o reflexo de geotactismo não foi alterado pela droga.

Animais tratados aguda, mas não cronicamente, com a 2,5-hexanodiona apresentaram antinocicepção dependente da dose e do intervalo de tempo após sua administração. Este efeito foi bloqueado parcialmente pela administração concomitante de atropina.

A atividade da AChE de cérebro foi inibida "in vitro" pela 2,5-hexanodiona. As alterações nos parâmetros cinéticos (aumento do Km aparente e diminuição na Vmax) em adição às características da representação gráfica de Dixon e à formação de um complexo enzima-sustrato-inibidor não catalítico, sugerem que a inibição induzida pela 2,5-hexanodiona seja do tipo mista linear.

A atividade da acetilcolinesterase de cérebro de ratos adultos tratados agudamente e de ratos adultos e jovens tratados cronicamente com a 2,5-hexanodiona não mostrou-se alterada. Apenas a atividade da acetilcolinesterase de soro de ratos jovens apresentou-se ligeiramente aumentada pelo tratamento crônico com a 2,5-hexanodiona.

## SUMARIO

I.	INTRODUÇÃO.....	01
I.1.	Neurotoxicidade.....	07
I.2.	Alterações comportamentais.....	10
I.3.	Metabolismo glicolítico.....	11
I.4.	Colinesterases.....	14
I.4.1.	Mecanismo de ação da acetilcolinesterase.....	15
I.4.2.	Ação de cetonas alifáticas sobre a atividade das colinesterases.....	16
I.5.	Objetivos.....	18
II.	MATERIAL E METODOS	
II.1.	Reagentes.....	19
II.2.	Equipamentos.....	20
II.3.	Animais experimentais.....	21
II.4.	Tratamento com hexacarbonos.....	21
II.4.1.	Preparo das soluções.....	21
II.4.2.	Tratamento de animais adultos.....	22
II.4.3.	Tratamento de animais jovens.....	22
II.5.	Tratamento comportamental.....	23
II.5.1.	Habituação ao campo aberto.....	23
II.5.2.	Esquiva inibitória.....	24
II.5.3.	Esquiva ativa de duas vias.....	25
II.5.4.	Medida do reflexo de retirada da cauda.....	26
II.5.5.	Comportamento reflexo de geotactismo negativo.....	26
II.5.6.	Teste de alternar espontâneo em um labirinto em T..	27
II.6.	Preparação do material biológico para a análise da	

	atividade das enzimas descritas nos itens II.7. a II.11. ....	28
II.7.	Medida da atividade específica da lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27, LDH).....	29
II.8.	Medida da atividade específica da enolase (EC 4.2.1.11).....	29
II.9.	Medida da atividade específica da malato desidrogenase (EC 1.1.1.37, MDH).....	30
II.10.	Medida da atividade específica da glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1).....	30
II.11.	Medida da atividade específica da acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7, AChE).....	31
II.12.	Medida do conteúdo de glicogênio de fígado e músculo esquelético .....	32
II.13.	Medida dos níveis de glicose sanguínea.....	32
II.14.	Dosagem de proteína.....	32
II.15.	Análise estatística .....	33
III.	RESULTADOS	
III.1.	Estudo de um modelo de intoxicação crônica com 2,5-hexanodiona sobre a atividade de enzimas glicolíticas .....	34
III.1.1.	Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o peso corporal, peso de cérebro e de fígado e sobre o consumo de água e comida em ratas adultas..	35
III.1.2.	Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre alguns parâmetros bioquímicos e sobre a	

atividade de enzimas glicolíticas de cérebro e fígado de ratas adultas.....	44
III.1.3. Efeito do tratamento prolongado com a 2,5-hexanodiona sobre o peso corporal e sobre alguns parâmetros bioquímicos em ratos jovens.....	48
III.2. Alterações comportamentais induzidas em ratos pelo tratamento com 2,5-hexanodiona.....	62
III.2.1. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o comportamento de ratas adultas.....	62
III.2.2. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o desempenho de ratos jovens em três tarefas comportamentais.....	75
III.2.3. Efeito do tratamento agudo com 2,5-hexanodiona sobre o comportamento de ratos adultos.....	81
III.3. Nocicepção e 2,5-hexanodiona: interação com o sistema colinérgico .....	88
III.3.1. Efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona sobre a nocicepção de ratas em um teste de "tail-flick" .....	88
III.3.2. Latência de "tail-flick" de ratas tratadas cronicamente com 2,5-hexanodiona .....	93
III.3.3. Efeito da atropina sobre a antinocicepção induzida em ratas por 2,5-hexanodiona.....	95
III.4. Efeito da 2,5-hexanodiona sobre a atividade da acetilcolinesterase de cérebro e colinesterases de soro de ratos .....	98
III.4.1. Determinação das constantes cinéticas Km e Vmax da acetilcolinesterase de cérebro de ratos e efeito da	

2,5-hexanodiona.....	9
III.4.2. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo de ratos adultos tratados agudamente com 2,5-hexanodiona.....	108
III.4.3. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo e colinesterase de soro de ratos adultos tratados cronicamente com 2,5-hexanodiona .....	110
III.4.4. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e colinesterase de soro de ratos jovens tratados prolongadamente com 2,5-hexanodiona.....	114
IV. DISCUSSAO.....	119
IV.1. Estudo de um modelo de intoxicação crônica de ratos com 2,5-hexanodiona: atividade de enzimas glicolíticas.....	120
IV.2. Alterações comportamentais induzidas em ratos pelo tratamento com 2,5-hexanodiona .....	126
IV.3. Nocicepção e 2,5-hexanodiona: interação com o sistema colinérgico .....	136
IV.4. Efeito da 2,5-hexanodiona sobre a atividade da acetilcolinesterase de cérebro e colinesterase de soro de ratos .....	138
V. CONCLUSÕES.....	145
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	147

## LISTA DE TABELAS

- TABELA I. Peso corporal, de cérebro e de fígado de ratas adultas tratadas, por 40 dias, com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....40
- TABELA II. Ingestão sólida e líquida de ratas adultas tratadas prolongadamente com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....43
- TABELA III. Níveis de glicose e de proteína sérica e conteúdo de glicogênio de fígado e de músculo esquelético de ratas adultas tratadas cronicamente com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....46
- TABELA IV. Atividade específica das enzimas enolase, LDH e MDH de cérebro e fígado e, glicogênio fosforilase de fígado de ratas adultas tratadas cronicamente com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....47
- TABELA V. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre a razão entre o peso de órgão e o peso corporal de ratos jovens.....56
- TABELA VI. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre a glicemia de ratos jovens..57
- TABELA VII. Conteúdo de glicogênio de fígado e músculo esquelético de ratos jovens tratados prolongadamente com 2,5-hexanodiona .....58
- TABELA VIII. Efeito do tratamento com 200 mg/kg de 2,5-

	hexanodiona, por 15 ou 30 dias, sobre o desempenho de ratas adultas em um campo aberto .....	67
TABELA IX.	Efeito do tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, por 20 ou 40 dias, sobre o desempenho de ratas adultas em uma tarefa de esquivas inibitória .....	68
TABELA X.	Efeito do tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, por 25 ou 50 dias, sobre o desempenho de ratas adultas em uma tarefa de esquivas ativa de duas vias.....	69
TABELA XI.	Habituação a um campo aberto de ratas adultas tratadas, por 30 dias, com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona.....	72
TABELA XII.	Latência de descida da plataforma em uma tarefa de esquivas inibitória de ratas adultas tratadas, por 40 dias, com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....	73
TABELA XIII.	Desempenho de ratas adultas tratadas, por 50 dias, com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona em uma tarefa de esquivas ativa de duas vias .....	74
TABELA XIV.	Efeito do tratamento com 2,5-hexanodiona, por 25 dias, sobre o comportamento de alternar espontâneo de ratos jovens em um labirinto em T .....	79
TABELA XV.	Efeito do tratamento com 2,5-hexanodiona, por 35 dias, sobre a latência de descida da plataforma de ratos jovens em uma tarefa de esquivas	

	inibitória .....	80
TABELA XVI.	Efeito do tratamento agudo com 2,5-hexanodiona sobre o desempenho de ratos adultos em um campo aberto.....	85
TABELA XVII.	Efeito do tratamento agudo com 2,5-hexanodiona, administrada 30 min antes da sessão de treino, sobre o desempenho de ratos adultos em uma tarefa de esquiva inibitória .....	86
TABELA XVIII.	Efeito do tratamento agudo com 2,5-hexanodiona, administrada 90 min antes da sessão de treino, sobre o desempenho de ratos adultos em uma tarefa de esquiva inibitória .....	87
TABELA XIX.	Efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona à ratas adultas sobre a soma das latências de retirada da cauda em um aparelho de "tail-flick" .....	91
TABELA XX.	Latência de retirada da cauda em um aparelho de "tail-flick" de ratas adultas tratadas cronicamente com 2,5-hexanodiona.....	94
TABELA XXI.	Parâmetros cinéticos, Km e Vmax, da AChE determinados na presença de 0 a 50 mM de 2,5-hexanodiona.....	105
TABELA XXII.	Atividade específica da AChE de cérebro e cerebelo de ratos adultos tratados agudamente com 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....	109
TABELA XXIII.	Atividade específica da AChE de cérebro e cerebelo de ratas adultas tratadas	

	prolongadamente com 2,5-hexanodiona .....	112
TABELA XXIV.	Atividade específica da ChE de soro de ratas adultas tratadas cronicamente com 2,5-hexanodiona .....	113
TABELA XXV.	Colinesterase e acetilcolinesterase de soro de ratos jovens tratados prolongadamente com 2,5-hexanodiona.....	118

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Efeito do tratamento prolongado com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona sobre o ganho de peso corporal de ratas adultas .....39
- FIGURA 2. Ingestao sólida apresentada por ratas adultas tratadas prolongadamente com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....41
- FIGURA 3. Ingestao líquida apresentada por ratas adultas tratadas prolongadamente com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona .....42
- FIGURA 4. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre o ganho de peso corporal de ratos jovens .....53
- FIGURA 5. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre o peso de cérebro de ratos jovens .....54
- FIGURA 6. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre o peso de fígado de ratos jovens .....55
- FIGURA 7. Atividade específica da malato desidrogenase de fígado e cérebro de ratos jovens tratados cronicamente com 2,5-hexanodiona .....59
- FIGURA 8. Atividade específica da lactato desidrogenase de fígado e cérebro de ratos jovens: efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona .....60
- FIGURA 9. Atividade específica da glicogênio-fosforilase de fígado de ratos jovens tratados cronicamente com

	2,5-hexanodiona .....	61
FIGURA 10.	Latência de geotactismo negativo de ratos jovens tratados com 2,5-hexanodiona .....	78
FIGURA 11.	Efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona à ratas adultas sobre as latências de retirada da cauda em um aparelho de "tail-flick" (TFL).....	92
FIGURA 12.	Efeito do tratamento com atropina sobre a antinocicepção induzida em ratas por 2,5-hexanodiona.....	97
FIGURA 13.	Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade específica da acetilcolinesterase de cérebro de ratos adultos.....	103
FIGURA 14.	Efeito da 2,5-hexanodiona sobre os parâmetros cinéticos (Km e Vmax) da AChE de cérebro de ratos.....	104
FIGURA 15.	Gráfico de Dixon para a determinação da constante de dissociação, Ki, da 2,5-hexanodiona para a AChE de cérebro de ratos .....	106
FIGURA 16.	Porcentagem da atividade da AChE de cérebro de ratos na presença de concentrações altas de 2,5-hexanodiona .....	107
FIGURA 17.	Ontogenia da AChE de cérebro de ratos jovens tratados prolongadamente com 2,5-hexanodiona ..	117

## ABREVIATURAS

AChE - acetilcolinesterase

AMPC - adenosina monofosfato cíclico

ATC - acetiltiocolina

BuChE - butirilcolinesterase

ChE - colinesterase

ip - intraperitoneal

HD - 2,5-hexanodiona

HDOH - 1,6-hexanodiol

LDH - lactato desidrogenase

MDH - malato desidrogenase

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

sc - subcutânea

TFL - latência de "tail-flick"

## I. INTRODUÇÃO

O n-hexano é um líquido volátil e incolor. Na maioria dos casos, este composto é usado como uma mistura de seus isômeros e outros compostos de seis carbonos. Seu uso é muito difundido por ser um excelente e inespecífico solvente, utilizado com predominância no processamento de alimentos, incluindo a extração de óleos de soja, semente de linho, amendoim, milho e caroço de algodão, na polimerização da borracha, na manufatura de produtos farmacêuticos, além de ser encontrado em produtos como colas, adesivos, tintas e vernizes e ainda, como componente da gasolina (0,4 - 9 %).

Por ser volátil, o n-hexano se encontra, no ambiente, predominantemente na fase de vapor, tendo uma meia-vida na atmosfera de aproximadamente 2 dias. É absorvido rapidamente pelos pulmões e também de forma rápida é distribuído pelo organismo do indivíduo adulto tao bem como pelos tecidos fetais [Couri & Milks, 1982; n-Hexane, 1991].

Até o fim da década de 60, o uso deste tipo de solvente na indústria era considerado seguro. Atualmente, em vários países, têm sido estipulados limites de exposição ocupacional ao n-hexano, sendo que estes variam de 100 - 1800 mg/m<sup>3</sup> (time-weighted average, TWA; exposição média máxima em um período de trabalho de 8 a 12 horas por dia) conforme o país [n-Hexane, 1991].

Estes limites foram impostos devido à identificação de uma síndrome de toxicidade caracterizada, clinicamente, por uma

fraqueza nos membros posteriores, em indivíduos expostos ocupacionalmente ao n-hexano e/ou a 2-hexanona.

Casos de neuropatia periférica acentuada foram relatados entre trabalhadores de fábricas de sandálias no Japão e fábricas de impressos em Taiwan, expostos a níveis de n-hexano de aproximadamente 176 e 353 mg/m<sup>3</sup> (50 e 100 ppm), respectivamente, por um período de mais de 8 horas por dia [n-Hexane, 1991]. Estes níveis são relativamente baixos quando comparados à variação do limite permitido, apesar de que no Japão este índice é de 141 mg/m<sup>3</sup>.

Observações clínicas similares têm sido feitas em indivíduos que têm o hábito de cheirar "cola de sapateiro", laques, vernizes e outros solventes que contenham n-hexano. Nestes casos de inalação voluntária, a neuropatia apresentada por estes indivíduos é chamada de "glue sniffer's neuropathy" ou "huffer's neuropathy" [Korobkin et al., 1975; Prockop et al., 1974; Towfighi et al., 1976].

Por razões econômicas, muitos indivíduos que cheiram cola o fazem em substituição ao uso da maconha e do álcool, assim como de outras drogas ainda mais caras e de maior controle de consumo.

A euforia induzida pelo vapor destas substâncias dura em média de 5 a 15 minutos, e a inalação pode ser repetida várias vezes durante horas [Prockop et al., 1974].

Normalmente, os indivíduos que fazem uso destas drogas são muito jovens (já a partir dos 14 anos de idade ou menos), e somente um pequeno número deles procura ajuda médica e só o

faz quando começa a apresentar sinais acentuados de fraqueza motora nas extremidades. A maioria deles, por apresentar ligeira neuropatia, sobrevive a ela, limitando desta forma não apenas os dados estatísticos do uso deste tipo de agente tóxico como também o estudo das consequências de uso dos mesmos.

Apesar das poucas informações disponíveis sobre a toxicidade aguda do n-hexano em humanos, os dados existentes sugerem que o composto tenha baixa toxicidade aguda. Porém a exposição a níveis em torno de 3520 a 17600 mg/m<sup>3</sup> (1000 a 5000 ppm) por 10 - 60 minutos pode induzir sinais de depressão no sistema nervoso central, sonolência, vertigem, náusea e dor de cabeça [Couri & Milks, 1982].

Vários estudos sobre a neurotoxicidade do n-hexano (e da 2-hexanona) e seus metabólitos, em humanos, ratos e galinhas, têm indicado a 2,5-hexanodiona como o metabólito neurotóxico destes agentes [Abou-Donia et al., 1988; Couri & Milks, 1982; Krasavage et al., 1980], com um potencial neurotóxico 38 vezes maior que o n-hexano [Krasavage et al., 1980].

O metabolismo do n-hexano e da 2-hexanona pode seguir várias vias distintas. Algumas levam à produção do metabólito neurotóxico 2,5-hexanodiona, e outras degradam alguns dos metabólitos a CO<sub>2</sub>. No organismo, o composto também pode ser inativado por conjugação a grupos hidroxil disponíveis para formar sulfatos e glucuronídeos. Estes conjugados são então eliminados rapidamente na urina e bile, tornando-se indisponíveis para biotransformações e/ou interações toxicológicas futuras [Couri & Milks, 1982; n-Hexane, 1991].

Em animais tratados com 2,5-hexanodiona, o único metabólito encontrado foi a 5-hidroxi-2-hexanona [DiVincenzo et al., 1976].

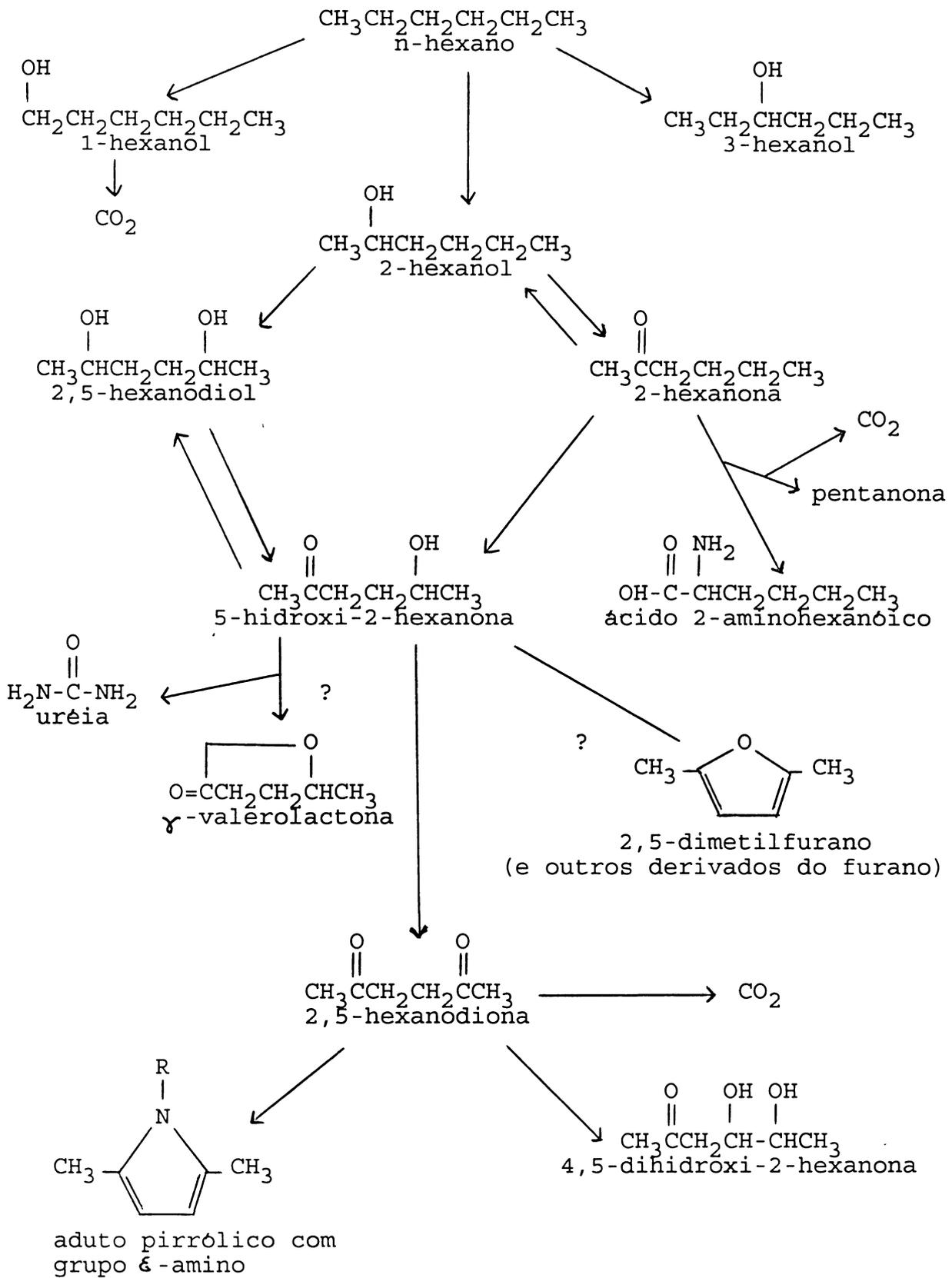
A determinação de metabólitos do n-hexano na urina tem sido utilizada para monitoramento biológico de pessoas expostas ocupacionalmente ao n-hexano. Os metabólitos mais comumente encontrados na urina de trabalhadores são: 2-hexanol, 2,5-dimetilfurano,  $\gamma$ -valerolactona [Perbellini et al., 1980], 2,5-hexanodiona [Ahonem & Schimberg, 1988; Fedtke & Bolt, 1987; Kawai et al., 1991; Perbellini et al., 1980] e 4,5-dihidroxi-2-hexanona [Fedtke & Bolt, 1987]. A urina de ratos intoxicados com vapor de n-hexano apresenta principalmente: 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2,5-hexanodiona, 2,5-dimetilfurano [Fedtke & Bolt, 1987; Frontali et al., 1981; Perbellini et al., 1982],  $\gamma$ -valerolactona [Frontali et al., 1981; Perbellini et al., 1982] e 4,5-dihidroxi-2-hexanona [Fedtke & Bolt, 1987].

Pode-se verificar que o metabólito comum em todos os estudos é a 2,5-hexanodiona. Assim, devido à presença constante da 2,5-hexanodiona como metabólito encontrado na urina de trabalhadores, um limite de exposição biológica (Biological Exposure Index, BEI) foi estabelecido nos Estados Unidos em 1986. Este índice é de 4 mg de 2,5-hexanodiona por litro de urina. Porém, a relação quantitativa entre a intensidade da exposição ao n-hexano e a excreção urinária de 2,5-hexanodiona, assim como a apresentação dos efeitos tóxicos, está sujeita a variações devido, não só a

dificuldades e diversidades técnicas [Ahonem & Schimberg, 1988; DiVincenzo et al., 1976; Fedtke & Bolt, 1987; Kessler et al., 1990; Ogata et al., 1991; Perbellini et al., 1990; Vohra & Gaiind, 1992], mas, principalmente, devido a interações químicas do n-hexano com outros solventes [Kawai et al., 1991; Perbellini et al., 1982; Ralston et al., 1985].

Na realidade, interações sinérgicas entre solventes parecem contribuir para o aparecimento dos efeitos sobre o sistema nervoso, desde que, na intoxicação ocupacional, a exposição simultânea a um número de diferentes solventes é mais comum que a exposição a um único solvente [Couri & Milks, 1982; n-Hexane, 1991].

Os riscos à saúde devido à exposição a misturas de solventes têm sido analisados em termos de somação dos efeitos quando da exposição a um único solvente. Entretanto, a estimativa de efeitos torna-se incorreta, desde que vários efeitos não aditivos têm sido relatados após a exposição a múltiplos solventes. Por exemplo, o solvente metil-etil-cetona é um composto não neurotóxico, mas aumenta sensivelmente a toxicidade do n-hexano [Kawai et al., 1991; Perbellini et al., 1982; Ralston et al., 1985], da 2-hexanona [Misumi & Nagano, 1985] e do metil-iso-butil-cetona [Abou-Donia et al., 1985]. A acetona aumenta a toxicidade da 2,5-hexanodiona [Ladefoged et al., 1989; Larsen et al., 1991]. Por outro lado, o tolueno [Nylén et al., 1994a] e o xileno [Nylén et al., 1994b] parecem diminuir a toxicidade do n-hexano.



ESQUEMA DA VIA METABOLICA DO n-HEXANO EM MAMIFEROS (n-Hexane, 1991)

O composto hexacarbonado 2,5-hexanodiona possui uma pressão de vapor baixa (1,6 mmHg a 25<sup>o</sup>C) e seu uso na indústria é muito limitado. Por estes motivos nenhum caso de neuropatia por intoxicação com 2,5-hexanodiona tem sido descrito. Porém, o vapor do composto causa irritação em mucosas e sua aplicação tópica provoca manchas na pele.

A 2,5-hexanodiona também pode ser absorvida pela pele, mas nenhum caso de neurotoxicidade tem sido descrito em humanos por esta via de administração [Couri & Milks, 1982].

Dados de toxicidade animal têm indicado, entretanto, que a 2,5-hexanodiona pode produzir neuropatia periférica quando animais são tratados com a droga pelas vias intraperitoneal [Anthony et al., 1983b; Braendgaard & Sidenius, 1986; Ferri et al., 1988; Rossi et al., 1982; Sickles, 1991], subcutânea [Missumi et al., 1985], oral, através de sonda ou na água de beber [Anthony et al., 1983a; DeCaprio & O'Neill, 1985; Krasavage et al., 1980; O'Donoghue et al., 1984; Ralston et al., 1985; Sahenk & Mendell, 1981], dérmica [Abou-Donia et al., 1985] e intratecal [Hammond-Tooke, 1992].

Como a 2,5-hexanodiona é solúvel em água, tem maior persistência no soro que o n-hexano, a 2-hexanona e que outros metabólitos, incluindo o 2-hexanol, 2,5-hexanodiol e a 5-hidroxi-2-hexanona. Este fato contribui para a neurotoxicidade pronunciada induzida pela 2,5-hexanodiona e por seus compostos progenitores [Couri & Milks, 1982].

### I.1. NEUROTOXICIDADE

Humanos e animais experimentais expostos a concentrações relativamente altas de n-hexano ou 2-hexanona e animais experimentais tratados com 2,5-hexanodiona desenvolvem uma síndrome neurotóxica que tornou-se conhecida como "hexacarbon peripheral neuropathy" [Allen et al., 1975; Anthony et al., 1983a,b; Couri & Milks, 1982; Ferri et al., 1988; n-Hexane, 1991; O'Donoghue et al., 1984; Paulson & Waylonis, 1976; Rossi et al., 1982].

O termo "hexacarbon neuropathy" tem sido aplicado à síndrome de axonopatia distal central e periférica, induzida quimicamente por compostos que possuem esqueleto de seis carbonos. Entretanto, a disposição  $\gamma$ -dicetona do oxigênio com os átomos de carbono do composto hexacarbonado parece exercer efeito fundamental na indução das neuropatias. Por exemplo, o 1-hexanol, 2,4-hexanodiona, 2,3-hexanodiona, 2,6-heptanodiona e a 1,6-hexanodiol não possuem o espaçamento 1,4 entre os grupos carbonil, sendo todos compostos não neurotóxicos. Por outro lado, as  $\gamma$ -dicetonas 2,5-heptanodiona e 3,6-octanodiona produzem neuropatia idêntica à induzida pela 2,5-hexanodiona [Couri & Milks, 1982].

A síndrome neurotóxica induzida por estes compostos é caracterizada, patologicamente, por um alargamento do diâmetro do axônio, por deposição focal de neurofilamentos de 10 nm em fibras nervosas mielinizadas do sistema nervoso central e periférico. Este alargamento ocorre ao longo da fibra nervosa, tendo origem próxima aos nodos de Ranvier na secção mais distal, mas não terminal, do axônio. Eventualmente, pode

desenvolver-se em regiões mais próximas e internodais, o que ocorre com o aumento da dosagem [Anthony et al., 1983a,b; Couri & Milks, 1982; Ferri et al., 1988; n-Hexane, 1991; O'Donoghue et al., 1984; Rossi et al., 1982].

Quanto ao transporte axonal de neurofilamentos, os dados da literatura são controversos. Alguns sugerem que a 2,5-hexanodiona aumenta [Monaco et al., 1989] outros que a 2,5-hexanodiona diminui o transporte de neurofilamentos [Griffin et al., 1984; Hammond-Tooke, 1992]. Outros estudos relatam ainda que as  $\gamma$ -dicetonas reduzem a velocidade do transporte axonal retrógrado [Braendgaard & Sidenius, 1986; Sahenk & Mendell, 1981] ou anterógrado [Sickles, 1991]. A quantidade de proteínas transportada também pode ser reduzida tanto por dose única como múltipla de 2,5-hexanodiona [Sickles, 1991]. Provavelmente, o decréscimo no transporte de neurofilamentos seja o responsável pela formação do alargamento axonal, desde que ele ocorre pré-terminalmente e não no terminal do axônio, como poderia ser esperado se houvesse um aumento no transporte de neurofilamentos [Hammond-Tooke, 1992].

A intoxicação com 2,5-hexanodiona altera a condução nervosa, ou por diminuir a amplitude do potencial de ação pós-ganglionar [Rossi et al., 1982] ou por diminuir a velocidade da condução em nervo motor [Ladefoged et al., 1989; Misumi et al., 1985].

A desmielinização e a degeneração retrógrada da fibra e o processo neurotóxico lembram as neuropatias "dying back" associadas com acrilamida, sulfeto de carbono e organofosforados [Couri & Milks, 1982; Griffin et al., 1983;

Hall & Gregson, 1982].

Vários estudos têm demonstrado que a reação da  $\gamma$ -dicetona com o grupo  $\epsilon$ -amino da lisina de proteínas forma adutos 2,5-dialquilpirróis [Anthony et al., 1983a,b; DeCaprio et al., 1983, 1988; DeCaprio & O'Neill, 1985]. A formação destes adutos pirrólicos com proteínas de neurofilamentos parece ser o evento crítico para a acumulação patológica dos neurofilamentos, como resultado de mudanças fisicoquímicas induzidas pelos adutos hidrofóbicos [DeCaprio et al., 1983; DeCaprio & O'Neill, 1985]. Anthony e colaboradores (1983b) verificaram que a autooxidação dos pirróis gera intermediários reativos que resultam na ligação covalente cruzada de proteínas, que, quando de neurofilamentos, "in vivo" pode levar à acumulação destes.

## I.2. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

A análise dos efeitos dos hexacarbonos sobre parâmetros comportamentais tem se limitado, praticamente, a observações clínicas do estado geral dos animais. Estas observações têm revelado que animais experimentais tratados por períodos prolongados com 2,5-hexanodiona apresentam alterações na atividade locomotora espontânea [Rossi et al., 1982] e fraqueza muscular, principalmente nos membros traseiros [Anthony et al., 1983b; DeCaprio et al., 1988; Misumi et al., 1985; Sabri, 1984]. Com o aumento das dosagens, os animais podem apresentar distúrbios no andar, caracterizado por andar cambaleando a parte posterior do dorso [Misumi et al., 1985;

Rossi et al., 1982], ataxia [Abou-Donia et al., 1985; DeCaprio & O'Neill, 1985] e paralisia dos membros traseiros [Braendgaard & Sidenius, 1986; Sahenk & Mendell, 1981].

Apenas dois trabalhos relatam alterações comportamentais analisadas em tarefas específicas. Em um desses estudos, a deficiência motora, observada por outros autores pela simples observação clínica, foi confirmada quando animais são submetidos a testes de reflexos simples e ao tempo de permanência em uma barra, após tratamento com a 2,5-hexanodiona. Os animais apresentam uma diminuição da resposta reflexa aos 60 dias e nenhum reflexo é emitido aos 80 dias de tratamento com a droga, enquanto que, aos 40 dias de tratamento, os animais apresentam diminuição no tempo de permanência na barra [Ralston et al., 1985].

No teste de "rotarod", os animais apresentam-se mais sensíveis ao tratamento com 2,5-hexanodiona. A partir da terceira semana de tratamento por via oral, na água de beber [Ladefoged et al., 1989] ou por sonda [Ralston et al., 1985], verifica-se diminuição no tempo de permanência no aparelho.

### I.3. METABOLISMO GLICOLITICO

O quadro de axonopatia relatado para a intoxicação com 2,5-hexanodiona é idêntico àquele verificado em humanos e em animais experimentais expostos à acrilamida [Couri & Milks, 1982; Spencer et al., 1979]. As semelhanças verificadas na enfermidade apresentada por estes dois compostos levou à hipótese de que ambos poderiam agir por um mesmo mecanismo de indução do quadro neurológico.

Spencer e colaboradores (1979) apresentaram uma hipótese para a neuropatia induzida por alguns agentes neurotóxicos. Esta hipótese sugere que a neuropatia pode ser produzida por uma inibição de enzimas glicolíticas ao nível do axônio, seguida pela interferência com o mecanismo de transporte axonal, o qual requer energia do processo oxidativo. Os nodos de Ranvier seriam as regiões mais atingidas neste mecanismo por requererem maior quantidade de energia que as demais regiões do axônio. Desta forma, o bloqueio do transporte axonal poderia ocorrer primeiro nestes sítios, causando acúmulo do material transportado nas regiões paranodais próximas aos nodos de Ranvier.

Muitos estudos nesta linha de pesquisa têm reforçado a teoria glicolítica.

"In vitro", a acrilamida inibe a atividade específica da enolase de cérebro de ratos [Howland et al., 1980a,b] e de camundongos [Sakamoto & Hashimoto, 1985a], a enolase específica de neurônio bovino [Sakamoto & Hashimoto, 1985a] e enolase do sistema visual [Griffiths et al., 1981] e de nervo ciático de ratos [Howland et al., 1980a]. Este composto também inibe a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e da fosfofrutoquinase-1 de cérebro de ratos [Howland et al., 1980b] e da GAPDH de cérebro de camundongos [Sakamoto e Hashimoto, 1985a].

Ratos tratados prolongadamente com acrilamida apresentam inibição da atividade da GAPDH e enolase de nervo ciático [Sakamoto & Hashimoto, 1985b] e enolase de cérebro [Howland et

al., 1980b].

Para os hexacarbonos, a enzima que tem-se apresentado mais sensível é a GAPDH. Sabri e colaboradores (1979) verificaram que a GAPDH cristalina é inibida por 2,5-hexanodiona e 2-hexanona, apresentando características cinéticas de inibição do tipo mista para ambos os solventes. Estes autores também verificaram que a GAPDH de nervo ciático e de cérebro de ratos é inibida "in vitro" por 2-hexanona, mas não por 2,5-hexanodiona, 1,6-hexanodiol e acetona.

Porém, outros estudos têm apresentado resultados diferentes quanto à sensibilidade da GAPDH a 2,5-hexanodiona.  $I_{50}$  de 3,85 mM e de 47,9 mM de 2,5-hexanodiona foram obtidos, respectivamente, para a GAPDH purificada de músculo de coelho e para homogeneizado de cérebro de rato [Sabri, 1984; Howland et al., 1980b]. Sabri (1984) verificou ainda que 25 mM de 2,5-hexanodiona inibe 85 % da atividade específica da enzima de cérebro de rato, quando a mesma foi pré-incubada 20 min com o solvente.

"In vivo", ratos tratados por 12 semanas com 0,5 % (v/v) de 2,5-hexanodiona na água de beber apresentaram somente inibição (25%) na atividade da GAPDH de nervo ciático, sendo que a atividade da enzima de cérebro e de fígado não foi alterada pelo tratamento [Sabri, 1984].

Outras enzimas glicolíticas, como a enolase, a fosfofrutoquinase-1 e a lactato desidrogenase, também têm sido estudadas quanto à sensibilidade aos hexacarbonos [Howland et al., 1980b; Sabri, 1984; Sabri et al., 1979].

Grande importância havia sido dada à sensibilidade da

fosfofrutoquinase-1 a estes solventes, devido ao fato desta enzima ser um ponto de controle importante da velocidade da glicólise (enzima alostérica com inúmeros reguladores positivos e negativos). Esta enzima, porém, parece ser pouco sensível. Apenas em um estudo, obteve-se inibição da mesma "in vitro" por 2,5-hexanodiona e 2-hexanona [Sabri et al., 1979].

A enolase, enzima bastante estudada em intoxicações por acrilamida, apresenta um  $I_{50}$  bastante alto para a 2,5-hexanodiona, 67,7 mM, determinado em cérebro de rato [Howland et al., 1980b].

#### 1.4. COLINESTERASES

As colinesterases são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Estudos farmacológicos recentes demonstram que, além da função esterásica das colinesterases, as acetilcolinesterases (AChE) desempenham outras funções como: efeitos inibitórios pré-sinápticos, ação direta sobre receptores colinérgicos, ação direta sobre canais, especialmente o de potássio, e ação sobre outros neurotransmissores [Ashford et al., 1989]. Já as butirilcolinesterases, produzidas em grandes quantidades no fígado e presentes no plasma, parecem ter função desconhecida [Chubb, 1984].

As colinesterases são então divididas em pelo menos duas famílias principais: acetilcolinesterases (AChE, ou colinesterase verdadeira, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterases

(BuChE, ou pseudocolinesterase, EC 3.1.1.8). Diversas similaridades têm sido observadas entre as duas famílias: mecanismo de ação, formas moleculares, natureza do sítio ativo e organização das subunidades [Bastone et al., 1987; Massoulié & Bon, 1982].

A atividade da ChE de plasma humano é representada principalmente pela atividade da BuChE, enquanto que plasma de ratos contém aproximadamente iguais quantidades das duas enzimas, AChE e BuChE [Traina & Serpietri, 1984].

A forma molecular da AChE contida em plasma humano e de ratos é a forma globular tetramérica (G4) [Massoulié & Bon, 1982]. Esta forma globular também está presente nos tecidos do sistema nervoso e muscular e pode ser liberada destes tecidos para o sangue [Chubb & Hodgson, 1984 citado em Bastone et al., 1987]. Os eritrócitos contém a forma dimérica (G2) [Bastone et al., 1987].

#### 1.4.1. Mecanismo de ação da AChE

O centro ativo da acetilcolinesterase é constituído por um local aniônico, carregado negativamente, que recebe a cabeça catiônica da acetilcolina (grupo quaternário) [ $-N^+ (CH_3)_3$ ], e um local esterásico que aloja o grupamento éster e carbonila.

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster-carbonila, promovendo a quebra da ligação éster. A colina é liberada e a enzima fica na forma acetilada, tendo seu local aniônico livre. A enzima acetilada

reage com a água, ácido acético é formado e a enzima é totalmente regenerada.

#### 1.4.2. Ação de cetonas alifáticas sobre a atividade das ChEs

Dafforn e colaboradores (1979), estudando a atividade da AChE de órgão elétrico de peixe (Electrophorus electricus), verificaram que um grande número de cetonas alifáticas simples eram inibidores competitivos da AChE "in vitro", com uma constante de dissociação que variava entre 1 a 5 mM. Das cetonas estudadas, os autores encontraram que a 2,5-hexanodiona e a ciclo-hexanona eram os mais fracos inibidores, com um  $K_i$  de 4,1 e 5,0 mM, respectivamente. Este estudo também demonstrou que, provavelmente, a inibição induzida pelas cetonas envolve o sítio aniônico da enzima, uma vez que a ligação da 2-pentanona excluiu a ligação do íon tetrametilamônio, um inibidor específico do local aniônico da enzima, mas não interferiu na inativação da enzima pelo metilsulfonilfluoreto, que reage com o grupo hidroxil nucleofílico do local esterásico.

O efeito do n-hexano sobre a atividade das ChE tem sido questionado. Vilanova & Vicedo (1983) verificaram que o resíduo obtido da destilação do n-hexano comercial inibia a atividade da ChE de soro humano, AChE de órgão elétrico de peixe e AChE de eritrócito humano. Esta inibição foi associada à presença de organofosforados encontrados neste resíduo. O n-hexano comercial usado pelos autores continha 36 % de n-hexano e um total de 94 % de cetonas alifáticas de 6 carbonos.

Os efeitos da exposição ocupacional a compostos

hexacarbonos sobre a atividade de colinesterases têm sido um tanto controversos. Paulson & Waylonis (1976) encontraram diminuição na atividade da ChE de plasma de trabalhadores que apresentaram polineuropatia devido à exposição ao n-hexano. Por outro lado, Allen e colaboradores (1975), em um estudo sobre polineuropatia em trabalhadores de uma indústria de capas plásticas, encontraram aumento significativo na atividade da ChE plasmática e redução na atividade da AChE de eritrócitos naqueles indivíduos que apresentaram sinais eletromiográficos. A composto metil-n-butil cetona (MnBK, MBK, 2-hexanona) foi reconhecido como sendo a causa da intoxicação.

Em ratos, verificou-se aumento na atividade da AChE, mas não da BuChE de plasma após 2 a 4 semanas de tratamento com n-hexano (5.000 ppm) ou 2,5-hexanodiona (1% na água de beber). Além disso, observou-se aumento na atividade da AChE do músculo extensor digital longo, mas não do solear, nem alteração na atividade da enzima hepática após o tratamento com 2,5-hexanodiona [Bastone et al., 1987].

## I.5. OBJETIVOS

O presente trabalho de tese teve como objetivos:

1. Estabelecer um modelo de intoxicação prolongada em ratos adultos e jovens que tornasse possível estudar os efeitos da 2,5-hexanodiona sobre parâmetros físicos (peso corporal e de cérebro e fígado, ingestão alimentar), bioquímicos (glicemia, conteúdo de glicogênio e atividade de enzimas glicolíticas) e comportamentais (comportamento exploratório, atividade locomotora e memória);
2. Estudar a interação da 2,5-hexanodiona com o sistema colinérgico através de parâmetros comportamentais (resposta nociceptiva) e bioquímicos (atividade da acetilcolinesterase).

## II. MATERIAL E METODOS

Será descrita em material e métodos a metodologia geral utilizada na realização desta tese. Detalhes específicos metodológicos serão descritos antes da apresentação dos resultados, em cada experimento.

### II.1. REAGENTES

Acido clorídrico - Merck

Acido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) - Sigma

Acido L(+)-láctico - Sigma

Acido málico - Merck

Acido ortofosfórico 85 % - Merck

Adenosina monofosfato de sódio - tipo III - Sigma

Albumina bovina - Reagen

Cloreto de atropina - Merck

Cloreto de magnésio - Reagen

Cloreto de sódio - Reagen

Coomassie brilhante azul G - Sigma

Etanol p.a. - Merck

Fosfoenolpiruvato de sódio - Merck

2-Fosfoglicerato de sódio - Boehringer Mannheim

Fosfato de potássio dibásico - Reagen

Fosfato de potássio monobásico - Reagen

Glicina - Merck

Glicogênio - Merck

Glicose - Merck

1,6-Hexanodiol - Aldrich  
2,5-Hexanodiona - Aldrich  
Hidroclorato de etopropazina - Sigma  
Hidróxido de potássio - KOH - Merck  
Imidazol - Sigma  
Iodeto de acetiltiocolina - Sigma  
Iodeto de potássio - Reagen  
Iodo - Reagen  
Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada - Sigma  
Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida - Sigma  
Ortotoluidina - Merck  
Sulfato de magnésio - Reagen  
Tris(hidroximetil)aminometano - Sigma

## II.2. EQUIPAMENTOS

Balança Analítica - Mettler  
Balança Eletrônica - Sartorius  
Banho-Maria - Warburg - B.Braun Melsungen  
Caixa de Condicionamento Automatizada - Albarsch  
Caixa para Habituação ao Campo Aberto  
Centrífuga Clínica - Baby  
Centrífuga Refrigerada - Janetsky K 24 - rotor com ângulo fixo de 40°.  
Espectrofotômetro Pekin Elmer - duplo feixe  
Espectrofotômetro Specoll  
Ph-metro - Testa  
Tail-Flick - Albarsch

### II.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos e jovens, machos e fêmeas.

Nos experimentos em que utilizaram-se ratos adultos, os mesmos eram provenientes ou do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Porto Alegre) ou do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Santa Maria).

Quando utilizaram-se ratos jovens, ratos adultos machos e fêmeas do Biotério Central da UFSM foram removidos previamente para o Biotério do Setor de Bioquímica do Departamento de Química da UFSM. Os animais foram acasalados, na proporção de 3 fêmeas para 1 macho, por um período de 20 dias, quando então as fêmeas eram separadas em caixas individuais. Ao nascimento, as ninhadas eram ajustadas em 8 filhotes, sendo as mesmas tratadas como descrito posteriormente.

Os animais tinham livre acesso à ração (Purina) e à água e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada em  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### II.4. TRATAMENTO COM HEXACARBONOS

#### II.4.1. Preparo das soluções:

Os animais controle foram tratados com solução veículo, que consistia de uma solução de NaCl 100 mM contendo tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,2.

Como droga neurotóxica, foi utilizada o hexacarbono 2,5-hexanodiona, e como droga não neurotóxica, o 1,6-hexanodiol.

Ambos foram preparados em solução veículo. As doses do 1,6-hexanodiol eram equimolares às da 2,5-hexanodiona.

#### II.4.2. Tratamento de animais adultos:

Os animais utilizados para o controle de ingestão líquida e sólida foram mantidos em grupos de dois por caixa, recebendo ambos o mesmo tratamento.

Os animais utilizados para os demais experimentos foram sempre mantidos em grupos de 5-6 por caixa, contendo cada caixa todos os tratamentos investigados no experimento.

Para o tratamento de animais adultos, as drogas foram preparadas de maneira a injetar-se 1 ml por kg de peso corporal por animal. Os animais tratados agudamente receberam as soluções por via intraperitoneal nas concentrações de 0 (controle), 200, 400 ou 800 mg/ml de 2,5-hexanodiona, enquanto que aqueles tratados cronicamente (tratamento diário) receberam o tratamento por via subcutânea nas concentrações de 0 (controle), 200 mg/ml de 2,5-hexanodiona ou 207 mg/ml de 1,6-hexanodiol.

#### II.4.3. Tratamento de animais jovens:

Ratos machos e fêmeas foram tratados subcutaneamente, a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida pós-natal, por diferentes períodos.

As drogas foram preparadas de maneira a injetar-se 10 ml por kg de peso corporal em ratos com o peso inferior a 100 g. Os animais foram tratados com as soluções nas concentrações de 0 (controle), 20 ou 40 mg/ml de 2,5-hexanodiona ou 20,7 ou 41,4 mg/ml de 1,6-hexanodiol, que equivalem às doses de 0, 200

e 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona e 207 e 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol.

Quando os animais atingiram 100 g de peso, passaram a receber as soluções em um volume equivalente a 1 ml por kg de peso corporal (isto só ocorreu nos experimentos em que os animais foram tratados por mais de 30 dias), recebendo as soluções nas concentrações de 0, 200 ou 400 mg/ml de 2,5-hexanodiona ou 207 ou 414 mg/ml de 1,6-hexanodiol.

## II.5. TRATAMENTO COMPORTAMENTAL

II.5.1. Habituação a um campo aberto - Foi realizada em uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade, com a face anterior de vidro. O assoalho era recoberto com linóleo e dividido com linhas brancas em 12 retângulos de 15,0 X 13,0 cm. Os animais foram submetidos a duas sessões (sessões de treino e teste) de 5 min, com intervalo de 24 horas entre as mesmas. A tarefa consistia em colocar o animal, gentilmente, no canto posterior direito da caixa, sendo registrados o número de respostas de orientação e o número de cruzamentos realizados pelo animal. Uma diminuição no número de respostas de orientação apresentada pelo animal na sessão de teste em relação à sessão de treino foi tomada como habituação à tarefa e considerada como medida de memória. O número de respostas de cruzamento foi tomado como parâmetro para avaliar a atividade locomotora [Izquierdo, 1979; Izquierdo et al., 1984].

II.5.2. Esquiva inibitória - Foi realizada em uma caixa automatizada (Albarsch), cujas dimensões são as seguintes: 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura, com a face frontal em vidro. O assoalho era constituído de uma grade de barras de bronze paralelas com 1 mm de diâmetro, distantes 1 cm umas das outras. O lado esquerdo da grade era coberto por uma plataforma com 7 cm de largura, 25 cm de comprimento e 5 cm de altura quando testados ratos adultos, ou por uma plataforma de 5 cm de largura, 25 cm de comprimento e 3 cm de altura para ratos jovens. A tarefa consistia no seguinte: na sessão de treino (sessão 1), o animal era colocado, gentilmente, sobre a plataforma com a face virada para o canto posterior esquerdo da caixa. Registrou-se o tempo em que o animal permanecia sobre a plataforma. Quando o rato descia com as quatro patas da plataforma sobre a grade, um choque intermitente de 0,3 mA era aplicado na grade e persistia até que o animal retornasse à plataforma. A sessão de teste era semelhante à sessão de treino com omissão do choque, e foi realizada 24 horas após a sessão de treino. O aumento da latência de descida da plataforma na sessão de teste comparado à sessão de treino foi considerado como medida de memória [Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo & Pereira, 1989; Netto & Izquierdo, 1985; Netto et al., 1985; Pereira et al., 1989]. Um limite de 300 segundos foi imposto para a diferença entre as latências de descida da plataforma da sessão de teste e a sessão de treino.

II.5.3. Esquiva ativa de duas vias - Foi realizada em uma

caixa de condicionamento automatizada (Albarsch) similar à caixa usada na tarefa de esquivia inibitória, exceto que esta não continha plataforma e possuía, entre as duas barras centrais, uma barra de acrílico medindo 1 cm de altura. As barras de bronze de cada lado da caixa foram, independentemente, conectadas a um estimulador elétrico que, ao ser acionado, permitia a passagem de uma corrente elétrica que oscilava de maneira irregular ("scrambled shock"), para que não houvesse polarização das barras e consequente insensibilização do choque. O animal era colocado em um dos lados da caixa, e, após um período de 4 min, eram apresentados 30 tons (1,0 kHz, 5 s e 70 dB) (estímulo condicionado) em intervalos variáveis, ao acaso, durando de 10 a 50 s. Cada tom era seguido de um choque de 0,5 mA nas patas (estímulo incondicionado), 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 tivesse emitido a resposta de esquivia ao tom (cruzamento para o outro lado da caixa durante a apresentação do tom), o mesmo era interrompido e a emissão do choque evitada. O número de respostas de esquivia e o número de respostas de cruzamento interprovas (cruzamento da caixa independentemente da apresentação do tom e do choque) foram registrados automaticamente. Os animais foram submetidos à sessão de teste 24 horas após a sessão de treino. A sessão de teste era idêntica ao treino, exceto que o período de habituação foi de 2 min. O aumento no número de respostas de esquivia na sessão de teste em relação à sessão de treino foi

tomado como medida de memória [Carrasco et al., 1982; Izquierdo et al., 1984; Pereira et al., 1988].

II.5.4. Medida do reflexo de retirada da cauda - Foi realizada num aparelho de "tail-flick", descrito por Siegfried e colaboradores (1987a,b). Os ratos eram contidos, usando-se uma toalha de pano, e colocados no aparelho com a cauda imobilizada sobre uma fenda delimitada por duas chapas de acrílico. Uma fonte luminosa fixa estava colocada 2,3 cm rostral à ponta da cauda do animal. O acionamento da fonte luminosa disparava automaticamente um cronômetro digital, e a deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado da lâmpada, ativava uma fotocélula que encerrava a medida (emissão de luz e cronômetro). A intensidade da corrente geradora de luz foi ajustada em 0,35 mA, para obter-se uma latência de retirada da cauda (latência de "tail-flick" ou TFL) de 3 a 5 segundos. Um limite de 10 segundos foi imposto às medidas para evitar danos teciduais aos animais. No dia 1, os animais eram familiarizados com o aparelho de "tail-flick" e manuseados para evitar efeitos da novidade sobre a nocicepção [Dalmaz, 1989; Netto et al., 1987; Vendite et al., 1990]. Ainda neste dia os animais eram submetidos a uma medida de latência de "tail-flick", medida basal. No dia 2, após uma nova medida de base, os animais foram tratados como descrito nos itens III.3.1, III.3.2. e III.3.3..

II.5.5. Comportamento reflexo de geotactismo negativo - Era realizado em uma plataforma de madeira medindo 30 cm de

comprimento por 20 cm de largura, com uma inclinação de 40°. Os ratos eram colocados sobre o centro da plataforma com a face voltada para baixo. Registrava-se o tempo necessário para que o animal virasse com a face para cima. Foram realizadas 8 provas, em 8 dias consecutivos, sendo que cada prova consistia da latência média de 3 sessões consecutivas. Utilizou-se um limite de 60 segundos para cada sessão. A diminuição na latência de virada, reflexo de geotactismo negativo, foi tomada como melhora da resposta reflexa motora [Da-Silva et al., 1990; Rocha et al., 1993].

II.5.6. Teste de alternar espontâneo em um labirinto em T - A resposta de alternar espontâneo foi analisada em uma caixa de madeira no formato de um T, medindo os braços menores 20 cm e o braço maior 34 cm de comprimento. Ambos os braços mediam 8 cm de largura e 20 cm de altura. O espaço comum entre os braços continha 8 X 8 cm. O animal era colocado na extremidade do braço maior, e registrava-se a latência que o mesmo levava para entrar em um dos outros braços (menores). Após a entrada, a abertura do braço era fechada com uma guilhotina de madeira (0,5 cm de espessura), para evitar o retorno do animal. O animal era retirado da caixa e, após um intervalo de 15 segundos, era colocado novamente na extremidade do braço maior, registrando-se novamente o tempo que o mesmo levava para entrar em um dos outros braços. Tal procedimento era repetido por, no máximo, 5 vezes e suspenso assim que o animal alternasse o braço escolhido. Registrava-se desta forma

a prova em que o rato alternou o braço do labirinto e o tempo total necessário para o mesmo [Da-Silva et al., 1990].

## II.6. PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DESCRITAS NOS ITENS II.7. a II.11..

As frações celulares foram preparadas com modificações do método descrito por Gray & Whittaker (1962) e Whittaker e colaboradores (1964).

Para a medida da atividade das enzimas malato e lactato desidrogenase, glicogênio fosforilase e enolase de ratos adultos, o cérebro e o fígado foram dissecados, homogeneizados em 3 volumes de tampão tris-fosfato 10 mM, pH 7,4, contendo  $MgSO_4$  1 mM, em um homogeneizador Potter-Elvehjem. A homogeneização foi realizada com 10 movimentos de vai e vem ("strokes") vagarosos, com o êmbolo girando a uma velocidade de 1300 rpm. O material foi centrifugado a 1200 g em uma centrífuga refrigerada (0-4°C) (Janetzki K-24) por 10 min. A partir desta centrifugação, obteve-se uma solução sobrenadante de baixa velocidade (S1) e um precipitado. O S1 foi centrifugado a 10.000 g por 20 min para obter-se um segundo sobrenadante, S2, e um segundo precipitado, P2 (mitocôndrias, sinaptossomas), que foi ressuspenso na solução de homogeneização. Estas frações foram armazenadas a -20°C por 5 - 10 dias, quando então foram realizados os ensaios enzimáticos.

Para a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase, o cérebro e o cerebelo foram dissecados, pesados e homogeneizados em 10 volumes de tampão tris-HCl 10 mM, pH 7,2,

contendo sacarose 0,16 M. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 g por 10 min em uma centrífuga refrigerada (0-4°C; Janetzki K-24), para obter-se um sobrenadante (S1) e um precipitado. A fração S1 foi usada na determinação da atividade enzimática. O material enzimático foi congelado a -20°C por 1 - 7 dias.

II.7. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPECIFICA DA LACTATO DESIDROGENASE (EC 1.1.1.27; LDH) - Foi monitorada espectrofotometricamente pelo aumento da absorbância a 340 nm a 30°C resultante da formação de NADH [Howland et al., 1980b]. O meio de ensaio continha tampão glicina-KOH 21 mM, pH 10, NAD<sup>+</sup> 0,25 mM, e 250 ou 200 µl de homogeneizado de cérebro (40-70 µg de proteína para ratos adultos e 60-90 µg para ratos jovens) ou fígado (50-80 µg de proteína para ratos adultos e 75-125 µg para ratos jovens), respectivamente. A mistura foi pré-incubada por 3 min, e a reação foi iniciada pela adição de ácido láctico neutralizado (pH 7) com KOH para prover uma concentração final de 500 mM. A reação foi linear por 2 min.

II.8. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPECIFICA DA ENOLASE (EC 4.2.1.11) - Foi analisada pelo aumento da absorbância a 240 nm a 30°C resultante da formação de fosfoenolpiruvato [Howland et al., 1980b]. O meio de ensaio enzimático continha tampão imidazol 10 mM (pH 6,8), MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, KCl 500 mM e 20 ou 50 µl de solução S2 de fígado (0,5-0,8 mg proteína) ou cérebro (0,7-0,9 mg de proteína), respectivamente. Após um período de 3 min de

pré-incubação, a reação foi iniciada por adição de 2-fosfoglicerato para prover uma concentração final de 1 mM. A reação foi linear por 2 min. A atividade da enolase não foi estudada em ratos jovens.

II.9. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA MALATO DESIDROGENASE (EC 1.1.1.37; MDH) - Foi analisada pelo aumento da absorbância a 340 nm, pela formação de NADH [Wolfe & Neilands, 1955] em um meio contendo tampão glicina-KOH 10 mM (pH 10),  $\text{NAD}^+$  2,5 mM e ácido málico 100 mM neutralizado (pH 7) com KOH. Esta mistura foi incubada por 5 min a 25°C, e a reação foi iniciada pela adição de 20 ou 50  $\mu\text{l}$  da solução P2 de fígado (40-70  $\mu\text{g}$  de proteína) ou cérebro (50-80  $\mu\text{g}$  de proteína), respectivamente. A reação foi linear por 3 min. Em ratos jovens, a atividade da malato desidrogenase foi estudada em homogeneizado de fígado (50  $\mu\text{l}$ , 60-90  $\mu\text{g}$  de proteína) e cérebro (50  $\mu\text{l}$ , 75-125  $\mu\text{g}$  de proteína).

II.10. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA GLICOGÊNIO FOSFORILASE (EC 2.4.1.1) - O material enzimático (100  $\mu\text{l}$  de homogeneizado de fígado, 1-2 mg de proteína) era incubado a 37°C por 30 min em um meio contendo tampão fosfato de potássio 13 mM (pH 7,5),  $\text{MgCl}_2$  0,084 mM, 8 mg/ml de glicogênio. A reação era interrompida pela adição de HCl de maneira a obter-se uma concentração final de 1,5 M. A seguir, os tubos eram colocados em gelo por 20 min, centrifugados a 2.000 rpm por 10 min (centrifuga clínica), e uma alíquota de 50  $\mu\text{l}$  era transferida para outro tubo juntamente com 0,45 ml de água

destilada e 2,0 ml de Reagente de Iodo (Krisman, 1962). Para análise da atividade da fosforilase a além da fosforilase b, AMPc foi adicionado ao meio de incubação de maneira a obter-se uma concentração final de 0,2 mM. A atividade da enzima é apresentada como mg de glicogênio hidrolisado por hora por mg de proteína [Long, 1961].

II.11. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPECIFICA DA ACETILCOLINESTERASE (EC 3.1.1.7; AChE)- A atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo foi analisada seguindo-se uma modificação do método de Ellman e colaboradores (1961), como descrito por Villescas e colaboradores (1981). O método baseava-se em medir o aumento da absorbância a 412 nm a 25°C conseqüente da formação de um ânion amarelo, o ácido 5-tio-2-nitro-benzóico. O meio de análise continha ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1 mM, tampão fosfato de potássio 24 mM (pH 7,2), acetiltiocolina 0,8 mM, etopropazina 0,1 mM (inibidor específico da butirilcolinesterase, EC 3.1.1.8) e 50 µl de material enzimático (S1, 0,2-0,4 mg de proteína de cérebro ou cerebelo). Para o estudo da atividade das colinesterases de soro, foi utilizado tampão fosfato de potássio 0,2 M no meio de incubação e 50 µl de soro. Após um período de 2 min de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de acetiltiocolina. A reação era linear por 2 min. No estudo dos parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase de cérebro, foram utilizadas outras concentrações de substrato. A atividade específica da enzima cerebral e cerebelar foi

analisada em fração S1 (ver página 28, item II.6) e expressa como  $\mu\text{mol}$  de acetiltiocolina hidrolisado por hora por mg de proteína. Para soro, a atividade foi expressa como nmol de substrato hidrolisado por hora por ml de soro.

II.12. MEDIDA DO CONTEUDO DE GLICOGÊNIO DE FIGADO E MÚSCULO ESQUELETICO - O glicogênio era extraído do tecido (fígado e músculo) a quente em 10 volumes de KOH a 30 % (peso/volume), durante 10 min. Após este período, os tubos eram colocados em gelo por 5 min. Um ml desta mistura era transferido para outro tubo com 1 ml de etanol (95 %). Após agitação, os tubos eram colocados em banho-maria a 70°C por 10 min, esfriados em gelo (10 min) e centrifugados a 2.000 rpm por 10 min (centrífuga clínica). O sobrenadante era desprezado, e o precipitado ressuspensionado em 0,2 ml de HCl 5 N e 3,8 ml (fígado) ou 0,8 ml (músculo) de água destilada. O conteúdo de glicogênio obtido pela extração foi quantificado pelo Reagente de Iodo (Krisman, 1962).

II.13. MEDIDA DOS NIVEIS DE GLICOSE SANGUINEA - Níveis de glicose sérica foram medidos usando o reagente da orto-toluidina, segundo o método de Cooper & McDaniel (1970).

II.14. DOSAGEM DE PROTEINA - Proteínas tanto teciduais como séricas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), usando Coomassie Brilhante Azul G como reagente de cor e albumina bovina como proteína padrão.

## II.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram comparados por análise de variância de uma via ou por análise de variância de duas ou três vias para amostras dependentes ou independentes, conforme o caso [Bruning & Kintz, 1968; Dayton, 1970; Sokal & Rohlf, 1969]. Quando o valor de F foi significativo (pelo menos para  $p < 0,05$ ), compararam-se os grupos pelo teste de Duncan ou teste t de Student para amostras independentes, ou pelo teste F para efeito simples e teste t de Student para amostras dependentes, de acordo com o apropriado [Bruning & Kintz, 1968].

Os dados comportamentais que utilizam teto como parâmetro de desempenho (esquiva inibitória, latência de geotactismo e de "tail-flick" e comportamento de alternar espontâneo), por não apresentarem distribuição normal, foram transformados em seus logarítimos, antes de ser feita a análise de variância, e apresentados nas tabelas e figuras como valores reais [Sokal & Rohlf, 1969].

Para análise, foi utilizado o programa de estatística SPSS/PC-plus em um microcomputador.

Os cálculos de regressão linear para as representações gráficas de Lineweaver e Burk e de Dixon foram realizadas em uma calculadora programável.

### III. RESULTADOS

#### III.1. ESTUDO DE UM MODELO DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS GLICOLITICAS

Dados da literatura têm demonstrado que a intoxicação de ratos adultos com 2,5-hexanodiona induz redução no ganho de peso ou mesmo perda de peso corporal [Anthony et al., 1983a,b; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio & O'Neill, 1985; Horan et al., 1989; Ladefoged et al., 1989; Larsen et al., 1991]. A maioria destes estudos utilizou doses do hexacarbono que variaram de 300 a 400 mg/kg [Anthony et al., 1983b; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio & O'Neill, 1985; Horan et al., 1989; Ladefoged et al., 1989; Larsen et al., 1991] e/ou a via oral como forma de administração, sendo a droga diluída na água, como única fonte de ingestão líquida [Anthony et al., 1983a; DeCaprio & O'Neill, 1985; Ladefoged et al., 1989; Larsen et al., 1991]. Não se tem resultados, por exemplo, do efeito destes compostos sobre o peso de órgãos nem sobre a relação entre a perda de peso corporal e a ingestão alimentar. Um outro ponto em questão é a inexistência de dados na literatura relacionados à intoxicação de animais jovens.

Tem-se sugerido que a ação neurotóxica de alguns hexacarbonos poderia estar associada a uma deficiência do metabolismo da glicose [Howland et al., 1980b; Sabri et al., 1979]. Nestes estudos, os autores demonstraram que a atividade de enzimas como a enolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de cérebro de ratos é inibida "in vitro" por

hexanodiona [Howland et al., 1980b; Sabri et al., 1979].

Tendo-se em vista os pontos levantados acima, este bloco de experimentos tem como objetivos estudar diversos parâmetros físicos e bioquímicos relacionados ao estado geral de ratos adultos e jovens, quando intoxicados com a 2,5-hexanodiona. Além disso, estudou-se o efeito da exposição prolongada à 2,5-hexanodiona sobre a atividade das enzimas enolase, malato e lactato desidrogenase de fígado e de cérebro e da glicogênio fosforilase de fígado destes animais.

#### III.1.1. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o peso corporal, peso de cérebro e de fígado e sobre o consumo de água e comida em ratas adultas

Ratas de 60-65 dias de idade, pesando 145-170 g, mantidas por 20 dias em grupos de 2 por caixa, foram tratadas com veículo, 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona ou 207 mg/kg de 1,6-hexanodiol, por via subcutânea (sc), entre 10:00 e 13:00 horas, por 40 dias. As doses dos hexacarbonos foram equimolares. O peso corporal e a ingestão de água e comida foram medidos em intervalos de 6 dias. Como os animais foram agrupados em 2 por caixa, cada caixa constituiu uma amostra. Após 40 dias de tratamento, os animais foram mortos por decapitação e cérebro e fígado dissecados e pesados.

##### III.1.1.1. Ganho de Peso Corporal

A análise de variância de duas vias considerando o peso em cada intervalo de tratamento como medida repetida (3

tratamentos X 7 medidas) revela que o tratamento com a 2,5-hexanodiona prejudica significativamente o ganho de peso corporal [ $F(2,35) = 3,38, p < 0,05$ ]. A análise também mostra efeito significativo das medidas [ $F(6,214) = 314,7, p < 0,0001$ ] e interação significativa entre tratamento X medida [ $F(12,214) = 11,67, p < 0,0001$ ]. A interação foi significativa devido ao fato de que, apesar de todos os grupos apresentarem aumento de peso corporal com o passar do tempo, os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram um ganho de peso inferior ao apresentado pelos demais grupos (figura 1). A análise de variância de uma via comparando os grupos em cada intervalo de tratamento revela que, a partir do 18<sup>o</sup> dia de tratamento, há diferença significativa entre os grupos pelo menos para  $p < 0,02$ .

#### III.1.1.2. Peso de cérebro e de fígado

Os resultados do peso corporal e do peso de cérebro e fígado são apresentados na tabela I. A análise de variância de uma via revela efeito significativo do tratamento no peso de cérebro [ $F(2,21) = 5,19, p < 0,02$ ], mas não no peso de fígado. Estes resultados demonstram que, em paralelo a uma diminuição no ganho de peso corporal, os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentam menor peso de cérebro que os demais grupos. O tratamento com o hexacarbono não neurotóxico, 1,6-hexanodiol, como era de se esperar, não alterou nenhuma destas medidas.

#### III.1.1.3. Ingestão sólida e líquida

Os resultados da ingestão de comida e água são apresentados nas figuras 2 e 3, respectivamente. O controle de ingestão foi realizado a cada 6 dias, sendo apresentado como a quantidade de comida (g) ou água (ml) ingerida por 100 g de peso corporal por dia. A primeira medida, dia 0, foi realizada nos últimos 6 dias anteriores ao início do tratamento.

#### III.1.1.3.1. Ingestão sólida

A análise de variância de duas vias considerando a ingestão em cada intervalo de tratamento como medida repetida (comparando 3 tratamentos X 7 medidas, sendo a primeira medida aquela imediatamente anterior ao início do tratamento) demonstra efeito significativo do tratamento [ $F(2,17) = 5,26$ ,  $p < 0,02$ ] e efeito da medida [ $F(6,102) = 19,03$ ,  $p < 0,001$ ]. Não houve interação significativa entre tratamento X medida. Analisando o efeito do tratamento em cada medida, a análise de variância de uma via revela que em nenhuma medida houve diferença significativa entre os grupos. Diferença significativa só foi encontrada comparando-se a soma das medidas (total de ingestão em 6 medidas) a partir do início do tratamento [ $F(2,17) = 4,02$ ,  $p < 0,04$ ], causada pelo consumo maior de comida apresentado pelos animais tratados com 1,6-hexanodiol (tabela II).

#### III.1.1.3.2. Ingestão líquida

A análise de variância de duas vias considerando a ingestão em cada intervalo de tratamento como medida repetida

(3 tratamentos X 7 medidas) revela efeito significativo do tratamento [ $F(2,10) = 12,22, p < 0,002$ ] e da medida [ $F(6,60) = 4,74, p < 0,001$ ]. Não houve interação significativa entre tratamento X medida. Considerando o efeito do tratamento em cada medida, a análise de variância de uma via revela que, com exceção do dia 0 (sem droga), em todas as demais medidas houve efeito significativo do tratamento pelo menos para  $p < 0,01$ , devido a um maior consumo de água apresentado pelo grupo tratado com 2,5-hexanodiona. Como consequência, a soma das medidas a partir do início do tratamento apresentou efeito significativo do tratamento no consumo de água [ $F(2,10) = 12,98, p < 0,002$ ] (tabela II).

Estes resultados demonstram que a diminuição no ganho de peso corporal apresentado pelos animais tratados com 2,5-hexanodiona não está relacionada a uma diminuição no consumo de comida ou água, uma vez que o tratamento com 2,5-hexanodiona não diminuiu a ingestão de comida e provocou um aumento na ingestão de água apresentada por estes animais.

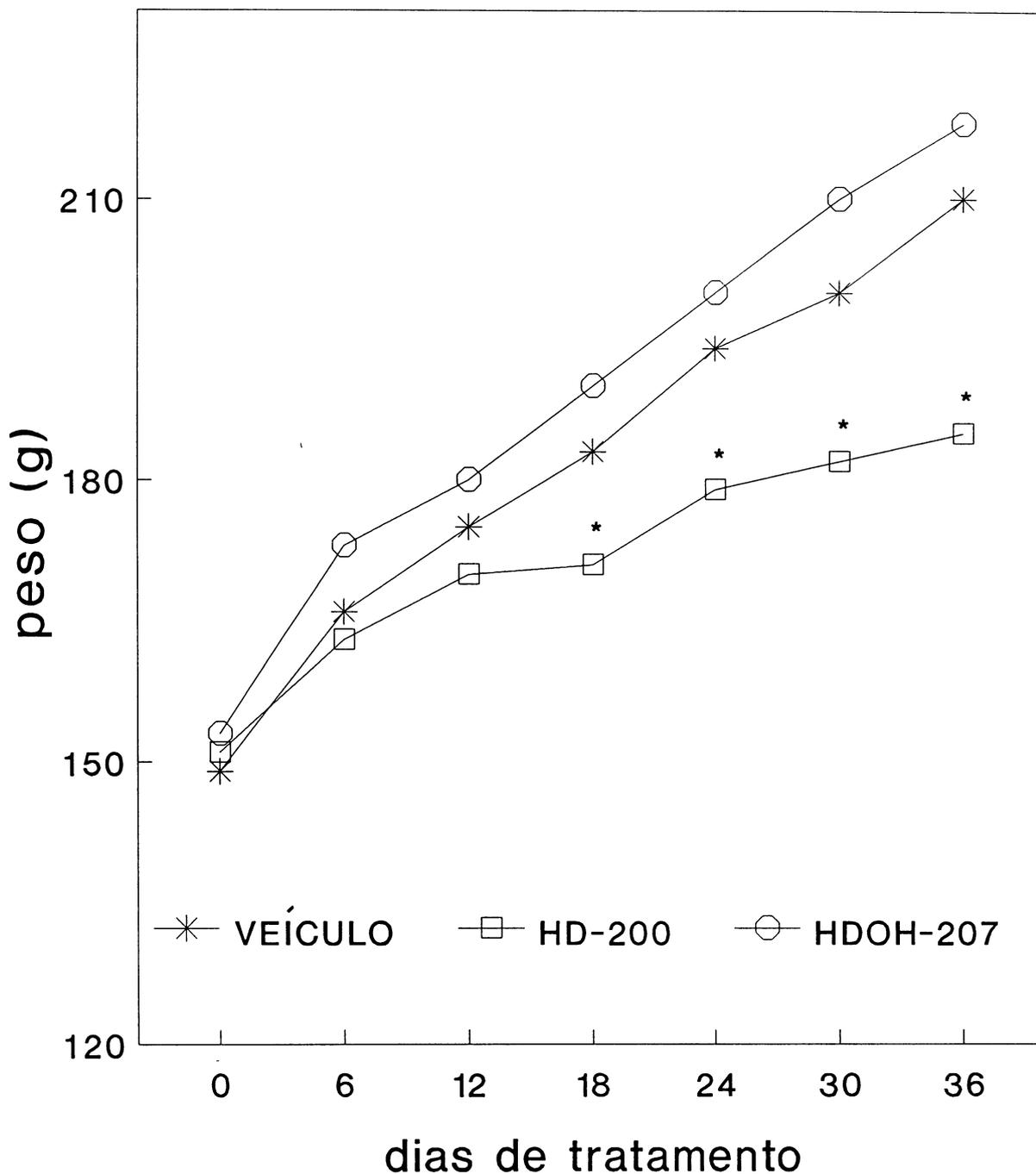


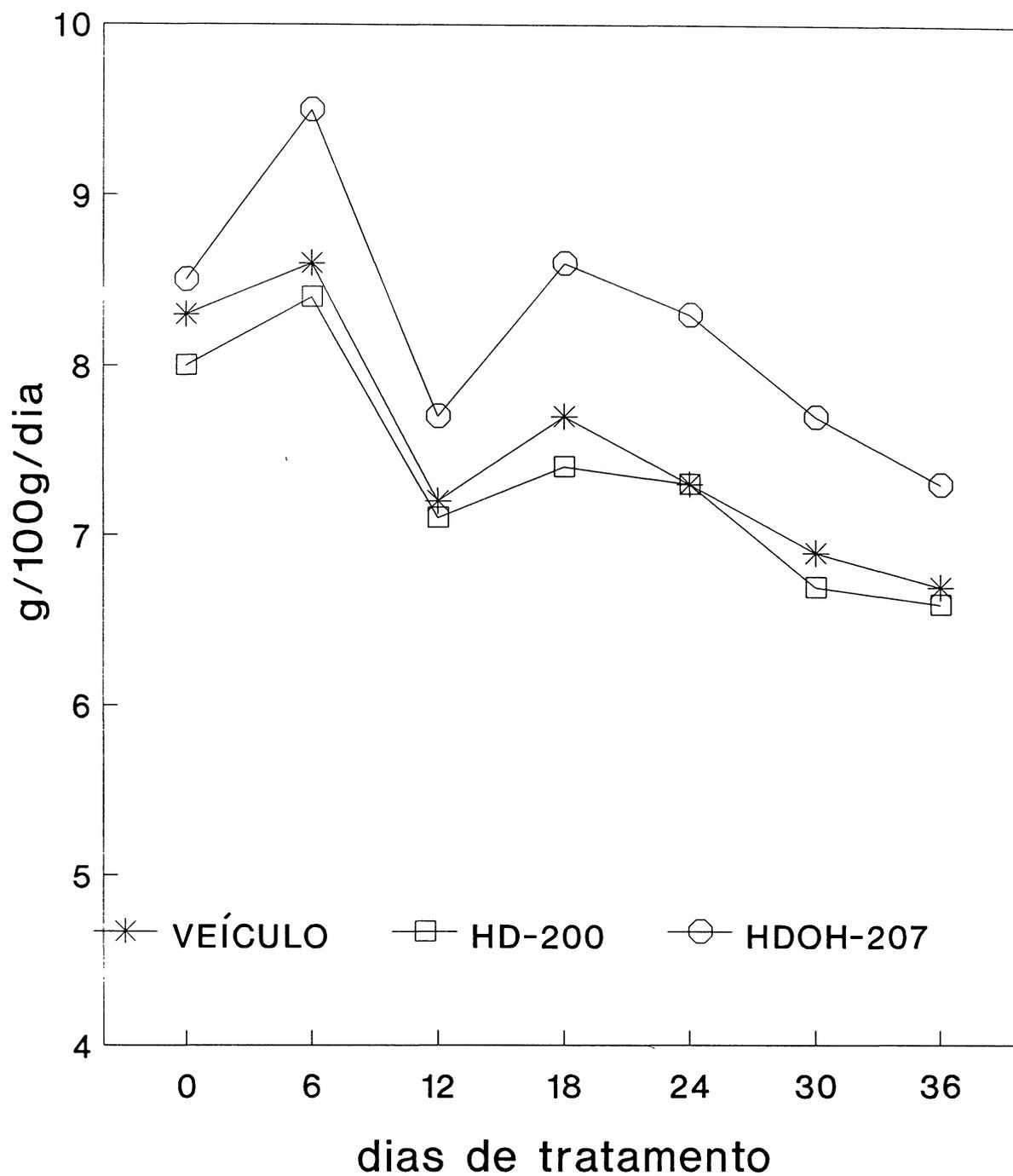
FIGURA 1. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DE RATAS ADULTAS. Animais com 60 a 65 dias de vida foram tratados por 40 dias com veiculo, 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200) ou 207 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-207), sc. Os resultados sao apresentados como média de 12 a 14 animais por grupo (erro padrao inferior a 5 % da média). Teste de raio múltiplo de Duncan: \*  $p < 0,05$ , quando comparado aos demais grupos.

TABELA I. PESO CORPORAL, PESO DE CEREBRO E DE FIGADO DE RATAS ADULTAS TRATADAS, POR 40 DIAS, COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

TRATAMENTO	N	P E S O ( g )		
		CORPORAL	CEREBRAL	HEPATICO
Veículo	7	213,6 ± 6,3	1,17 ± 0,01	7,1 ± 0,5
HD-200	9	186,7 ± 6,0*	1,08 ± 0,02*	6,8 ± 0,3
HDOH-207	8	218,7 ± 10,1	1,15 ± 0,02	7,6 ± 0,6

Os animais foram tratados como descrito na figura 1. Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão do peso em gramas. N = número de animais por grupo.

Teste de raio múltiplo de Duncan: \* p<0,05, quando comparado aos demais grupos.



**FIGURA 2. INGESTAO SOLIDA APRESENTADA POR RATAS ADULTAS TRATADAS PROLONGADAMENTE COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.** As ratas foram tratadas como descrito na figura 1. Os resultados sao apresentados como a média (6-7 amostras) da quantidade (g) de comida ingerida por 100 g de peso corporal por dia (erro padrao inferior a 10 % do valor da média). Nao houve diferença significativa entre os grupos na mesma medida (análise de variância de uma via).

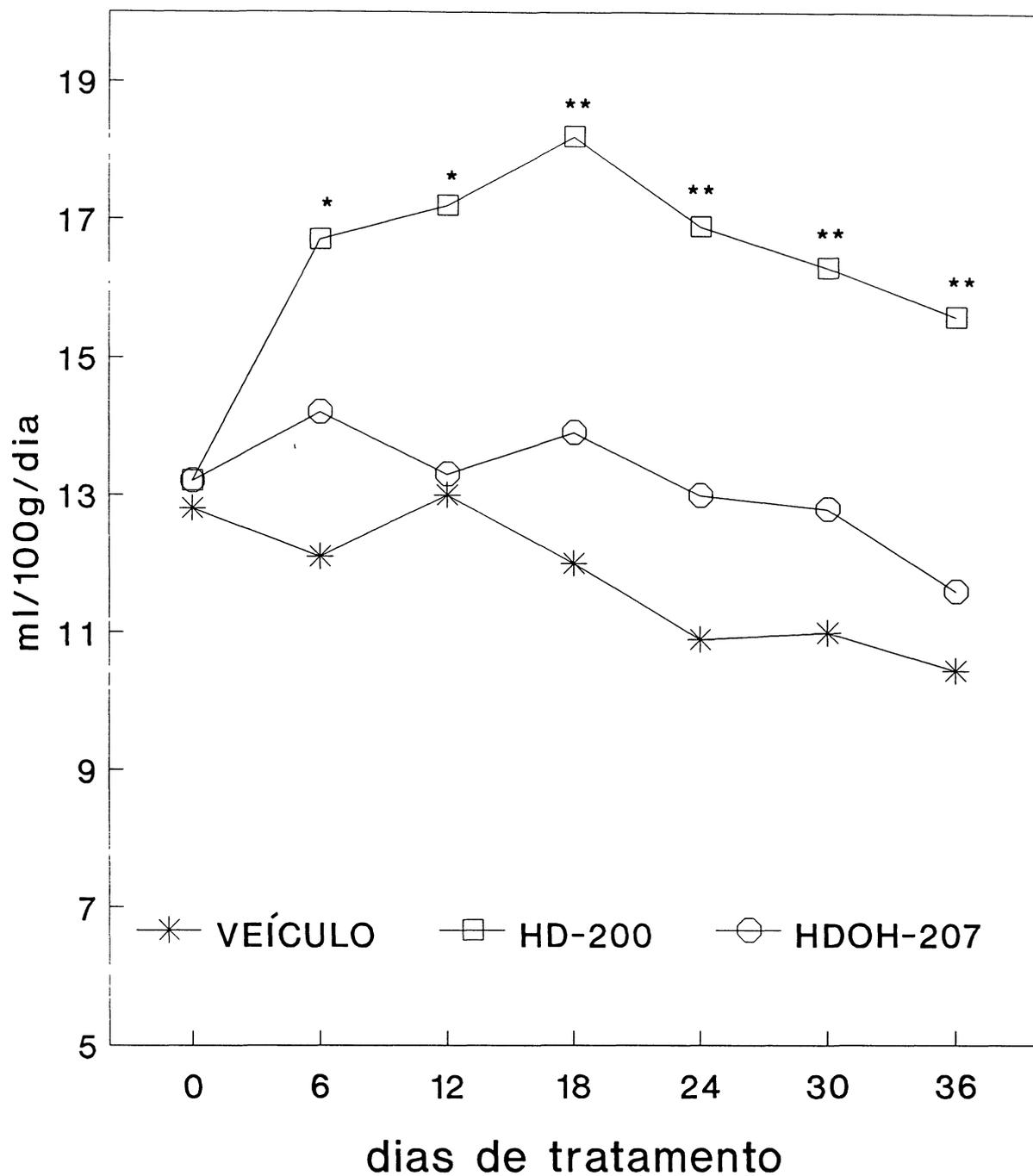


FIGURA 3. INGESTAO LIQUIDA APRESENTADA POR RATAS ADULTAS TRATADAS PROLONGAMENTE COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA. As ratas foram tratadas como descrito na figura 1. Resultados sao apresentados como a média (4-5 amostras) da quantidade (ml) de água ingerida por 100 g de peso corporal por dia (erro padrao inferior a 10 % do valor da média). Teste de raio múltiplo de Duncan: \*p<0,05, \*\* p<0,01, quando comparado aos demais grupos na mesma medida.

TABELA II. INGESTAO SOLIDA E LIQUIDA DE RATAS ADULTAS TRATADAS PROLONGADAMENTE COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

	INGESTAO SOLIDA		INGESTAO LIQUIDA	
	g / 100 g / 6 dias	N	ml / 100 g / 6 dias	N
Veículo	44,36 ± 1,51	7	69,37 ± 4,58	4
HD-200	43,54 ± 1,77	7	101,22 ± 5,86**	4
HDOH-207	49,32 ± 1,06*	6	78,78 ± 2,89	5

As ratas foram tratadas como descrito na figura 1. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da soma de 6 medidas (a cada 6 dias de tratamento) da quantidade de comida e água ingerida por 100 g de peso corporal por dia. N = número de animais por grupo.

Teste de raio múltiplo de Duncan: \* p<0,05, \*\* p<0,01, quando comparado aos demais grupos.

### III.1.2. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre alguns parâmetros bioquímicos e sobre a atividade de enzimas glicolíticas de cérebro e fígado de ratas adultas

Ao final dos 40 dias de tratamento com veículo, 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona ou 207 mg/kg de 1,6-hexanodiol, os animais foram mortos por decapitação e os cérebros e fígados foram removidos e pesados. Uma alicota foi removida de cada fígado e do músculo gastrocnêmio e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise do conteúdo de glicogênio (ver material e métodos). O sangue foi coletado e centrifugado por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e 1000 g e o soro foi usado para a medida dos níveis de glicose e de proteína sérica. As frações de tecido cerebral e hepático para os ensaios enzimáticos, preparadas como descrito em material e métodos, foram: homogeneizado para a LDH e glicogênio fosforilase, S2 para a enolase e P2 para a MDH.

#### III.1.2.1. Níveis séricos de glicose e proteína e conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A análise de variância de uma via revela que o tratamento com 2,5-hexanodiona por 40 dias não alterou os níveis glicêmicos nem o nível de proteína sérica (tabela III). Quanto ao conteúdo de glicogênio, a análise de variância de uma via revela efeito significativo do tratamento no conteúdo de glicogênio de fígado [ $F(2,21) = 3,19, p < 0,02$ ], mas não no de músculo esquelético. O efeito do tratamento sobre o conteúdo de glicogênio hepático foi devido ao fato de que o grupo de ratos tratados com 1,6-hexanodiol apresentou aumento

significativo nos níveis de glicogênio. Este efeito deve estar relacionado ao aumento no consumo de comida apresentado por estes animais (ver figura 2).

#### III.1.2.2. Atividade específica das enzimas enolase, malato e lactato desidrogenase de cérebro e fígado e glicogênio fosforilase de fígado

A análise de variância de uma via das atividades específicas das enzimas estudadas demonstra que o tratamento com 2,5-hexanodiona, na dose utilizada, não alterou a atividade específica de nenhuma das enzimas. A análise de variância de duas vias da atividade da glicogênio fosforilase considerando a atividade na ausência e presença de AMPc como medida dependente (3 tratamentos: veículo, 2,5-hexanodiona e 1,6-hexanodiol X 2 medidas: com ou sem AMPc) revela que a presença de AMPc aumenta a atividade da enzima em todos os grupos [ $F(1,14) = 39,72, p < 0,001$ ] (tabela IV).

Estes resultados demonstram que a perda de peso corporal apresentada pelos animais tratados com 2,5-hexanodiona não está relacionada à ingestão alimentar e não foi acompanhada por alterações na atividade das enzimas estudadas. Porém, estes resultados também não descartam a possibilidade de um possível efeito passageiro ou mesmo ainda não atingido no intervalo de tratamento utilizado.

TABELA III. NIVEIS DE GLICOSE E DE PROTEINA SERICA E CONTEUDO DE GLICOGÊNIO DE FIGADO E DE MÚSCULO ESQUELETICO DE RATAS ADULTAS TRATADAS CRONICAMENTE COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

	Veículo	HD-200	HDOH-207
GLICOSE (mg/100 ml de soro)	119,5 ± 6,8 (8)	111,5 ± 2,2 (9)	118,8 ± 2,6 (8)
PROTEINA (g/100 ml de soro)	8,0 ± 0,4 (7)	7,2 ± 0,8 (6)	-----
GLICOGÊNIO (g/100 g de tecido)			
FIGADO	5,9 ± 0,6 (7)	6,0 ± 0,6 (9)	9,0 ± 1,1* (8)
MÚSCULO	1,8 ± 0,4 (7)	1,2 ± 0,1 (9)	1,7 ± 0,4 (8)

As ratas foram tratadas como descrito na figura 1. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. Número de animais por grupo apresentado entre parênteses.

Teste de raio múltiplo de Duncan: \* p<0,05, quando comparado aos demais grupos.

TABELA IV. ATIVIDADE ESPECIFICA DAS ENZIMAS ENOLASE, LDH E MDH DE CEREBRO E FIGADO E GLICOGÊNIO FOSFORILASE DE FIGADO DE RATAS ADULTAS TRATADAS CRONICAMENTE COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

	Veiculo	2,5-hexanodiona	1,6-hexanodiol
Cérebro			
LDH	0,30 ± 0,02 (5)	0,30 ± 0,02 (5)	0,27 ± 0,01 (5)
Enolase	4,57 ± 0,34 (8)	4,75 ± 0,31 (9)	4,64 ± 0,31 (8)
MDH	2,11 ± 0,17 (8)	2,22 ± 0,33 (8)	2,40 ± 0,31 (8)
Fígado			
LDH	0,39 ± 0,03 (6)	0,36 ± 0,01 (6)	0,42 ± 0,03 (5)
Enolase	2,82 ± 0,62 (8)	3,92 ± 0,34 (9)	3,44 ± 0,27 (8)
MDH	0,46 ± 0,03 (8)	0,52 ± 0,02 (9)	0,45 ± 0,02 (8)
glicogênio fosforilase			
---	0,70 ± 0,03 (6)	0,64 ± 0,09 (8)	0,58 ± 0,11 (7)
AMPC	0,78 ± 0,05* (6)	0,76 ± 0,09* (8)	0,79 ± 0,12* (7)

As ratas foram tratadas como descrito na figura 1. Os dados são apresentados como média ± erro padrão do número de amostras analisadas, mostrado entre parênteses. As atividades da LDH e MDH são expressas como μmol de NADH formado por min por mg proteína a 25°C (MDH) ou 30°C (LDH) e pH 10. A atividade da enolase é expressa como μmol de fosfoenolpiruvato formado por hora por mg proteína a 30°C e pH 6,8. A atividade da glicogênio fosforilase é apresentada como mg de glicogênio hidrolisado por hora por mg de proteína a 37°C e pH 7,5.

Teste t de Student para amostras dependentes: \* p<0,05, comparado a atividade sem AMPC.

### III.1.3. Efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre o peso corporal e sobre alguns parâmetros bioquímicos em ratos jovens

No experimento anterior, verificou-se que o tratamento com a 2,5-hexanodiona induz uma redução no ganho de peso corporal de ratos adultos. Também constatou-se que o efeito sobre o peso corporal não estava relacionado à ingestão alimentar nem tão pouco à atividade das enzimas estudadas. Neste estudo, investigou-se as enzimas LDH, MDH e glicogênio fosforilase de animais jovens tratados com 2,5-hexanodiona, em uma dose maior do que aquela utilizada para ratos adultos. Além dos efeitos sobre a atividade destas enzimas, investigou-se também o efeito do tratamento sobre os demais parâmetros analisados para ratos adultos.

A partir do 4<sup>o</sup> dia de vida, os ratos foram tratados com veículo, 200 ou 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona ou 207 ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol, sc. As doses dos hexacarbonos foram equimolares. Os animais foram pesados diariamente para o ajuste da dose. Os animais foram mortos aos 5, 8, 16, 25 ou 36 dias de tratamento para a análise do peso de cérebro e fígado, glicemia e conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

Uma alíquota foi removida de cada fígado e do músculo gastrocnêmio e armazenada a -20°C até o momento das dosagens do conteúdo de glicogênio (ver material e métodos). O sangue foi coletado e centrifugado por 10 min a 4°C e 1000 g e o soro foi usado para a análise dos níveis de glicose sanguínea.

Para o estudo das enzimas LDH, MDH e glicogênio

fosforilase, foram utilizados ratos tratados com as doses maiores dos hexacarbonos por 36 dias. As atividades específicas das enzimas foram analisadas em homogeneizado, que, após preparado, foi armazenado por 5-10 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Como a atividade da malato desidrogenase foi analisada em homogeneizado e não em P2, como realizado com ratos adultos, mediu-se então a soma das atividades da malato desidrogenase intra- e extra-mitochondrial e enzima málica (extra-mitochondrial).

#### III.1.3.1. Ganho de peso corporal

O efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona sobre o peso corporal é apresentado na figura 4. A análise de variância de duas vias considerando o peso em cada intervalo de tratamento com medida dependente (5 tratamentos X 12 medidas) revela efeito significativo do tratamento [ $F(4,74) = 52,78, p < 0,0001$ ], efeito significativo da medida [ $F(11,814) = 4380,11, p < 0,0001$ ] e interação significativa entre tratamento X medida [ $F(44,814) = 34,77, p < 0,0001$ ]. A interação foi devido ao fato de que apesar de todos os grupos apresentarem um aumento significativo do peso corporal com o passar dos dias (efeito da medida), nos animais tratados com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona, o ganho de peso corporal foi menor do que o apresentado pelos demais grupos. A análise de variância de uma via comparando o efeito do tratamento em cada medida (intervalo de tratamento) revela diferença significativa entre os grupos a partir do 7<sup>o</sup> dia de tratamento, pelo menos para  $p < 0,003$ .

### III.1.3.2. Peso de fígado, cérebro e razão entre o peso de órgão e peso corporal

O peso de cérebro e fígado e a razão órgão/corpo são apresentados nas figuras 5 e 6 e tabela V, respectivamente.

A análise de variância de duas vias para amostras independentes do peso de cérebro e fígado (5 tratamentos X 5 intervalos de tratamento) revela efeito significativo do tratamento [cérebro,  $F(4,153) = 98,50$ ,  $p < 0,001$ ; fígado,  $F(4,153) = 20,73$ ,  $p < 0,001$ ], efeito significativo do crescimento [cérebro,  $F(4,153) = 434,81$ ,  $p < 0,001$ ; fígado,  $F(4,153) = 563,58$ ,  $p < 0,001$ ] e interação significativa entre tratamento X crescimento [cérebro,  $F(16, 153) = 3,61$ ,  $p < 0,0001$ ; fígado,  $F(16,153) = 3,99$ ,  $p < 0,0001$ ]. A interação foi significativa, uma vez que apesar de todos os grupos apresentarem um aumento significativo no peso tanto de cérebro como de fígado, este aumento foi menor nos animais tratados com ambas as doses de 2,5-hexanodiona. A análise de variância de uma via, comparando os grupos em cada intervalo de tratamento, demonstra que, a partir de 16 dias de tratamento, há diferença significativa entre os grupos tanto para o peso de cérebro, como para o peso de fígado, pelo menos para  $p < 0,001$ .

A análise de variância de duas vias comparando a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal, considerando todos os intervalos de tratamento, demonstra que o tratamento interferiu significativamente na razão fígado/corpo [ $F(4,159) = 4,89$ ,  $p < 0,001$ ], mas não na razão cérebro/corpo. A análise

também revela que, com o passar dos dias, a razão peso cérebro/corpo diminui [ $F(4,166) = 574,21, p < 0,001$ ] e a razão fígado/corpo aumenta significativamente [ $F(4,159) = 131,18, p < 0,001$ ]. A análise de variância de uma via, comparando o efeito do tratamento em cada intervalo de intoxicação, revela que há diferença significativa entre os grupos aos 25 dias de tratamento na relação fígado/corpo para  $p < 0,002$ .

#### III.1.3.3. Níveis de glicose sanguínea

A análise de variância de uma via dos níveis de glicose sanguínea, comparando os grupos em cada intervalo de tratamento, demonstra que somente aos 8 dias de tratamento houve diferença significativa entre os grupos [ $F(4,37) = 3,81, p < 0,01$ ]. Esta diferença deveu-se ao fato de que os animais tratados com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona apresentaram glicemia menor que os demais grupos (tabela VI). Como nos demais intervalos de tratamento não verificou-se este efeito, pode-se sugerir que a diminuição na glicemia seja um efeito passageiro, desaparecendo com o decorrer do tratamento; este efeito não deve estar relacionado à deficiência no ganho de peso, uma vez que, com a continuidade do tratamento, aumenta a diferença de peso entre os grupos, mas não se verifica o efeito sobre a glicemia.

#### III.1.3.4. Conteúdo de glicogênio hepático e muscular

O conteúdo de glicogênio de fígado e músculo esquelético foram dosados aos 8, 16 e 25 dias de tratamento. A análise de variância de uma via revela que não há diferença significativa

entre os grupos em nenhum dos intervalos de tratamento estudados, tanto para o glicogênio muscular como para o hepático (tabela VII).

#### III.1.3.5. Atividade das enzimas glicolíticas

As atividades específicas das enzimas glicolíticas foram analisadas somente em animais tratados por 36 dias com as doses maiores dos hexacarbonos.

A atividade específica da malato desidrogenase é apresentada na figura 7. A análise de variância de uma via comparando os tratamentos revela que o tratamento com 2,5-hexanodiona não alterou significativamente a atividade da enzima de fígado e cérebro.

Para a atividade da lactato desidrogenase, a análise de variância demonstra que a atividade desta enzima no cérebro não foi influenciada pelo tratamento, enquanto que para a enzima de fígado verificou-se diferença significativa entre os grupos [ $F(2,17) = 5,38, p < 0,02$ ]. Este efeito foi devido a uma redução de 22 % na atividade específica da LDH de ratos tratados com 2,5-hexanodiona (figura 8).

Quanto à glicogênio-fosforilase (figura 9), a análise de variância de duas vias, comparando 3 tratamentos (veículo, 2,5-hexanodiona e 1,6-hexanodiol) X 2 tratamentos "in vitro" (com e sem AMPc), considerando o tratamento "in vitro" como medida dependente, revelou efeito do AMPc [ $F(1,17) = 8,71, p < 0,009$ ], mas não houve efeito significativo do tratamento nem interação entre tratamento X tratamento "in vitro".

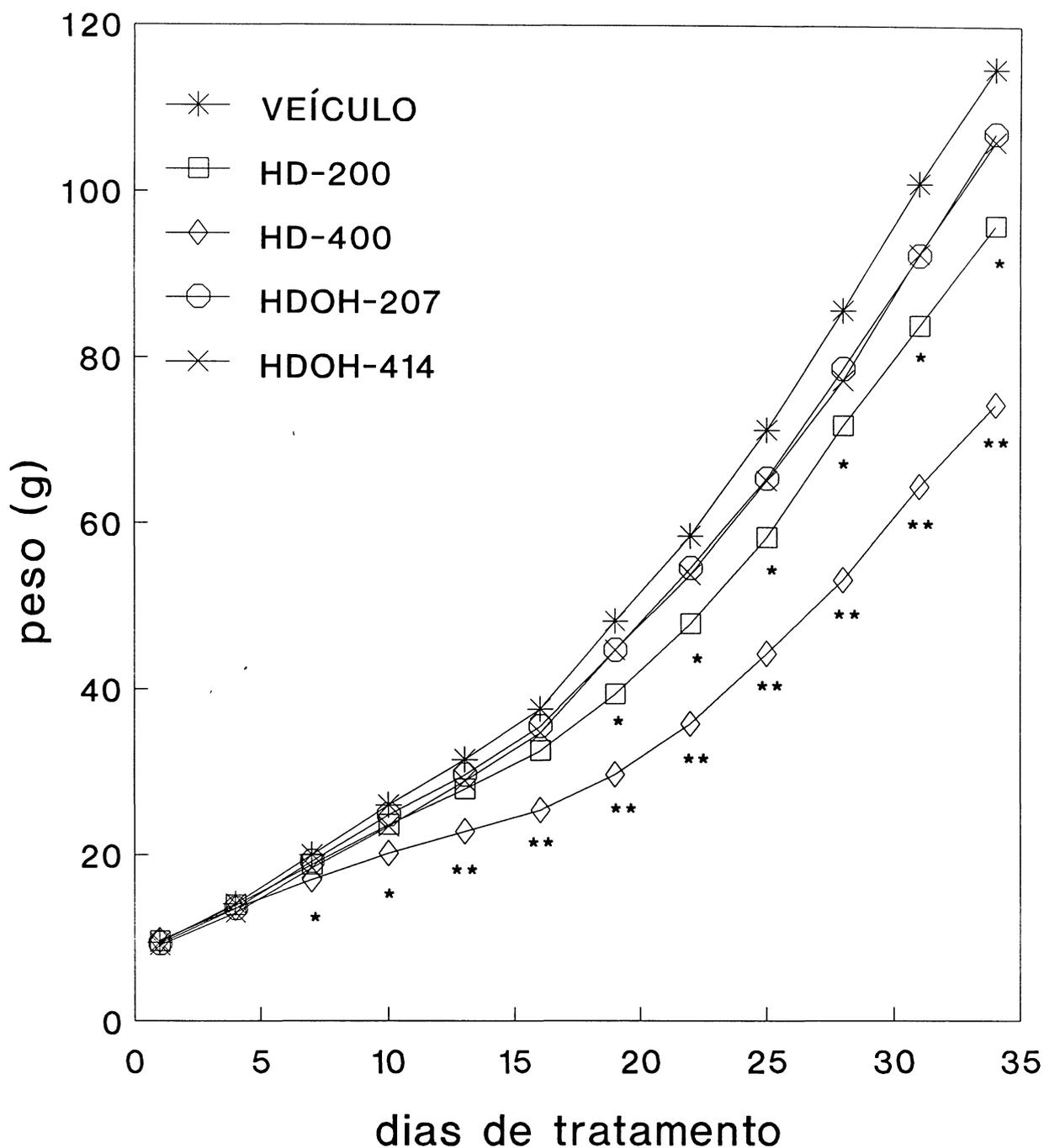


FIGURA 4. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL DE RATOS JOVENS. Os animais foram tratados com veículo, 200 ou 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200 ou HD-400) ou 207 ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-207 ou HDOH-414), sc, diariamente. Os dados são apresentados como média do peso corporal de 13-18 animais por grupo (erro padrão inferior a 4 % do valor da média). Teste de raio múltiplo de Duncan: \* p<0,05, \*\* p<0,01, comparado aos demais grupos.

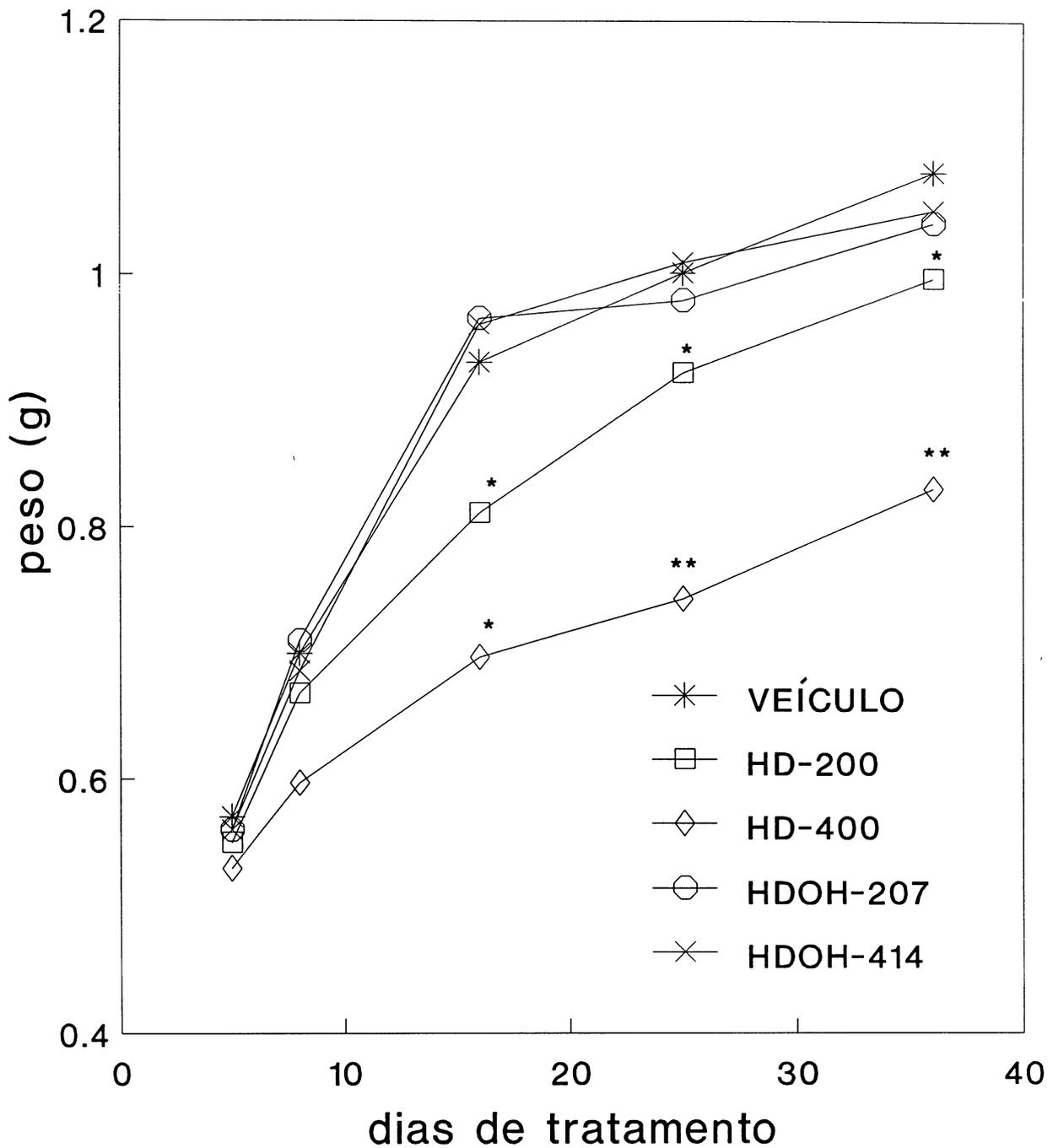


FIGURA 5. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE O PESO DE CEREBRO DE RATOS JOVENS. Os animais foram tratados como descrito na figura 4 por 5, 8, 16, 25 ou 36 dias e mortos 24 horas após a última dose. Os resultados são apresentados como média de 6-12 animais por grupo, sendo o erro padrão menor que 5 % do valor da média. Teste de raio múltiplo de Duncan: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , comparado aos demais grupos.

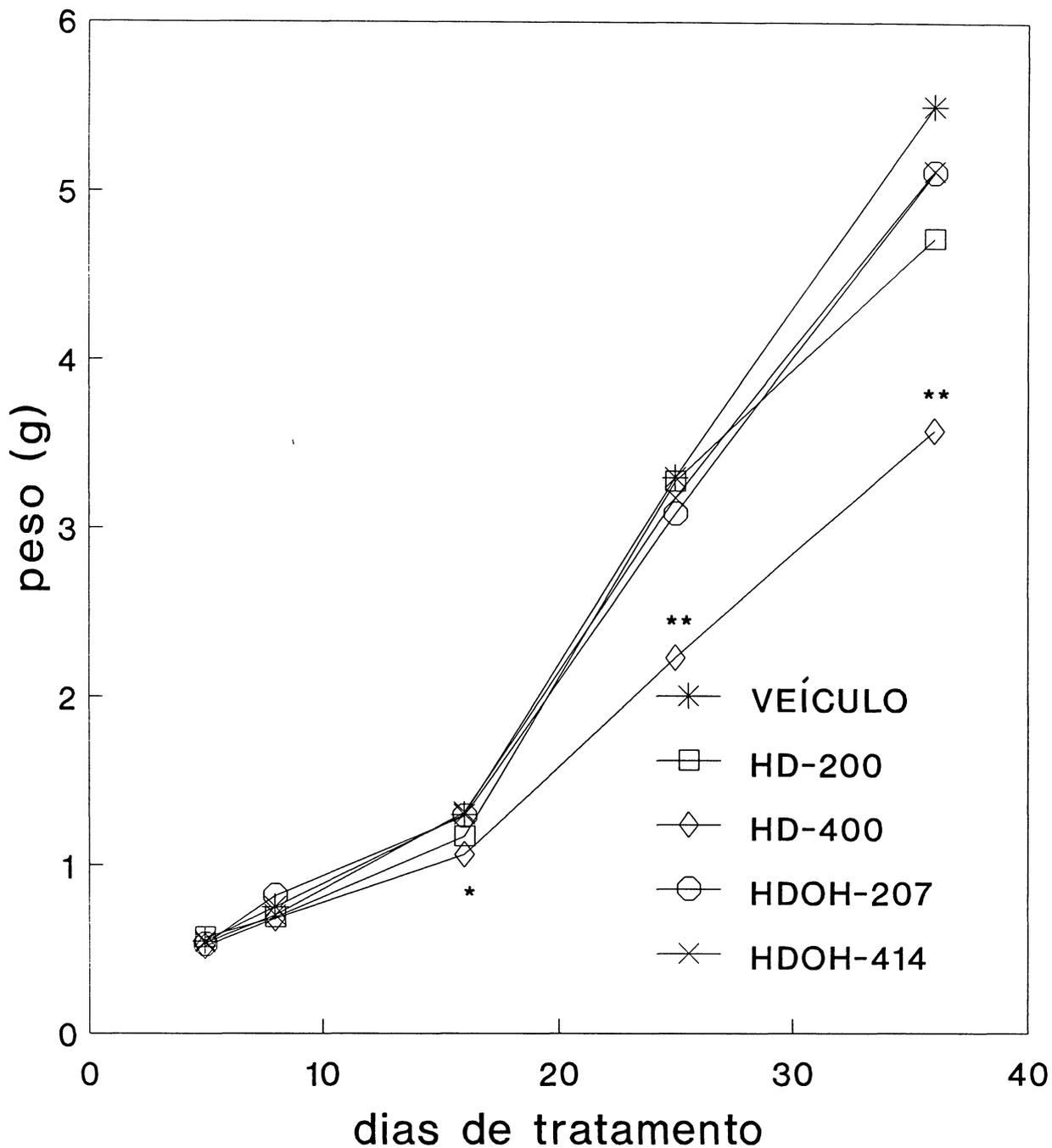


FIGURA 6. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE O PESO DE FIGADO DE RATOS JOVENS. Os animais foram tratados como descrito na figura 4 por 5, 8, 16, 25 ou 36 dias e mortos 24 horas após a última injeção. Os resultados são apresentados como média de 5-10 animais por grupo, sendo o erro padrão inferior a 10 % do valor da média. Teste de raio múltiplo de Duncan: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , comparado aos demais grupos.

TABELA V. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE A RAZAO ENTRE O PESO DE ORGAO E PESO CORPORAL DE RATOS JOVENS.

	Veiculo	HD-200	HD-400	HDOH-207	HDOH-414
CEREBRO/CORPO (mg/g)					
5 dias	33,2±1,7 (8)	31,3±1,7 (7)	32,1±1,8 (6)	30,6±2,6 (5)	30,9±1,8 (5)
8 dias	29,6±1,6 (7)	29,2±1,3 (6)	28,8±1,9 (6)	26,5±2,8 (3)	27,8±1,6 (6)
16 dias	25,8±0,5 (10)	25,3±0,4 (5)	25,9±0,5 (5)	27,2±0,6 (5)	26,0±0,2 (5)
25 dias	13,9±0,4 (12)	14,1±0,6 (8)	16,6±0,4 (9)	14,0±1,4 (7)	14,2±0,7 (7)
36 dias	9,0±0,2 (15)	9,7±0,3 (12)	10,8±0,3 (11)	9,1±0,2 (12)	9,3±0,1 (11)
FIGADO/CORPO (mg/g)					
5 dias	31,1±1,5 (7)	30,2±0,6 (6)	32,6±0,8 (6)	30,1±1,0 (3)	28,4±0,8 (3)
8 dias	31,3±0,4 (5)	31,9±1,0 (5)	34,5±2,8 (4)	28,2±1,1 (4)	29,7±2,3 (4)
16 dias	36,0±1,2 (10)	36,5±0,8 (5)	39,5±0,5 (5)	36,4±1,3 (5)	35,7±0,5 (5)
25 dias	44,8±1,1 (14)	48,9±1,5 <sup>#</sup> (9)	48,7±1,1 <sup>#</sup> (10)	42,6±0,8 (8)	44,0±1,3 (8)
36 dias	45,2±1,2 (14)	45,9±1,3 (11)	45,6±1,5 (11)	44,7±1,5 (11)	45,5±1,7 (10)

Os animais foram tratados como descrito na figura 4 e mortos 24 horas após a 5<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup> ou 36<sup>a</sup> dose. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão do número de amostras, apresentado entre parênteses.

Teste de raio múltiplo de Duncan: # p<0,05 comparado aos demais grupos (sem asterístico) no mesmo intervalo de tratamento.

TABELA VI. EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE A GLICEMIA DE RATOS JOVENS.

-----

GLICEMIA ( mg de glicose por 100 ml de soro )

Veiculo	HD-200	HD-400	HDOH-207	HDOH-414
-----				
5 dias				
114,5 $\pm$ 4,4 (8)	119,9 $\pm$ 3,1 (5)	116,1 $\pm$ 3,8 (6)	122,5 $\pm$ 4,9 (5)	118,9 $\pm$ 2,7 (5)
8 dias				
139,3 $\pm$ 4,1 (12)	132,2 $\pm$ 5,1 (10)	106,9 $\pm$ 8,2* (9)	128,0 $\pm$ 9,9 (4)	130,4 $\pm$ 8,9 (7)
16 dias				
141,8 $\pm$ 3,1 (10)	146,4 $\pm$ 2,9 (7)	133,3 $\pm$ 7,8 (6)	151,0 $\pm$ 4,5 (8)	150,3 $\pm$ 4,1 (6)
25 dias				
133,9 $\pm$ 4,9 (14)	122,3 $\pm$ 6,8 (9)	130,3 $\pm$ 9,3 (10)	128,2 $\pm$ 6,2 (8)	132,6 $\pm$ 6,2 (8)

-----

Os animais foram tratados como descrito na figura 4. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão do número de amostras, dado entre parênteses.

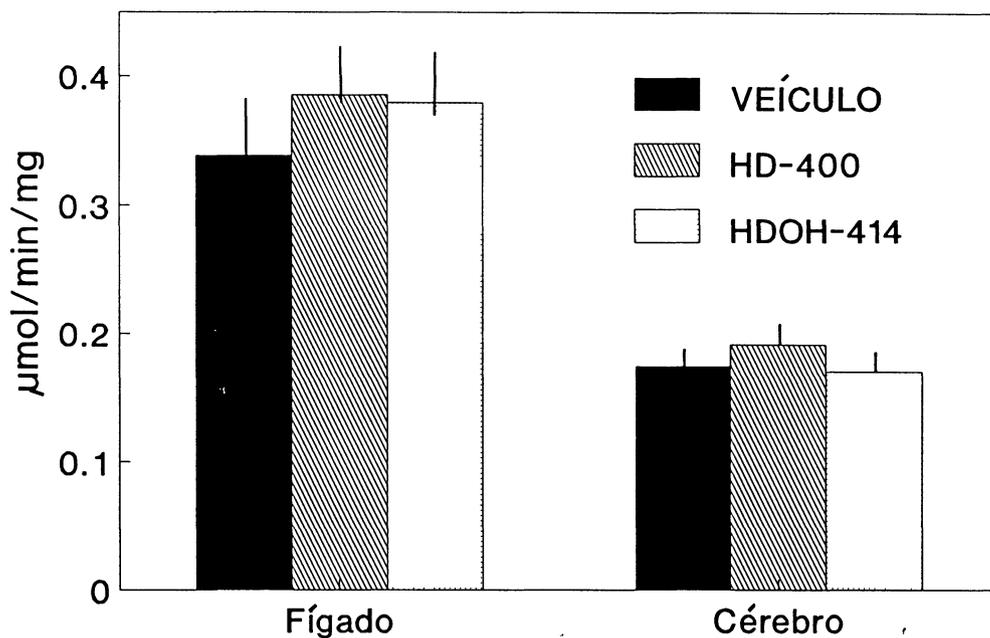
Teste de raio múltiplo de Duncan: \* $p < 0,01$ , comparado aos demais grupos no mesmo intervalo de tratamento.

TABELA VII. CONTEUDO DE GLICOGÊNIO DE FIGADO E MUSCULO ESQUELETICO DE RATOS JOVENS TRATADOS PROLONGADAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.

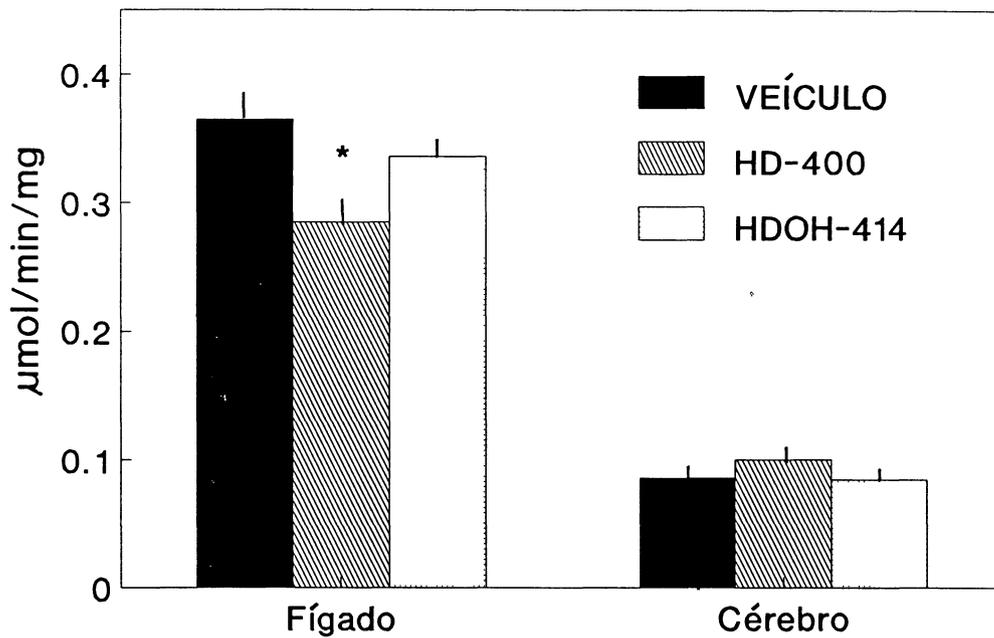
GLICOGÊNIO ( mg por 100 g de tecido )				
Veículo	HD-200	HD-400	HDOH-207	HDOH-414
----- MUSCULO ESQUELETICO -----				
8 dias				
1,45±0,33 (6)	1,76±0,53 (5)	1,62±0,35 (5)	1,34±0,30 (3)	1,62±0,44 (5)
16 dias				
1,73±0,26 (10)	1,36±0,35 (5)	1,08±0,26 (5)	1,72±0,32 (5)	1,66±0,29 (5)
25 dias				
1,46±0,06 (13)	1,33±0,07 (7)	1,31±0,09 (7)	1,53±0,04 (6)	1,47±0,04 (6)
----- FIGADO -----				
8 dias				
5,50±0,32 (6)	7,78±1,84 (5)	8,00±1,59 (5)	6,67±0,37 (3)	7,91±0,77 (4)
16 dias				
6,78±0,90 (10)	8,28±0,27 (5)	7,18±0,68 (5)	7,02±1,12 (5)	6,74±1,20 (5)
25 dias				
5,80±0,14 (9)	6,02±0,33 (5)	5,54±0,50 (5)	5,40±0,12 (4)	5,30±0,12 (4)

Os ratos foram tratados como descrito na figura 4. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão do número de amostras analisadas, dado entre parênteses.

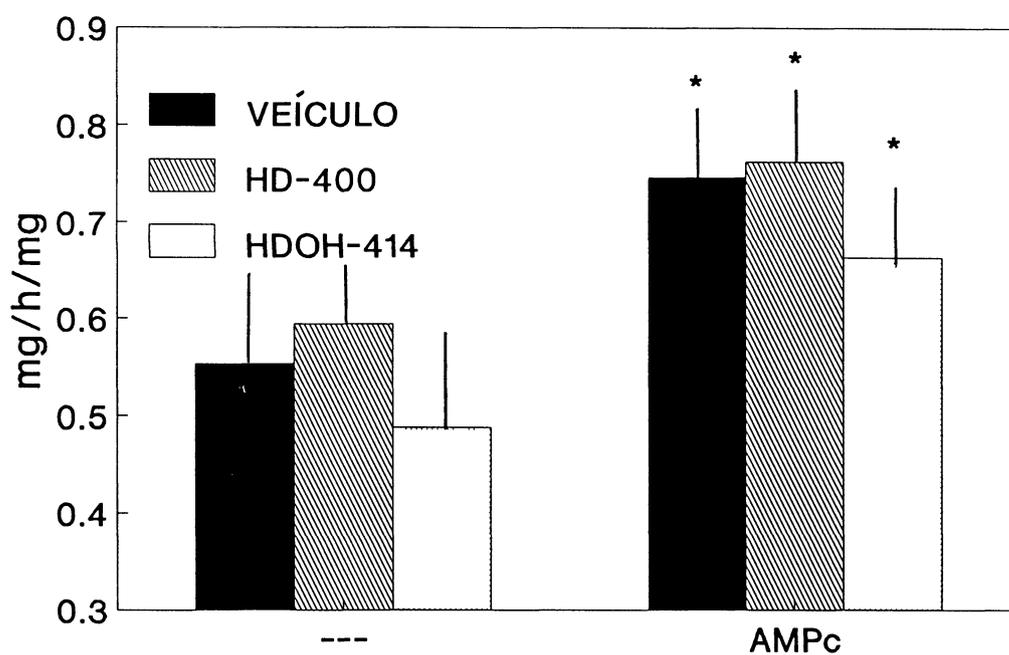
Não há diferença significativa entre os grupos no mesmo intervalo de tratamento (análise de variância de uma via).



**FIGURA 7. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA MALATO DESIDROGENASE DE FIGADO E CEREBRO DE RATOS JOVENS TRATADOS CRONICAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.** Ratos foram tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida com veículo, 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-400) ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-414), sc, por 36 dias. A atividade específica é apresentada como a média  $\pm$  erro padrão de 6-8 animais por grupo e expressa como  $\mu\text{mol}$  de NADH formado por min por mg de proteína a 25°C e pH 10. Não houve diferença significativa entre os grupos (análise de variância de uma via).



**FIGURA 8. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA LACTATO DESIDROGENASE DE FIGADO E CEREBRO DE RATOS JOVENS: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM 2,5-HEXANODIONA.** Ratos foram tratados como descrito na figura 7. A atividade específica é apresentada como a média  $\pm$  erro padrão de 6-8 animais por grupo e expressa como  $\mu\text{mol}$  de NADH formado por min por mg de proteína a  $30^{\circ}\text{C}$  e pH 10. Teste de raio múltiplo de Duncan: \* $p < 0,05$ , comparado ao grupo veículo.



**FIGURA 9. ATIVIDADE EXPECIFICA DA GLICOGÊNIO-FOSFORILASE DE FIGADO DE RATOS JOVENS TRATADOS CRONICAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.** Os animais foram tratados como descrito na figura 7. Atividade da enzima é apresentada como a média  $\pm$  erro padrao de 6-8 animais por grupo. A atividade especifica da enzima (sem e com 0,2 mM de AMPc) é expressa como mg de glicogênio hidrolisado por hora por mg de proteina a 37°C e pH 7,5.

Teste F para efeito simples: \* $p < 0,05$ , comparado a atividade na ausência de AMPc no mesmo tratamento.

### III.2. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS EM RATOS PELO TRATAMENTO COM 2,5-HEXANODIONA

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição prolongada à 2,5-hexanodiona altera a atividade motora espontânea de ratos. Os animais apresentam fraqueza motora severa, principalmente nos membros traseiros [Anthony et al., 1983a,b; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio & O'Neill, 1985; Misumi et al., 1985].

Dois estudos demonstraram que ratos tratados por via oral com 2,5-hexanodiona apresentam, a partir da terceira semana de tratamento, uma diminuição no desempenho em um "rotarod" [Ladefoged et al., 1989; Ralston et al., 1985].

Não encontram-se, porém, na literatura, dados quanto ao efeito destes compostos sobre outros parâmetros comportamentais. Assim, neste bloco de experimentos, investigou-se o efeito do tratamento prolongado com 2,5-hexanodiona em ratos adultos e jovens e o efeito do tratamento agudo sobre algumas tarefas comportamentais.

#### III.2.1. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o comportamento de ratas adultas

Ratas de 60 a 65 dias de idade e pesando 140 a 170 g foram tratadas cronicamente com 2,5-hexanodiona, subcutaneamente. Os animais receberam a droga diariamente entre as 9:00 e 13:00 horas, e, nos dias em que foram submetidos às tarefas comportamentais, as mesmas eram administradas de 4-5 horas antes da tarefa. Os animais foram pesados a cada 3 dias para o ajuste da dose. O tratamento com

1,6-hexanodiol foi omitido deste e dos próximos experimentos com ratos adultos, uma vez que não verificou-se qualquer efeito tóxico do composto nos parâmetros estudados anteriormente.

#### III.2.1.1. Tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona: dose alta.

Para examinar os efeitos comportamentais da 2,5-hexanodiona, os animais foram submetidos a duas sessões (treino e teste, com 24 horas de intervalo entre as mesmas) de três diferentes tarefas comportamentais. As ratas foram expostas às tarefas na seguinte ordem fixada: habituação ao campo aberto, esquivas inibitória e esquivas ativas de duas vias. Os animais foram expostos à droga em um dos dois intervalos de tratamento: tratamento crônico breve e tratamento crônico prolongado. No primeiro caso, tratamento breve, os animais foram tratados por 25 dias, e as tarefas comportamentais ficaram assim distribuídas: 15 dias de tratamento - habituação ao campo aberto, 20 dias - esquivas inibitória e 25 dias - esquivas ativas de duas vias. No tratamento prolongado, os animais foram tratados por 50 dias, e as tarefas comportamentais foram distribuídas da seguinte forma: aos 30 dias - habituação ao campo aberto, 40 dias - esquivas inibitória e 50 dias - esquivas ativas de duas vias. As ratas foram submetidas somente uma vez (2 sessões) a cada tarefa comportamental, isto é, os animais submetidos às tarefas comportamentais no tratamento breve não foram os mesmos

submetidos às tarefas comportamentais no tratamento prolongado.

#### III.2.1.1.1. Habituação ao campo aberto

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (2 tratamentos X 2 sessões) revelou efeito significativo da 2,5-hexanodiona (200 mg/kg) sobre o número de respostas de orientação dos ratos tratados por 15 dias [ $F(1,29) = 17,49, p < 0,001$ ] e por 30 dias [ $F(1,23) = 8,03, p < 0,01$ ]. A análise de variância também revelou efeito significativo das sessões tanto para o tratamento por 15 dias [ $F(1,29) = 32,29, p < 0,001$ ] como por 30 dias [ $F(1,23) = 40,91, p < 0,001$ ]. Teste F para efeito simples demonstrou que os ratos de todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa no número de respostas de orientação na sessão de teste quando comparada à sessão de treino (tabela VII).

A análise de variância para as respostas de cruzamento apresentou um resultado similar àquele encontrado para as respostas de orientação. A droga causou uma redução significativa no número de cruzamentos feitos pelos ratos tratados por 15 dias [ $F(1,29) = 25,70, p < 0,001$ ] e por 30 dias [ $F(1,23) = 35,15, p < 0,001$ ]. A análise de variância também revelou efeito significativo das sessões para o tratamento por 15 dias [ $F(1,29) = 8,69, p < 0,01$ ] e por 30 dias [ $F(1,23) = 29,16, p < 0,001$ ] (tabela VIII).

Estes resultados demonstram que apesar do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona prejudicar sensivelmente a atividade locomotora (diminuição do número total de

cruzamentos e respostas de orientação) não interferiu com a habituação à tarefa, pois a diferença do número de respostas de orientação entre as sessões de treino e teste apresentada pelos animais tratados com 2,5-hexanodiona (por 15 ou por 30 dias) é semelhante à apresentada pelos animais controle (não houve interação significativa entre tratamento X sessão).

#### III.2.1.1.2. Latência de descida da plataforma em uma tarefa de esquivas inibitória

Os resultados do desempenho de ratas em uma tarefa de esquivas inibitória são apresentados na tabela IX. A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (2 tratamentos X 2 sessões) revela diferença significativa entre as sessões tanto para o tratamento por 20 dias [ $F(1,29) = 41,37, p < 0,001$ ] como para o tratamento por 40 dias [ $F(1,22) = 39,47, p < 0,001$ ]. Não houve efeito significativo do tratamento, nem interação significativa entre tratamento X sessão para os dois intervalos de intoxicação. O teste F para efeito simples mostra que, em todos os grupos, a latência de descida da plataforma foi significativamente maior na sessão de teste do que na de treino, demonstrando que o tratamento com 2,5-hexanodiona não altera o desempenho de ratas na tarefa de esquivas inibitória em nenhum dos intervalos de exposição à droga, isto é, os animais tratados com a droga não apresentam deficiência na retenção da tarefa.

#### III.2.1.1.3. Esquiva ativa de duas vias

A análise de variância das respostas de esquiva considerando as sessões como medida repetida (tabela X) comparando 2 tratamentos X 2 sessões demonstra que o tratamento com 2,5-hexanodiona provoca uma diminuição no número de respostas de esquiva, tanto dos animais tratados por 25 [F(1,27) = 30,65, p<0,001] como dos animais tratados por 50 dias [F(1,35) = 22,31, p<0,001]. A análise de variância também revelou diferença significativa entre as sessões [25 dias, F(1,27) = 4,66, p<0,05; 50 dias, F(1,35) = 6,90, p<0,02]. A interação entre tratamento X sessão foi significativa para os ratos tratados por 25 dias [F(1,27) = 5,39, p<0,03] mas não para os ratos tratados por 50 dias. A interação significativa entre tratamento X sessão para o tratamento por 25 dias deveu-se ao fato de que, neste intervalo de tratamento, somente as ratas tratadas com veículo apresentaram um aumento no número de respostas de esquiva na sessão de teste quando comparado com a sessão de treino (teste F para efeito simples).

Quanto ao número de respostas interprovas (tabela X), a análise de variância considerando as sessões como medida repetida revelou efeito significativo do tratamento [F(1,27) = 10,35, p<0,001, para o tratamento por 25 dias; F(1,35) = 27,49, p<0,001, para o tratamento por 50 dias], onde verificase que os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram menor número de cruzamentos interprovas que os animais tratados com veículo. A diferença entre as sessões e a interação entre tratamento X sessão não foram significativas.

TABELA VIII. EFEITO DO TRATAMENTO COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA, POR 15 OU 30 DIAS, SOBRE O DESEMPENHO DE RATAS ADULTAS EM UM CAMPO ABERTO.

TRATAMENTO	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
RESPOSTAS DE ORIENTAÇÃO			
15 dias de tratamento			
Veículo	49,1 ± 2,4	38,6 ± 3,3 <sup>#</sup>	15
2,5-hexanodiona	38,5 ± 1,6 <sup>**</sup>	23,4 ± 3,2 <sup>**#</sup>	16
30 dias de tratamento			
Veículo	42,5 ± 2,7	25,0 ± 2,8 <sup>#</sup>	13
2,5-hexanodiona	25,0 ± 2,8 <sup>**</sup>	20,2 ± 2,3 <sup>#</sup>	12
RESPOSTAS DE CRUZAMENTO			
15 dias de tratamento			
Veículo	107,1 ± 3,8	93,7 ± 7,3 <sup>+</sup>	15
2,5-hexanodiona	79,5 ± 3,9 <sup>**</sup>	61,9 ± 6,6 <sup>*+</sup>	16
30 dias de tratamento			
Veículo	91,2 ± 5,2	66,7 ± 7,7 <sup>##</sup>	13
2,5-hexanodiona	60,3 ± 3,6 <sup>**</sup>	43,8 ± 4,7 <sup>*++</sup>	12

Os animais foram tratados com veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, sc, diariamente. O número de respostas de orientação e de cruzamentos registrados nas sessões de treino e teste, num período de 5 min, são apresentados como média ± erro padrão. N = número de animais por grupo.

Teste t de Student: \* p<0,02, \*\* p<0,002, quando comparado ao grupo veículo na mesma sessão.

Teste F para efeito simples: + p<0,05, ++ p<0,01, # p<0,005, ## p<0,0005, comparado ao treino.

TABELA IX. EFEITO DO TRATAMENTO COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA, POR 20 OU 40 DIAS, SOBRE O DESEMPENHO DE RATAS ADULTAS EM UMA TAREFA DE ESQUIVA INIBITORIA.

TRATAMENTO	LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA (s)		
	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
20 dias de tratamento			
Veículo	7,3 ± 0,9	153,8 ± 36,7*	15
2,5-hexanodiona	11,0 ± 1,0	189,2 ± 34,5*	16
40 dias de tratamento			
Veículo	17,5 ± 2,8	203,6 ± 38,4**	13
2,5-hexanodiona	39,8 ± 8,9	202,2 ± 43,9*	11

As ratas foram tratadas com veículo ou 200 mg/kg, sc, diariamente. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da latência de descida da plataforma em segundos. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,001, \*\* p<0,0005, comparado com a sessão de treino.

TABELA X. EFEITO DO TRATAMENTO COM 200 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA, POR 25 OU 50 DIAS, SOBRE O DESEMPENHO DE RATAS ADULTAS EM UMA TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS

TRATAMENTO	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
-----			
RESPOSTAS DE ESQUIVA			
-----			
25 dias de tratamento			
Veículo	9,3 ± 0,9	12,9 ± 1,6*	14
2,5-hexanodiona	4,3 ± 0,7#	4,2 ± 0,9#	15
50 dias de tratamento			
Veículo	6,6 ± 0,9	8,7 ± 1,2*	19
2,5-hexanodiona	1,7 ± 0,4#	3,2 ± 0,8#	18
-----			
CRUZAMENTOS INTERPROVAS			
-----			
25 dias de tratamento			
Veículo	6,7 ± 1,2	6,9 ± 1,5	14
2,5-hexanodiona	3,4 ± 0,8#	2,6 ± 0,5#	15
50 dias de tratamento			
Veículo	8,8 ± 1,4	6,8 ± 1,3	19
2,5-hexanodiona	2,2 ± 0,4##	1,3 ± 0,3##	18

-----  
 As ratas foram tratadas com veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, sc, diariamente. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão do número de respostas de esquiva e do número de respostas de cruzamento interprovas. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,05 quando comparado a sessão de treino.  
 Teste t de Student: # p<0,01, ## p<0,001, comparado ao grupo veículo na mesma sessão.

### III.2.1.2. Tratamento com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona: dose baixa.

Desde que o tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona induziu efeitos marcantes sobre o desempenho comportamental (exceto para a tarefa de esquiva inibitória), principalmente sobre a atividade motora, investigou-se o efeito do tratamento crônico com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona sobre as mesmas tarefas testadas no experimento com a dose alta (200 mg/kg). O tratamento foi realizado por 50 dias, ficando assim distribuídas as tarefas comportamentais durante o tratamento: 30 dias - habituação ao campo aberto, 40 dias - tarefa de esquiva inibitória e 50 dias - tarefa de esquiva ativa de duas vias.

#### III.2.1.2.1. Habituação ao Campo Aberto

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (2 tratamentos X 2 sessões) demonstra que houve efeito significativo da sessão quanto ao número de respostas de orientação [ $F(1,35) = 7,63, p < 0,009$ ], mas não quanto às respostas de cruzamentos. O tratamento com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona não afetou nem o número de respostas de orientação nem o número de cruzamentos. Também não houve interação significativa entre tratamento X sessão em nenhum dos parâmetros medidos (tabela XI).

#### III.2.1.2.2. Latência de descida da plataforma em uma tarefa de esquiva inibitória

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (2 tratamentos X 2 sessões) revela diferença significativa entre as sessões de treino e teste [ $F(1,32) = 87,42, p < 0,0001$ ]. Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos nem interação significativa entre tratamento X sessão (tabela XII).

#### III.2.1.2.3. Esquiva ativa de duas vias

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (2 tratamentos X 2 sessões) demonstra que somente houve diferença significativa entre as sessões de treino e teste para as respostas de esquiva [ $F(1,31) = 11,82, p < 0,002$ ]. O tratamento com 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona não alterou nem o número de respostas de esquiva nem o número de cruzamentos interprovas. A interação entre tratamento X sessão também não foi significativa quanto às respostas de esquiva, porém foi significativa quanto aos cruzamentos interprovas [ $F(1,31) = 4.54, p < 0.04$ ]. Este efeito foi devido a um aumento do número de cruzamentos interprovas apresentado pelos animais tratados com 2,5-hexanodiona, mas não pelos tratados com veículo, na sessão de teste (tabela XIII).

#### III.2.1.2.4. Peso corporal

O tratamento com 20 mg/kg não prejudicou o ganho de peso corporal (dados não mostrados). Enquanto que, os animais tratados com a dose maior da 2,5-hexanodiona apresentaram uma redução de aproximadamente 10 % e 15 % de peso aos 25 e 50

dias, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, resultados que estão de acordo com aqueles apresentados no experimento descrito no item III.1.1. (ver figura 1).

**TABELA XI. HABITUAÇÃO A UM CAMPO ABERTO DE RATAS TRATADAS, POR 30 DIAS, COM 20 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.**

TRATAMENTO	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
RESPOSTAS DE ORIENTAÇÃO			
Veículo	45,1 ± 2,2	40,1 ± 1,7*	19
2,5-hexanodiona	45,0 ± 2,1	39,2 ± 2,2*	18
RESPOSTAS DE CRUZAMENTOS			
Veículo	87,3 ± 5,7	88,3 ± 7,3	19
2,5-hexanodiona	89,6 ± 4,3	93,0 ± 4,6	18

As ratas receberam veículo ou 2,5 hexanodiona, sc, diariamente. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão do número de respostas de orientação e de cruzamentos registrados em 5 min de sessão. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,05 comparado à sessão de treino.

TABELA XII. LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA EM UMA TAREFA DE ESQUIVA INIBITORIA DE RATAS TRATADAS, POR 40 DIAS, COM 20 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

TRATAMENTO	LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA (s)		
	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
Veículo	16,4 ± 2,6	252,7 ± 28,7*	18
2,5-hexanodiona	13,3 ± 1,7	202,6 ± 37,9*	16

As ratas receberam veículo ou 2,5-hexanodiona, sc, diariamente. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da latência de descida da plataforma em segundos. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \*  $p < 0,005$ , quando comparado à sessão de treino.

TABELA XIII. DESEMPENHO DE RATAS ADULTAS TRATADAS, POR 50 DIAS, COM 20 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA EM UMA TAREFA DE ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS.

TRATAMENTO	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	N
RESPOSTAS DE ESQUIVA			
Veiculo	8,9 ± 1,1	12,5 ± 1,7*	17
2,5-hexanodiona	9,3 ± 1,3	13,4 ± 1,3*	16
CRUZAMENTOS INTERPROVAS			
Veiculo	6,3 ± 0,8	5,2 ± 1,3	17
2,5-hexanodiona	5,7 ± 1,3	8,9 ± 1,4*	16

As ratas receberam veiculo ou 2,5-hexanodiona, sc, diariamente. Os resultados sao apresentados como média ± erro padrao do número de respostas de esquiva e de cruzamentos interprovas. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p <0,01, quando comparado à sessao de treino.

### III.2.2. Efeito do tratamento crônico com 2,5-hexanodiona sobre o desempenho de ratos jovens em três tarefas comportamentais

Nos experimentos anteriores, verificou-se que ratos adultos intoxicados por um período prolongado com 2,5-hexanodiona apresentaram uma série de alterações comportamentais, associadas principalmente a uma deficiência motora. No presente experimento, estudou-se se ratos jovens submetidos ao tratamento com a droga são igualmente sensíveis a estas alterações comportamentais.

Ratos machos e fêmeas mantidos com a mãe foram tratados do 4<sup>o</sup> ao 36<sup>o</sup> dia de vida com veículo, 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol, subcutaneamente. Neste experimento, ainda utilizou-se um grupo de animais tratados com 1,6-hexanodiol, porque parte destes animais são aqueles utilizados para os ensaios enzimáticos das enzimas glicolíticas (III.1.3.).

Cada ninhada continha ratos submetidos a todos os tratamentos estudados, e cada grupo experimental era formado por no máximo dois ratos de cada ninhada. Os animais foram pesados diariamente para o ajuste da dose. Do 4<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dia de vida, que corresponde do 1<sup>o</sup> ao 8<sup>o</sup> dia de tratamento, os animais foram submetidos a medida do comportamento reflexo de geotactismo negativo. Aos 25 dias de tratamento (29 dias de idade), foram observados em um labirinto em T e, aos 35-36 dias de tratamento (39-40 dias de vida), em uma tarefa de esquiva inibitória. Com exceção do primeiro dia de tratamento, em que os animais foram submetidos à tarefa de geotactismo

negativo antes de serem tratados, as tarefas comportamentais foram realizadas entre 13:00 e 16:00 horas e aproximadamente de 3 a 4 horas após o tratamento. As tarefas comportamentais foram realizadas como descrito em material e métodos.

#### III.2.2.1. Latência do reflexo de geotactismo negativo

A análise de variância de duas vias considerando as provas como medida repetida (3 tratamentos X 8 provas) revela efeito significativo das provas [ $F(7,336) = 57,54, p < 0,0001$ ], não havendo diferença significativa entre os tratamentos, nem interação significativa entre tratamento X prova (figura 10). Estes resultados demonstram que o tratamento com 2,5-hexanodiona não alterou o desenvolvimento do comportamento de geotactismo negativo que apresentam os animais nesta fase de crescimento.

#### III.2.2.2. Comportamento de alternar espontâneo em um labirinto em T

Os resultados do efeito do tratamento com 2,5-hexanodiona sobre a tarefa de alternar espontâneo é apresentada na tabela XIV.

A análise de variância de uma via revela efeito significativo do tratamento na latência para alternar o braço do labirinto [ $F(2,43) = 3,64, p < 0,03$ ] e na prova alternada [ $F(2,43) = 3,61, p < 0,04$ ]. Estes resultados demonstram que o tratamento com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona prejudicou o desempenho de ratos jovens no labirinto em T, aumentando

significativamente tanto a latência para alternar, como a prova em que o animal alternou o braço do labirinto.

#### III.2.2.3. Latência de descida da plataforma em uma tarefa de esquiva inibitória

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (3 tratamentos X 2 sessões) revela que não houve efeito significativo do tratamento, mas sim efeito significativo da sessão [ $F(1,49) = 22,35, p < 0,0001$ ] e interação significativa entre tratamento X sessão [ $F(2,49) = 3,52, p < 0,037$ ]. Como pode-se observar na tabela XV, apesar de não ter havido efeito significativo do tratamento, a interação foi significativa devido ao fato de que os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram uma maior latência de descida da plataforma na sessão de treino (resultado obtido pela análise de variância de uma via, comparando os tratamentos só na sessão de treino [ $F(2,49) = 5,93, p < 0,005$ ]) e uma menor latência na sessão de teste que os demais grupos (esta diferença não foi significativa) o que leva a uma menor diferença teste-treino da latência de descida da plataforma em relação aos demais grupos.

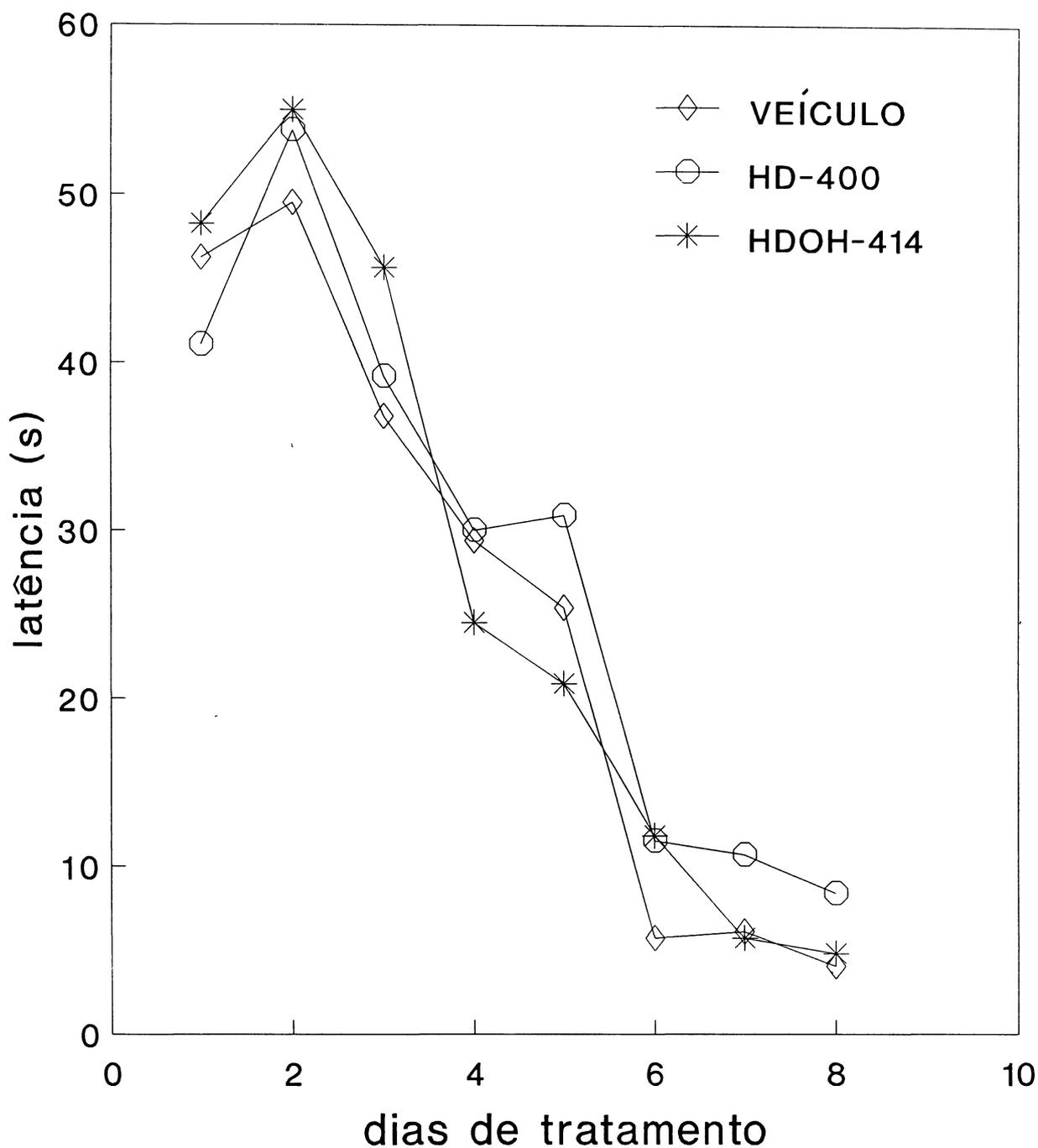


FIGURA 10. LATÊNCIA DE GEOTACTISMO NEGATIVO DE RATOS JOVENS TRATADOS COM 2,5-HEXANODIONA. Ratos foram tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida, *sc.* O teste comportamental foi iniciado no 1<sup>o</sup> dia de tratamento e foi realizado por 8 dias consecutivos. Os resultados são apresentados como média da latência de geotactismo (segundos) apresentada por 18, 20 e 13 ratos por grupo de tratamento, veículo, 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-400) e 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-414), respectivamente. O erro padrão variou de 1 a 15 % do valor da média.

TABELA XIV. EFEITO DO TRATAMENTO COM 2,5-HEXANODIONA, POR 25 DIAS, SOBRE O COMPORTAMENTO DE ALTERNAR ESPONTÂNEO DE RATOS JOVENS EM UM LABIRINTO EM T.

TRATAMENTO	COMPORTAMENTO DE ALTERNAR ESPONTÂNEO		N
	LATÊNCIA (s)	PROVA ALTERNADA	
Veículo	46,3 ± 7,8	2,35 ± 0,17	20
HD-400	110,7 ± 22,9 <sup>#</sup>	2,94 ± 0,26 <sup>*</sup>	17
HDOH-414	89,5 ± 30,3	2,11 ± 0,11	9

Os ratos foram tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida, sc, com veículo, 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-400) ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-414) e submetidos ao labirinto em T aos 25 dias de tratamento (29 dias de idade). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da latência (segundos) para alternar o braço do labirinto e da prova alternada. N = número de animais por grupo.

Teste de raio múltiplo de Duncan:  $p < 0,005$ , <sup>#</sup> quando comparado ao grupo veículo, <sup>\*</sup> quando comparado aos demais grupos.

TABELA XV. EFEITO DO TRATAMENTO COM 2,5-HEXANODIONA, POR 35 DIAS, SOBRE A LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA DE RATOS JOVENS EM UMA TAREFA DE ESQUIVA INIBITORIA.

LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA (s)				
TRATAMENTO				N
	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE	TESTE-TREINO	
Veículo	11,7 ± 3,8	81,1 ± 21,6*	69,4 ± 19,1	18
HD-400	37,6 ± 10,9#	47,8 ± 16,9	10,2 ± 19,7#	16
HDOH-414	8,9 ± 2,1	86,5 ± 18,2*	77,6 ± 18,7	18

Os ratos foram tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida como descrito na tabela XIV. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da latência (segundos) de descida da plataforma nas sessões de treino e teste e da diferença da latência teste menos treino. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,01, comparado à sessão de treino.

Teste de raio múltiplo de Duncan: # p<0,05 comparado aos demais grupos.

### III.2.3. Efeito do tratamento agudo com 2,5-hexanodiona sobre o comportamento de ratos adultos

Neste experimento, investigou-se o efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona sobre o desempenho de ratos adultos em duas tarefas comportamentais.

Ratos machos adultos, pesando de 190 a 250 g e com 70 a 90 dias de idade, foram tratados com veículo ou 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona, por via intraperitoneal (ip). Na tarefa de habituação ao campo aberto, os animais receberam o tratamento 30 min antes da sessão de treino (sessão 1). Na tarefa de esQUIVA inibitória, os animais foram tratados 30 ou 90 min antes da sessão de treino, utilizando-se uma intensidade de choque de 0,3 mA. Os animais foram treinados e testados entre 15:00 e 18:00 hs. As tarefas comportamentais foram realizadas como descrito em material e métodos.

#### III.2.3.1. Habituação ao campo aberto

Os resultados do número de respostas de orientação e número de cruzamentos registrados durante 5 min de duração da sessão são mostrados na tabela XVI. A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (4 tratamentos X 2 sessões) do número de respostas de orientação revela efeito significativo do tratamento [ $F(3,41) = 5,84, p < 0,002$ ], diferença significativa entre treino e teste [ $F(1,41) = 22,46, p < 0,0001$ ] e interação significativa entre tratamento x sessão [ $F(3,41) = 3,79, p < 0,017$ ]. A análise de variância de uma via mostra diferença significativa entre os

grupos na sessão de treino [ $F(3,41) = 9,87, p < 0,0001$ ], o que levou a interação entre tratamento X sessão, pois na sessão de teste, eles não diferem significativamente.

A análise de variância de duas vias (4 tratamentos X 2 sessões) do número de respostas de cruzamento mostra diferença significativa entre as sessões [ $F(1,41) = 44,08, p < 0,0001$ ]. Porém, não houve efeito significativo dos tratamentos nem interação entre tratamento X sessão.

Como o tratamento com 2,5-hexanodiona induz uma diminuição do número de respostas de orientação sem afetar o número de cruzamentos, estes resultados sugerem que o efeito sobre as respostas de orientação não esteja relacionado a uma deficiência motora. Verifica-se ainda que, diferentemente do grupo controle, os ratos intoxicados, independentemente da dose que receberam, não apresentaram redução do número de respostas de orientação no teste. Isto demonstra que o tratamento com a 2,5-hexanodiona prejudica a habituação de ratos em um campo aberto.

#### III.2.3.2. Latência de descida da plataforma em uma tarefa de esquiva inibitória

Os resultados do efeito do tratamento com 2,5-hexanodiona, administrada 30 min antes da sessão de treino, são apresentados na tabela XVII. A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (4 tratamentos X 2 sessões) revela diferença significativa entre as sessões de treino e teste [ $F(1,75) = 55,82, p < 0,0001$ ], não havendo efeito significativo do tratamento, nem interação

entre tratamento X sessão.

Apesar de haver diferença significativa entre treino e teste para todos os grupos, houve uma tendência de diminuição da latência de descida da plataforma na sessão de teste (mas não na de treino) dos animais tratados com 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona quando comparado ao grupo controle [ $F(3,75) = 2,68, p = 0,053$ ].

Na tabela XVIII, estão apresentados os resultados referentes ao tratamento com 2,5-hexanodiona realizado 90 min antes da sessão de treino. Aumentou-se o intervalo entre o tratamento porque quando administrada 30 min antes do treino, a 2,5-hexanodiona apresentou uma tendência de alterar a retenção da tarefa de esquivas inibitória (os animais tratados com 400 e 800 mg/kg apresentaram menor latência de descida da plataforma que o grupo controle, sendo esta diferença não significativa), o que poderia ser uma consequência do nível de droga circulante atingido neste intervalo de tratamento ser insuficiente para que a diferença entre os grupos fosse significativa.

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida (4 tratamentos X 2 sessões) revela efeito significativo do tratamento [ $F(3,82) = 4,58, p < 0,005$ ], efeito da sessão [ $F(1,82) = 48,77, p < 0,0001$ ] e interação entre tratamento X sessão [ $F(3,82) = 4,72, p < 0,004$ ]. A interação entre tratamento X sessão foi significativa porque, apesar de todos os grupos apresentarem melhor desempenho na sessão de teste do que na sessão de treino, a

diferença teste - treino dos animais tratados com 2,5-hexanodiona (400 e 800 mg/kg) foi significativamente menor do que a dos animais controle. Ainda, a análise de variância de uma via comparando os grupos na sessão de teste revela efeito significativo do tratamento [ $F(3,82) = 4,67, p < 0,005$ ].

Estes resultados demonstram que o tratamento com 2,5-hexanodiona prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória quando a droga é injetada 90 min antes da sessão de treino, o que sugere que este composto prejudica a retenção desta tarefa. Pode-se ainda descartar que tal efeito esteja relacionado a uma deficiência locomotora, uma vez que a droga não interferiu na latência de descida da plataforma na sessão de treino.

TABELA XVI. EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM 2,5-HEXANODIONA SOBRE O DESEMPENHO DE RATOS ADULTOS EM UM CAMPO ABERTO.

TRATAMENTO	N	SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE
Respostas de Orientação			
Veículo	12	26,17 ± 2,05	13,25 ± 3,15 <sup>+</sup>
HD-200	11	26,00 ± 2,70	20,45 ± 3,15
HD-400	11	17,55 ± 2,11 <sup>*</sup>	11,45 ± 2,69
HD-800	11	11,91 ± 1,93 <sup>**</sup>	11,36 ± 1,79
Respostas de Cruzamento			
Veículo	12	65,83 ± 5,08	41,92 ± 8,54 <sup>++</sup>
HD-200	11	70,82 ± 6,15	53,27 ± 7,26 <sup>+</sup>
HD-400	11	62,71 ± 8,01	38,82 ± 9,07 <sup>+</sup>
HD-800	11	57,36 ± 7,40	21,27 ± 3,69 <sup>+</sup>

Os ratos foram tratados com veículo, 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200, HD-400, HD-800), *ip*, 30 min antes da sessão de treino. O intervalo entre as sessões de treino e teste foi de 24 horas. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. N = número de animais por grupo.

Teste de raio múltiplo de Duncan: \* p<0,05, \*\* p<0,01, comparado aos demais grupos na mesma sessão.

Teste F para efeito simples: + p<0,05, ++ p<0,01, comparado à sessão de treino.

TABELA XVII. EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM 2,5-HEXANODIONA, ADMINISTRADA 30 MIN ANTES DA SESSAO DE TREINO, SOBRE O DESEMPENHO DE RATOS ADULTOS EM UMA TAREFA DE ESQUIVA INIBITORIA.

TRATAMENTO	N	LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA (s)	
		SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE
Veículo	23	9,61 ± 2,08	167,93 ± 30,22**
HD-200	19	5,31 ± 0,82	134,41 ± 30,32*
HD-400	18	6,43 ± 1,20	70,00 ± 26,79*
HD-800	19	5,42 ± 0,66	80,17 ± 26,75**

Os ratos foram tratados com veículo, 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200, HD-400, HD-800), 30 min antes da sessão de treino, ip. O intervalo entre as sessões de treino e teste foi de 24 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,05, \*\* p<0,01 em relação à sessão de treino.

Não há diferença significativa entre os grupos na sessão de treino e na sessão de teste (análise de variância de uma via).

TABELA XVIII. EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM 2,5-HEXANODIONA, ADMINISTRADA 90 MIN ANTES DA SESSAO DE TREINO, SOBRE O DESEMPENHO DE RATOS ADULTOS EM UMA TAREFA DE ESQUIVA INIBITORIA.

TRATAMENTO	N	LATÊNCIA DE DESCIDA DA PLATAFORMA (s)	
		SESSAO DE TREINO	SESSAO DE TESTE
Veículo	21	6,42 ± 1,10	146,11 ± 29,22**
HD-200	21	6,83 ± 1,30	104,79 ± 27,50*
HD-400	22	5,05 ± 1,31	52,84 ± 18,27*#
HD-800	22	7,65 ± 2,18	38,95 ± 13,22*#

Os ratos foram tratados com veículo, 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200, HD-400, HD-800), 90 min antes da sessão de treino, ip. O intervalo entre as sessões de treino e teste foi de 24 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. N = número de animais por grupo.

Teste F para efeito simples: \* p<0,05, \*\* p<0,01 em relação à sessão de treino.

Teste de raio múltiplo de Duncan: # p<0,05, comparado ao grupo controle na mesma sessão.

### III.3. NOCICEPÇÃO E 2,5-HEXANODIONA: INTERAÇÃO COM O SISTEMA COLINÉRGICO.

Alterações comportamentais envolvendo o enfraquecimento locomotor têm sido verificadas quando animais são tratados cronicamente com compostos hexacarbonados como a 2,5-hexanodiona [Anthony et al., 1983a; Braendgaard & Sidenius, 1986; De Caprio & O'Neill, 1985; Ladefoged et al., 1989; Misumi et al., 1985; resultados do experimento descrito no item III.2.1.]. Porém, o efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona parece não envolver efeitos locomotores (III.2.3.).

Dafforn e colaboradores (1979) verificaram que a atividade da acetilcolinesterase de Electrophorus electricus era inibida "in vitro" por 2,5-hexanodiona. Desde que agonistas colinérgicos e inibidores da acetilcolinesterase induzem antinocicepção [Gillberg et al., 1989; Sitaram & Gillin, 1977], investigou-se, neste estudo, os efeitos da 2,5-hexanodiona sobre a resposta nociceptiva de ratos.

#### III.3.1. Efeito da administração aguda de 2,5-hexanodiona sobre a nocicepção de ratos em um teste de "tail-flick"

Ratas Wistar adultas, pesando 160 - 190 g, com 70-90 dias de idade, foram submetidas a medidas da latência de retirada da cauda em um aparelho de "tail-flick", como descrito em material e métodos. No primeiro dia, os animais foram pesados, manuseados, familiarizados com o aparelho e submetidos a uma medida basal de latência de "tail-flick" (latência de deflexão

da cauda). No dia 2, após nova medida de base (basal), os animais foram tratados, intraperitonealmente, com veículo, 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona. Todas as soluções foram injetadas em um volume de 1 ml por kg de peso corporal. A medida de nocicepção foi realizada aos 10, 30, 60 e 90 min após a administração das soluções.

A análise de variância de duas vias considerando as latências de "tail-flick" em cada intervalo de tratamento como medida repetida (4 doses: 0, 200, 400 ou 800 mg/kg X 5 medidas: basal, 10, 30, 60 e 90 min) revela efeito significativo das doses [ $F(3,60) = 7,95, p < 0,001$ ], das medidas [ $F(4,240) = 6,20, p < 0,001$ ] e interação significativa entre doses X medidas [ $F(12,240) = 4,12, p < 0,001$ ]. O efeito das doses (tratamento) foi devido ao fato de que os animais tratados com 400 e 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona apresentaram uma maior latência de "tail-flick" do que os demais grupos (ver tabela XIX, onde são apresentados as somas das latências das 5 medidas). A análise de variância de uma via comparando os grupos em cada medida revela efeito significativo do tratamento aos 10 min [ $F(3,60) = 9,21, p < 0,0001$ ], 30 min [ $F(3,60) = 10,70, p < 0,0001$ ] e 60 min [ $F(3,60) = 3,30, p < 0,03$ ] após a administração da droga.

Na figura 11, verifica-se, que aos 10 min do tratamento, somente a dose maior aumentou significativamente a latência de "tail-flick". Aos 30 min, tanto 400 como 800 mg/kg foram efetivos, e, aos 60 min, todos os grupos tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram maior latência de "tail-flick" do que

os animais controle. Aos 90 min, todos os ratos tratados com 2,5-hexanodiona também mostraram maior latência de "tail-flick" do que os ratos tratados com veículo, entretanto, as diferenças entre os grupos não foram significativas, embora uma tendência tenha sido observada ( $p < 0.1$  para todas as comparações). Estes resultados revelam um efeito dependente de dose e de tempo da 2,5-hexanodiona, que deve estar relacionado com a quantidade de droga e com o tempo necessário para que a mesma seja absorvida e atinja níveis circulantes efetivos na indução da analgesia.

TABELA XIX. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 2,5-HEXANODIONA A RATAS ADULTAS SOBRE A SOMA DAS LATÊNCIAS DE RETIRADA DA CAUDA EM UM APARELHO DE "TAIL-FLICK".

Dose de 2,5-hexanodiona	Soma das latências de "tail-flick" (s)	N
Veículo	15,67 ± 1,09	17
200 mg/kg	20,40 ± 1,92*	15
400 mg/kg	26,32 ± 2,55**	16
800 mg/kg	27,90 ± 2,28**	16

As ratas foram tratadas com veículo, 200, 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200, HD-400 OU HD-800), ip, após a medida de base (basal). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da soma das latências de "tail-flick" de 5 medidas (basal, 10, 30, 60 e 90 min). N = número de animais por grupo. Teste de raio múltiplo de Duncan: \*p<0,05, \*\*p<0,01, comparado ao grupo controle.

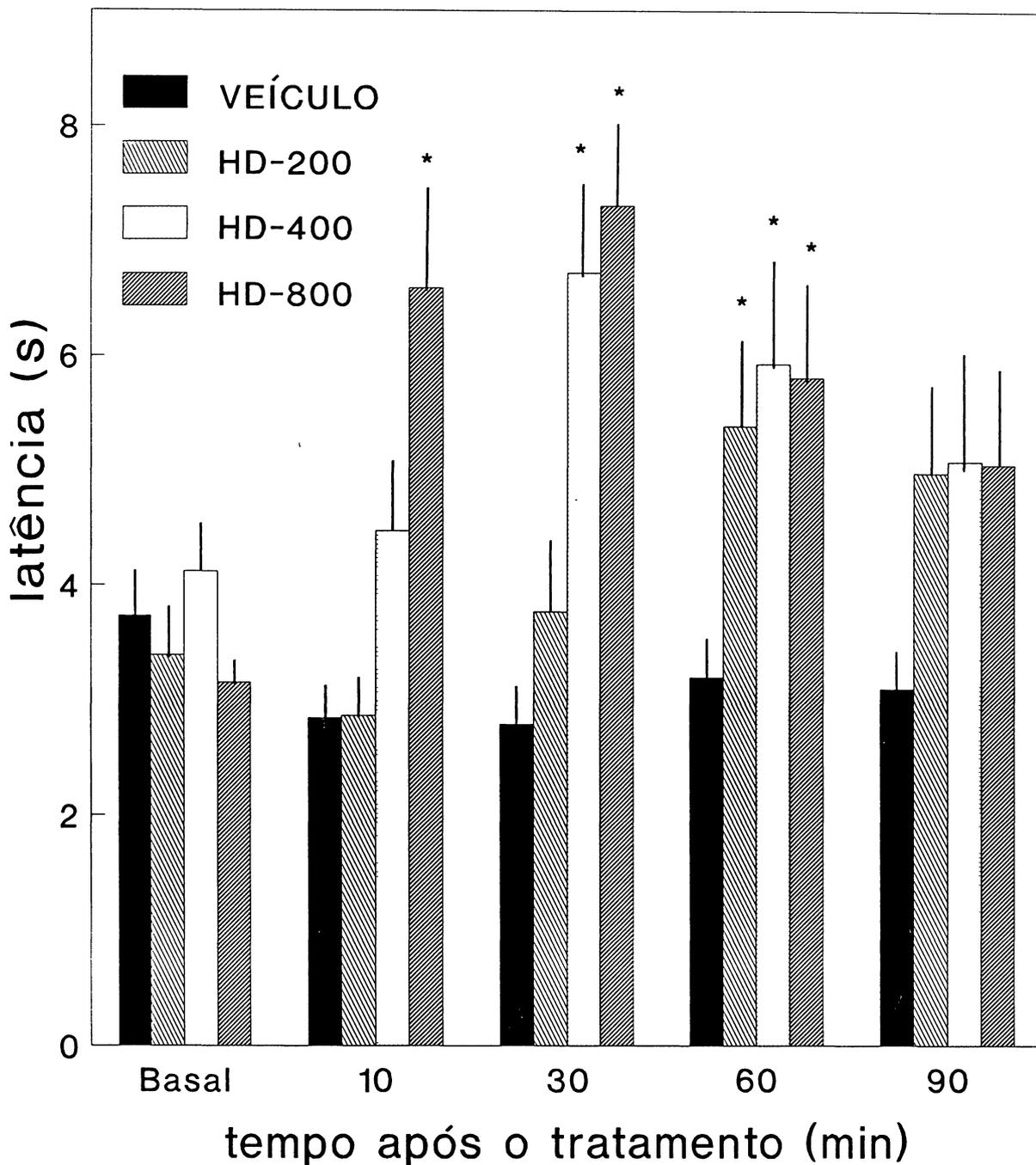


FIGURA 11. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 2,5-HEXANODIONA A RATAS ADULTAS SOBRE AS LATÊNCIAS DE RETIRADA DA CAUDA EM UM APARELHO DE "TAIL-FLICK" (TFL). Os animais foram submetidos a medidas de TFL de base (basal) e aos 10, 30, 60 e 90 min após o tratamento com uma das soluções. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão de 15-17 animais por grupo (ver tabela XIX).

Teste de raio múltiplo de Duncan: \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo. Teste F para efeito simples revela que todos os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentam aumento da TFL em função do tempo ( $p < 0,005$ ).

### III.3.2. Latência de "tail-flick" de ratas tratadas cronicamente com 2,5-hexanodiona

Para investigar se a deficiência na atividade motora, verificada anteriormente nos animais submetidos ao tratamento prolongado, mas não agudo, com 2,5-hexanodiona, seria acompanhada de uma alteração na resposta de retirada da cauda em um aparelho de "tail-flick", neste experimento, ratas adultas (60 a 65 dias, pesando de 140 a 170 g) foram tratadas por 42 dias com veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, sc, e submetidas à medida da latência de "tail-flick" 3-6 horas após a administração da última dose do hexacarbono.

No dia 1, os animais foram manuseados, familiarizados ao aparelho e foi registrada a latência de base. No dia 2, foi realizada uma medida de latência de "tail-flick" em cada animal.

Os resultados demonstram que, apesar de neste intervalo de tratamento os animais tratados com 200 mg/kg apresentarem uma deficiência locomotora muito severa, a resposta de deflexão da cauda estimulada pelo calor (latência de "tail-flick") foi similar à apresentada pelo grupo tratado com veículo. A comparação entre os dois tratamentos pelo teste t de Student revela diferença não significativa entre eles (tabela XX).

TABELA XX. LATÊNCIA DE RETIRADA DA CAUDA EM UM APARELHO DE "TAIL-FLICK" DE RATAS TRATADAS CRONICAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.

	LATÊNCIA DE "TAIL-FLICK" (s)	N
Veículo	3,12 ± 0,14	13
2,5-hexanodiona	4,63 ± 0,75	12

Os animais foram tratados por 42 dias com veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, sc. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão das latências apresentadas em segundos. N = número de animais por grupo.

Não há diferença significativa entre os grupos (teste t de Student).

### III.3.3. Efeito da atropina sobre a antinocicepção induzida em ratas por 2,5-hexanodiona

No experimento descrito no item III.3.1., verificou-se que a administração aguda de 2,5-hexanodiona induziu antinocicepção de maneira dependente de dose e de tempo (figura 11). Desde que agonistas colinérgicos são drogas antinociceptivas [Gillberg et al., 1989; Sitaram & Gillin, 1977], o presente estudo investigou se o tratamento concomitante com atropina, um antagonista colinérgico muscarínico [Brown, 1988], bloquearia a ação antinociceptiva da 2,5-hexanodiona.

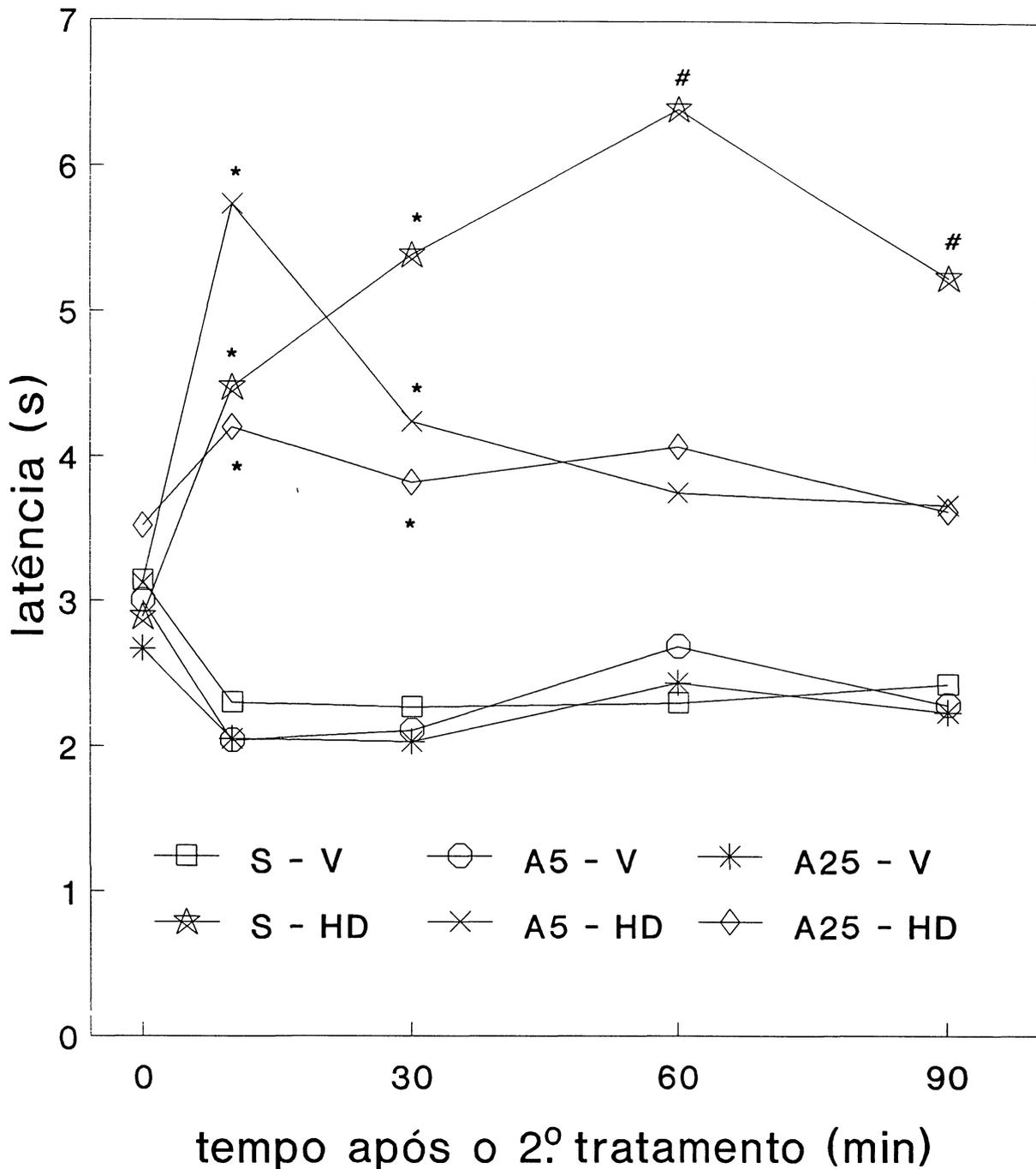
Ratas adultas, pesando de 170-200 g e com 75 a 95 dias de idade, foram expostas ao aparelho de "tail-flick" usando o mesmo procedimento descrito no item III.3.1. Após a medida da latência basal (dia 2), os animais receberam salina (NaCl 0,9 g%), 5 mg/kg ou 25 mg/kg de atropina. Após 10 min de um destes tratamentos (tratamento 1), os animais foram injetados com veículo ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (tratamento 2). Todas as soluções foram injetadas intraperitonealmente em um volume de 1 ml por kg de peso corporal. Dez, 30, 60 e 90 min após o segundo tratamento, as latências de "tail-flick" foram medidas.

A análise de variância de três vias comparando o tratamento 1 (salina, 5 ou 25 mg/kg de atropina) X tratamento 2 (veículo ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona) X 5 medidas (basal, 10, 30, 60 e 90 min) e considerando as latências de "tail-flick" como medida repetida revela efeito significativo

do tratamento 2 [ $F(1,86) = 38,71, p < 0,001$ ]. Não houve efeito significativo do tratamento 1, de modo que atropina, em nenhuma das doses, alterou a latência de "tail-flick". Também não houve efeito das medidas. A análise de variância também demonstra interação significativa entre tratamento 2 x medida [ $F(4,344) = 8,84, p < 0,001$ ], e interação significativa entre tratamento 1 X tratamento 2 X medida [ $F(8,344) = 3,15, p < 0,002$ ]. O efeito do tratamento 2 deveu-se ao fato de que os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram uma maior latência de "tail-flick" do que os tratados com veículo, independente de terem recebido previamente salina ou atropina. O aumento da latência de "tail-flick" induzido pela 2,5-hexanodiona também foi a causa da interação significativa entre tratamento 2 x medida, pois não houve efeito da medida. A interação entre tratamento 1 X tratamento 2 X medida é consequência do efeito antinociceptivo da 2,5-hexanodiona, que apresentou-se diminuído pelo tratamento prévio com atropina.

A análise de variância de uma via comparando os grupos em cada medida revela diferença significativa entre os grupos pelo menos para  $p < 0,0001$  em todas as medidas (menos basal).

Desde que a atropina, tanto na dose de 5 como de 25 mg/kg (que não teve efeito por si só), reverteu parcialmente o efeito antinociceptivo da 2,5-hexanodiona, estes resultados sugerem uma participação colinérgica da 2,5-hexanodiona em sua ação antinociceptiva.



**FIGURA 12. EFEITO DO TRATAMENTO COM ATROPINA SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA EM RATAS POR 2,5-HEXANODIONA.** Após a medida de base, os animais receberam salina, 5 ou 25 mg/kg de atropina (S, A5 ou A25), *ip*. Após 10 min, foram tratados com veículo ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona (V ou HD), *ip*, e, aos 10, 30, 60 e 90 min após, foram submetidos a novas medidas de TFL. Os resultados são apresentados como média de 14-17 animais por grupo (erro padrão inferior a 10 % do valor da média).

Teste de raio múltiplo de Duncan: \*  $p < 0,05$ , diferente dos grupos S-V, A5-V e A25-V. #  $p < 0,05$ , diferente dos demais grupos, na mesma medida.

#### III.4. EFEITO DA 2,5-HEXANODIONA SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE CEREBRO E COLINESTERASES DE SORO DE RATOS.

Dafforn e colaboradores (1979) verificaram que algumas cetonas alifáticas, incluindo a 2,5-hexanodiona, inibem a atividade da acetilcolinesterase purificada de orgão elétrico de Electrophorus electricus. Estes autores também verificaram que a 2,5-hexanodiona parece ligar-se ao sítio aniônico da enzima, induzindo uma inibição do tipo competitiva com um  $K_i$  de 4,1 mM.

Nos experimentos anteriores, verificou-se que a administração aguda de 2,5-hexanodiona produz antinocicepção. A hipótese de que este efeito envolvesse mecanismos colinérgicos foi confirmada quando a administração de atropina reverteu parcialmente o efeito analgésico da 2,5-hexanodiona (figura 12).

Neste bloco de experimentos, investigou-se se o efeito antinociceptivo da 2,5-hexanodiona está relacionado a uma alteração na atividade da acetilcolinesterase de cérebro de ratos. Estudou-se ainda a atividade de colinesterase de soro.

Para a medida da atividade da AChE seguiu-se o método de Ellman e colaboradores (1961), modificado por Villescas e colaboradores (1981) como descrito em material e métodos.

Previamente à determinação das constantes cinéticas da AChE, determinou-se se havia diferença entre as frações subcelulares (Homogeneizado total-H, S1, P1, P2, S3 e P3) quanto à sensibilidade à 2,5-hexanodiona. Verificou-se que a presença de 20 mM de 2,5-hexanodiona, na presença de

concentrações saturantes de substrato, induzia inibição na atividade da AChE em grau semelhante em todas as frações estudadas: H - 38%, S1 - 45%, P1 - 43 %, P2 - 42%, S3 - 45% e P3 - 41%. Assim, utilizou-se a fração S1 para os ensaios da atividade da AChE de cérebro e cerebelo.

Um outro parâmetro também abordado foi o tempo de pré-incubação. A enzima foi pré-incubada com diferentes concentrações de 2,5-hexanodiona em intervalos que variaram de 2 a 20 min, e verificou-se que o tempo de pré-incubação não interferia na inibição da AChE pela 2,5-hexanodiona (dados não mostrados). Assim, utilizou-se, em todos os experimentos, o tempo de pré-incubação de dois minutos.

#### III.4.1. Determinação das constantes cinéticas $K_m$ e $V_{max}$ da acetilcolinesterase de cérebro de ratos e efeitos da 2,5-hexanodiona

Neste estudo, determinou-se as constantes cinéticas da acetilcolinesterase de cérebro de ratos adultos e os efeitos da 2,5-hexanodiona sobre estes parâmetros.

Na determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , foram utilizadas de 5-6 concentrações de acetiltiocolina que variaram de 0,025 a 1,0 mM. Os efeitos da 2,5-hexanodiona sobre o  $K_m$  e  $V_{max}$  da acetilcolinesterase foram determinados na presença de 4-8 concentrações de 2,5-hexanodiona (0, 1, 2, 5, 10, 20, 35, 50 mM) para 4 concentrações de acetiltiocolina (0,025, 0,05, 0,1, 0,4 mM). A enzima (0,2-0,4 mg de proteína, solução S1) foi pré-incubada por 2 min a 25°C na presença 0,1

mM de etopropazina e da 2,5-hexanodiona. A reação foi iniciada pela adição do substrato.

As constantes  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculadas usando-se o método gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) [Price & Stevens, 1989].

#### III.4.1.1. Constantes cinéticas para acetilcolinesterase de cérebro de ratos adultos

O gráfico duplo-recíproco da velocidade inicial versus concentração de substrato é apresentado na figura 13. O valor de  $K_m$  determinado para a AChE foi de  $41,4 \pm 2,7$   $\mu$ M de acetiltiocolina e a  $V_{max}$  encontrada foi de  $1,83 \pm 0,12$   $\mu$ moles de acetiltiocolina hidrolisada por hora por mg de proteína (n=14) a 25°C e pH 7,5.

#### III.4.1.2. Constantes cinéticas $K_m$ e $V_{max}$ na presença de 2,5-hexanodiona

O gráfico duplo-recíproco da velocidade inicial versus a concentração de substrato da atividade específica da AChE de cérebro na presença de várias concentrações de 2,5-hexanodiona é apresentado na figura 14. A análise de variância revela um efeito significativo da 2,5-hexanodiona sobre os parâmetros cinéticos [ $K_m$ ,  $F(7,61) = 6,21$ ,  $p < 0,0001$ ;  $V_{max}$ ,  $F(7,61) = 4,25$ ,  $p < 0,0007$ ]. O  $K_m$  aparente apresentou-se aumentado e o  $V_{max}$  diminuído na presença de 10 mM ou mais de 2,5-hexanodiona. Tal tipo de alterações nestes parâmetros, aumento do  $K_m$  e diminuição na  $V_{max}$ , caracteriza uma inibição do tipo mista. Para maior clareza, na tabela XXI estão apresentados os

valores dos Km aparentes e Vmax obtidos na presença de 2,5-hexanodiona.

#### III.4.1.3. Constante de dissociação (Ki) para a 2,5-hexanodiona

A constante de dissociação, Ki, para a 2,5-hexanodiona foi calculada segundo o método gráfico de Dixon [Dixon & Webb, 1964], plotando-se na abscissa a variação da concentração de inibidor e na ordenada o inverso da velocidade (1/V), na presença de 4 concentrações fixas de substrato (0,025, 0,05, 0,1 e 0,4 mM de ATC) (figura 15). Os resultados obtidos de 8-12 ensaios enzimáticos por concentração de ATC apresentados no gráfico mostram que a projeção do intercepto das retas em direção à abscissa, determina um Ki de 7,1 mM de 2,5-hexanodiona. Esta constante foi semelhante àquela obtida por outros autores para Electrophorus electricus [Dafforn et al., 1979], que encontram um Ki de 4,1 mM. As características deste gráfico também sugerem que a inibição induzida pela 2,5-hexanodiona sobre a AChE seja do tipo mista linear [Segel, 1979]. Outro aspecto importante é que o "plot" obtido para a obtenção do Ki foi linear, que sugere um complexo ESI não ativo cataliticamente.

#### III.4.1.4. Formação de um complexo enzima-substrato-inibidor não produtivo

Com o objetivo de verificar se concentrações muito altas de 2,5-hexanodiona inibiriam totalmente a atividade da AChE,

incubou-se a fração S1 em concentrações que variaram de 0 a 800 mM de 2,5-hexanodiona.

Na figura 16, observa-se que a atividade da AChE na presença de 0,05 mM de ATC foi completamente inibida por 200 mM de 2,5-hexanodiona; na presença de 0,1 mM de ATC, a concentração de 2,5-hexanodiona que inibiu 100 % da atividade enzimática foi de 400 mM; enquanto que uma concentração de 800 mM de 2,5-hexanodiona foi necessária para inibir completamente a atividade da enzima na presença de 0,8 mM de ATC. Estes resultados demonstram que a inibição total da atividade da AChE por 2,5-hexanodiona está relacionada à concentração de substrato presente no meio. Esta relação, porém, não é proporcional. Para um aumento de 16 vezes na concentração de substrato (de 0,05 mM para 0,8 mM) aumentou-se 4 vezes a concentração de 2,5-hexanodiona para induzir 100 % de inibição da AChE.

A inibição total da atividade enzimática por concentrações muito altas de inibidor colaboram com a indicação anterior (determinação do  $K_i$ ) da formação de um complexo ESI não produtivo [Segel, 1979].

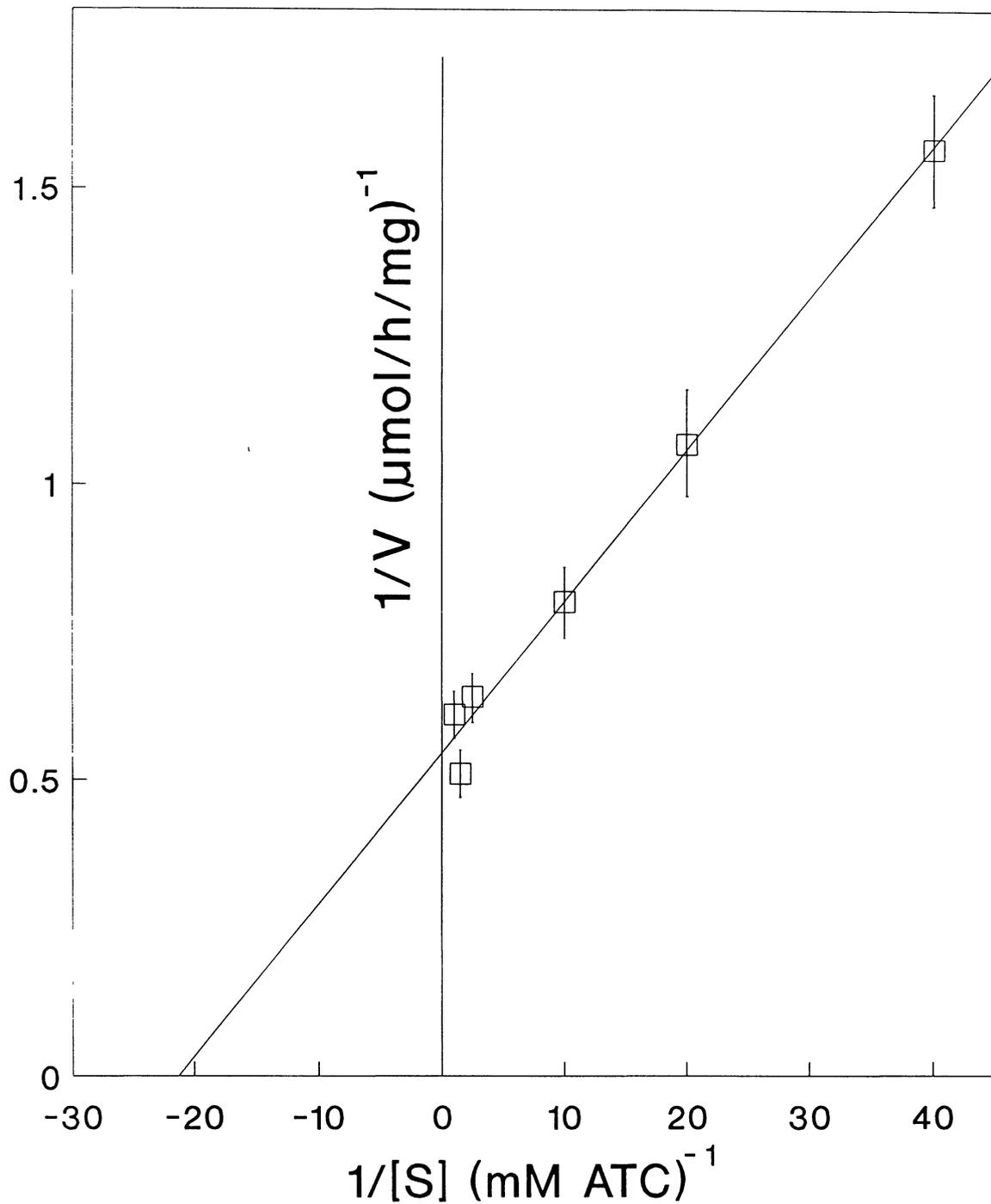


FIGURA 13. GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK DA ATIVIDADE ESPECIFICA DA ACETILCOLINESTERASE DE CEREBRO DE RATOS. S1 foi incubado a  $25^{\circ}\text{C}$  e pH 7,5 com 0,025 a 1,0 mM de acetiltiocolina (ATC).  $K_m = 41,4 \pm 2,7 \mu\text{M}$  de ATC e  $V_{\text{max}} = 1,83 \pm 0,12 \mu\text{moles}$  de ATC hidrolisada por hora por mg de proteina (n=14). Média  $\pm$  erro padrao de  $1/V$  versus  $1/[S]$ .

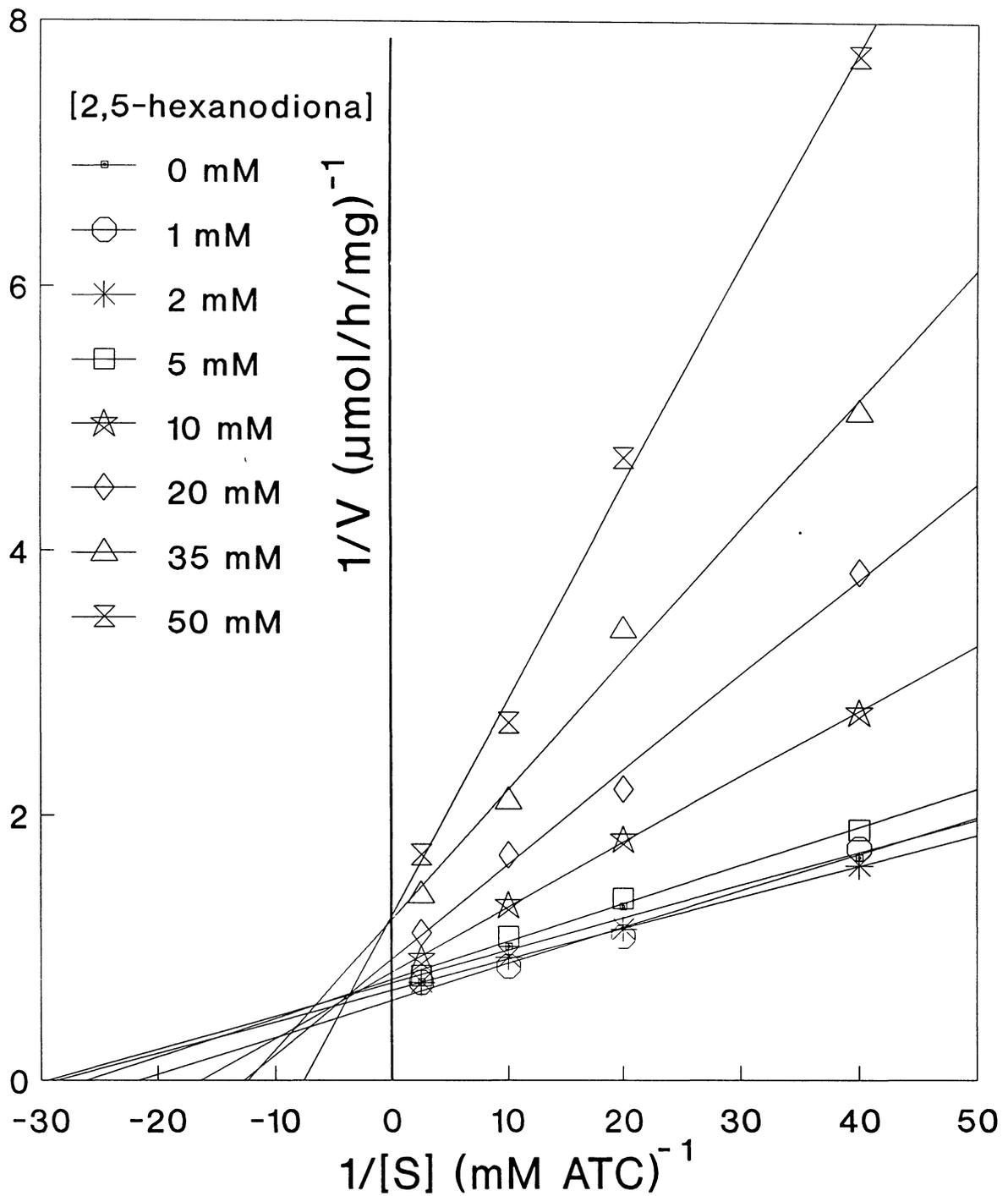


FIGURA 14. EFEITO DA 2,5-HEXANODIONA SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS ( $K_m$  E  $V_{max}$ ) DA AChE DE CEREBRO DE RATOS. Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade da AChE de cérebro de ratos, na presença de 0 a 50 mM 2,5-hexanodiona. O gráfico foi construído a partir da média de 5-14 ensaios enzimáticos por concentração de inibidor.

TABELA XXI. PARÂMETROS CINÉTICOS,  $K_m$  e  $V_{max}$ , DA AChE DETERMINADOS NA PRESENÇA DE 0 A 50 mM DE 2,5-HEXANODIONA.

[2,5-hexanodiona]	$K_m$ aparente	$V_{max}$	N
mM	$10^{-3}$ mM	$\mu\text{moles.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	
0	$39,4 \pm 3,1$	$1,63 \pm 0,11$	14
1	$47,7 \pm 6,7$	$1,71 \pm 0,21$	7
2	$35,3 \pm 3,2$	$1,48 \pm 0,12$	5
5	$37,9 \pm 3,6$	$1,32 \pm 0,13$	5
10	$60,8 \pm 6,6^*$	$1,31 \pm 0,08^\#$	14
20	$74,6 \pm 10,8^{**}$	$1,11 \pm 0,08^\#$	9
35	$90,0 \pm 12,0^\#$	$0,94 \pm 0,08^\#$	10
50	$196,1 \pm 46,7^{**}$	$1,09 \pm 0,18^{**}$	11

Os  $K_m$  aparentes e  $V_{max}$  foram determinados de acordo com o gráfico de Lineweaver-Burk apresentado na figura 14. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão. N = número de amostras analisadas.

Teste de raio múltiplo de Duncan: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,007$ , #  $p < 0,002$ , comparado à concentração 0 mM.

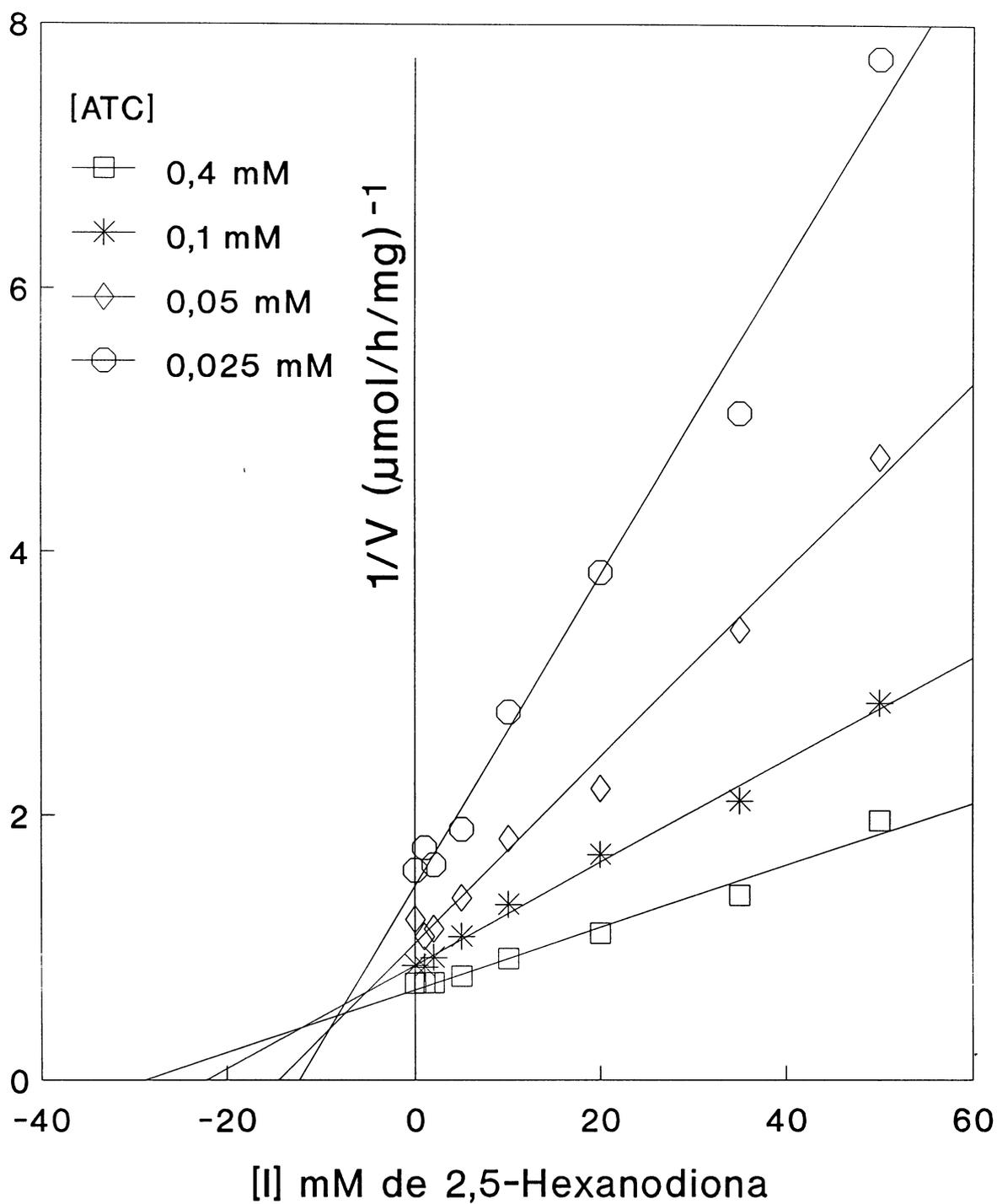
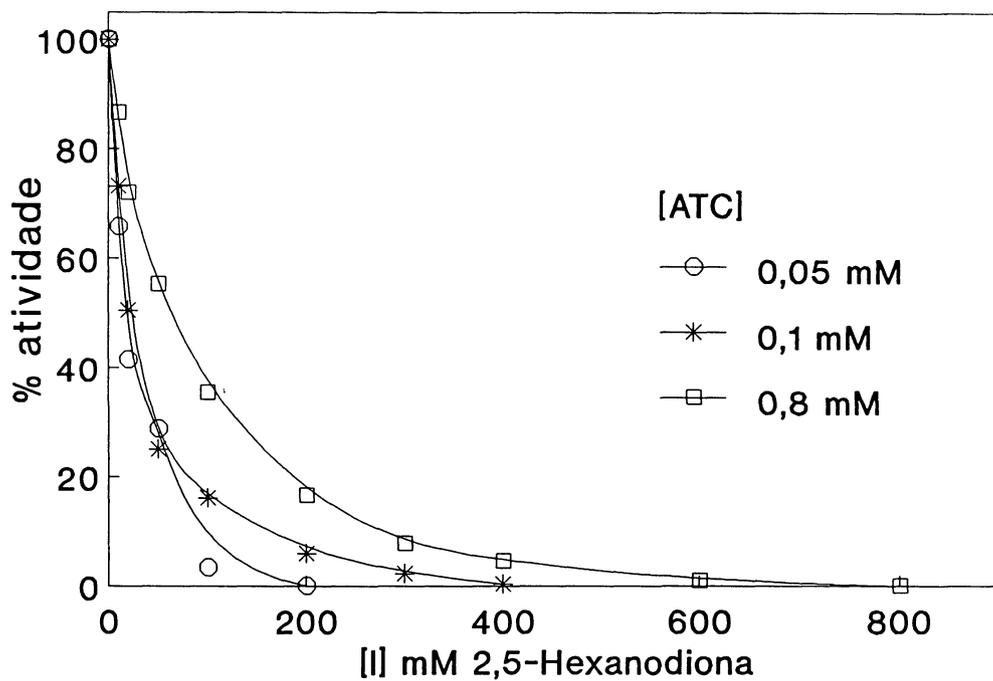


FIGURA 15. GRAFICO DE DIXON PARA A DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO,  $K_i$ , DA 2,5-HEXANODIONA PARA A AChE DE CEREBRO DE RATOS.  $1/V$  versus  $[I]$  a diferentes concentrações de substrato. A projeção do intercepto em direção à abscissa determina um  $K_i$  de 7,1 mM.



**FIGURA 16. PORCENTAGEM DA ATIVIDADE DA AChE DE CEREBRO DE RATOS NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES ALTAS DE 2,5-HEXANODIONA. % da atividade da AChE de cérebro versus concentração de 2,5-hexanodiona na presença de diferentes concentrações de substrato. Os resultados representam a média de 4 ensaios enzimáticos para cada concentração de inibidor e substrato.**

#### III.4.2. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo de ratos adultos tratados agudamente com 2,5-hexanodiona

No item III.3.1., verificou-se que a administração aguda, intraperitoneal, de 2,5-hexanodiona causa antinocicepção. No intervalo de 1 hora após o tratamento, todas as doses foram efetivas, sendo que a dose de 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona causou analgesia desde os 10 min após o tratamento. Neste experimento, mediu-se a atividade específica da AChE de cérebro e cerebelo de ratos tratados com veículo ou 2,5-hexanodiona (800 mg/kg). Os animais foram mortos 1 hora após a administração das drogas. O cérebro e cerebelo foram dissecados e preparados para a análise da atividade enzimática, como descrito em material e métodos.

As atividades específicas da AChE de cérebro e cerebelo são apresentados na tabela XXII.

O teste t de Student para amostras independentes revela diferenças não significativas entre os dois grupos na atividade de AChE para ambos os tecidos, isto é, o tratamento intraperitoneal com 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona, uma dose que produz analgesia marcante, não alterou a atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo de ratos adultos.

TABELA XXII. ATIVIDADE ESPECIFICA DA AChE DE CEREBRO E CEREBELO DE RATOS ADULTOS TRATADOS AGUDAMENTE COM 800 mg/kg DE 2,5-HEXANODIONA.

-----			
Atividade específica ( $\mu\text{mol/h/mg}$ proteína)			
	CEREBRO	CEREBELO	N
-----			
VEICULO	2,68 $\pm$ 0,15	0,954 $\pm$ 0,071	4
2,5-HEXANODIONA	2,43 $\pm$ 0,48	0,906 $\pm$ 0,142	4
-----			

Os animais foram mortos 1 hora após a administração das drogas, ip. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da atividade específica, expressa como  $\mu\text{mol}$  de ATC hidrolisado por hora por  $\text{mg}$  de proteína. N = número de animais por grupo.

Não há diferença significativa entre os grupos, para a mesma estrutura (teste t de Student).

### III.4.3. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e cerebelo e colinesterase de soro de ratos adultos tratados cronicamente com 2,5-hexanodiona

No item III.4.1., verificou-se que a AChE de cérebro apresentou-se inibida pelo tratamento "in vitro" com 2,5-hexanodiona (figura 14).

Bastone e colaboradores (1987) estudando o efeito do tratamento com 2,5-hexanodiona na água de beber constataram que a atividade da AChE de plasma apresentava-se aumentada nos animais tratados com a droga. Em cérebro, o tratamento não foi efetivo.

Neste experimento, estudou-se a atividade da AChE de cérebro e cerebelo de ratas adultas (60 a 70 dias, pesando de 150-175 g) tratadas por diferentes períodos com 2,5-hexanodiona. Os animais foram mortos 24 horas após a última injeção, e o cérebro e cerebelo removidos e preparados para a análise da atividade enzimática, como descrito em material e métodos. Também verificou-se a atividade total de colinesterases de soro de animais tratados por 40 dias com a droga.

#### III.4.3.1. Atividade da AChE de cérebro e cerebelo

A análise de variância de duas vias comparando 2 tratamentos (veículo e 2,5-hexanodiona) X 4 intervalos de tratamento (10, 20, 40 e 60 dias) revela que não houve efeito significativo do tratamento, do intervalo de tratamento, nem interação significativa entre tratamento X intervalo de tratamento tanto para cérebro como para cerebelo.

Os resultados, apresentados na tabela XXIII, demonstram que a AChE de cérebro e cerebelo não é sensível ao tratamento prolongado com a 2,5-hexanodiona. A ausência de efeito pode estar relacionada aos níveis baixos de droga atingidos no sistema nervoso central "in vivo" pelo tratamento subcutâneo [Couri & Milks, 1982] e, como a inibição do tipo mista envolve um fator competitivo, o substrato endógeno (acetilcolina) poderia deslocar o inibidor do sítio ativo da enzima [Segel, 1979].

#### III.4.3.2. Atividade da ChE de soro de ratos adultos tratados por 40 dias

A atividade da ChE de soro de ratas adultas dos animais tratados com veículo ou 2,5-hexanodiona foram comparadas pelo teste t de Student (tabela XXIV). Os resultados demonstram que não há diferença significativa entre os tratamentos na atividade da ChE. Estes resultados diferem daqueles verificados por Bastone e colaboradores (1987), que encontraram um aumento na atividade da AChE de plasma de ratos tratados com 2,5-hexanodiona ou n-hexano. Entretanto, aqui foi analisada a atividade total da ChE, isto é, incluiu-se a atividade da AChE e da BuChE.

TABELA XXIII. ATIVIDADE ESPECIFICA DA AChE DE CEREBRO E CEREBELO DE RATAS ADULTAS TRATADAS PROLONGADAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.

Tratamento	Atividade da AChE ( $\mu\text{mol/h/mg}$ proteina)		
	CEREBRO	CEREBELO	N
10 dias			
veículo	2,95 $\pm$ 0,27	1,01 $\pm$ 0,06	3
HD-200	2,61 $\pm$ 0,24	0,91 $\pm$ 0,09	3
20 dias			
veículo	2,48 $\pm$ 0,10	1,17 $\pm$ 0,24	4
HD-200	2,50 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,25	4
40 dias			
veículo	3,78 $\pm$ 0,45	0,98 $\pm$ 0,11	5
HD-200	3,28 $\pm$ 0,22	0,70 $\pm$ 0,14	5
60 dias			
veículo	2,95 $\pm$ 0,25	0,76 $\pm$ 0,08	11
HD-200	2,89 $\pm$ 0,22	0,75 $\pm$ 0,09	12

Ratas adultas foram tratadas por 10, 20, 40 ou 60 dias com veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200), sc. As amostras foram incubadas a 25°C e pH 7,5 com 0,8 mM de ATC. Atividade da AChE é apresentada como média  $\pm$  erro padrao e expressa como  $\mu\text{mol}$  de acetiltiocolina hidrolisado por hora por mg de proteina. N = número de animais por grupo.

Nao há diferença significativa entre os grupos no mesmo intervalo de tratamento (teste t de Student).

TABELA XXIV. ATIVIDADE ESPECIFICA DA ChE DE SORO DE RATAS ADULTAS TRATADAS CRONICAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.

Tratamento	N	Atividade da ChE $\mu\text{mol de ATC / min / ml de soro}$
Veículo	6	1,02 $\pm$ 0,05
2,5-hexanodiona	7	0,93 $\pm$ 0,07

Os animais receberam veículo ou 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona por 40 dias, sc. A amostra de soro foi incubada a 25°C e pH 7,5. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão e a atividade específica expressa como  $\mu\text{mol de ATC hidrolisado por min por ml de soro}$ . N = número de animais por grupo.

Não há diferença significativa entre os grupos (Teste t de Student).

#### III.4.4. Atividade da acetilcolinesterase de cérebro e colinesterase de soro de ratos jovens tratados prolongadamente com 2,5-hexanodiona

Os resultados anteriores demonstram que a atividade da AChE de cérebro e ChE de soro de ratos adultos não apresentou-se alterada pelo tratamento com 2,5-hexanodiona. Neste estudo, investigou-se se a enzima de animais jovens, tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida, seria mais sensível ao tratamento do que a de animais adultos.

Ratos machos e fêmeas foram tratados a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida com veículo, 200 ou 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona ou 207 ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol, sc. Os animais foram mortos 24 horas após o 5<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup> ou 36<sup>o</sup> dia de tratamento. A atividade da AChE de cérebro foi analisada após 8, 16, 25 e 36 dias de tratamento e a atividade das colinesterases de soro após 5, 8, 25 e 36 dias de tratamento.

##### III.4.4.1. Atividade da AChE de cérebro de ratos jovens

A análise de variância de duas vias para amostras independentes da atividade da AChE de cérebro de ratos jovens revela efeito significativo da idade [ $F(3,7) = 78,59$ ,  $p < 0,001$ ]. Não houve, porém, efeito significativo do tratamento, nem interação significativa entre tratamento X idade. O efeito da idade foi devido ao fato de que a atividade específica da enzima apresentou-se maior com o aumento da idade, em todos os grupos (figura 17). O tratamento com o hexacarbono 1,6-hexanodiol não apresentou nenhum sinal de

toxicidade.

Estes resultados demonstram que a AChE de cérebro de animais jovens expostos ao hexacarbono a partir do 4<sup>o</sup> dia de vida pós-natal não foi sensível ao tratamento com a droga. A ontogenia da enzima também não foi alterada pelo tratamento.

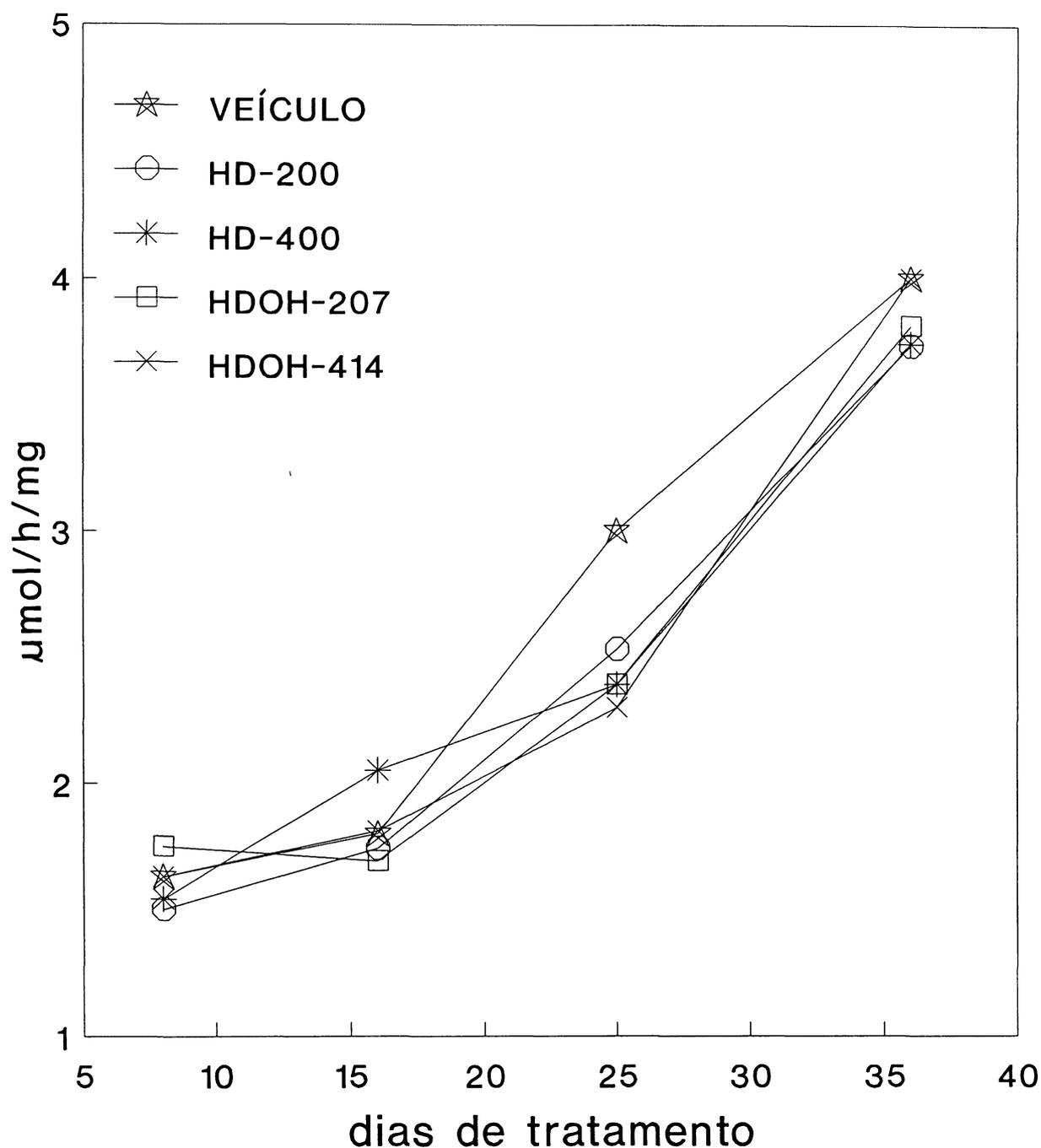
#### III.4.4.2. Atividade da ChE de soro de ratos jovens

As atividades da ChE e AChE (considerada como a atividade obtida na presença de um inibidor da butirilcolinesterase, a etopropazina) foram analisadas por uma análise de variância de três vias (considerando as atividades enzimáticas como medida repetida), comparando 5 tratamentos X 4 intervalos de tratamentos X 2 medidas (AChE e ChE). Os resultados estatísticos revelam efeito significativo do tratamento [ $F(4,88) = 4,11, p < 0,004$ ] e efeito dos dias de tratamento [ $F(3,88) = 10,53, p < 0,0001$ ]. Ainda, a análise demonstra interação significativa entre tratamento X medida [ $F(4,88) = 2,64, p < 0,04$ ] e entre dias de tratamento X medida [ $F(3,88) = 4,70, p < 0,004$ ] (tabela XXV).

A análise de variância com medida repetida, comparando as duas atividades enzimáticas x 5 tratamentos em cada intervalo individual de exposição à droga, demonstra que em todos os intervalos de tratamento houve diferença significativa entre a atividade da ChE e AChE [5 dias,  $F(1,15) = 136,01, p < 0,001$ ; 8 dias,  $F(1,19) = 70,91, p < 0,001$ ; 25 dias,  $F(1,20) = 131,61, p < 0,001$ ; 36 dias,  $F(1,37) = 210,06, p < 0,001$ ]. Porém, não houve efeito significativo do tratamento, nem interação entre tratamentos X medidas.

A análise de variância de uma via, considerando uma medida (ChE ou AChE) em um intervalo de tratamento, mostra que não há diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos de tratamento e em nenhuma das medidas.

O efeito do tratamento, verificado na análise de variância de três vias, deveu-se ao fato de que esta análise considera a soma das atividades (ChE e AChE) em todos os intervalos de tratamento, e, como pode ser visto na tabela XXV, os animais tratados com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona apresentam atividades ligeiramente maiores que os demais grupos.



**FIGURA 17. ONTOGENIA DA AChE DE CEREBRO DE RATOS JOVENS TRATADOS PROLONGADAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.** Os animais foram tratados por 8, 16, 25 ou 36 dias, a partir do 4<sup>o</sup> de vida, com veículo, 200 ou 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (HD-200, HD-400) ou 207 ou 414 mg/kg de 1,6-hexanodiol (HDOH-207, HDOH-414), *sc.* Dados são apresentados como média da atividade específica, expressa como  $\mu$ moles de ATC hidrolisado por hora por mg de proteína (n=6-7). Erro padrão inferior a 10 % do valor da média.

Não há diferença significativa entre os grupos em cada intervalo de tratamento (análise de variância de uma via).

TABELA XXV. COLINESTERASE E ACETILCOLINESTERASE DE SORO DE RATOS JOVENS TRATADOS PROLONGADAMENTE COM 2,5-HEXANODIONA.

Tratamento	N	nmol ATC / min / ml de soro	
		ChE	AChE
5 dias			
Veículo	4	235,6 ± 6,1	132,3 ± 7,3
HD-200	4	221,5 ± 27,6	125,8 ± 9,6
HD-400	4	241,8 ± 17,6	146,3 ± 6,5
HDOH-207	4	208,0 ± 23,5	126,1 ± 14,3
HDOH-414	4	194,6 ± 24,7	120,6 ± 11,2
8 dias			
Veículo	5	187,7 ± 19,2	112,1 ± 9,6
HD-200	5	173,0 ± 18,1	113,6 ± 10,2
HD-400	5	204,4 ± 26,8	144,4 ± 18,4
HDOH-207	4	156,7 ± 16,3	104,5 ± 11,4
HDOH-414	5	155,2 ± 12,9	119,2 ± 9,7
25 dias			
Veículo	5	145,7 ± 7,4	85,9 ± 5,7
HD-200	5	172,3 ± 31,0	86,9 ± 11,2
HD-400	5	216,2 ± 18,7	99,5 ± 11,8
HDOH-207	5	168,5 ± 20,4	85,9 ± 10,6
HDOH-414	5	156,0 ± 16,2	93,1 ± 2,4
36 dias			
Veículo	10	213,1 ± 17,1	131,4 ± 6,8
HD-200	7	203,8 ± 15,6	134,0 ± 11,1
HD-400	9	225,9 ± 13,4	147,3 ± 8,8
HDOH-207	7	199,3 ± 13,0	140,2 ± 7,9
HDOH-414	6	171,9 ± 17,4	116,3 ± 7,6

Os animais foram tratados por 5, 8, 25 ou 36 dias, como descrito na figura 17. As atividades enzimáticas são expressas como nmol de substrato hidrolisado por min por ml de soro. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. N = número de amostras analisadas.

Teste F para efeito simples revela diferença significativa entre as duas atividades enzimáticas, em todos os grupos, para  $p < 0,05$ .

Não há efeito do tratamento considerando cada intervalo de intoxicação e uma atividade enzimática (análise de variância de uma via).

#### IV. DISCUSSAO

Um dos principais objetivos deste trabalho foi a montagem de um modelo de intoxicação prolongada de ratos com 2,5-hexanodiona que tornasse possível o estudo dos efeitos da droga sobre parâmetros comportamentais, físicos e bioquímicos.

Não se pretendia, no entanto, comparar este modelo de intoxicação com aqueles verificados na intoxicação ocupacional e voluntária em humanos. Em primeiro lugar, neste estudo, foi usado como agente neurotóxico a 2,5-hexanodiona, por ser este o principal metabólito neurotóxico de vários hexacarbonos, entre eles o n-hexano e a 2-hexanona [Couri & Milks, 1982; Krasavage et al., 1980]. Tal escolha baseou-se no fato de ser de fácil manuseio e pouco volátil. No entanto, como descrito anteriormente, nenhum caso de neuropatia foi descrito pela intoxicação ocupacional com este solvente. A segunda preocupação estaria na comparação dos efeitos deste modelo com os efeitos da exposição ocupacional ao n-hexano, pois, além das dificuldades inerentes à transposição de dados de animais experimentais para humanos, sabe-se que, na intoxicação ocupacional, os indivíduos estão expostos, juntamente com o n-hexano, a outros solventes (metil-etil-cetona, tolueno, etc), que podem agravar ou amenizar os efeitos do n-hexano [Kawai et al., 1991; Nylén et al., 1994a,b; Perbellini et al., 1982; Ralston et al., 1985].

Quanto à via de administração, escolheu-se a via subcutânea por prolongar o tempo de absorção da droga em

jovens tratados com 200 mg/kg e de cérebro e fígado dos ratos jovens tratados com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona (tabela I, figura 5 e 6). A diminuição no ganho de peso corporal provocada pela droga, porém, foi ligeiramente mais acentuada do que a verificada no peso de cérebro e fígado, desde que a relação entre o peso de órgão e o peso corporal apresenta-se aumentada, tanto para os ratos adultos como para os ratos jovens (cérebro de ratos tratados por 25 e 36 dias com 400 mg/kg e fígado para os animais tratados por 25 dias com 200 e 400 mg/kg) (tabela V).

Diminuição no ganho de peso corporal de ratos adultos tem sido relatada frequentemente em animais tratados com a 2,5-hexanodiona [Anthony et al., 1983b; DeCaprio & O'Neill, 1985; Ladefoged et al., 1989; Horan et al., 1989; Larsen et al., 1991]. Nesses estudos, porém, o efeito sobre o peso foi mais drástico, provavelmente devido às doses usadas, que variaram de 300 - 700 mg/kg. Alguns autores relatam ainda perda de peso corporal provocada pelo tratamento com o hexacarbono [Bastone et al., 1987; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio et al., 1988].

A diminuição no ganho de peso corporal verificada neste estudo poderia estar relacionada a uma diminuição na ingestão alimentar. Observou-se no entanto, que os animais adultos tratados com 2,5-hexanodiona não comem menos do que os animais controles e, até bebem mais do que os últimos (figuras 2 e 3, tabela II). Um efeito não esperado foi a maior ingestão alimentar apresentada pelos ratos adultos tratados com 1,6-hexanodiol.

Os resultados do presente estudo diferem daqueles de outros autores, os quais obtiveram uma diminuição nas ingestões líquida [DeCaprio et al., 1985; Ladefoged et al., 1989; Larsen et al., 1991] e sólida [Bastone et al., 1987, Larsen et al., 1991] pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona. No entanto, nesses estudos, a droga foi administrada na água de beber em concentrações de 0,5% a 1% (v/v), o que equivale a uma dose de 400 - 750 mg/kg de 2,5-hexanodiona por dia. Além das doses serem mais altas do que a utilizada neste trabalho, a presença da droga na água de beber pode causar aversão à ingestão de líquido, provocando, desta forma, uma redução no consumo alimentar. Aliás, quando a dose de 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona é injetada subcutaneamente em ratos adultos, não se verifica alteração no consumo de água e comida destes animais, o que reforça a hipótese da importância da via de administração para os efeitos observados [Pereira et al., 1994].

Em ratos jovens, o consumo alimentar não foi analisado. Um método usado para o controle do consumo de leite pelo filhote é o controle de peso antes e depois da mamada [Pault, 1970; Weiner & Levine, 1978]. Considera-se, no entanto, este método bastante artificial e errático, desde que o mesmo não leva em conta os processos de eliminação de fezes e urina que podem ocorrer durante este período.

A diferença de peso corporal observada tanto em ratos adultos como em ratos jovens intoxicados com 2,5-hexanodiona não foi acompanhada por alterações na glicemia e nos níveis de

de proteínas séricas nem no conteúdo de glicogênio hepático e muscular (tabelas III, VI, VII), exceção feita aos ratos jovens tratados por oito dias com a dose de 400 mg/kg, que apresentaram uma menor glicemia do que o grupo controle. Este efeito, porém, não foi verificado nos demais intervalos de tratamento, o que sugere que seja um efeito transitório, desaparecendo no decorrer dos dias.

Quanto ao conteúdo de glicogênio, os animais jovens tratados com 2,5-hexanodiona, independente da dose, e os animais adultos apresentam resultados semelhantes ao grupo controle. Deve-se ressaltar, porém, que os ratos adultos tratados com 1,6-hexanodiol apresentam conteúdo de glicogênio hepático superior aos apresentados pelos demais grupos. Este aumento deve estar relacionado ao maior consumo de comida apresentado por estes animais (discutido anteriormente), o que, por sua vez, induziria um aumento do depósito deste combustível.

Estes resultados sugerem que a diminuição no ganho de peso corporal apresentado pelos animais tratados com 2,5-hexanodiona não deve estar relacionada a efeitos nutricionais, desde que, em ratos adultos, não observou-se deficiência na ingestão alimentar e, em ratos adultos e jovens, os níveis de glicose e glicogênio também não foram alterados.

Uma das hipóteses sugeridas para o mecanismo de neurotoxicidade dos hexacarbonos seria a inibição de enzimas glicolíticas, o que, por sua vez, provocaria uma redução do suprimento de energia para o axônio [Sabri et al., 1979; Sakamoto & Hashimoto, 1985a,b; Spencer et al., 1979].

Neste trabalho, analisou-se a atividade de algumas enzimas em cérebro e fígado de ratos adultos e jovens intoxicados cronicamente com 2,5-hexanodiona. Apesar de não ser um órgão diretamente relacionado com a neurotoxicidade dos hexacarbonos, estudaram-se as atividades das enzimas no fígado (assim como os outros parâmetros abordados anteriormente), por ser este um órgão alvo no metabolismo de drogas e no controle do metabolismo energético de todo o organismo, regulando entre outras vias, o fornecimento de glicose para o sistema nervoso central [Bradford, 1986; Lehninger et al, 1993].

Em animais adultos, estudaram-se as enzimas LDH, MDH e enolase de cérebro e fígado e glicogênio fosforilase de fígado. Verificou-se que a atividade específica destas enzimas não foi alterada pelo tratamento com 2,5-hexanodiona (tabela IV). A ativação da fosforilase b pelo AMPc foi semelhante em todos os grupos.

Inibição da enolase, mas não da LDH, tem sido relatada "in vitro" pela 2,5-hexanodiona, onde os autores obtiveram um  $IC_{50}$  de 67,7 mM [Howland et al., 1980b]. A baixa sensibilidade da enzima ao composto pode ser a causa da ausência de efeito verificada no presente estudo.

Com exceção da enolase, as demais enzimas também foram analisadas em animais jovens tratados somente com as doses maiores dos hexacarbonos (400 mg/kg para a 2,5-hexanodiona e 414 mg/kg para o 1,6-hexanodiol).

A atividade específica das enzimas LDH e MDH de cérebro e MDH e glicogênio fosforilase de fígado foram semelhantes entre

os grupos (figura 7-9). Apenas a atividade da LDH de fígado (figura 8) apresentou-se ligeiramente inibida (22 %) pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona. Os resultados para a LDH de cérebro estão de acordo com aqueles de Howland e colaboradores (1980b), que não encontraram qualquer alteração na atividade da enzima de cérebro de ratos "in vitro".

A diferença na sensibilidade da LDH de fígado de ratos jovens ao tratamento com 2,5-hexanodiona entre ratos jovens e adultos deve estar relacionada às doses diferentes utilizadas para a intoxicação dos mesmos, desde que os animais adultos receberam 200 mg/kg/dia enquanto os animais jovens receberam 400 mg/kg/dia de 2,5-hexanodiona.

A ausência de efeitos da droga sobre as demais enzimas estudadas pode estar relacionada a dois fatores: primeiro, ao nível baixo de droga circulante atingido "in vivo" pelo tratamento; segundo, ao efeito sobre a enzima ser passageiro, de tal forma que possa ter ou não aparecido no intervalo de tratamento utilizado no presente estudo (36-40 dias).

Apesar de fora dos objetivos principais deste estudo, pode-se comparar as atividades enzimáticas entre ratos adultos e jovens. Verifica-se que a atividade da MDH de cérebro de ratos adultos é bem maior do que a atividade da enzima em ratos jovens. Convém ressaltar, entretanto, que, em ratos jovens, a MDH foi analisada em homogeneizado de cérebro, enquanto que, em ratos adultos, a mesma enzima foi dosada em fração mitocondrial. Quando a atividade da MDH é analisada em homogeneizado, a atividade enzimática obtida não se restringe somente a MDH mitocondrial, abrangendo também as atividades da

MDH citosólica e enzima málica. Porém, a atividade baixa obtida em homogeneizado de cérebro pode estar relacionada à baixa atividade da MDH citosólica neste órgão devido à pouca (ou nenhuma) utilidade desta enzima na regeneração de oxalacetato para a gliconeogênese (não ocorre no cérebro) e ainda ao fato de que a lançadeira de elétrons em funcionamento no cérebro é a do glicerol-fosfato e não a do malato-aspartato [Lehninger et al., 1993].

#### IV.2. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS EM RATOS PELO TRATAMENTO COM 2,5-HEXANODIONA.

A inexistência de dados na literatura relacionados aos efeitos comportamentais dos hexacarbonos levou-nos a estudar o desempenho de ratos adultos e jovens tratados cronicamente com 2,5-hexanodiona.

No experimento com animais adultos, ratas foram tratadas prolongadamente com 200 (dose alta) ou 20 mg/kg (dose baixa) de 2,5-hexanodiona e submetidas a três tarefas comportamentais: habituação a um campo aberto, esquiva inibitória e esquiva ativa de duas vias, em dois intervalos de tratamento. O tratamento de animais adultos com 1,6-hexanodiol foi omitido devido ao fato de que, em todos os parâmetros discutidos até o momento, não houve qualquer efeito tóxico do composto. Desta forma, o grupo tratado com 2,5-hexanodiona foi somente comparado ao grupo veículo.

Os animais tratados com dose alta do hexacarbono apresentaram, na tarefa de habituação ao campo aberto, uma

redução no número de respostas de orientação e de cruzamentos, nos 2 intervalos de tratamento analisados, 15 e 30 dias. Entretanto, todos os grupos apresentaram uma redução no número de respostas de orientação e cruzamentos na sessão de teste quando comparada a sessão de treino, indicando que, embora a atividade motora tenha sido afetada, os ratos habituaram-se à tarefa [Izquierdo, 1979; Izquierdo et al., 1984]. Desta forma, a memória desta tarefa parece não ter sido prejudicada pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona.

Os efeitos sobre a atividade motora obtidos neste estudo diferem daqueles observados por outros autores os quais verificaram deficiência motora em um "rotarod" após 3 semanas de tratamento com 2,5-hexanodiona, usando doses maiores, administradas por via oral na água de beber [400 - 750 mg/kg, Ladefoged et al., 1989] ou por sonda [250 mg/kg, Ralston et al., 1991]. No entanto, neste experimento, verificaram-se efeitos locomotores já aos 15 dias de tratamento (tratamento breve).

Pode-se ainda observar que os efeitos sobre a atividade locomotora aparecem em paralelo aos efeitos sobre o peso corporal, apesar de que este último não apresentou-se tão prejudicado quando comparado a outros trabalhos [Bastone et al., 1987; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio et al., 1988].

Em torno de 25 dias de tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona, pode-se observar, por simples inspeção visual, sinais neurológicos, caracterizados por ligeira paresia e andar cambaleante. A intensidade destes sinais aumentou com a

continuidade do tratamento. Estes efeitos têm sido comumente relatados por outros autores [Abou-Donia et al., 1985; Anthony et al., 1983b; Braendgaard & Sidenius, 1986; DeCaprio & O'Neill, 1985; DeCaprio et al., 1988; Missumi et al., 1985; Rossi et al., 1982; Sahenk & Mendell, 1981].

Quando os animais foram submetidos à tarefa de esquiva ativa de duas vias em ambos os intervalos (25 e 50 dias) de tratamento e esquiva inibitória no intervalo maior (40 dias), eles já apresentavam sinais neurológicos de intoxicação pelo hexacarbono.

O desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória não foi afetado pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona. As ratas tratadas por 20 ou 40 dias com a droga apresentaram desempenho nas sessões de treino e teste e escore de retenção (diferença teste menos treino) similares aos apresentados pelos animais controle. Os animais tratados com 200 mg/kg por 40 dias apresentaram um ligeiro aumento na latência de descida da plataforma na sessão de treino, que poderia estar relacionado aos sinais neurológicos já presentes nos animais neste intervalo de tratamento. Porém, a diferença entre este grupo e o controle não foi significativa.

Assim como na tarefa de habituação ao campo aberto, também na esquiva inibitória, os animais não apresentaram deficiência de memória, apesar do envolvimento motor.

Na tarefa de esquiva ativa de duas vias, o desempenho dos animais foi marcadamente prejudicado pelo tratamento com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona. O número de respostas de esquiva foi

reduzido em, aproximadamente, 50 e 30 % do número de respostas apresentado pelo controle para o tratamento por 25 e 50 dias, respectivamente. Diferentemente dos animais controle, os ratos tratados com 2,5-hexanodiona não apresentaram aumento do número de respostas de esquiva na sessão de teste quando comparada à sessão de treino (tabela X). Estes resultados indicam que os ratos tratados com a droga apresentam uma deficiência de memória para esta tarefa. Entretanto, o enorme envolvimento da função motora, como pode também ser visto pela redução do número de cruzamentos interprovas (além dos efeitos sobre a tarefa de campo aberto), levantam dúvidas sobre a conclusão de um efeito sobre a memória. Por outro lado, os animais tratados com o hexacarbono apresentaram um menor número de respostas de esquiva na sessão de treino do que o grupo veículo, o que pode sugerir que eles tenham uma deficiência de aprendizagem mais do que uma deficiência de memória. Isto é, se os animais não aprendem a tarefa, eles não podem apresentar memória da mesma. Para analisar tal suposição, se poderia investigar o desempenho de ratos na tarefa de esquiva ativa durante a intoxicação e após um período de reabilitação da intoxicação. Se os animais aprendessem a associação entre os estímulos condicionado (tom) e incondicionado (choque), seu desempenho seria superior ao daqueles animais que nunca foram submetidos à tarefa. Isto parece plausível desde que a associação entre os estímulos condicionado e incondicionado consiste numa fase fundamental para a aprendizagem da tarefa de esquiva ativa, levando ao condicionamento instrumental [Izquierdo & Cavalheiro,

1976a,b.]. Para isto, a intoxicação não poderia afetar, de maneira permanente, a capacidade do animal de evocar esta tarefa.

Devido ao grande envolvimento motor nos efeitos da 2,5-hexanodiona na dose de 200 mg/kg, resolveu-se então testar uma dose do hexacarbono bem menor que esta sobre os mesmos parâmetros comportamentais investigados com a dose de 200 mg/kg.

Os resultados deste experimento demonstraram que a dose de 20 mg/kg de 2,5-hexanodiona não causou qualquer alteração no desempenho de ratos em nenhuma das tarefas testadas (tabelas de XI a XIII). Também não houve efeito sobre a atividade locomotora. Os animais não apresentaram sinais neurológicos nem alteração no peso corporal.

O comportamento de ratos jovens também foi analisado em três tarefas comportamentais: reflexo de geotactismo negativo, teste de alternar espontâneo e tarefa de esquiva inibitória. Duas das tarefas comportamentais foram diferentes daquelas utilizadas para ratos adultos porque tinha-se como objetivo avaliar o desempenho de ratos jovens desde o início do processo de intoxicação, isto é, num período ainda muito precoce da vida.

Os animais foram tratados com as doses maiores (400 mg/kg para a 2,5-hexanodiona e 414 mg/kg para o 1,6-hexanodiol) dos hexacarbonos, como descrito anteriormente para as enzimas glicolíticas. Neste experimento também foi utilizado o hexacarbono não neurotóxico, 1,6-hexanodiol, porque parte

destes ratos foram os mesmos utilizados para os ensaios das enzimas glicolíticas.

No comportamento de geotactismo negativo, estudou-se a latência para o animal virar com a face para cima e não o aparecimento do reflexo, porque com quatro a cinco dias de vida grande parte dos animais já apresenta o reflexo de geotactismo negativo [Da-Silva et al., 1990; Smart & Dobbing, 1971]. Verificou-se que, com passar dos dias, os animais respondem mais rapidamente à tarefa (figura 10). As curvas da latência de geotactismo são muito semelhantes entre os grupos, isto é, os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentam desempenho similar aos demais grupos.

No sétimo e oitavo dias de tratamento, observa-se uma tendência dos animais tratados com a 2,5-hexanodiona de apresentarem uma maior latência de geotactismo do que os demais grupos. Apesar de não significativo, este efeito pode estar relacionado ao início de um enfraquecimento motor dos ratos neste período de tratamento, o que coincide com o início da diferença no ganho de peso corporal de ratos jovens tratados com esta dose do hexacarbono (ver figura 4).

Aos 25 dias de tratamento, os animais foram observados em um labirinto em T, onde mediu-se o comportamento de alternar espontâneo os braços do labirinto (tabela XIV).

Nesta tarefa verificou-se que os animais tratados com 2,5-hexanodiona levam mais tempo para alternar o braço do labirinto e o fazem em provas subsequentes ao grupo controle. Como o limite para alternar o braço do labirinto é imposto pelo número de oportunidades de fazê-lo (5 provas) e não pela

latência em fazê-lo, o aumento da prova alternada pode estar relacionado a outros efeitos que não sobre a atividade locomotora destes animais.

O comportamento de alternar espontâneo assim como o desempenho em um labirinto radial de ratos parece depender da integridade da formação hipocampal [Olton et al., 1979]. Sobre este aspecto alguns autores têm sugerido que a desnutrição gestacional e/ou lactacional pode prejudicar o desenvolvimento do hipocampo [Noback & Eisenman, 1981], enquanto que outros autores não encontraram qualquer alteração no comportamento de alternar espontâneo de ratos desnutridos perinatalmente [Cravens, 1974; Hall, 1983; Smart, 1976].

No presente trabalho não determinou-se se os animais jovens tratados com 2,5-hexanodiona apresentam ou não alteração na formação hipocampal, mas verificou-se que o tratamento induz uma diminuição no ganho de peso corporal. Como discutido anteriormente, tal efeito parece não envolver parâmetros nutricionais.

O tratamento com 2,5-hexanodiona por 35 dias prejudicou o desempenho dos ratos jovens na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (tabela XV).

Na sessão de treino, os animais intoxicados levaram mais tempo para descer da plataforma que os demais grupos. Na sessão de teste, não houve diferença significativa. A diferença da latência entre as sessões de teste - treino (escores de retenção), porém, foi muito menor no grupo intoxicado do que nos demais grupos (aproximadamente 7 vezes

menor).

O aumento da latência na sessão de treino pode estar relacionado a uma deficiência locomotora. Entretanto, isto não facilitaria a descida da plataforma na sessão de teste, o que não descarta a possibilidade de uma deficiência na retenção da tarefa.

Aos 35 dias de tratamento, os animais tratados com 2,5-hexanodiona apresentaram uma diferença marcante de peso corporal em relação aos demais grupos (figura 4). Desta forma, se poderia levantar a hipótese de que o efeito sobre o tarefa de esquiva inibitória estaria relacionado à desnutrição e não a um efeito específico da droga. Entretanto, dados da literatura têm demonstrado que ratos desnutridos durante a amamentação apresentam desempenho igual [Vendite et al., 1987] ou melhor [Souza et al., 1992] do que ratos nutridos, na tarefa de esquiva inibitória. Os autores justificam o melhor desempenho dos ratos desnutridos como sendo uma consequência da maior sensibilidade ao choque que estes animais apresentam, o que facilitaria a memória no momento do teste [Souza et al., 1992; Vendite et al., 1987].

Estes resultados diferem daqueles observados em ratos adultos (tabela IX), onde observou-se que a retenção da tarefa de esquiva inibitória não foi alterada pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona. Esta diferença pode estar relacionada a pelo menos duas hipóteses: primeiro, a uma diferença nas doses usadas nos dois experimentos (ratos adultos: 200 mg/kg, ratos jovens: 400 mg/kg); segundo, ao fato de que o período de tratamento de ratos jovens iniciou-se no 4<sup>o</sup> dia de vida pós-

natal, atingindo as três principais fases de crescimento rápido do cérebro (0<sup>o</sup> ao 6<sup>o</sup>; 8<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dia e 17<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia de vida pós-natal) [Gottlieb et al., 1977]. Insultos externos aplicados em alguma destas fases de crescimento ou em todas pode levar a alterações permanentes sobre o SNC, atingindo funções específicas, como a cognição [Annau & Cuomo, 1988; Rodier, 1988; Rodrigues et al, 1993, 1994].

Esta parece uma explicação plausível para a deficiência cognitiva dos animais no labirinto em T e para a deficiência na retenção na tarefa de esQUIVA inibitória.

O efeito da intoxicação aguda de ratos com a 2,5-hexanodiona foi analisado em duas tarefas comportamentais. Neste experimento, a droga, administrada em diferentes doses (200, 400 ou 800 mg/kg), foi injetada intraperitonealmente, previamente à exposição à tarefa comportamental. No caso de administração aguda, escolheu-se a via intraperitoneal, desde que por ela a droga é absorvida rapidamente, atingindo prontamente os níveis circulantes desejados para a indução do efeito agudo.

Na tarefa de habituação ao campo aberto (tabela XIV) verifica-se que os animais tratados com 400 e 800 mg/kg do hexacarbono apresentaram menor número de respostas de orientação na sessão de treino, mas não na sessão de teste, do que os animais tratados com veículo. O efeito sobre o número de respostas de orientação na sessão de treino não deve estar relacionado a efeitos sobre a atividade motora, desde que o número de respostas de cruzamento não foi reduzido pelo

tratamento com a 2,5-hexanodiona. Observa-se ainda que somente o grupo controle apresenta diminuição no número de respostas de orientação na sessão de teste quando comparada à sessão de treino, enquanto que, para as respostas de cruzamentos, todos os grupos cruzam menos o campo na sessão de teste. Desde que o efeito sobre o número de respostas de orientação provavelmente não envolve efeito sobre atividade locomotora, estes resultados sugerem que os animais tratados com 2,5-hexanodiona, independente da dose, não se habituaram ao campo aberto [Izquierdo, 1979; Izquierdo et al., 1984].

Na tarefa de esquivia inibitória, verificou-se que o tratamento com a 2,5-hexanodiona aplicado 30 min antes da sessão de treino não alterou o desempenho dos animais. Os ratos intoxicados apresentaram latência de descida da plataforma na sessão de treino semelhante ao grupo veículo, e todos os grupos apresentaram retenção da tarefa, como verificado na sessão de teste. Entretanto, pode-se ainda observar que os animais tratados com as doses maiores do hexacarbono apresentaram tendência a uma menor latência de descida da plataforma na sessão de teste do que o grupo controle.

Para investigar tal efeito, novos grupos de animais foram tratados 90 min antes da sessão de treino e submetidos à tarefa de esquivia inibitória. Aumentou-se o intervalo de administração da droga, mesmo sabendo-se que dados da literatura têm demonstrado que a meia-vida da 2,5-hexanodiona é de 100 min (em galinhas, por via ip) [DiVincenzo et al., 1976]. Porém, dados preliminares do experimento sobre o efeito

da 2,5-hexanodiona sobre a nocicepção (os experimentos foram feitos concomitantemente), indicavam que maiores latências de "tail-flick" eram observadas nos intervalos de 60 a 90 min após a administração do hexacarbono (ver adiante).

Os resultados deste experimento demonstram que, tal como injetado 30 min antes da sessão de treino, o tratamento com a 2,5-hexanodiona administrado com o intervalo de 90 min antes do treino não afetou o desempenho dos animais nesta sessão. Entretanto, os animais tratados com 400 ou 800 mg/kg de 2,5-hexanodiona descem da plataforma mais rapidamente do que os animais controle na sessão de teste. Todos os grupos apresentaram retenção da tarefa.

Os resultados deste experimento confirmam a hipótese de que a ausência de efeito significativo quando a droga foi injetada 30 min antes do treino poderia estar relacionado aos níveis baixos de droga circulante atingidos no momento do treino, desde que quando aumentou-se este intervalo para 90 min, o desempenho dos animais no teste foi inferior aos animais controle, o que demonstra que apesar de apresentar memória, os animais tratados com as maiores doses do hexacarbono apresentam prejuízo na retenção da tarefa.

Os resultados da administração aguda diferem completamente daqueles obtidos para a administração crônica do composto. Enquanto que os animais tratados cronicamente apresentam envolvimento motor acentuado, no tratamento agudo verificou-se que a droga causa efeito sobre parâmetros cognitivos, verificado pela menor retenção no campo aberto e

na tarefa de esquivar-se inibitória.

#### IV.3. NOCICEPÇÃO E 2,5-HEXANODIONA: INTERAÇÃO COM O SISTEMA COLINÉRGICO

Verificou-se anteriormente que a administração aguda de 2,5-hexanodiona causava deficiência de memória em duas tarefas comportamentais. O principal objetivo deste experimento era investigar se o mesmo tratamento também interferiria na nocicepção de ratos em um aparelho de "tail-flick".

Os resultados deste experimento demonstraram que a 2,5-hexanodiona produz um aumento na latência de "tail-flick" e que este efeito foi dependente de dose e de tempo. A maior dose usada (800 mg/kg) produziu antinocicepção aos 10, 30 e 60 min, a dose intermediária (400 mg/kg) aos 30 e 60 min e a menor dose (200 mg/kg) aos 60 min após sua administração (figura 11).

O efeito da 2,5-hexanodiona sobre a nocicepção poderia ser decorrente de uma deficiência sensorial ou motora generalizada, que provocaria uma maior latência de retirada da cauda no aparelho. Entretanto, este parece não ser o caso, desde que animais tratados por 40 dias com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona apresentam grande distúrbio motor e não apresentam nenhuma alteração na latência de "tail-flick" (tabela XX).

Uma variedade de hexacarbonos, incluindo a 2,5-hexanodiona, são inibidores da acetilcolinesterase [Dafforn et al., 1979]. Sabe-se também que inibidores da acetilcolinesterase, assim como agonistas colinérgicos, são drogas antinociceptivas [Gillberg et al., 1989; Gower, 1987;

Sitaram & Gillin, 1977]. Estes achados poderiam sugerir que o mecanismo pelo qual a 2,5-hexanodiona causa antinocicepção possa envolver o sistema colinérgico. Para testar tal hipótese, investigou-se o efeito da administração de atropina sobre a antinocicepção induzida em ratos pela 2,5-hexanodiona.

Os resultados deste experimento revelaram que a pré-administração de atropina (tanto na dose de 5 como de 25 mg/kg) reduz consideravelmente o efeito antinociceptivo da 2,5-hexanodiona aos 60 e 90 min (figura 12). Aos 10 e 30 min, este efeito não foi significativo, o que deve estar relacionado à dificuldade da atropina de penetrar no sistema nervoso central [Brown, 1988]. A atropina por si só não alterou a latência de "tail-flick" quando comparada ao controle. Estes dados indicam que a analgesia induzida pela 2,5-hexanodiona tem um componente colinérgico (muscarínico). Estes resultados estão de acordo com a literatura que relata antinocicepção por inibidores da acetilcolinesterase e agonistas colinérgicos [Gillberg et al., 1989; Gower, 1987; Sitaram & Gillin, 1977].

#### IV.4. EFEITO DA 2,5-HEXANODIONA SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE CEREBRO E COLINESTERASE DE SORO DE RATOS.

Inibição da acetilcolinesterase por dicetonas alifáticas foi relatada por Dafforn e colaboradores (1979). Estes autores encontraram tal efeito em enzima purificada de órgão elétrico de Electrophorus electricus, e observaram ainda que a inibição

induzida pelos solventes usados era do tipo competitiva. Neste experimento, investigou-se se a atividade da AChE de cérebro de ratos era inibida "in vitro" pela 2,5-hexanodiona e se as características cinéticas da inibição se assemelhavam àquelas de órgão elétrico de peixe.

Os resultados deste experimento revelam que a atividade da AChE de cérebro de ratos é inibida por 2,5-hexanodiona. A caracterização cinética da inibição demonstra que a 2,5-hexanodiona causa uma inibição do tipo mista, pois, na presença de 10 mM ou mais do composto, verifica-se um aumento no Km aparente e uma diminuição na Vmax (figura 14, ver tabela XXI). Estes resultados diferem daqueles de Dafforn e colaboradores (1979), que encontraram uma inibição do tipo competitiva para a AChE de Electrophorus electricus pela 2,5-hexanodiona.

A constante de dissociação, determinada pelo método gráfico de Dixon (1964), revela um Ki de 7,1 mM de 2,5-hexanodiona para a AChE (figura 15). Este resultado é semelhante aquele obtido por outros autores, que encontraram um Ki de 4,1 mM de 2,5-hexanodiona para a AChE de peixe [Dafforn et al., 1979].

Com o objetivo de verificar se concentrações muito altas de 2,5-hexanodiona inibiriam totalmente a atividade da AChE, incubou-se a enzima com concentrações que variaram de 0 a 800 mM de 2,5-hexanodiona. Os resultados demonstram que 200, 400 e 800 mM de 2,5-hexanodiona inibem totalmente a atividade da AChE, quando na presença de 0,05, 0,1 e 0,8 mM de acetilcolina, respectivamente (figura 16). Sendo assim, a

inibição total da atividade da enzima foi dependente da concentração de substrato presente no meio.

A análise destes resultados sugere que a inibição da AChE de cérebro de ratos seja do tipo mista linear. Este tipo de inibição apresenta, além de uma diminuição na velocidade máxima e aumento do Km aparente, outras características como: (1) intercepto das curvas com diferentes concentrações de inibidor localizado no primeiro quadrante no gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), (2) "plot" de Dixon linear, (3) formação do complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) cataliticamente não ativo, desde que a atividade da AChE pode chegar a zero na presença de concentrações altas de inibidor [Segel, 1979].

Anteriormente verificou-se que a 2,5-hexanodiona causa analgesia em ratos. Desde que a atividade da AChE de cérebro de ratos é inibida "in vitro" pela 2,5-hexanodiona, investigou-se se a atividade da AChE de cérebro e cerebelo era inibida quando os animais eram tratados agudamente com maior dose de 2,5-hexanodiona usada no experimento anterior. Os animais foram mortos 1 hora após o tratamento, que é o intervalo em que todas as doses do hexacarbono causaram analgesia.

Os resultados deste estudo demonstram que a atividade da AChE de cérebro e cerebelo dos animais tratados com 2,5-hexanodiona foi semelhante à do grupo veículo (tabela XXII). A discrepância entre estes resultados e aqueles obtidos para reversão parcial pela atropina da antinocicepção induzida pela

2,5-hexanodiona pode estar relacionado ao envolvimento de estruturas outras que o cérebro (medula espinhal, por exemplo) na ação antinociceptiva da 2,5-hexanodiona. E mesmo considerando que o cérebro esteja envolvido na ação da droga, a ausência de efeito sobre a atividade da AChE pode ter duas principais causas: primeiro, a preparação da amostra para análise da atividade da AChE pode diluir o inibidor, ou segundo, a quantidade mínima de substrato necessária para o ensaio enzimático pode ser suficientemente alta para competir com inibidor (presente "in vivo") e mascarar a inibição presente "in vivo" mas não detectável tecnicamente (deve-se ressaltar aqui, que a inibição do tipo mista linear é a mistura da inibição competitiva parcial e inibição não competitiva pura, desta forma o componente competitivo está presente).

Alterações na atividade das colinesterases de plasma têm sido verificada em humanos expostos ocupacionalmente ao n-hexano ou à 2-hexanona [Allen et al., 1975; Paulson & Waylonis, 1976]. Entretanto, os resultados são inconsistentes. Alguns autores encontraram diminuição na atividade da ChE de plasma [Paulson & Waylonis, 1976] e outros verificaram aumento na atividade da ChE plasmática e inibição da AChE eritrocitária [Allen et al., 1975].

Em ratos, Bastone e colaboradores (1987) demonstraram que a atividade da AChE de plasma era aumentada tanto pela exposição prolongada ao n-hexano como à 2,5-hexanodiona.

No presente estudo, investigou-se a atividade da AChE de cérebro e cerebelo em ratos adultos tratados por diferentes

períodos com 200 mg/kg de 2,5-hexanodiona. Também investigou-se a atividade da ChE de plasma e animais intoxicados por 40 dias com a droga.

A atividade da AChE de cérebro e cerebelo dos animais intoxicados foi semelhante à dos animais controle em todos os intervalos de tratamento analisados (tabela XXIII). A atividade da ChE de soro também não apresentou-se alterada pelo tratamento (tabela XXIV).

Em animais jovens, a atividade da AChE de cérebro e a atividade ChE e AChE de soro foram estudadas também em diferentes intervalos de tratamento. Verificou-se um aumento da atividade da enzima cerebral com o decorrer da idade. Do 12<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia de vida, o aumento da atividade não foi muito acentuado, mas do 20<sup>o</sup> ao 40<sup>o</sup> dia o aumento foi bem maior. A ontogenia da atividade da AChE verificada neste estudo está de acordo com aquela verificada por Lai e colaboradores (1982).

O tratamento com 2,5-hexanodiona, mesmo na dose de 400 mg/kg, não alterou a atividade da AChE em nenhum dos intervalos de tratamento estudados nem a ontogenia da enzima. As atividades encontradas para todos os grupos foram muito semelhantes.

Para a atividade da ChE e AChE de plasma, verificou-se que nos animais tratados com 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona a atividade destas enzimas apresenta-se ligeiramente maior do que nos demais grupos. Esta diferença foi significativa quando analisados todos os intervalos de tratamento em conjunto.

Porém a análise em cada intervalo de tratamento revela efeitos não significativos.

Os resultados deste estudo sobre a atividade da AChE de cérebro estão de acordo com aqueles verificados por Bastone e colaboradores (1987), que não encontram alteração na atividade da enzima de cérebro. Entretanto, diferem destes mesmos autores quanto à atividade da ChE de soro, desde que aqueles autores verificaram aumento na atividade da AChE de plasma. Esta diferença pode ter duas causas: primeiro, no presente experimento a atividade enzimática para soro de ratos adultos foi considerada como sendo de colinesterases, desde que nenhum inibidor específico foi utilizado, enquanto que Bastone e colaboradores (1987) analisaram a atividade da AChE; segundo, estes autores utilizaram uma dose de 1% na água de beber, que, segundo os mesmos, corresponde a aproximadamente 400 mg/kg de 2,5-hexanodiona, o que equivale ao dobro da dose utilizada no presente estudo. Porém, para ratos jovens, verificou-se um ligeiro aumento na AChE quando os animais são tratados com a dose maior, o que colabora com a hipótese de que este efeito deve ser dependente da dose utilizada para a intoxicação. Aumento na atividade da ChE plasmática também foi verificada em humanos intoxicados ocupacionalmente com n-hexano [Allen et al., 1975].

No presente trabalho de tese constatou-se que é possível o estudo de diversos parâmetros comportamentais e bioquímicos utilizando o modelo de intoxicação crônica de ratos adultos e jovens aqui desenvolvido. Verificaram-se alterações comportamentais relacionadas a efeitos locomotores em ratos

adultos e relacionados a processos cognitivos em ratos jovens. Se os efeitos comportamentais estão relacionados a algum sistema de neurotransmissores não foi determinado, a não ser a constatação da ausência de efeitos sobre AChE de cérebro. No entanto, a analgesia induzida pela 2,5-hexanodiona parece envolver o sistema colinérgico. A relação deste efeito com a inibição da AChE determinada "in vitro" não foi confirmada, desde que o mesmo não foi verificado "in vivo".

## V. CONCLUSÕES

A intoxicação prolongada de ratos adultos e jovens provocou uma diminuição no ganho de peso corporal e diminuição no peso de cérebro, mas não alterou a glicemia, os níveis de proteínas séricas e o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Os animais adultos intoxicados apresentaram semelhante ingestão alimentar e maior ingestão líquida que os controles. Com exceção da LDH de fígado de ratos jovens que apresentou inibição de 22%, a atividade das demais enzimas glicolíticas não foi alterada pelo tratamento com a 2,5-hexanodiona.

Ratos adultos apresentaram diferente sensibilidade ao tratamento com a 2,5-hexanodiona quando o mesmo foi aplicado aguda ou cronicamente. Enquanto que os animais tratados cronicamente apresentaram retenção das tarefas (campo aberto e esquiva inibitória) e prejuízo locomotor, os ratos tratados agudamente apresentaram diminuição da retenção das mesmas tarefas sem apresentar qualquer alteração na atividade locomotora. O tratamento prolongado de ratos jovens com a 2,5-hexanodiona prejudicou o desempenho destes animais (comportamento de alternar espontâneo e esquiva inibitória). A diferença nos resultados de ratos adultos e ratos jovens pode estar relacionada à dose maior usada para ratos jovens e ao fato de que, nestes últimos, o tratamento foi realizado em uma fase precoce da vida.

A 2,5-hexanodiona administrada aguda mas nao cronicamente causa antinocicepção dependente de dose e de tempo. Este efeito foi bloqueado parcialmente por atropina, sugerindo uma ação, ao menos em parte, colinérgica para a analgesia induzida pela 2,5-hexanodiona.

A 2,5-hexanodiona inibe a atividade da AChE "in vitro". As características cinéticas da inibição sugerem que a mesma seja do tipo mista linear. "In vivo", a 2,5-hexanodiona nao alterou a atividade da AChE de cérebro e de cerebelo de ratos adultos e jovens. A ausência de efeito da 2,5-hexanodiona pode estar relacionada ao baixo nível de droga circulante atingido "in vivo" ou, caso a inibição exista, a mesma pode nao ter sido detectada devido às características cinéticas do tipo de inibição e/ou devido às condições experimentais.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA, M.B.; LAPADULA, D.M.; SUWITA, E. Cytoskeletal proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity. Toxicology, v.49, p.469-477, 1988.
- ABOU-DONIA, M.B.; MAKKAWY, H.M.; CAMPBELL, G.M. Pattern of neurotoxicity of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol, and 2,5-hexanedione alone and in combination with o-ethyl o-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate in hens. Journal of Toxicology and Environmental Health, v.16; p.85-100, 1985.
- AHONEM, I. & SCHIMBERG, R.W. 2,5-Hexanedione excretion after occupational exposure to n-hexane. British Journal of Industrial Medicine, v.45, p.133-136, 1988.
- ALLEN, N.; MENDELL, J.R.; BILLMAIER, D.J.; FONTAINE, R.E.; O'NEILL, J. Toxic polyneuropathy due to methyl n-butyl ketone. Archives of Neurology, v.32, p.209-218, 1975.
- ANNAU, Z. & CUOMO, V. Mechanisms of neurotoxicity and their relationship to behavioral changes. Toxicology, v.49, p.219-225, 1988.
- ANTHONY, D.C.; BOEKELHEIDE, K.; ANDERSON, C.W.; GRAHAM, D.G. The effect of 3,4-dimethyl substitution on the neurotoxicity of 2,5-hexanedione. II. Dimethyl substitution accelerates pyrrole formation and protein crosslinking. Toxicology and Applied Pharmacology, v.71, p.372-782, 1983a.
- ANTHONY, D.C.; BOEKELHEIDE, K.; GRAHAM, D.G. The effect of 3,4-dimethyl substitution on the neurotoxicity of 2,5-hexanedione. I. Accelerated clinical neuropathy is accompanied by more proximal axonal swellings. Toxicology Applied Pharmacology, v.71, p.362-371, 1983b.
- ASHFORD, J.W.; SHERMAN, K.A.; KUMAR, V. Advances in Alzheimer Therapy: cholinesterase inhibitors. Neurobiology Aging, v. 10, p.95-105, 1989.
- BASTONE, A.; FRONTALI, N.; MALLOZZI, C.; SBRACCIA, M.; SETTIMI, L. Cholinesterases in blood plasma and tissues of rats treated with n-hexane or with its neurotoxic metabolite 2,5-hexanedione. Archives of Toxicology, v.61, p 138-144, 1987.
- BRADFORD, H.F. Chemical Neurobiology. W.H. Freedman and Company, New York, 1986, 507p.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-die binding. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAENDGAARD, H. & SIDENIUS, P. The retrograde fast component of axonal transport in motor and sensory nerves of the rat during administration of 2,5-hexanedione. Brain Research, v.378, p.1-7, 1986.
- BROWN, J.H. Atropine, scopolamine, and related antimuscarinic drugs. In: Pharmacological Basis of Therapeutics. GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (eds). 8 ed. Pergamon Press, New York, 1988, pp.150-165.
- BRUNING, J.L. & KINTZ, B.L. Analysis of variance (part 2) and Supplemental computations for analysis of variance (part 3) In: Computations Handbook of Statistics. Scott, Foresman and Company, Glenview, 1968, pp. 16-105 and pp. 106-151.
- CARRASCO, M.A.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Naloxone reverses retrograde amnesia induced by electroconvulsive shock. Behavioral and Neural Biology, v.34, p.352-357, 1982.
- CHUBB, I. Acetylcholinesterase: multiple functions ? In: Cholinesterases: Fundamental and Applied Aspects. BRZIN, M.; BARNARD, E.A.; SKET, D. (eds). Walter de Gruyter, Berlin, 1984, pp.345-359.
- COOPER, G.R. & MCDANIEL, V. The determination of glucose by ortho-tholuidine method. Clinical Chemistry, v.6, p.159-170, 1970.
- COURI, D. & MILKS, M. Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-hexane, 2-hexanone and 2,5-hexanedione. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.22, p.145-166, 1982.
- CRAVENS, R.W. Effects of maternal undernutrition of offspring behavior: incentive value of a food reward an ability to escape from water. Developmental Psychobiology, v.7, p.61-69, 1974.
- DAFFORN, A.; JEWELL, M.; ANDERSON, M.; ASH, D.; HORVATH, D.; KITSON, R.; MARGIOTTA, S.; RYCH, G. Aliphatic ketones are acetylcholinesterase inhibitors but not transition state analogs. Biochimica et Biophysica Acta, v.569, p.23-30, 1979.
- DALMAZ, C. Tratamento de ratos com etanol: efeitos sobre a modulação da memória e sobre parâmetros neuroquímicos relacionados. Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba, 1989.
- DA-SILVA, V.A.; MALHEIROS, L.R.; BUENO, F.M.R. Effects of toluene exposure during gestation on neurobehavioral development of rats and hamsters. Brazilian Journal of

Medical and Biological Research, v.23, p.533-537, 1990.

- DAYTON, C.M. Repeated measures designs. In: The design of educational experiments. LA MAR, N. & STIRES, A. (eds). MacGraw-Hill, New York, 1970, pp.244-282.
- DeCAPRIO, A.P.; BOEKELHEIDE, K.; ANDERSON, C.W.; GRAHAM, D.G. The effect of 3,4-dimethyl substitution on the neurotoxicity of 2,5-hexanedione: II. Dimethyl substitution accelerates pyrrole formation and protein crosslinking. Toxicology and Applied Pharmacology, v.71, p.372-382, 1983.
- DeCAPRIO, A.P.; BRIGGS, R.G.; JACKOWSKI, S.J.; KIM, J.C.S. Comparative neurotoxicity and pyrrole-forming potential of 2,5-hexanedione and perdeuterio-2,5-hexanedione in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology, v.92, p.75-85, 1988.
- DeCAPRIO, A.P. & O'NEILL, E.A. Alterations in rat axonal cytoskeletal proteins induced by "in vitro" and "in vivo" 2,5-hexanedione exposure. Toxicology and Applied Pharmacology, v.78, 235-247, 1985.
- DiVINCENZO, G.D.; KAPLAN, C.J.; DEDINAS, J. Characterization of the metabolites of methyl n-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea pig serum and their clearance. Toxicology and Applied Pharmacology, v.36, p.511-522, 1976.
- DIXON, M. & WEBB, E.C. Enzymes. 2 ed., Longmans, London & Colchester, 1964, 950p.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRESS Jr, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, v.7, p.88-95, 1961.
- FEDTKE, N. & BOLT, H.M. The relevance of 4,5-dihydroxy-2-hexanone in the excretion kinetics of n-hexane metabolites in rat and man. Archives of Toxicology, v.61, p.131-137, 1987.
- FERRI, G.L.; ZAREH, S.; AMADORI, A.; BASTONE, A.; SBRACCIA, M.; DAHL, D.; FRONTALI, N. 2,5-Hexanedione-induced accumulations of neurofilament-immunoreactive material throughout the rat autonomic nervous system. Brain Research, v.444, p.383-388, 1988.
- FRONTALI, N.; AMANTINI, M.C.; SPAGNOLO, A.; GUARCINI, A.M.; SALTARI, M.C. Experimental neurotoxicity and urinary metabolites of the C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> aliphatic hydrocarbons used as glue solvents in shoe manufacture. Clinical Toxicology, v.18, p.1357-1367, 1981.
- GILLBERG, P.-G.; GORDH-Jr, T.; HARTVIG, P.; JANSSON, I.; PETTERSSON, J.; POST, C. Characterization of the

- antinociception induced by intrathecally administered carbachol. Pharmacology and Toxicology, v.64, p.340-343, 1989.
- GOEL, S.K.; RAO, G.S.; PANDYA, K.P. Hepatotoxic effects elicited by n-hexane or n-heptane. Journal of Applied Toxicology, v.8, p.81-84, 1988.
- GOTTLIEB, A.; KEYDAR, I.; EPSTEIN, H.T. Rodent brain growth stages: an analytical review. Biological Neonate, v.32, p.166-176, 1977.
- GOWER, A.J. Effects of acetylcholine agonists and antagonists on yawning and analgesia in the rat. European Journal of Pharmacology, v.139, p.79-89, 1987.
- GRAY, E.G. & WHITTAKER, V.P. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. Journal of Anatomy, v.96, p.79-88, 1962.
- GRIFFIN, J.W.; ANTHONY, D.C.; FAHNESTOCK, K.E.; HOFFMAN, P.N.; GRAHAM, D.G. 3,4-Dimethyl-2,5-hexanedione impairs the axonal transport of neurofilament proteins. The Journal of Neuroscience, v.4, p.1516-1526, 1984.
- GRIFFIN, J.W.; FAHNESTOCK, K.E.; PRICE, D.L.; CORK, L.C. Cytoskeletal disorganization induced by local application of B,B'-iminodipropionitrile and 2,5-hexanedione. Annals of Neurology, v.14, p.55-61, 1983.
- GRIFFITHS, I.R.; KELLY, P.A.T.; CARMICHAEL, S.; McCULLOCH, M.; WATERSTON, M. The relationship of glucose utilization and morphological change in the visual system in hexacarbon neuropathy. Brain Research, v.222, p.447-451, 1981.
- HALL, R.D. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? Developmental Psychobiology, v.16, p.395-411, 1983.
- HALL, S.M. & GREGSON, N.A. The effects of 2,5-hexanedione on remyelination in the peripheral nervous system of the mouse. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, v.41, p.642-651, 1982.
- HAMMOND-TOOKE, G.D. Slow axonal transport is impaired by intrathecal 2,5-hexanedione. Experimental Neurology, v.116, p.210-217, 1992.
- n-HEXANE. In: Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva, v.122, 1991, 163p.
- HORAN, K.L.; EICHBERG, J.; BERTI-MATTERA, L.N.; LOPACHIN, R.M. Hexanedione effects on protein phosphorylation in rat peripheral nerve. Brain Research, v.491, p.366-370, 1989.

- HOWLAND, R.D.; VYAS, I.L.; LOWNDES, H.E. The etiology of acrylamide neuropathy: possible involvement of neuron specific enolase. Brain Research, v.190, p.529-535, 1980a.
- HOWLAND, R.D.; VYAS, I.L.; LOWNDES, H.E.; ARGENTIERI, T.M. The etiology of toxic peripheral neuropathies: in vitro effects of acrylamide and 2,5-hexanedione on brain enolase and other glycolytic enzymes. Brain Research, v.202, p.131-142, 1980b.
- IZQUIERDO, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. Psychopharmacology, v.66, p.199-203, 1979.
- IZQUIERDO, I. & CAVALHEIRO, E. The influence of stimulus pairing of the shuttle-shock contingency on the performance of shuttle responses to a buzzer by weanling rats. Behavioral Biology, v.17, p.119-122, 1976a.
- IZQUIERDO, I. & CAVALHEIRO, E. Three main factors in task shuttle behavior: their pharmacology and sequential entry in operation during a two-way avoidance session. Psychopharmacology, v.49, p.145-157, 1976b.
- IZQUIERDO, I. & DIAS, R.D. Memory as a state-dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. Behavioral and Neural Biology, v.38, p.144-151, 1983.
- IZQUIERDO, I. & PEREIRA, M.E. Post-training memory facilitation blocks extinction but not retroactive interference. Behavioral and Neural Biology, v.51, p.108-113, 1989.
- 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 B-endorphin-like immunoreactivity and the possible role of B-endorphin in behavioral regulation. Psychoneuroendocrinology, v.9, p.381-389, 1984.
- KAWAI, T.; YASUGI, T.; MIZUNUMA, K.; HORIGUCHI, S.; UCHIDA, Y.; IWAMI, O.; IGUCHI, H.; IKEDA, M. Dose-dependent increase in 2,5-hexanedione in the urine of workers exposed to n-hexane. International Archives of Occupational and Environmental Health, v.63, p.285-291, 1991.
- KESSLER, W.; HEILMAIER, H.; KREUZER, P.; SHEN, H.J.; FILSER, M.; FILSER, J.G. Spectrophotometric determination of pyrrole-like substances in urine of rat and man: an assay for the evaluation of 2,5-hexanedione formed from n-hexane. Archives of Toxicology, v.64, p.242-246, 1990.
- KOROBKIN, R.; ASBURY, A.K.; SUMNER, A.J. & NIELSEN, S.L. Glue-Sniffing Neuropathy. Archives of Neurology, v 32,

p.158-162, 1975.

KRASAVAGE, W.J.; O'DONOGHUE, J.L.; DIVICENZO, G.D.; TERHAAR, C.J. The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. Toxicology and Applied Pharmacology, v.52, p.433-441, 1980.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. Analytical Biochemistry, v.4, p.17-23, 1962.

LADEFOGED, O.; HASS, U.; SIMONSEN, L. Neurophysiological and behavioural effects of combined exposure to 2,5-hexanedione and acetone or ethanol in rats. Pharmacology and Toxicology, v.65, p.372-375, 1989.

LAI, J.C.K.; LEUNG, T.K.C.; LIM, L. The ontogeny of acetylcholinesterase activities in rat brain regions and the effect of chronic treatment with manganese chloride. Journal of Neurochemistry, v.39, p.1767-1769, 1982.

LARSEN, J.-J.; LYKKEGAARD, M.; LADEFOGED, O. Infertility in rats induced by 2,5-hexanedione in combination with acetone. Pharmacology & Toxicology, v.69, p.43-46, 1991.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. Principles of Biochemistry. 2 ed. Work Publishers, New York, 1993, 1013p.

LONG, C. Biochemist's Handbook. E.& F.N. Spon Ltda, London, 1961, 1192p.

MASSOULIE, J. & BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annual Review of Neuroscience, v.5, p.57-106, 1982.

MISUMI, J. & NAGANO, M. Experimental study on the enhancement of the neurotoxicity of methyl n-butyl ketone by non-neurotoxic aliphatic monoketones. British Journal of Industrial Medicine, v.42, p.155-161, 1985.

MISUMI, J.; NAGANO, M.; KAISAKU, J.; HITOSHI, T. Effects of vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> on 2,5-hexanedione-induced neuropathy. Archives of Toxicology, v.56, p.204-206, 1985.

MONACO, S.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; LASEK, R.J.; KATZ, M.J.; GAMBETTI, P. Experimental increase of neurofilament transport rate: decreases in neurofilament number and in axon diameter. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, v.48, p.23-32, 1989.

NETTO, C.A.; CAVALHEIRO, E.A.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Response of the rat brain B-endorphin system to novelty: Importance of the fornix connection. Behavioral and Neural Biology, v.43, p.37-46, 1985.

- NETTO, C.A. & IZQUIERDO, I. Posterior hypothalamic deafferentation abolishes the amnestic effect of electroconvulsive shock in rats. Psychoneuroendocrinology, v.10, p.159-163, 1985.
- NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. Behavioral and Neural Biology, v.48, p.304-309, 1987.
- NOBACK, N.R. & EISENMAN, L.M. Some effects of protein-caloric undernutrition on the developing central nervous system of rat. Anatomy Recordings, v.201, p.67-73, 1981.
- NYLEN, P.; HAGMAN, M.; JOHNSON, A.-C. Function of the auditory and visual systems, and of peripheral nerve, in rats after long-term combined exposure to n-hexane and methylated benzene derivatives. I. Toluene. Pharmacology and Toxicology, v.74, p.116-123, 1994a.
- NYLEN, P. & HAGMAN, M. Function of the auditory and visual systems, and of peripheral nerve, in rats after long-term combined exposure to n-hexane and methylated benzene derivatives. II. Xylene. Pharmacology and Toxicology, v.74, p.124-129, 1994b.
- O'DONOGHUE, J.L.; KRASAVAGE, W.J.; DIVINCENZO, G.D.; KATZ, G.V. Further studies on ketone neurotoxicity and interactions. Toxicology and Applied Pharmacology, v.72, 201-209, 1984.
- OGATA, M.; IWAMOTO, T.; TAGUCHI, T. Urinary 2,5-hexanedione assay involving its conversion to 2,5-dimethylpyrrole. International Archives of Occupational Environmental Health, v.62, p.561-568, 1991.
- OLTON, D.S.; BECKER, J.T.; HANDELMANM, G.E. Hippocampus, space, and memory. Behavioral and Brain Sciences, v.2, p.313-365, 1979.
- PAULSON, G.W. & WAYLONIS, G.W. Polyneuropathy due to n-hexane. Archives of International Medicine, v.136, p.880-882, 1976.
- PERBELLINI, L.; AMANTINI, M.C.; BRUGNONE, F.; FRONTALI, N. Urinary excretion of n-hexane metabolites: a comparative study in rat, rabbit and monkey. Archives of Toxicology, v.50, p.203-215, 1982.
- PERBELLINI, L.; AMOROS, D.M.; LLORENS, A.C.; GIULIARI, C.; BRUGNONE, F. An improved method of analysing 2,5-hexanedione in urine. British Journal of Industrial Medicine, v.47, p.421-424, 1990.

- PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F.; PAVAN, I. Identification of the metabolites of n-hexane, cyclohexane, and their isomers in men's urine. Toxicology and Applied Pharmacology, v.53, p.220-229, 1980.
- PEREIRA, M.E.; DALMAZ, C.; ROSAT, R.M.; 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.
- PEREIRA, M.E.; GONÇALVES, C.A.S.; RODNIGHT, R. Phosphorylation in vitro of glial fibrillary acidic protein is increased in rat hippocampus by administration of 2,5-hexanedione Brain Research, v.656, p.417-419, 1994.
- PEREIRA, M.E.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Effect of pre-training flumazenil administration on the acquisition of three different tasks in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.22, p.1501-1505, 1989.
- PRICE, N.C. & STEVENS, L. Fundamentals of Enzymology. 2 ed. Oxford University Press, Oxford & New York, 1989, 526p.
- PROCKOP, L.D.; ALT, M.; TISON, J. "Huffer's neuropathy". Journal of American Medicine Association, v.229, p.1083-1084, 1974.
- RALSTON, W.H.; HILDERBRAND, R.L.; UDDIN, D.E.; ANDERSEN, M.E.; GARDIER, R.W. Potentiation of 2,5-hexanedione neurotoxicity by methyl ethyl ketone. Toxicology and Applied Pharmacology, v.81, p.319-327, 1985.
- ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; SOUZA, D.O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.26, p.1077-1083, 1993.
- RODIER, P.M. Structural-functional relationships in experimentally induced brain damage. Progress Brain Research, v.73, p.335-348, 1988.
- 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. Effects of perinatal lead exposure on developmental and behavioral parameters of weaning rats. Submitted, 1994.
- ROSSI, A.; SIMONATI, A.; RIZZUTO, N.; TOSCHI, G. Neurotoxic action of 2,5-hexanedione on the autonomic nervous system: ultrastructural and functional alterations in the rat sympathetic superior cervical ganglion. Brain Research,

v.243, p.373-377, 1982.

- SABRI, M.I. Further observations on in vitro and in vivo effects of 2,5-hexanedione on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Archives of Toxicology, v.54, p.191-194, 1984.
- SABRI, M.I.; MOORE, C.L.; SPENCER, P.S. Studies on the biochemical basis of distal axonopathies - I. Inhibition of glycolysis by neurotoxic hexacarbon compounds. Journal of Neurochemistry, v.32, p.683-689, 1979.
- SAHENK, Z. & MENDELL, J.R. Acrylamide and 2,5-hexanedione neuropathies: abnormal bidirectional transport rate in distal axons. Brain Research, v.219, p.397-405, 1981.
- SAKAMOTO, J. & HASHIMOTO, K. Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in mouse brain in vitro. Archives of Toxicology, v.57, p.276-281, 1985a.
- SAKAMOTO, J. & HASHIMOTO, K. Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in rat sciatic nerve in vivo. Archives of Toxicology, v.57, p. 282-284, 1985b.
- SEGEL, I.H. Bioquímica, teoria e problemas. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro & Sao Paulo, 1979, 527p.
- SICKLES, D.W. Toxic neurofilamentous axonopathies and fast anterograde axonal transport: III. Recovery from single injections and multiple dosing effects of acrylamide and 2,5-hexanedione. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 108, p.390-396, 1991.
- SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H.-R.; RIGGIO, G.; WASER, P.G. Pre-exposure to a nonaggressive opponent prevents low intensity social conflict analgesia in mice. Behavioral Neurosciences, v.101, p.423-426, 1987a.
- SIEGFRIED, B.; NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. Behavioral Neurosciences, v.101, p.436-439, 1987b.
- SITARAM, N.J. & GILLIN, J.C. Acetylcholine: possible involvement in sleep and analgesia. In: Brain acetylcholine and neuropsychiatric disease. Eds: K.L.Davis & P.A.Berger. Plenum Press, New York & London, p.311-343, 1977.
- SMART, J.L. Reversal of spatial discrimination learning in a water maze by previously undernourished rats. Animal Learning Behavior, v.4, p.313-316, 1976.
- SMART, J.L. & DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. Brain Research, v.28, p.85-95, 1971,

- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. Single classification analysis of variance (chapter 9) and Assumptions of analysis of variance (chapter 13). In: Biometry. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1969, pp.204-246 and pp.367-403.
- SOUZA, D.O.; VENDITE, D.; MELLO, C.F.; ROCHA, J.B.T. Effects of undernutrition during suckling on foot-shock escape behavior and of post-training beta-endorphin administration on inhibitory avoidance task test behavior of young rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.25, p.275-280, 1992.
- SPENCER, P.S.; SABRI, M.I.; SCHAUMBURG, H.H.; MOORE, C.L. Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies? Annals Neurology, v.5, p.501-507, 1979.
- TOWFIGHI, J.; GONATAS, N.K.; PLEASURE, D.; COOPER, H.S.; MCCREE, L. Glue sniffer's neuropathy. Neurology, v.26, p.238-243, 1976.
- TRAINA, M.E. & SERPIETRI, L.A. Changes in the levels and forms of rat plasma cholinesterases during chronic diisopropylphosphorofluoridate intoxications. Biochemical Pharmacology, v.33, p.645-653, 1984.
- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Effects of undernutrition during suckling on novelty-induced analgesia in young and adult rats. Physiology & Behavior, v.47, p.393-395, 1990.
- VENDITE, D.; ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effect of undernutrition during suckling and of post-training B-endorphin administration on avoidance performance of adult rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.20, p.731-740, 1987.
- VILANOVA, E. & VICEDO, J.L. Serum cholinesterase inhibitors in the commercial hexane impurities. Archives of Toxicology, v.53, p.59-69, 1983.
- VILLESAS, R.; OSTWALD, R.; MORIMOTO, H.; BENNETT, E. Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats. Journal of Nutrition, v.111, p.1103-1110, 1981.
- VOHRA, K. & GAIND, V.S. Gas chromatographic determination of 2,5-hexanedione in urine as an indicator of exposure to n-hexane. Journal of Analytical Toxicology, v.16, p.176-178, 1992.
- WHITTAKER, V.P.; MICHAELSON, I.A.; KIRKLAND, R.J.A. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes"). Biochemical Journal, v.90, p.293-303,

1964.

WOLFE, R.G. & NEILANDS, J.B. Some molecular and kinetic properties of heart malic dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry, v.221, p.61-69, 1955.



