



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental

Ulisses Cesar de Araujo

Comportamento rotacional em Teste de Nado Livre como um modelo em roedores para estudo da neurotoxicidade do chumbo durante a vida adulta.

Rio de Janeiro
2009

Ulisses Cesar de Araujo

Comportamento rotacional em Teste de Nado Livre como um modelo em roedores para estudo da neurotoxicidade do chumbo durante a vida adulta.

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A663 Araujo, Ulisses Cesar de.

Comportamento rotacional em teste de nado livre como um modelo em roedores para estudo da neurotoxicidade do chumbo durante a vida adulta / Ulisses Cesar de Araujo.- 2009.

xiii, 71f. : il.

Orientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.

Co-orientador: Mauro Velho de Castro Faria.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Bibliografia: f. 61-71.

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Ulisses Cesar de Araujo

Comportamento rotacional em Teste de Nado Livre como um modelo em roedores para estudo da neurotoxicidade do chumbo durante a vida adulta.

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em _____

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ

Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria (Co-orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ

Banca examinadora: _____

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Lisboa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ

Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ

Prof. Dr. Josino Costa Moreira
Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Cussa Kubrusly
Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF)

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Pai e
Tia Irene (*in memoriam*) e minha
irmã Cláudia, que sempre
acreditaram que eu
pudesse alcançar os meus
objetivos e sonhos.
Em especial dedico esta Tese
aos amores
de minha vida
Marlucia (minha esposa) e
Leonardo (meu filho),
que sempre me apoiam em tudo e
valorizam cada segundo que
passamos juntos.

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço imensamente ao prof. Cláudio Carneiro Filgueiras, que está sempre disponível para ajudar e orientar a todos, pelas suas brilhantes idéias e *insights*, pela sua habilidade com Excel, SPSS,... e por momentos inusitados pelos quais passamos, principalmente no último mês, descobrindo cada vez mais a respeito de resultados que já estavam a algum tempo bem próximos de nós. Cláudio já estava pronto para enxergá-los. Isto que diferencia os bons pesquisadores daqueles simples repetidores de técnicas.

Gostaria de agradecer ao meu chefe e co-orientador Mauro Velho de Castro Faria, que viabilizou o meu afastamento para desenvolver este trabalho, além de todas as idéias que sempre pudemos trocar ao longo destes anos. Agradeço muito às meninas do laboratório Enzitox (BioCel), Cláudia, Ceiça, Carol e, Fafá, que sempre me apoiaram nesta jornada.

Agradeço ao companheiro Anderson, que em breve será Doutor e sempre se mostrou solícito, contribuindo bastante para o desenvolvimento deste trabalho, juntamente com alunos de iniciação científica.

Agradeço a prof^a. Yael e prof. Alex pela ajuda sempre que necessário e a todos do Laboratório de Neurofisiologia, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, em especial à Andréia e Mabel pela força nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos amigos do CESTEH/FIOCRUZ, não somente pela grande colaboração nas análises de chumbo em sangue (PbS), que a Regina, Fátima Moreira e Renato sempre fizeram e fazem com o maior prazer, mas sobretudo pela amizade. Lembro-me bem da Fátima Pivetta, que foi importantíssima para minha iniciação científica, orientando-me no Mestrado e do Josino, que está sempre dando oportunidades aos iniciantes e veteranos da ciência. Grande companheiro Luiz Sérgio, de muitas visitas às fábricas e reformadoras de baterias, e assim a estória parece que está começando novamente. Espero que seja uma espiral ascendente, apesar dos altos e baixos da vida.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 – Locomoção na Periferia (Pe) e no Centro do Campo Aberto.	24
TABELA 02 – Locomoção no Teste de Nado Livre.	26
TABELA 03 – Variâncias de machos e fêmeas	28
TABELA 04 – Classificação dos animais em função da consistência da lateralidade	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 01 - Histograma das distribuições de frequência de concentração de chumbo em sangue (PbS) dos camundongos expostos às soluções de 180 ppm em chumbo (Pb180) e 540 ppm em chumbo (Pb540) utilizados no estudo 1	23
FIGURA 02 - Médias das medidas de locomoção no centro (C) e na periferia (Pe) do campo aberto dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60).	25
FIGURA 03 - Médias das medidas de atividade natatória (A), alteração de sentido (B e C) e imobilidade (D) no teste de nado livre de camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60)	27
FIGURA 04 - Histograma das distribuições de frequência de concentração de chumbo em sangue (PbS) dos camundongos expostos às soluções de 180 ppm em chumbo (Pb180) e 540 ppm em chumbo (Pb540) utilizados no estudo 2	29
FIGURA 05 - Médias do percentual de deslocamentos para o lado preferido dos camundongos utilizados no estudo 2. Para a amostra total (A) notar o aumento dos valores ao longo das sessões. quando os animais foram separados em função da consistência da lateralidade (B)	31
FIGURA 06 - Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2.	32
FIGURA 07 - Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D).	33
FIGURA 08 - Médias do número de alterações de sentido para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2.	34
FIGURA 09 - Médias do número de alterações de sentido para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D).	35

- FIGURA 10 - Médias da razão entre o número de alterações de sentido (AS) e o número total de deslocamentos (NT) para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2.. 36
- FIGURA 11 - Médias da razão entre o número de alterações de sentido (AS) e o número total de deslocamentos (NT) para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D). 37
- FIGURA 12 - Médias do número total de deslocamentos (A) e da razão entre o número de alterações de sentido e o número total de deslocamentos (B) dos animais do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60) para cada uma das três sessões de nado livre. 39
- FIGURA 13 - Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões de nado livre dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60) classificados como consistentes (A) e não consistentes (B). 40
- FIGURA 14 - Médias da razão entre o número de alterações de sentido e o número total de deslocamentos (AS/NT) para cada uma das três sessões de nado livre dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60) classificados como consistentes (A) e não consistentes (B). 41
- FIGURA 15 - Médias de chumbo em sangue (PbS) dos grupos controle, exposto a 90 ppm em chumbo (Pb90), exposto a 270 ppm em chumbo (Pb270) e exposto a 540 ppm em chumbo (Pb540) 42
- FIGURA 16 - Médias de glutathiona total (A), glutathiona oxidada (B), glutathiona reduzida (C) e percentual de glutathiona oxidada (D) em relação à glutathiona total dos grupos controle, exposto a 90 ppm em chumbo (Pb90), exposto a 270 ppm em chumbo (Pb270) e exposto a 540 ppm em chumbo (Pb540). 43
- FIGURA 17 - Médias de glutathiona total (A), glutathiona oxidada (B), glutathiona reduzida (C) e percentual de glutathiona oxidada (D) em relação à glutathiona total dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (PbS<40) e superiores a 60 µg/dL (PbS>60). 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA - análise de variância

AS – alterações de sentido

D - deslocamentos angulares de 30° para direita

DTNB – 5',5' - ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)

FLSD - Fisher's Least Significant Difference Test

gl - graus de liberdade

GSH – glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

LIS – consistência da lateralidade de modo independente do sentido

LP – deslocamentos angulares de 30° para o lado preferido

n - número de animais

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NT – número total de deslocamentos angulares de 30°

P - valor de prova

PbS – concentração de chumbo em sangue

ppm – parte por milhão

t - t de Student

TNB – ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico

%D - percentual de deslocamentos angulares de 30° para direita

%LP - percentual de deslocamentos angulares de 30° para o lado preferido

µg/dL – unidade de concentração que significa micrograma por decilitro (100mL)

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 – INTRODUÇÃO	
1.1. Mecanismos de ação do chumbo	2
1.2. Efeitos do chumbo no sistema nervoso humano	4
1.3. Fatores que interferem na neurotoxicidade do chumbo	4
1.4. Modelos animais	6
1.4.1. <u>Teste de campo aberto</u>	7
1.4.2. <u>Comportamento rotacional</u>	8
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA	12
3.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.	12
3.1.1. <u>Formação dos grupos experimentais</u>	12
3.1.2. <u>Teste de Campo Aberto</u>	13
3.1.3. <u>Teste de Nado Livre</u>	14
3.1.4. <u>Determinação da concentração de chumbo em sangue (PbS)</u>	15
3.1.5. <u>Análise Estatística</u>	16
3.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre.	17
3.2.1. <u>Formação dos grupos experimentais</u>	17
3.2.2. <u>Teste de Nado Livre</u>	18
3.2.3. <u>Consistência da lateralidade</u>	18
3.2.4. <u>Determinação da concentração de chumbo em sangue (PbS)</u>	19
3.2.5. <u>Análise Estatística</u>	19
3.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutatona no cérebro de camundongos Suíços.	20
3.3.1. <u>Formação dos grupos experimentais</u>	20
3.3.2. <u>Determinação de PbS e de glutatona</u>	20
3.3.3. <u>Análise Estatística</u>	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.	22
4.1.1. <u>Chumbo em sangue (PbS)</u>	22
4.1.2. <u>Campo Aberto</u>	23
4.1.3. <u>Nado Livre</u>	25
4.1.4. <u>Variabilidade relacionada ao sexo</u>	27

4.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre	28
4.2.1. <u>Chumbo em sangue</u>	28
4.2.2. <u>Consistência da lateralidade</u>	29
4.2.3. <u>Análise dos índices de lateralidade</u>	30
4.2.4. <u>Efeitos da exposição ao chumbo no número total de deslocamentos (NT)</u>	32
4.2.5. <u>Efeitos da exposição ao chumbo no número alterações de sentido (AS)</u>	34
4.2.6. <u>Efeitos da exposição ao chumbo para AS/NT</u>	35
4.2.7. <u>Efeitos da intensidade da intoxicação com chumbo</u>	38
4.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutatona no cérebro de camundongos Suíços.	42
4.3.1. <u>Chumbo em Sangue</u>	42
4.3.2. <u>Glutaciona no cérebro</u>	42
5. DISCUSSÃO	45
5.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre	45
5.1.1. <u>Resumo dos resultados do estudo 1</u>	45
5.1.2. <u>Ausência de diferenças entre os animais expostos ao chumbo e seus respectivos controles na atividade locomotora no teste de campo aberto</u>	45
5.1.3. <u>Aumento da atividade locomotora e diminuição do número de alterações de sentido do grupo exposto ao chumbo no teste de nado livre</u>	46
5.1.4. <u>Imobilidade</u>	49
5.1.5. <u>Efeito do sexo</u>	49
5.1.6. <u>PbS₁ tempo de exposição e atividade locomotora no teste de nado livre</u>	50
5.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre	51
5.2.1. <u>Resumo dos resultados do estudo 2</u>	51
5.2.2. <u>Redução da atividade natatória ao longo das sessões experimentais</u>	52
5.2.3. <u>Efeitos do chumbo na consistência da lateralidade</u>	54
5.2.4. <u>Consistência da lateralidade como um fator determinante da susceptibilidade aos efeitos neurocomportamentais do chumbo</u>	56
5.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutatona no cérebro de camundongos Suíços.	57
5.3.1. <u>Resumo dos resultados do estudo 3</u>	57
5.3.2. <u>Considerações metodológicas</u>	58
5.3.3. <u>Efeitos do chumbo sobre os níveis de glutatona reduzida e oxidada</u>	58
6 – CONCLUSÕES	60
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

Resumo

A exposição ao chumbo ainda permanece como um sério problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Apesar do número crescente de estudos mostrando déficits neurocomportamentais em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo, os mecanismos envolvidos com a manifestação destes transtornos permanecem pouco conhecidos. Desta forma, o uso de modelos animais abre grandes possibilidades, não somente de investigação dos mecanismos biológicos envolvidos com a toxicidade do chumbo, mas também na elaboração de estratégias para proteção e/ou reversão dos seus efeitos. Portanto, o objetivo central deste trabalho foi avaliar o potencial do comportamento rotacional, medido em testes de nado livre, como um modelo em roedores para estudo dos efeitos neurocomportamentais da exposição ao chumbo durante a vida adulta. Para tanto, foram realizados três estudos. No primeiro, avaliamos os efeitos da exposição subcrônica (60-90 dias) ao chumbo sobre a atividade locomotora no teste de nado livre e em um teste tradicionalmente utilizado para avaliar a ação de substâncias neurotóxicas sobre a locomoção, o campo aberto. Enquanto no campo aberto não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo exposto e o grupo controle, no teste de nado livre, os animais expostos ao chumbo apresentaram maior atividade natatória e menor quantidade de alternâncias espontâneas no sentido de natação que o grupo controle. No segundo estudo, observamos que a magnitude dos efeitos do chumbo no teste de nado livre variou em função da consistência da lateralidade, sendo os resultados mais pronunciados no grupo de animais não consistentes (com menor lateralidade). Nos dois estudos, os efeitos do chumbo foram independentes do nível de chumbo em sangue (PbS) dos animais expostos. No terceiro estudo, mostramos um aumento dos níveis de glutathiona oxidada no cérebro somente no grupo de animais com PbS acima de 60 µg/dL. Com base nestes resultados, podemos concluir que: 1) O comportamento rotacional medido em teste de nado livre é um modelo interessante para estudar os efeitos neurocomportamentais do chumbo; 2) A consistência da lateralidade pode ser um fator determinante da susceptibilidade aos efeitos tóxicos do chumbo no sistema nervoso; e 3) Os efeitos do chumbo no teste de nado livre ocorrem mesmo em níveis de estresse oxidativo que não afetam os níveis de glutathiona oxidada no cérebro.

Palavras-chave: Toxicologia. Chumbo. Teste nado livre. Assimetria cerebral. Glutathiona.

Abstract

Lead exposure continues to be a serious public health problem, particularly in developing countries such as Brazil. Despite the increasing number of studies showing neurobehavioral deficits in people occupationally exposed to lead, the mechanisms involved in the manifestation of these problems remain largely unknown. In this sense, the use of animal models opens up the possibility of not only investigating the biological mechanisms associated with lead toxicity but also of elaborating strategies aiming at protecting individuals against its ill effects or even reversing those that already present. Therefore, the main objective of the present work was to assess the potential of the rotatory behavior in the free-swimming test as a rodent model for studying of the neurobehavioral effects adult life lead exposure. In the first study, we analyzed the effect of subchronic lead exposure on motor activity in the free-swimming test and in open-field test, which has been traditionally used to assess the effects of toxic substances on locomotion. While no significant differences were observed between the exposed and control groups in the open-field, in the free-swimming test, lead exposed animals displayed increased natatory activity and fewer spontaneous alterations in the direction of locomotion in comparison with the control group. In the second study, we observed that the magnitude of the effects of lead exposure varied as a function of the consistency of the lateralization, being the results more pronounced in inconsistent animals (lesser degree of lateralization). In both studies, the effects of lead were not dependent on blood levels of lead exposed animals. In the third study, we demonstrated a significant increase in the levels of oxidized glutathione in the brain (indicative of oxidative stress) only in the group of animals that had lead levels above 60 $\mu\text{g/dL}$. Based in these results, we can conclude that: 1) Rotatory behavior in the free-swimming test constitutes an interesting model for the study of the neurobehavioral effects of lead exposure, 2) Consistency of laterality may be a relevant factor regarding the susceptibility to the toxic effects of lead on the nervous system and 3) The effects of lead are observable in the free-swimming test even at oxidative stress levels that do not affect brain levels of oxidized glutathione.

Key-words: Toxicology. Lead. Free-swimming test. Cerebral asymmetry. Glutathione.

1. INTRODUÇÃO

O chumbo, um dos metais pesados (ou traços) mais abundantes da crosta terrestre, tem sua toxicidade reconhecida a pelo menos mais de três mil anos (Lidsky e Schneider 2003). Contudo, nos grandes centros urbanos dos EUA e na maioria dos países em desenvolvimento, a exposição ao chumbo ainda permanece como um sério problema de saúde pública (ATSDR 2005;Flora et al. 1991;Lidsky e Schneider 2003;Tong et al. 2000).

O chumbo pode ser usado em diversas atividades, tais como produção de baterias, munições, alguns tipos de solda, ligas metálicas, canos e em esmalte cerâmico. A maior parte do chumbo usado pela indústria provém do minério de chumbo ou da reciclagem de pedaços de metal ou de baterias. Devido ao conhecimento crescente sobre a toxicidade deste metal, o chumbo foi sendo retirado de diversos produtos, tais como algumas tintas, canos, soldas e da própria gasolina. O chumbo tetraetila, utilizado até as décadas de 80 e 90 como aditivo da gasolina (antidetonante), contribuiu para espalhar o chumbo amplamente pelo meio ambiente. O chumbo contaminou lagos, rios, solos, plantas e animais, circulando pela cadeia alimentar. Apesar do fato de que a população geral ainda se contamina, principalmente, através do consumo de água e alimentos (Carvalho et al. 2003;de Freitas et al. 2007), a exposição de trabalhadores de fundições, fábricas e reformadoras de baterias, tem se mostrado um grave problema de saúde, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (Ahamed e Siddiqui 2007a;Ahamed e Siddiqui 2007b;Araujo et al. 1999;Carvalho et al. 2003;de Freitas et al. 2007;Paoliello e De Capitani 2007;Quiterio et al. 2001;Tong et al. 2000;Toscano e Guilarte 2005;Wright et al. 2005)

As rotas primárias de entrada do chumbo no organismo são por via respiratória e gastrointestinal. O chumbo absorvido é transportado pelo sangue, onde a maior quantidade (95%) é conduzida pelas hemácias e o restante fica livre no plasma. Do plasma, o chumbo pode ser depurado pelos rins ou penetrar em praticamente todos os tecidos. A medida da concentração de chumbo em sangue corresponde ao principal indicador de dose interna de chumbo, portanto apresenta a melhor relação com os efeitos do metal no organismo, sendo utilizado em rotina tanto para monitorização da presença do metal no organismo, quanto para avaliar o risco dos efeitos tóxicos do chumbo.

A dificuldade do organismo em eliminar grandes quantidades de chumbo de modo eficiente leva geralmente ao acúmulo deste metal no corpo. De modo geral, a meia vida do chumbo no sangue é de 35 dias, no cérebro é de dois anos, sendo que nos ossos o chumbo pode permanecer por décadas (Garza et al. 2006). Estes depósitos de longa duração podem ser mobilizados em determinadas condições, como durante a gravidez e na amamentação e exercer efeitos deletérios nos fetos e recém-nascidos (Gulson et al. 1999; Lidsky e Schneider 2003). Um dos maiores desafios, nos casos de intoxicação pelo chumbo, é a questão de como podem ser revertidos os efeitos, tanto em crianças quanto em adultos, visto que não existe um tratamento eficaz atualmente (ATSDR 2005; Flora et al. 1991; Goyer 1996).

1.1. Mecanismos de ação do chumbo

O chumbo, na forma de cátion (Pb^{2+}), pode ligar-se à maioria dos grupamentos químicos presentes nas biomoléculas, tais como: sulfidril (SH), fosfato, amino e carboxila, com maior afinidade pelo grupo SH. O chumbo apresenta também a capacidade de substituir outros cátions, principalmente zinco e cálcio; o primeiro atuando como co-fator de muitas proteínas/enzimas e o segundo participando da liberação de neurotransmissores e da sinalização celular, ambos importantes para realização de muitos processos biológicos. Desta forma o chumbo pode alterar a estrutura de proteínas e do DNA e RNA, e potencialmente, interferir nos mecanismos de transporte através das membranas, inibir enzimas e interferir nos processos de transcrição/tradução e de replicação do código genético (ATSDR 2005; Clarkson 1987; Garza et al. 2006). A variedade de alvos em potencial torna ainda maior o desafio de compreender a seqüência de eventos dos efeitos bioquímicos e celulares que explicariam os sinais e sintomas clínicos observados (Clarkson 1987).

Estudos recentes vêm sugerindo que a toxicidade do chumbo também está relacionada à sua capacidade de induzir estresse oxidativo (Correa et al. 2004; Gurer e Ercal 2000; Patra et al. 2001). A alteração do equilíbrio pró-oxidante/anti-oxidante promovida pelo chumbo pode produzir graves danos teciduais via oxidação de biomoléculas críticas, tais como lipídeos, proteínas e DNA (Adonaylo e Oteiza 1999a; Adonaylo e Oteiza 1999b; Gurer e Ercal 2000; Hsu e Guo 2002; Moreira et al.

2001;Patra et al. 2001). Entretanto, além dos efeitos diretos sobre biomoléculas críticas, o chumbo também atua sobre as enzimas anti-oxidantes e a glutathione, que são mecanismos celulares que mantêm o balanço pró-oxidante/anti-oxidante e previnem doenças (Correa et al. 2004).

O chumbo modifica as atividades das enzimas anti-oxidantes através da inibição dos grupos funcionais SH e/ou substituição de cátions (ex.: zinco e selênio) em diversas enzimas tais como: ALA desidratase (ALAD), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Adonaylo e Oteiza 1999a;Correa et al. 2004;Flora et al. 2003;Patra et al. 2001). Outro importante indicador de estresse oxidativo é a peroxidação lipídica causada pelo chumbo, medida através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) nos tecidos (Adonaylo e Oteiza 1999a;Correa et al. 2004;Flora et al. 2003;Gurer e Ercal 2000;Hsu 1981;Hsu e Guo 2002;Patra et al. 2001)

A medida da razão entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) é um dos principais indicadores do balanço pró-oxidante/anti-oxidante das células. Em condições normais, as células procuram manter a razão GSH/GSSG acima de 100 ou os níveis de GSSG abaixo de 1%, o que corresponde à preservação do potencial redutor da célula, permitindo combater com eficiência os radicais livres (Anderson 1998;Griffith 1999). Mesmo que algumas enzimas anti-oxidantes sofram alteração de suas atividades ou exista algum grau de lipoperoxidação, o balanço GSH/GSSG pode manter-se inalterado, devido aos mecanismos compensatórios presentes nas células. Desta forma, a razão GSH/GSSG traduziria, pelo menos em grande parte, a resultante entre as ações diretas e indiretas do chumbo e os mecanismos de defesa anti-oxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) compensatórios. Embora existam estudos mostrando que a exposição ao chumbo é capaz de diminuir tanto a concentração de glutathione no sangue (Patrick 2006) como a razão GSH/GSSG (Sandhir e Gill 1995) pouco se sabe ainda sobre a relação destes eventos e os déficits neurocomportamentais observados nos indivíduos expostos ao chumbo.

1.2. Efeitos do chumbo no sistema nervoso humano.

Apesar de serem descritos efeitos tóxicos do chumbo em vários órgãos e sistemas, o sistema nervoso permanece como o principal alvo da toxicidade deste metal (ATSDR 2005;Gidlow 2004). Em acordo com esta idéia, vários estudos apontam o chumbo como uma potente neurotoxina, capaz de exercer uma série de ações no tecido nervoso como, por exemplo, aumento de morte neuronal por apoptose, excitotoxicidade, alteração dos processos de armazenamento e liberação de neurotransmissores, modificação nos níveis de segundos-mensageiros e comprometimento da função de astrócitos e oligodendrócitos (Finkelstein et al. 1998;Lidsky e Schneider 2003).

Do ponto de vista neurológico e comportamental, a exposição ao chumbo tem sido associada a uma série de distúrbios. Em particular, déficits de aprendizado e consolidação da memória, atenção reduzida, diminuição da percepção visual, da destreza manual e da velocidade de resposta, desmielinização, encefalopatia, hiperatividade, alteração da habilidade motora e do comportamento exploratório (Costa et al. 2004;Kosnett et al. 2007;Moreira et al. 2001;Murata et al. 2008;Shih et al. 2006;Shih et al. 2007;Trombini et al. 2001). Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que o chumbo aumenta o risco de Parkinsonismo (Brown et al. 2005;Carpenter 2001) e esclerose amiotrófica lateral (Carpenter 2001;Kamel et al. 2005).

1.3. Fatores que interferem na neurotoxicidade do chumbo

A idade em que os indivíduos são expostos é um dos fatores mais importantes na determinação da intensidade dos efeitos neurocomportamentais do chumbo. De modo geral é bem aceita a idéia de que as crianças são mais susceptíveis à toxicidade do chumbo do que os adultos (Costa et al. 2004;Lidsky e Schneider 2003). Esta maior susceptibilidade tem sido atribuída em grande parte ao fato de que, o chumbo é capaz de interferir com eventos cruciais do desenvolvimento neural, como diferenciação neuronal, sinaptogênese, morte celular programada e a mielinização (Costa et al. 2004;Lidsky e Schneider 2003). Além disso, as crianças têm uma maior absorção gastrintestinal de

chumbo (Aykin-Burns et al. 2003) e, devido à imaturidade da barreira hematoencefálica, uma proporção maior de chumbo circulante tem acesso ao cérebro (ATSDR 2005;Costa et al. 2004).

Em 1991 o Centro de Controle de Doenças (CDC) americano estabeleceu um nível de chumbo em sangue (parâmetro usualmente utilizado para avaliar a presença deste metal no organismo) de 10 µg/dL como limite tolerável em crianças (CDC 1991). Desde então este limite foi adotado por várias organizações de saúde no mundo (Tong et al. 2000). Contudo, estudos recentes vêm demonstrando que crianças apresentam alterações neurológicas significativas e, na maioria das vezes, irreversíveis em concentrações sanguíneas abaixo deste limite (Canfield et al. 2003;Chiodo et al. 2004;Costa et al. 2004;Garza et al. 2006;Gilbert e Weiss 2006;Lanphear et al. 2000;Lanphear et al. 2005). Transtornos de leitura, discalculia, déficits de memória de curto prazo e agnosia visual têm sido demonstradas em crianças com níveis de chumbo em sangue inferiores a 9 µg/dL (Canfield et al. 2003;Lanphear et al. 2005;Pocock et al. 1994;Schnaas et al. 2006). De modo geral, para níveis de chumbo em sangue inferiores a 10 µg/dL, cada aumento de 1 µg/dL resulta em uma diminuição de 1,37 pontos em testes de QI (Gilbert e Weiss 2006).

Apesar do fato de que a exposição precoce ao chumbo promove danos severos sobre o desenvolvimento subsequente do sistema nervoso, deve-se ter cautela antes de generalizar que os riscos da exposição ao chumbo durante a vida adulta são pequenos. Vale a pena ressaltar que a toxicidade do chumbo, geralmente atribuída a sua habilidade em substituir cátions e induzir estresse oxidativo (Ahamed e Siddiqui 2007b;Garza et al. 2006;Hsu e Guo 2002;Lidsky e Schneider 2003), tem o potencial de interferir com a função das células nervosas independentemente da idade do sujeito. Em acordo com esta idéia, uma série de estudos tem demonstrado que a exposição cumulativa ao chumbo durante a idade adulta também promove alterações neurocomportamentais (Kosnett et al. 2007;Murata et al. 2008;Shih et al. 2006;Shih et al. 2007). Em particular, déficits cognitivos e motores vêm sendo amplamente descritos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo (Bleecker et al. 2003;Bleecker et al. 2007;Milanov e Kolev 2001;Shih et al. 2007).

De modo geral, é bem aceito que as primeiras manifestações neurológicas começam a ocorrer em termos populacionais, em concentrações sanguíneas de 30-40 µg/dL (ATSDR, 2005). De acordo com as recomendações da *Occupational Safety and*

Health Administration (OSHA), os trabalhadores com níveis de chumbo em sangue superiores a 60 µg/dL devem ser afastados do local de trabalho até que os valores atinjam níveis inferiores a 40 µg/dL (Blando et al. 2007). No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora (NR-7) do Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional (PCMSO) do ministério do trabalho, 60 µg/dL é o índice biológico máximo permitido (IBMP) e 40 µg/dL é o valor de referência (MT-NR-7 2001).

Nos últimos anos vêm crescendo o número de estudos que descrevem alterações neurocomportamentais em indivíduos adultos com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL (Kosnett et al. 2007; Murata et al. 2008; Shih et al. 2006; Shih et al. 2007). Contudo, na maioria dos casos não existe um registro contínuo da intensidade, frequência e duração das exposições, a fim de relacionar adequadamente a dose cumulativa com os efeitos (Araujo et al. 1999; Kosnett et al. 2007; Murata et al. 2008; Shih et al. 2006; Shih et al. 2007). Além disso, a magnitude dos efeitos do chumbo no sistema nervoso varia em função de fatores genéticos, da idade dos indivíduos e do nível sócio-econômico da população estudada (Correa et al. 2004; Lidsky e Schneider 2003; Onalaja e Claudio 2000). Do ponto de vista genético, pode existir uma susceptibilidade ou resistência diferenciada de alguns indivíduos, devido à alteração da toxicocinética do chumbo, determinada pela expressão de isoformas de enzimas, por exemplo, da ALA-desidratase, que podem aumentar a meia-vida do chumbo no sangue, reduzindo a taxa de difusão para os tecidos (Lidsky e Schneider 2003). Baixo nível socioeconômico é um fator de risco para a manifestação dos efeitos deletérios do chumbo, assim como de várias disfunções comportamentais e neurológicas (Virgolini et al. 2005). Além disso, uma dieta pobre em minerais, característica de populações de baixo status sócio-econômico pode contribuir para potencializar os efeitos do chumbo (Cory-Slechta et al. 2004; Skerfving et al. 1993; Virgolini et al. 2005).

1.4. Modelos animais

Em função da maioria dos estudos em humanos envolvendo a exposição ambiental ao chumbo serem observacionais e não experimentais (excetuando-se os testes clínicos que comparam a eficácia de modalidades alternativas de tratamentos), grande parte da controvérsia envolvendo os resultados tem sido atribuída à influência de fatores outros que

não a toxicidade do chumbo em si (Bellinger 2004). Considerando que, com base nos níveis de chumbo em sangue, a relação dose-efeito descrita para humanos é semelhante àquela encontrada em ratos e camundongos (ATSDR 2005), a utilização de modelos animais para estudar a toxicidade do chumbo pode desempenhar papel fundamental. A inferência que a exposição a doses baixas ou moderadas de chumbo provoca efeitos deletérios em humanos se torna mais plausível quando resultados semelhantes são observados em animais sob circunstâncias experimentais. Além disso, o uso de modelos animais abre grandes possibilidades, não somente de investigação dos mecanismos biológicos envolvidos com a toxicidade do chumbo, mas também na elaboração de estratégias para proteção e/ou reversão dos seus efeitos.

1.4.1. Teste de campo aberto.

A medida da atividade locomotora em testes de campo aberto tem se mostrado uma ferramenta importante em neurociência e vem sendo utilizada em testes de memória e aprendizado (Carey et al. 1998), como um indicador comportamental de emocionalidade (Tejani-Butt et al. 2003), de atividade exploratória (Crusio 2001; Steiner et al. 1988) e de ansiedade (Prut and Belzung 2003) e para avaliar a recuperação funcional de lesões no sistema nervoso central (Schucht et al. 2002). Além disso, no desenvolvimento da pesquisa clínica, particularmente em estudos relativos ao transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (Ueno et al. 2002), depressão (Decker et al. 2000) e psicoses (Dawirs e Teuchert-Noodt 2001). De particular interesse, este teste vem sendo utilizado para avaliar os efeitos de várias drogas e compostos neurotóxicos no sistema nervoso.

A medida da atividade locomotora em testes de campo aberto tem sido amplamente utilizada para estudar os efeitos da exposição ao chumbo em animais, especialmente em roedores (Dawirs e Teuchert-Noodt 2001; Leasure et al. 2008; Moreira et al. 2001; Silbergeld e Goldberg 1974b; Szczerbak et al. 2007; Trombini et al. 2001). De modo geral, tem sido demonstrado que a exposição ao chumbo durante o período gestacional e/ou lactação induz hiperatividade em roedores (Ma et al. 1999; Moreira et al. 2001; Rodrigues et al. 1996; Silbergeld e Goldberg 1974a; Silbergeld e Goldberg 1974b; Trombini et al. 2001). De modo semelhante, hiperatividade também tem sido descrita em crianças que foram expostas ao chumbo tanto no ambiente uterino ou durante os primeiros anos de infância

(Bellinger 2008;Nigg et al. 2008). Em contraste, roedores expostos ao chumbo após o desmame ou vida adulta não diferem dos seus respectivos controles em relação à atividade locomotora (Correa et al. 1999;Nieto-Fernandez et al. 2006;Rice 1996b;Salinas e Huff 2002).

1.4.2. Comportamento rotacional.

O comportamento rotacional tem sido amplamente utilizado para os mais diversos fins, a saber: 1) para avaliar os mecanismos envolvidos com a recuperação funcional após lesões no tecido nervoso (Robinet e Bardo 2001;Waldner et al. 2001) 2) para testar e avaliar a ação de drogas em neurônios dopaminérgicos centrais (Belforte et al. 2001); 3) no desenvolvimento da pesquisa clínica, particularmente em estudos relativos ao mal de Parkinson (Boules et al. 2001), depressão (Carlson e Glick 1991;Krahe et al. 2002) e esquizofrenia (Bracha 1987;Lyon e Satz 1991) e 4) para estudar assimetrias cerebrais¹ (Carlson e Glick 1989;Fedrowitz et al. 2000;Filgueiras e Manhães 2004;Krahe et al. 2001;Krahe et al. 2002;Schmidt et al. 1999) . Estas aplicações distintas decorrem, em última análise, de uma série de evidências que apontam fortemente para uma relação entre a assimetria comportamental do movimento rotacional e assimetrias bioquímicas nas vias dopaminérgicas do sistema nigro-estriado. De modo geral, é aceito que o animal roda preferencialmente em direção contralateral ao lado com maior quantidade de dopamina e/ou atividade dopaminérgica (Fedrowitz et al. 2000;Schwartz e Huston 1996).

A relação entre a função dopaminérgica e o comportamento rotacional torna este paradigma particularmente interessante para estudar os efeitos da exposição do sistema nervoso ao chumbo. Vários autores vêm demonstrando que o chumbo promove uma série de efeitos sobre a função dopaminérgica (Cory-Slechta 1995;Gedeon et al. 2001;Ma et al. 1999). Estes efeitos incluem: alterações na síntese, renovação e recaptção de dopamina;

¹ As assimetrias cerebrais consistem em diferenças morfológicas, bioquímicas e funcionais entre os hemisférios cerebrais. Assimetrias morfológicas correspondem as diferenças estruturais e podem ser tanto macroscópicas como microscópicas. Assimetrias bioquímicas são caracterizadas por diferenças no conteúdo e/ou metabolismo de neurotransmissores. As assimetrias funcionais, de particular interesse para este estudo, são divididas em especializações hemisféricas e comportamentos lateralizados. Por especializações hemisféricas entendem-se aquelas funções em que um dos hemisférios é melhor preparado para execução do que o outro. Os comportamentos lateralizados são caracterizados por apresentarem um favorecimento sistemático de um dos dimídios (lateralidade). Exemplos deste tipo de comportamento são o uso preferencial de uma das mãos para a realização de determinadas atividades (como por exemplo, escrever) e o comportamento rotacional que é caracterizado por uma tendência ao deslocamento em "círculos" em determinados ambientes.

nos níveis de dopamina e seus metabólitos; assim como no número de receptores de dopamina (Cory-Slechta 1995). Alguns autores têm sugerido que estas ações no sistema dopaminérgico respondem em grande parte pela hiperatividade locomotora observada em roedores e, talvez, contribuem para os problemas de atenção observados em crianças expostas ao chumbo (Ma et al. 1999; Sagvolden et al. 2005). Interessantemente, padrões anômalos de assimetria cerebral têm sido observados tanto em indivíduos com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD) (Klimkeit e Bradshaw 2006) como em indivíduos expostos ao chumbo durante o desenvolvimento (Lasky et al. 2005; Meng et al. 2005). Contudo, se os distúrbios neurocomportamentais promovidos pelo chumbo estão associados com as alterações no padrão de assimetrias cerebrais é uma questão que ainda permanece por ser esclarecida. Vale mencionar ainda que, não existe nenhum estudo avaliando se a exposição ao chumbo durante a adolescência ou vida adulta afeta as assimetrias cerebrais.

Uma das vantagens da utilização do comportamento rotacional é que este pode ser avaliado através da utilização de técnicas simples e de baixo custo. Além disso, sua análise pode ser tanto quantitativa como qualitativa, não necessitando de um treinamento prévio do animal para a realização da tarefa e tampouco da interação entre este e o experimentador. Em nosso laboratório, o comportamento rotacional tem sido medido em recipientes cilíndricos parcialmente repletos com água (Filgueiras e Manhães 2004; 2005; 2006, Krahe et al., 2001; 2002; Manhães et al. 2007; Schmidt et al. 1999).

Os testes na água apresentam algumas vantagens sobre os realizados em arena seca: não necessitam da utilização de drogas para a obtenção de um bom número de rotações; sua realização não necessita da utilização de sistemas sofisticados para a avaliação das rotações e apresenta resultados reprodutíveis com testes de poucos minutos de duração (Denenberg et al. 1990; Schmidt et al. 1999). Enquanto os testes realizados em arena seca usualmente têm duração entre 12 e 16 horas (Glick e Cox 1978; Kim et al. 1999; Nielsen et al. 1999) os testes na água podem ser realizados em apenas 5 minutos (Denenberg et al. 1990; Filgueiras e Manhães 2004; 2005; Filgueiras et al. 2006; Manhães et al. 2007). Estas características tornam este teste particularmente interessante para estudos envolvendo grandes amostras. Resumidamente, o teste consiste em colocar o animal (rato ou camundongo) no interior de um recipiente cilíndrico parcialmente repleto com água por alguns minutos. Este procedimento pode ser repetido algumas vezes e o comportamento

rotacional dos animais é avaliado para cada uma destas sessões experimentais, seja durante o teste ou através de imagens gravadas por uma câmera de vídeo.

De modo interessante, foi demonstrado que, no teste de nado livre, camundongos passam a maior parte do tempo nadando próximo à parede do recipiente de teste (Schmidt et al. 1999), resultado que também foi observado em ratos (West et al. 1986). Quando próximos à parede do recipiente, os animais apresentam uma atividade vigorosa e freqüentemente tentam escalá-la (Schmidt et al. 1999; Krahe et al. 2001). Desta forma, tem sido sugerido que no comportamento rotacional de nado livre a atração pela parede reflete a tentativa do animal de escapar da situação adversa do teste (Filgueiras e Manhães 2004;2005;2006;Krahe et al. 2001; 2002;Manhães et al. 2007;Schmidt et al. 1999;West et al., 1986).

A situação aversiva do teste de nado livre pode ser uma característica adicional interessante para o estudo dos efeitos da exposição ao chumbo. Estudos recentes realizados em ratos (Virgolini et al., 2005) e em humanos (Glass et al. 2009) sugerem que o estresse ambiental pode exacerbar os efeitos deletérios do chumbo no cérebro adulto. Alguns autores têm demonstrado que a exposição ao chumbo do desmame à vida adulta pode alterar os níveis de corticosterona, a resposta comportamental ao estresse, as catecolaminas no cérebro e aumentar o impacto do perigo de vários tipos de situações estressantes sobre a função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Cory-Slechta et al. 2008). Além disso, o estresse pode alterar significativamente os efeitos do chumbo por meio de interações dos glicocorticóides com o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (White et al. 2007). Considerando que a função do sistema dopaminérgico têm sido amplamente associada com a lateralidade do comportamento rotacional em roedores (Fedrowitz et al. 2000; Schwarting e Huston 1996) é razoável supor que a assimetria rotacional esteja relacionada com os efeitos neurocomportamentais do chumbo. Contudo, esta hipótese carece de suporte experimental capaz de validá-la.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se compreender melhor os efeitos neurocomportamentais da exposição ocupacional ao chumbo e os benefícios que podem advir da utilização de animais de laboratório na investigação da neurotoxicidade deste metal, o objetivo central deste trabalho foi avaliar o potencial do comportamento rotacional medido em testes de nado livre como um modelo em roedores para estudo dos efeitos neurocomportamentais da exposição ao chumbo da adolescência à vida adulta. Para tanto foram realizados três estudos cujos objetivos específicos foram:

Estudo 1) Avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.

Estudo 2) Avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre

Estudo 3) Avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutathione no cérebro de camundongos Suíços.

3. METODOLOGIA

Todos os experimentos conduzidos neste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e estão de acordo com a declaração de Helsink.

Neste trabalho foram utilizados camundongos Suíços. Todos os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ. O ciclo de luminosidade dos biotérios foi de 12 horas (início do período escuro = 14:00h) e a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C. Todos os animais utilizados neste experimento tiveram livre acesso à ração e água. Para facilitar o entendimento, os métodos serão apresentados de acordo com cada estudo.

3.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.

3.1.1. Formação dos grupos experimentais

Neste experimento foram utilizados 127 camundongos (63 fêmeas e 64 machos, provenientes de 20 ninhadas).

No trigésimo dia pós-natal (PN30), os animais de uma mesma ninhada foram separados em função do sexo (mínimo de 2 e máximo de 4 animais por gaiola) e distribuídos randomicamente entre os grupos exposto ao chumbo e controle. A exposição ao chumbo (acetato de chumbo tri-hidratado) se deu por via oral, através da água consumida pelos animais por no mínimo 60 dias (período de exposição médio = 73,2 dias, SD = 10,1, tempo de exposição máximo = 90 dias). Quarenta e seis animais (25 fêmeas e 21 machos) foram expostos diariamente a uma solução de 0,47 mM ou 180 ppm em chumbo (grupo Pb180) e 41 animais (18 fêmeas e 23 machos) foram expostos a solução de 1,42 mM ou 540 ppm em chumbo (grupo Pb540). O grupo controle, formado por 20 fêmeas e 20 machos, bebeu água potável.

A fim de evitar que a experiência prévia em um dos testes influenciasse o desempenho no outro teste, uma parte dos animais foi submetida somente ao campo aberto, enquanto outra foi submetida apenas ao nado livre.

3.1.2. Teste de Campo Aberto

O Grupo controle, constituído por 20 animais (12 fêmeas e 8 machos) e o Grupo exposto formado por 44 animais (Pb180: 11 fêmeas e 13 machos, Pb540: 9 fêmeas e 11 machos) foram submetidos ao teste de Campo Aberto.

A arena do teste de campo aberto consiste de uma caixa retangular de polipropileno (37,6 x 30,4 x 17 cm), que foi dividida em 16 retângulos (9,4 cm x 7,6 cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais. Para realização dos testes, os animais eram colocados sempre em um dos cantos da caixa e ficavam recobertos por um anteparo de papelão por 10 segundos. O tempo de duração da sessão experimental foi de 5 minutos. Após o fim de cada sessão, a caixa era lavada com água com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que poderiam interferir no comportamento dos animais que seriam testados subsequentelemente. O posicionamento da caixa na sala, a temperatura da sala e o horário de início das sessões foram mantidos ao longo de todo o estudo. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo (VHS) posicionada a um metro acima da caixa. As contagens foram feitas à partir do material gravado.

Foram estudados escores de tempo e de ambulação. A ambulação foi medida pelo número de quadrados em que o animal colocava as quatro patas. Foram avaliadas a ambulação total (C+Pe), a ambulação nos 4 quadrados do centro (C), nos 12 quadrados da periferia (Pe) e a razão $C/Pe \times 100$. Considerando-se que os resultados referentes às comparações entre as medidas de centro e periferia podem ser influenciados pelo maior número de retângulos na periferia da arena, as medidas de ambulação no centro e na periferia foram respectivamente divididas pelo número de quadrados em cada região da arena (C/4 e Pe/12). Em relação às medidas de tempo, foi medido o tempo de permanência dos animais nos quadrados do centro (TC) e da periferia (TP) da arena.

3.1.3. Teste de nado livre

O Grupo controle, formado por 20 animais (8 fêmeas e 12 machos) e o Grupo exposto por 43 animais (Pb180: 14 fêmeas e 8 machos, Pb540: 9 fêmeas e 12 machos) foram submetidos a uma sessão de 5 minutos no teste de nado livre. A sessão era iniciada 2 a 3 h depois do ciclo escuro começar. Para a realização do teste de nado livre, os camundongos eram colocados individualmente no centro de um recipiente plástico cilíndrico com água a uma temperatura em torno de 25°C (diâmetro do recipiente = 21cm, altura do recipiente = 23cm; altura da coluna de água = 16cm). O posicionamento do recipiente na sala, a temperatura da sala e o horário de início das sessões foram mantidos ao longo de todo o estudo. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo (VHS) posicionada a um metro acima da caixa. As contagens foram feitas a partir do material gravado.

A fim de auxiliar as contagens, a imagem do recipiente era dividida por uma grátícula em 12 arcos de circunferência. Cada arco corresponde a um ângulo de 30° com vértice no centro da circunferência. A cada movimento natatório eram marcados os pontos de início e de interrupção do movimento, tomando-se como referência o focinho do animal. O sentido de deslocamento (anti-horário = esquerda ou horário = direita) era observado para as unidades de deslocamento angular (DA) de 30°. Um deslocamento de 30° era equivalente ao cruzamento consecutivo de duas linhas adjacentes sem alteração de sentido. A maioria dos animais realizava deslocamentos em torno do centro do recipiente de teste (Filgueiras e Manhães, 2004, 2005; Manhães et al., 2006). Nos casos cujo deslocamento não era feito ao redor do centro, era marcado o ponto de partida e o fim do movimento e era estimado o número de deslocamentos com o auxílio da grátícula. Um deslocamento de 30° só era considerado quando o animal movimentava-se ativamente. Portanto, o período de tempo no qual o animal permanecia imóvel ou flutua passivamente não era utilizado para esta contagem, mas sim para a medida de um outro parâmetro, o tempo de imobilidade.

A partir das contagens do número de deslocamentos em cada sentido (direita e esquerda) foram calculados: 1) o número total de deslocamentos (NT) que corresponde ao somatório do número de deslocamentos de 30° para a esquerda e direita, 2) o número de alternâncias espontâneas no sentido de natação (AS), que corresponde ao número de

vezes que o animal girava pelo menos 30° em direção oposta ao movimento que vinha realizando (direita para esquerda ou vice-versa) e 3) a razão AS/NT, que mede as alternâncias de sentido, independente do número total de deslocamentos angulares exibidos pelo animal. Uma quarta medida é o tempo de imobilidade do animal, ou seja, o tempo no qual o animal permaneceu flutuando com todas as patas e cauda imóveis (IMOB). Então, foram contados para cada animal, através de imagens gravadas do teste, os seguintes parâmetros: NT, AS, AS/NT e IMOB.

3.1.4. Determinação da concentração de chumbo em sangue (PbS).

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue foi coletado por via intracardíaca. A concentração de chumbo no sangue foi determinada pela técnica de Espectrometria de Absorção Atômica – forno de grafite. A Espectrometria de Absorção Atômica fundamenta-se: 1) na formação de átomos no estado de vapor no estado fundamental, e 2) na capacidade dos átomos absorverem um determinado comprimento de onda (λ) de uma lâmpada constituída pelo próprio elemento. No caso, uma lâmpada de chumbo que emite radiação com $\lambda = 283,3$ nm. Segundo a lei de Lambert-Beer, a absorvância é diretamente proporcional à concentração (c) de chumbo, visto que absortividade (ϵ) e caminho óptico (b) são constantes. Desta forma, constrói-se uma curva de calibração antes da análise das amostras, relacionando concentração de chumbo (eixo x) e absorvância (eixo y).

No dia da análise, prepara-se uma curva de calibração em meio ácido (HNO₃ 0,2%) e uma curva de adição padrão, utilizando-se uma das amostras do grupo controle, adicionando três concentrações de chumbo (10, 25 e 50 μg / dL). As amostras de sangue são diluídas (5, 10 ou 20X), dependendo da concentração de chumbo, com o detergente Triton X-100 (0,1%) e colocadas no amostrador automático do aparelho (Perkin-Elmer 5100 - Zeeman) para leitura. Paralelamente à leitura dos pontos da curva e das amostras, são lidos padrões certificados e de intercalibração.

A técnica de forno de grafite permite o processamento e análise direta (*in situ*) da amostra, sem necessidade de mineralização prévia. O forno de grafite é submetido a um programa de temperatura e tempo previamente padronizado, promovendo a evaporação

do solvente, mineralização (ou pirólise) e atomização do chumbo no próprio tubo. Quanto maior a concentração de chumbo, maior a população de átomos e, proporcionalmente, maior a absorvância. A curva é construída com valores de Pb-S dentro da faixa de linearidade do método.

3.1.5. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrões. Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de $P < 0,05$ (bicaudal).

Para as comparações envolvendo as medidas de chumbo em sangue foram realizadas ANOVAs univariadas classificando os animais pelo Tipo de Exposição (Controle, Pb180 ou Pb540) e pelo Sexo (macho e fêmea). As relações entre Pb-S, tempo de exposição e as variáveis comportamentais foram avaliadas usando o coeficiente de correlação de Pearson. Considerando que alguns estudos têm reportado uma relação não-linear entre os efeitos neurocomportamentais e os níveis de chumbo em sangue (Bowers e Beck 2006), nos casos em que não houve relação linear significativa, foram testados outros 10 modelos para estimativa de curva de regressão: logarítmica, inversa, quadrática, cúbica, potência, curva-S, composta, logística, crescimento e exponencial.

As análises dos dados de campo aberto e de nado livre foram conduzidas em dois níveis. No primeiro, verificamos se a exposição ao chumbo por si foi capaz de afetar o comportamento e, para tanto, as ANOVAs foram realizadas classificando os animais em função do Tratamento (Exposto ao chumbo ou Controle) e Sexo (macho ou fêmea). O tempo de exposição foi utilizado como um fator de co-variação. No segundo, verificamos se o nível de intoxicação pelo chumbo afeta de modo diferenciado o comportamento e, para tanto, utilizamos somente camundongos expostos ao Pb com valores de Pb-S menores do que 40 $\mu\text{g/dL}$ ou maiores do que 60 $\mu\text{g/dL}$. Estes pontos de corte foram escolhidos com base nas normas estabelecidas pela instituição Americana OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) e pelo Ministério do Trabalho brasileiro (MT-NR-7), que exige a remoção do posto de trabalho e cuidados médicos para trabalhadores com Pb-S acima de 60 $\mu\text{g/dL}$, até que os valores de Pb-S retornem a valores inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$. Desta forma, a segunda série de ANOVAs foi conduzida

classificando os animais pelo nível de intoxicação (Controle, Pb-S<40 ou Pb-S>60) e Sexo. O tempo de exposição foi utilizado como um fator de co-variação. Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post-hoc*. Os camundongos com Pb-S entre 40 e 60 µg/dL não foram incluídos na análise devido ao pequeno número de indivíduos testados no campo aberto (6 fêmeas e 5 machos) e no nado livre (4 fêmeas e 3 machos).

As flutuações dos níveis de hormônios durante o ciclo estral poderiam afetar o comportamento rotacional (Becker et al. 1982) e as medidas de ambulação no campo aberto (Meziane et al. 2007). Se isto acontecesse, a variabilidade dos dados do grupo de fêmeas deveria ser maior do que a observada no grupo de machos. Esta hipótese foi avaliada para os animais testados tanto no campo aberto quanto no nado livre, através do teste de Levene's para igualdade de variâncias.

3.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre.

3.2.1. Formação dos grupos experimentais

Neste experimento foram utilizados 107 camundongos (58 machos e 49 fêmeas provenientes de 17 ninhadas)

No trigésimo dia pós-natal (PN30), os animais de uma mesma ninhada foram separados em função do sexo (mínimo de 2 e máximo de 4 animais por gaiola) e distribuídos randomicamente entre os grupos exposto ao chumbo e controle. A exposição ao chumbo (acetato de chumbo tri-hidratado) se deu por via oral, através da água consumida pelos animais por no mínimo 66 dias (período de exposição médio= 74 dias, SD= 7, tempo de exposição máximo = 88 dias). 46 animais (24 fêmeas e 22 machos) foram expostos diariamente a uma solução de 180 ppm em chumbo (grupo Pb180) e 25 animais (9 fêmeas e 16 machos) foram expostos a solução de 540 ppm em chumbo (grupo Pb540). O grupo controle (16 fêmeas e 20 machos) bebeu água potável.

3.2.2. Teste de Nado Livre

A partir de PN90, os camundongos foram submetidos a três sessões experimentais de nado livre (duração de cada sessão = 5 minutos; intervalo entre sessões = 48 horas). As sessões iniciavam-se 2 a 3 horas depois do início do período escuro e os testes foram realizados de acordo com o procedimento descrito no item 3.1.3.

A partir das contagens do número de deslocamentos para a direita (D) e para a esquerda (E), foram calculados o número total de deslocamentos (NT) e o número de deslocamentos para o lado preferido (LP). A lateralidade do comportamento rotacional foi estudada utilizando-se índices de direção, que indicam se o animal se desloca preferencialmente para direita ou para esquerda, e de magnitude, que indicam a grandeza das diferenças entre as rotações para o lado esquerdo e o para o lado direito. Para avaliar a magnitude da lateralidade rotacional foi utilizado o percentual de deslocamento para o lado preferido (%LP) que foi determinado pela fórmula: $\%LP = (LP / NT) \times 100$. Para avaliar o sentido preferencial de rotação foi utilizado o percentual de deslocamento para a direita (%D) que foi determinado pela fórmula: $\%D = (D / NT) \times 100$. O %D foi utilizado como indicador do sentido preferencial de deslocamento para cada sessão. Desta forma, os animais eram classificados como levógiros (sentido preferencial de natação para a esquerda), quando o valor do %D era menor que 50, e classificados como destrógiros (sentido preferencial de natação para a direita), quando o valor do %D era maior que 50.

3.2.3. Consistência da lateralidade

Para avaliar a consistência do sentido da lateralidade, foi observado o sentido preferencial de natação (indicado pelo %D) em cada uma das sessões experimentais. Os animais foram classificados como consistentemente lateralizados para a esquerda ou consistentemente lateralizados para a direita quando, nos três testes, não invertiam a classificação (destrógiro ↔ levógiro). Quando o animal invertia a classificação era considerado não consistente.

A consistência da lateralidade também foi avaliada de modo independente do sentido (LIS). Neste caso, os animais foram classificados como consistentemente

lateralizados (consistentemente lateralizados para a direita + consistentemente lateralizados para a esquerda) ou não consistentes.

3.2.4. Determinação da concentração de chumbo em sangue (PbS)

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue coletado por via intracardíaca foi utilizado para avaliação dos níveis de chumbo pela técnica de Espectrometria de Absorção Atômica – forno de grafite conforme descrito no item 3.1.4.

3.2.5. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrões. Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de $P < 0,05$ (bicaudal).

A percentagem de animais classificados como consistentemente lateralizados e não consistentes foi comparada com o acaso pelo teste de Z-binomial (Z). As comparações entre o grupo exposto e controle envolvendo as proporções de animais consistentes e não consistentes e as proporções de animais consistentes para a esquerda e para a direita foram feitas pelo teste χ^2 (2x2).

Para as comparações envolvendo as medidas de chumbo em sangue foram realizadas ANOVAs univariadas classificando os animais pelo Tipo de Exposição (Controle, Pb180 ou Pb540) e pelo Sexo (macho e fêmea). As análises envolvendo as variáveis comportamentais foram conduzidas em dois níveis. No primeiro, as ANOVAs foram realizadas classificando os animais em função do Tratamento (exposto ao chumbo ou controle), do Sexo e da consistência da lateralidade independente do sentido (LIS: consistentes ou não consistentes). No segundo, utilizamos somente camundongos expostos ao Pb com valores de Pb-S menores do que 40 $\mu\text{g/dL}$ ou maiores do que 60 $\mu\text{g/dL}$. Desta forma, a segunda série de ANOVAs foi conduzida classificando os animais pelo nível de intoxicação (Controle X PbS<40 X PbS>60), Sexo e LIS. Para as ANOVAs envolvendo o nível de intoxicação, o tempo de exposição foi usado como um fator de co-

variação. Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post-hoc*.

3.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutathiona no cérebro de camundongos Suíços.

3.3.1. Formação dos grupos experimentais

Em P30, 53 camundongos (27 fêmeas e 26 machos) foram separados em função do sexo (mínimo de 2 e máximo de 4 animais por gaiola) e distribuídos em quatro grupos experimentais: um grupo controle e três grupos tratados com soluções de chumbo por via oral - 90 ppm, 270ppm e 540 ppm em Pb. Para a exposição ao chumbo, uma garrafa contendo uma solução de acetato de chumbo tri-hidratado era colocada em cada gaiola, e esta solução era a única fonte de água que os animais tiveram acesso durante o todo o período de exposição, de no mínimo 66 dias (média =68 dias, SD=1,8, máximo =73 dias). O grupo controle consumiu água potável por tempo equivalente ao dos grupos expostos.

3.3.2. Determinação de PbS e de glutathiona

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foram coletados o sangue (por via intracardíaca) e cérebro. O sangue foi utilizado para avaliação dos níveis de chumbo pela técnica de Espectrometria de Absorção Atômica – forno de grafite. O cérebro foi utilizado para a análise da glutathiona. Para tanto, os cérebros foram congeladas a -20°C e processadas em até 2 dias ou mantidas a -80°C e processadas em até 5 dias. Os tecidos foram homogeneizados em ácido 5-sulfosalicílico 5% (p/v) gelado na proporção de 5 partes de ácido para cada uma de tecido. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 minutos. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante foram usadas para a dosagem. O método fundamenta-se na reação cíclica da enzima glutathiona redutase, que transforma GSSG em GSH, que reage com DTNB, formando de novo GSSG e TNB (possui um pico de absorvância em 412 nm). O meio de reação contém o tampão fosfato 125 mM pH 7.5 + 6.3 mM EDTA e NADPH 0,3 mM. Antes da análise das amostras, sempre é construída

uma curva de glutathione reduzida (GSH): 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 μ M. Soluções de GSH e NADPH são preparadas na hora (Anderson, 1980).

3.3.3. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrões. Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de $P < 0,05$ (bicaudal).

Para as comparações envolvendo as medidas de chumbo em sangue (Pb-S) foram realizadas ANOVAs univariadas classificando os animais pela solução que os animais foram expostos (Controle, Pb90ppm, Pb270ppm e Pb540ppm) e pelo Sexo (macho ou fêmea). Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post-hoc*.

As análises dos dados de glutathione total, GSH, GSSG e GSSG/glutathione total (%GSSG) foram conduzidas em dois níveis. No primeiro, as ANOVAs foram realizadas classificando os animais em função da solução que os animais foram expostos (Controle, Pb90ppm, Pb270ppm e Pb540ppm) e Sexo (macho ou fêmea). No segundo, as ANOVAs foram conduzidas classificando os animais pelo nível de intoxicação (Controle, Pb-S<40 e Pb-S>60) e Sexo. Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post-hoc*.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.

4.1.1. Chumbo em sangue (PbS)

Considerando o limite de detecção do método de 0,6 µg/dL, no grupo controle, 68% dos camundongos (n=27) apresentaram PbS detectável, na faixa de 0.6 a 4.2 µg/dL (média = 1,1; SEM = 0,2). Em relação às medidas de Pb-S, o grupo exposto apresentou uma grande variabilidade individual (Figura 1). No grupo Pb180, o intervalo de Pb-S foi de 14.3 a 62.7 µg/dL (média = 35,1; SEM = 1,7) e no grupo exposto Pb540, o Pb-S variou de 52.0 a 106.9 µg/dL (média = 75.4; SEM = 2.0). O Pb-S do grupo Pb540 foi significativamente maior que o do Pb-S do grupo Pb180 ($F = 240.5$, $df = 1$, $P < 0.001$). Apesar dessas diferenças dos resultados de Pb-S entre os grupos Pb180 e Pb540, análises preliminares não mostraram qualquer diferença significativa entre estes grupos para ambos os testes comportamentais. Além disso, tanto Pb-S quanto o tempo de exposição não se relacionaram com qualquer medida de comportamento (o maior R^2 observado foi 0.07, $p=0.41$). Em consequência, para a análise do comportamento, os grupos Pb180 e Pb540 foram compilados no grupo Exposto, cuja média de Pb-S foi de 54,1 µg/dL (EPM = 2,5). A média de Pb-S dos camundongos testados no campo aberto (média = 55,2; EMP = 3,6) não diferiu daquela obtida para o grupo testado no nado livre (média = 53,0; EPM = 3,6). Vale mencionar que estes níveis de intoxicação são compatíveis com aqueles encontrados em populações ocupacionalmente expostas em todo o mundo (Ahamed e Siddiqui 2007a; Ahamed e Siddiqui 2007b; Apostoli et al. 2002; Araujo et al. 1999; Blando et al. 2007; Chen et al. 2005; Kasperczyk et al. 2008; Paoliello e De Capitani 2007; Thanapop et al. 2007; Whittaker 2003)

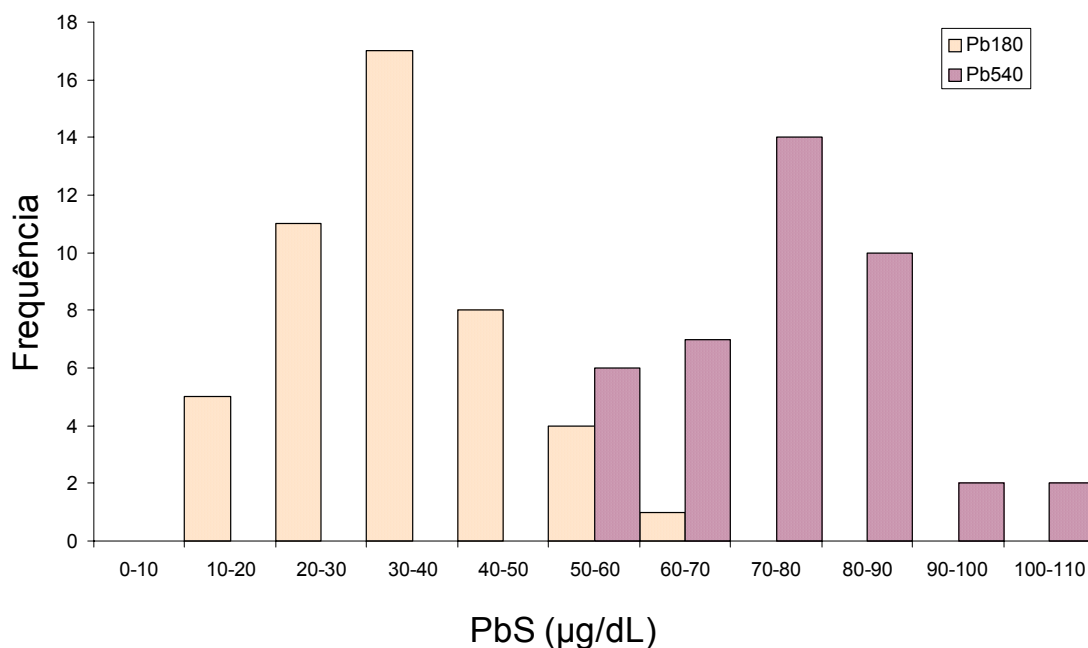


Figura 1. Histograma das distribuições de frequência de concentração de chumbo em sangue (PbS) dos camundongos expostos às soluções de 180 ppm em chumbo (Pb180) e 540 ppm em chumbo (Pb540) utilizados no estudo 1. Notar que os valores de PbS do grupo Pb540 foram bem superiores aos do grupo Pb180.

4.1.2. Campo Aberto

Em geral, a maioria da atividade no campo aberto ocorre na periferia (tabela 1). Em ambos os grupos (controle e exposto), a ambulação na periferia foi significativamente superior àquela no centro. Resultados similares foram encontrados quando os valores de ambulação foram divididos pelo número de retângulos correspondentes no centro e na periferia. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controle e exposto para quaisquer medidas de campo aberto (tabela 1).

Tabela 1: Locomoção na periferia (Pe) e no centro (C) do campo aberto

	Grupo Controle	Grupo Exposto
Pe	89,1 ± 8,1 ***	88,5 ± 5,4 ***
C	15,0 ± 2,9	17,0 ± 1,9
Pe/12	7,5 ± 0,7 ***	7,4 ± 0,4 ***
C/4	3,7 ± 0,7	4,3 ± 0,5
C/Pe	15,0 ± 2,6	17,6 ± 1,8
C+Pe	105,0 ± 10,2	105,7 ± 6,6

Valores são médias ± EPM. *** P<0,001 comparação centro vs. periferia

As ANOVAs realizadas para as medidas de campo aberto não revelaram qualquer efeito significativo para o Sexo e Tempo de exposição, assim como as interações envolvendo estes fatores.

Quando os animais expostos foram classificados pela intensidade de intoxicação, as ANOVAs não mostraram diferenças significativas entre os grupos Pb-S<40, Pb-S>60 e Controle (Figura 2). As ANOVAs não indicaram efeitos significativos do Sexo e duração da exposição, assim como interações entre estes fatores. As análises de regressão não revelaram qualquer relação significativa entre as medidas de campo aberto e os níveis de Pb-S e duração da exposição.

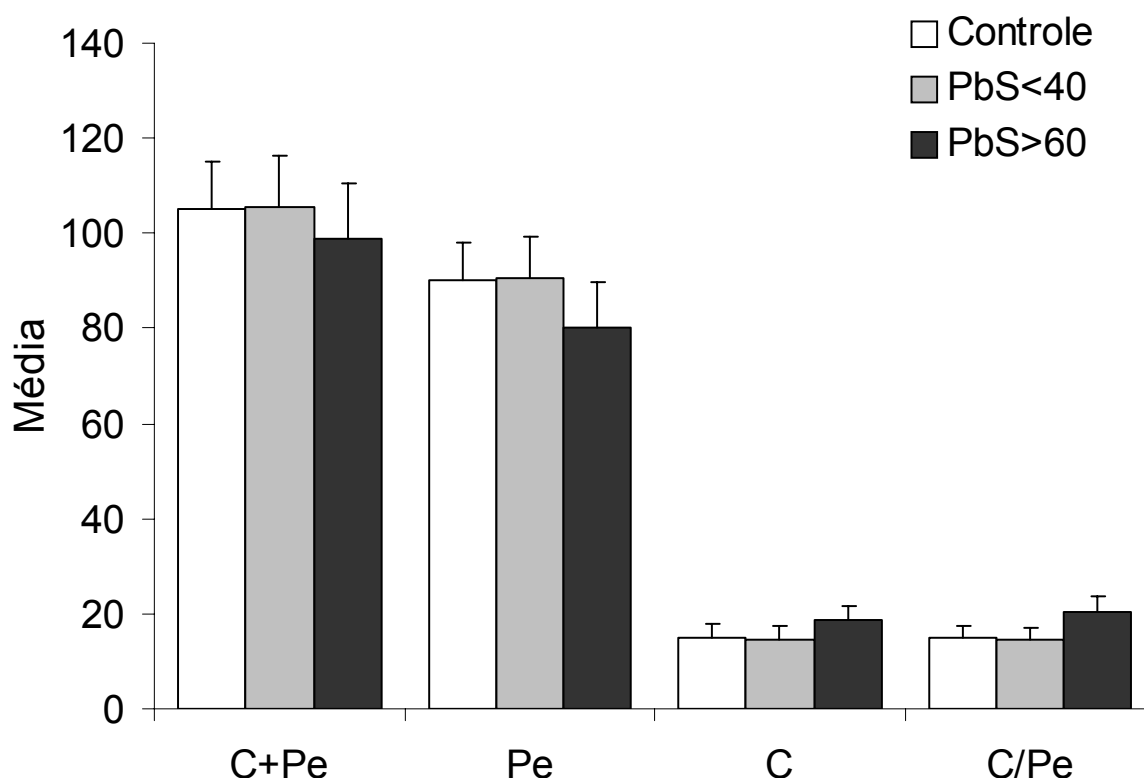


Figura 2. Médias das medidas de locomoção no centro (C) e na periferia (Pe) do campo aberto dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60). Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média.

4.1.3. Nado Livre

No teste de nado livre foram observadas diferenças significativas entre os Grupos Exposto e Controle (Tabela 2). Os camundongos expostos apresentaram maior número total de deslocamentos (NT) (Efeito do tratamento: $F = 7,5$, $df = 1,0$, $P = 0,008$), menor Alternância de Sentido (AS) (Efeito do tratamento: $F = 8,2$, $df = 1,0$, $P = 0,006$) e menor razão AS/NT (Efeito do tratamento: $F = 11,3$, $df = 1,0$, $P = 0,001$) do que os controles. Os tempos de imobilidade não diferiram entre o grupo Controle e o grupo total de animais expostos ao chumbo (Efeito do tratamento: $F = 0,2$, $df = 1$, $P = 0,88$). As ANOVAs realizadas para as medidas de nado livre não revelaram efeitos significativos do Sexo e Tempo de exposição, assim como interações envolvendo estes fatores.

Tabela 2: Locomoção no teste de nado livre

	Grupo Controle	Grupo Exposto
Total de deslocamentos (NT)	455,5 ± 33,2	565,5 ± 21,9 **
Alterações de sentido (AS)	36,0 ± 2,8	26,4 ± 1,8 **
AS/NT	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01 **
Tempo de imobilidade	33,3 ± 10,2	31,4 ± 6,7

Valores são médias ± EPM. ** P<0,01 comparação Controle vs. Exposto

As análises de regressão não revelaram qualquer relação significativa entre as medidas comportamentais (NT, AS, AS/NT e IMOB) e os níveis de Pb-S e tempo de exposição.

Em relação às análises classificando os animais do grupo exposto em função do Pb-S, ambos os grupos Pb-S <40 e Pb-S >60 apresentaram maior NT (Efeito do nível de intoxicação: F = 7.4, df = 2.0, P = 0.03), menor AS (Efeito do nível de intoxicação: F = 4.1, df = 2.0, P = 0.02) e menor AS/NT (Efeito do nível de intoxicação: F = 5.3, df = 2.0, P = 0.008) do que o grupo controle (Figura 3). Contudo, as análises post-hoc não apontaram diferença significativa entre os grupos Pb-S<40 e Pb-S>60, considerando NT, AS e AS/NT. Os tempos de imobilidade (figura 3D) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Controle e os grupos Pb-S<40 e Pb-S>60 (Efeito do nível de intoxicação: F = 0.03, df = 2.0, P = 0.97).

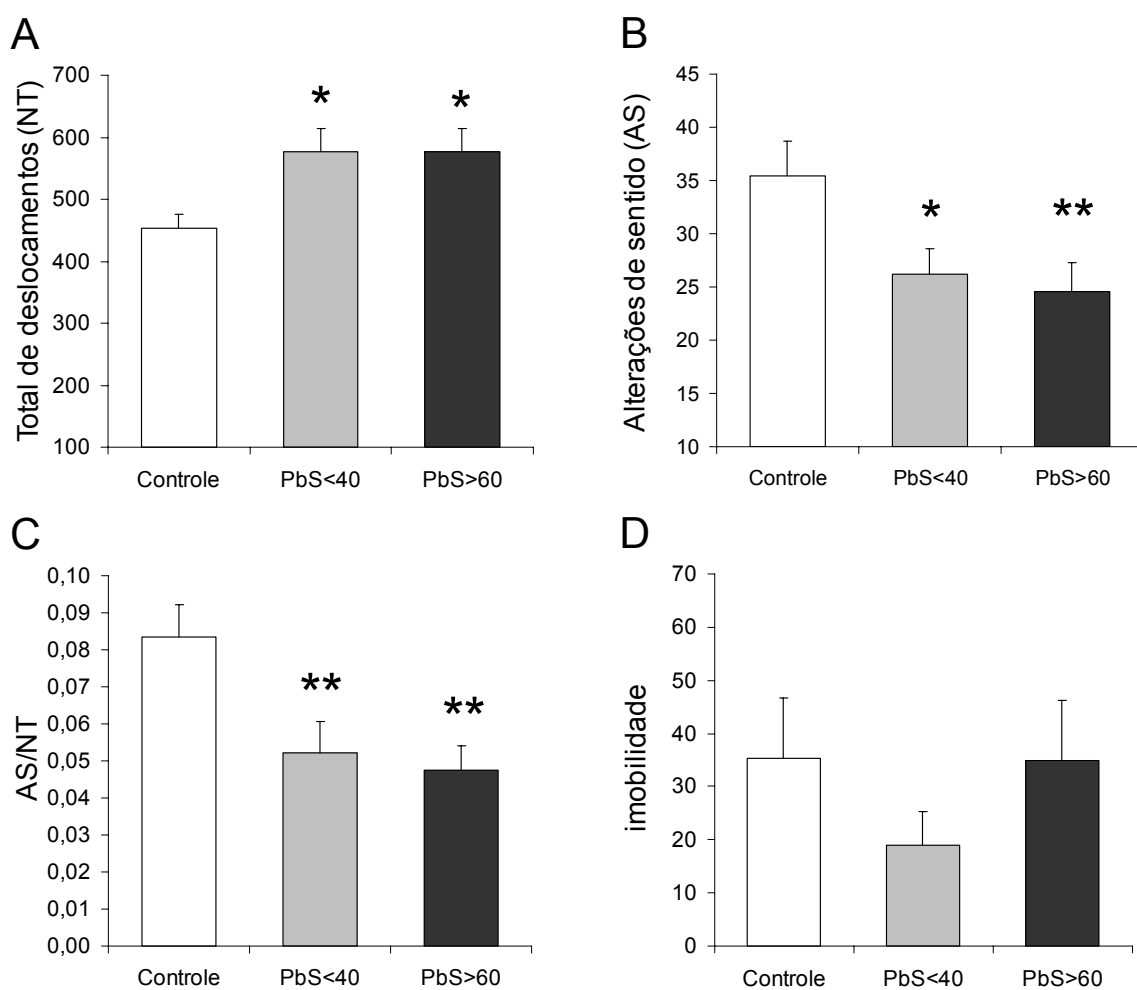


Figura 3. Médias das medidas de atividade natatória (A), alteração de sentido (B e C) e imobilidade (D) no teste de nado livre de camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60). Notar que os efeitos do chumbo foram independentes da dose de chumbo no sangue. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: comparações com o grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.1.4. Variabilidade relacionada ao sexo

A comparação das variâncias entre machos e fêmeas não revelou diferenças significativas tanto para o teste de campo aberto quanto para o nado livre (Tabela 3).

Tabela 3: Variâncias de machos e fêmeas

<i>Campo aberto</i>	Periferia (Pe)	Centro (C)	C+Pe	C/Pe
machos	1326,7	187,6	2253,9	157,2
fêmeas	1130,5	121,2	1664,4	123,5
<i>Nado livre</i>	Total de deslocamentos (NT)	Alterações de sentido (AS)	AS/NT	imobilidade
machos	22509,8	173,8	0,002	1893,1
fêmeas	22225,0	133,2	0,001	1770,8

4.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre.

4.2.1. Chumbo em sangue

No grupo controle, 66% dos camundongos (n=24) apresentaram Pb-S detectável, na faixa de 0.6 a 4.2 µg/dL (média = 1,3; SEM = 0,2). Conforme descrito no capítulo 1, o grupo Exposto apresentou uma grande variabilidade individual nas medidas de Pb-S (Figura 4). Apesar do fato de o grupo exposto à solução de 540ppm em chumbo apresentar Pb-S significativamente maior que o grupo exposto à solução de 180ppm em chumbo ($F = 176.2$, $df = 1$, $P < 0.001$), análises preliminares não mostraram qualquer diferença significativa entre estes grupos para medidas de comportamento obtidas nas 3 sessões de nado livre. Além disso, tanto Pb-S quanto o tempo de exposição não se relacionaram com qualquer medida de comportamento. Em consequência deste resultado, os grupos Pb180 e Pb540 foram compilados no grupo Exposto para a análise comportamental. A média de Pb-S do grupo exposto foi de 48,2 µg/dL (EPM = 5,7).

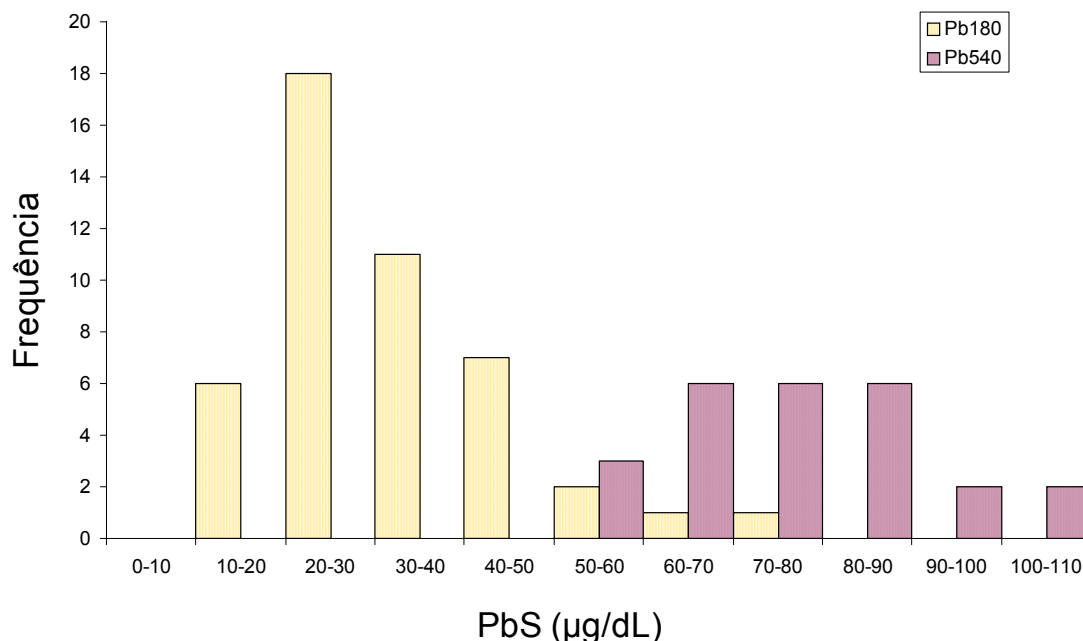


Figura 4. Histograma das distribuições de frequência de concentração de chumbo em sangue (PbS) dos camundongos expostos às soluções de 180 ppm em chumbo (Pb180) e 540 ppm em chumbo (Pb540) utilizados no estudo 2. Notar que os valores de PbS do grupo Pb540 foram bem superiores aos do grupo Pb180.

Vale mencionar ainda que os valores de Pb-S não diferiram entre o grupo de animais consistentemente lateralizados ($49,4 \pm 4,7 \mu\text{g/dL}$) e não consistentes ($47,4 \pm 3,9 \mu\text{g/dL}$).

4.2.2. Consistência da lateralidade

A exposição ao chumbo afetou a consistência da lateralidade de modo sexo-dependente (Tabela 4). Em relação aos machos, a proporção de animais consistentemente lateralizados e não consistentes diferiu significativamente entre o grupo exposto e o grupo controle ($\chi^2 = 4,36$; $P < 0,05$). Enquanto a maior parte dos machos do grupo exposto foi classificada como consistentemente lateralizada ($Z = 2,27$; $P < 0,05$), no grupo controle, a maior parte foi de não consistentes. Nas comparações envolvendo as fêmeas, a proporção de animais consistentes e não consistentes não diferiu significativamente entre os grupos controle e exposto ($\chi^2 = 0,85$; $P = 0,36$).

Tabela 4: Classificação dos animais em função da consistência da lateralidade

	Não consistentes x Consistentes	Levógiro x destrógiro
Machos		
Grupo controle	12 (60%) x 8 (40%)	5 (62%) x 3 (38%)
Grupo exposto	12 (32%) x 26 (68%) *	12 (46%) x 14 (54%)
Fêmeas		
Grupo controle	6 (37%) x 10 (63%)	6 (60%) x 4 (40%)
Grupo exposto	17 (52%) x 16 (48%)	7 (46%) x 9 (54%)

* $P < 0,05$, Z-binomial: não consistentes vs. consistentes.

Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo exposto e controle nas comparações envolvendo as proporções de animais consistentemente lateralizados para direita (destrógiros) e consistentemente lateralizados para esquerda (levógiros).

4.2.3. Análise dos índices de lateralidade

Em relação ao %LP (Figura 5A), houve um aumento significativo da magnitude da lateralidade da primeira para a segunda sessão experimental (Efeito da sessão experimental: $F = 6,62$; $gl = 2/198,10$; $p < 0,01$). Além disso, como indicado na Figura 5B, os animais consistentemente lateralizados apresentaram maior número de deslocamentos para o lado preferido que os animais não consistentes ao longo das três sessões (Efeito do LIS: $F = 18,62$; $gl = 1/99$; $p < 0,001$; Interação Sessão x LIS: $F = F = 3,43$; $gl = 2/199$; $p < 0,05$). Para %D, as ANOVAS não indicaram resultados significativos envolvendo o tratamento e a consistência da lateralidade.

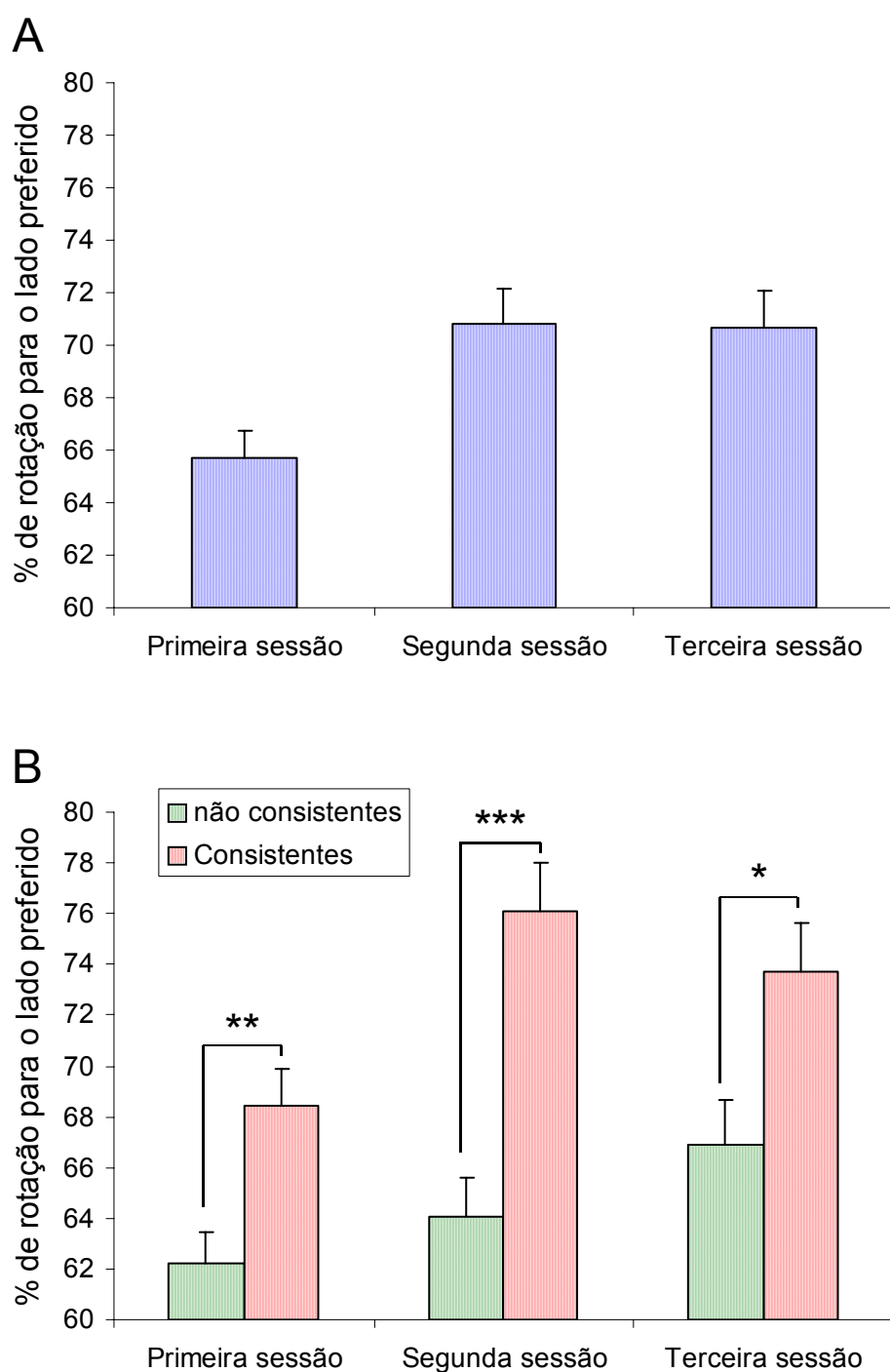


Figura 5. Médias do percentual de deslocamentos para o lado preferido dos camundongos utilizados no estudo 2. Para a amostra total (A) notar o aumento dos valores ao longo das sessões. quando os animais foram separados em função da consistência da lateralidade (B), notar que os consistentes apresentaram valores maiores que os não consistentes ao longo das três sessões. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média.

4.2.4. Efeitos da exposição ao chumbo no número total de deslocamentos (NT)

Para a variável NT (Figura 6A), houve marcante diminuição da atividade ao longo das sessões experimentais (efeito da sessão: $F = 137,53$; $gl = 1,77/175,09$; $p < 0,001$). Para ambos os grupos experimentais, a atividade na primeira sessão experimental foi significativamente maior que atividade na segunda (grupo controle: $t = 7,6$, $gl = 35$, $p < 0,001$; grupo exposto: $t = 8,4$, $gl = 70$, $p < 0,001$) e esta maior do que na terceira sessão (grupo controle: $t = 6,0$, $gl = 35$, $p < 0,001$; grupo exposto: $t = 6,8$, $gl = 70$, $p < 0,001$). Em todas as sessões experimentais, a atividade do grupo exposto foi significativamente maior que a do grupo controle, como mostrado na Figura 6B (efeito do tratamento: $F = 10,70$; $gl = 1/99$; $p = 0,001$).

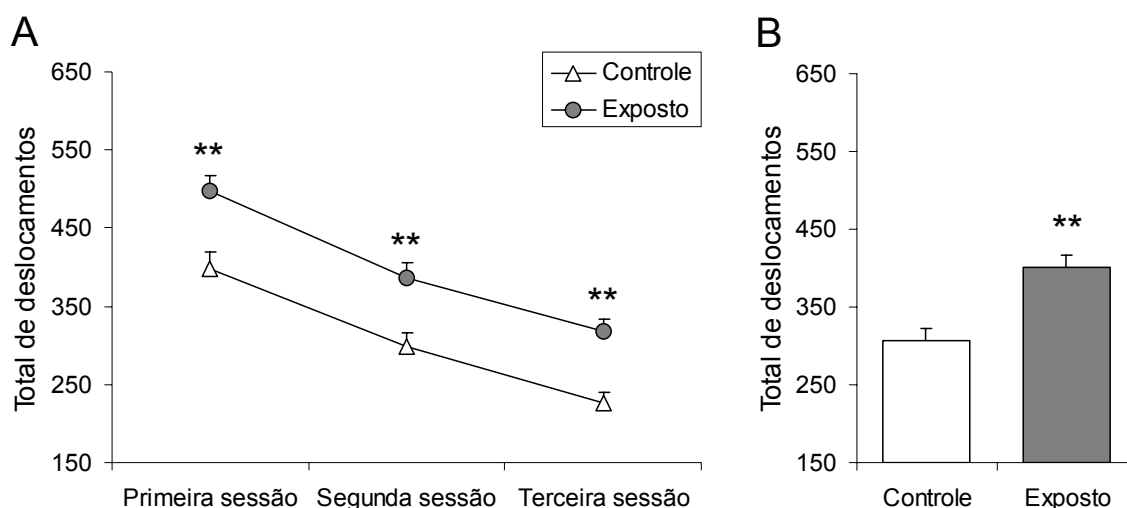


Figura 6. Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2. Notar que a atividade dos animais do grupo exposto foi sempre maior que a do grupo controle. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, ** $P < 0,01$.

Como indicado na Figura 7, a hiperatividade induzida pelo chumbo foi mais acentuada entre os animais não consistentes do que entre os animais consistentemente lateralizados (interação Tratamento \times LIS: $F = 3,45$; $gl = 1/99$; $p = 0,07$).

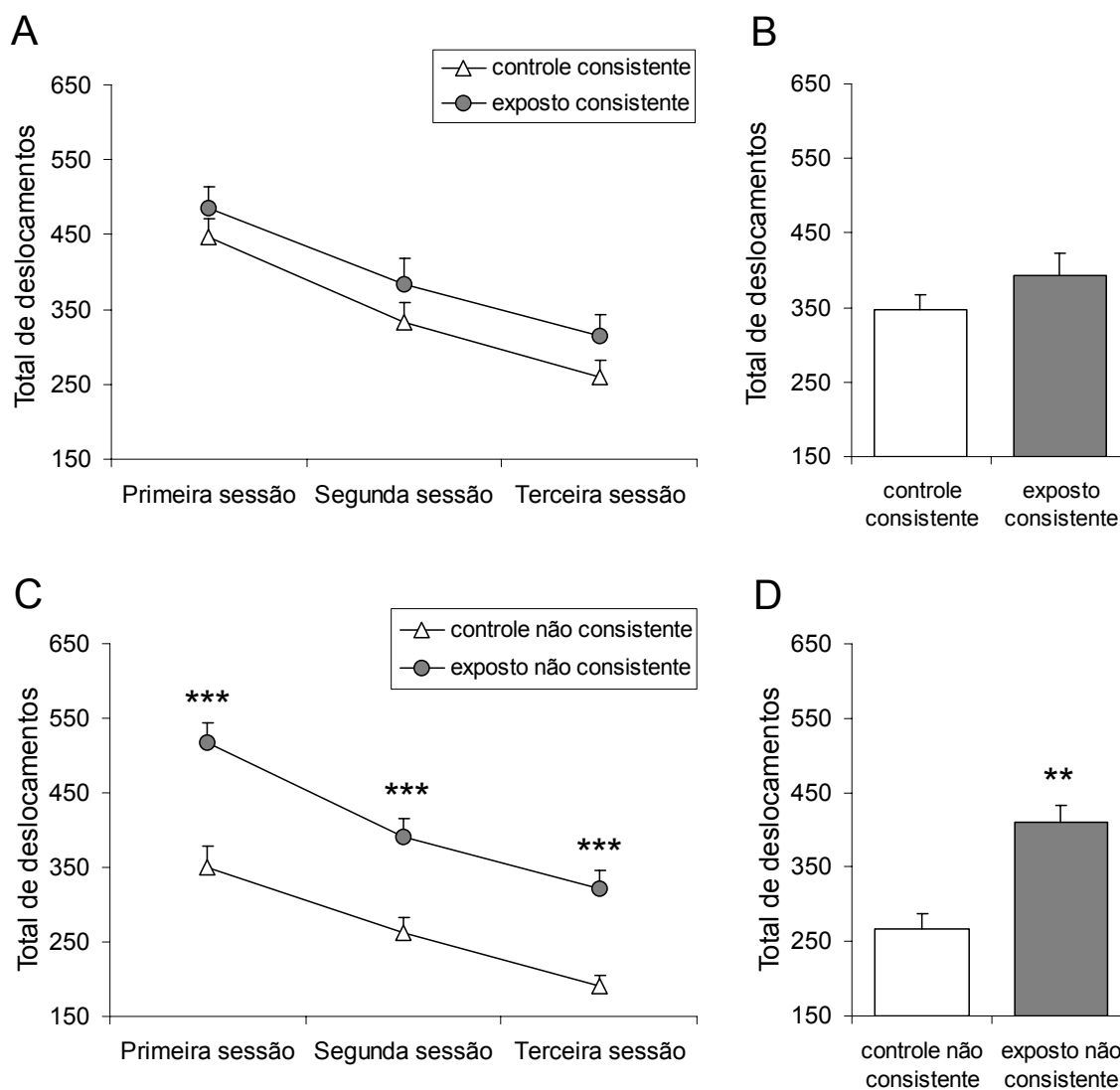


Figura 7. Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D). Notar que os efeitos do chumbo foram mais pronunciados nos animais não consistentes. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.5. Efeitos da exposição ao chumbo no número alterações de sentido (AS)

Para a variável AS (Figura 8), os dois grupos experimentais apresentaram marcante diminuição do número de alternâncias da primeira para a terceira sessão experimental (efeito da sessão: $F = 8,37$; $gl = 2/198$; $p < 0,001$). Embora o grupo exposto tenha apresentado valores de AS menores que o grupo controle nas três sessões experimentais, somente na primeira sessão esta diferença alcançou significância estatística ($F = 4,3$; $gl = 1/106$; $p = 0,04$). Esta diferença foi mais acentuada entre os animais não consistentes do que entre os animais consistentemente lateralizados Figura 9.

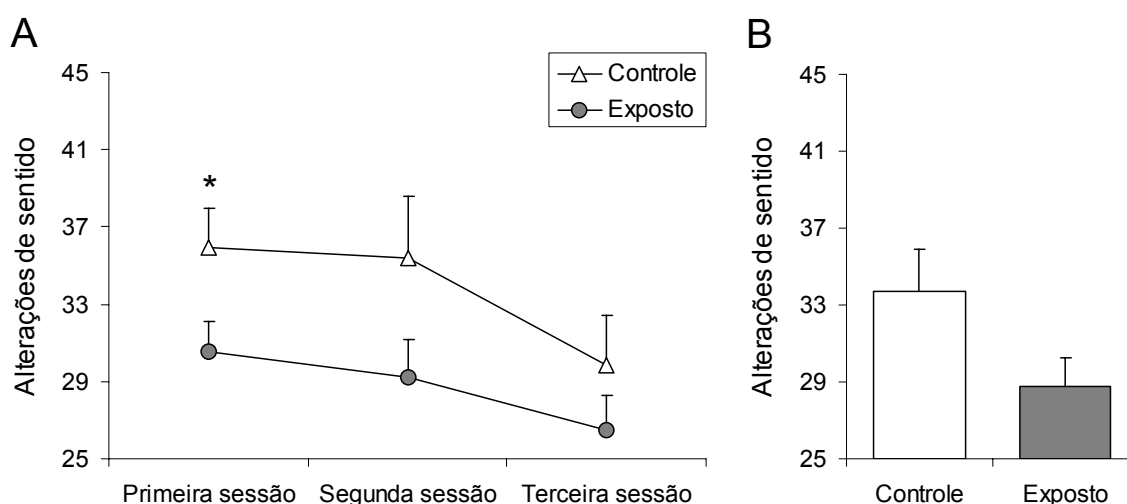


Figura 8. Médias do número de alterações de sentido para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2. Notar que os animais expostos ao chumbo alteraram menos o sentido de natação que os controles. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, * $P < 0,05$.

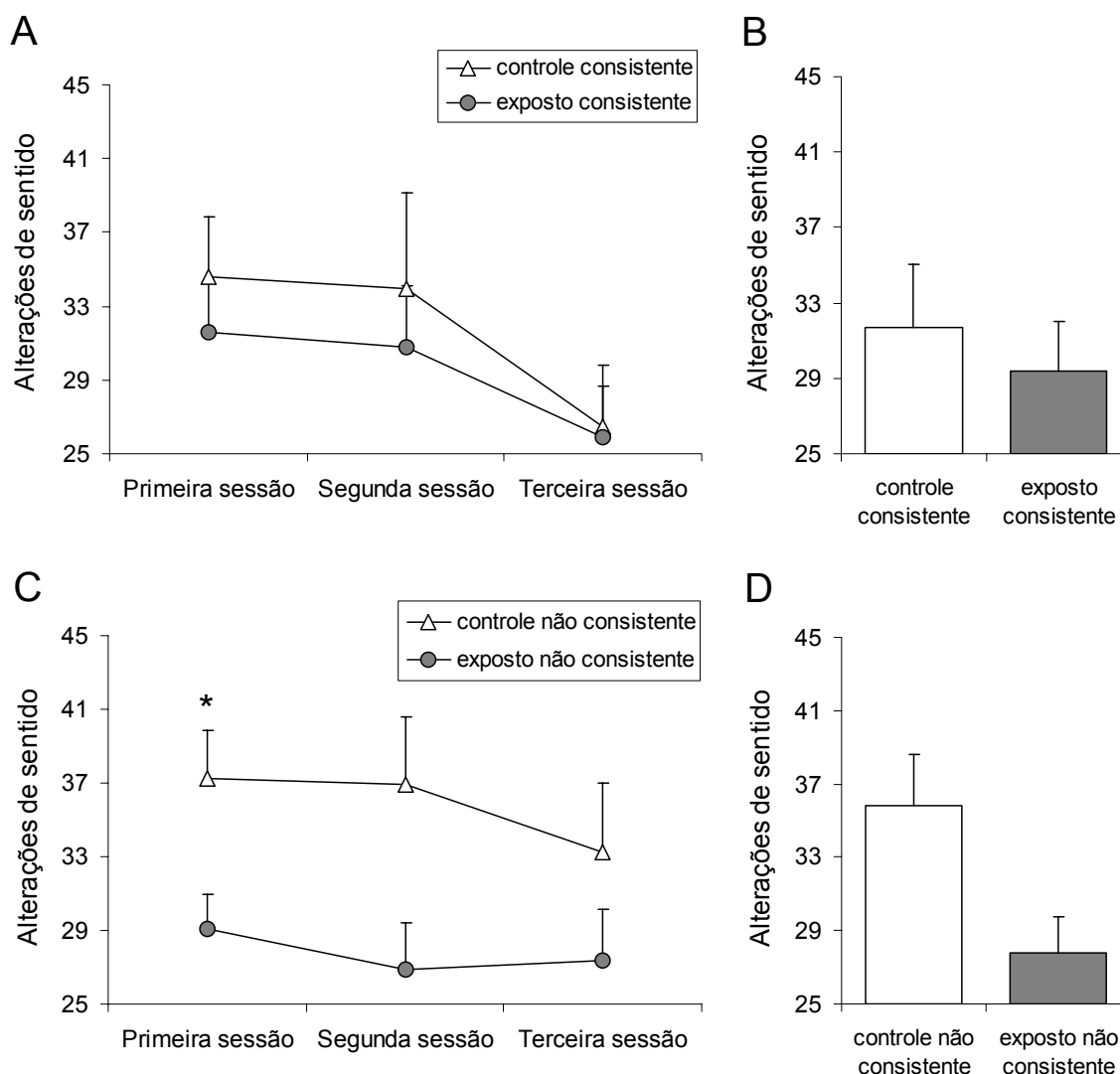


Figura 9. Médias do número de alterações de sentido para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos do grupo controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D). Notar que os efeitos do chumbo foram mais pronunciados nos animais não consistentes. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, * $P < 0,05$.

4.2.6. Efeitos da exposição ao chumbo para AS/NT

Para a variável AS/NT (Figura 10), os dois grupos experimentais apresentaram um aumento significativo da primeira para a segunda sessão experimental (efeito da sessão: $F = 22,27$; $gl = 2/198$; $p < 0,001$). Nas três sessões experimentais, os valores de AS/NT do grupo exposto foram significativamente menores que os do grupo controle (efeito do tratamento: $F = 8,50$; $gl = 1/99$; $p < 0,01$).

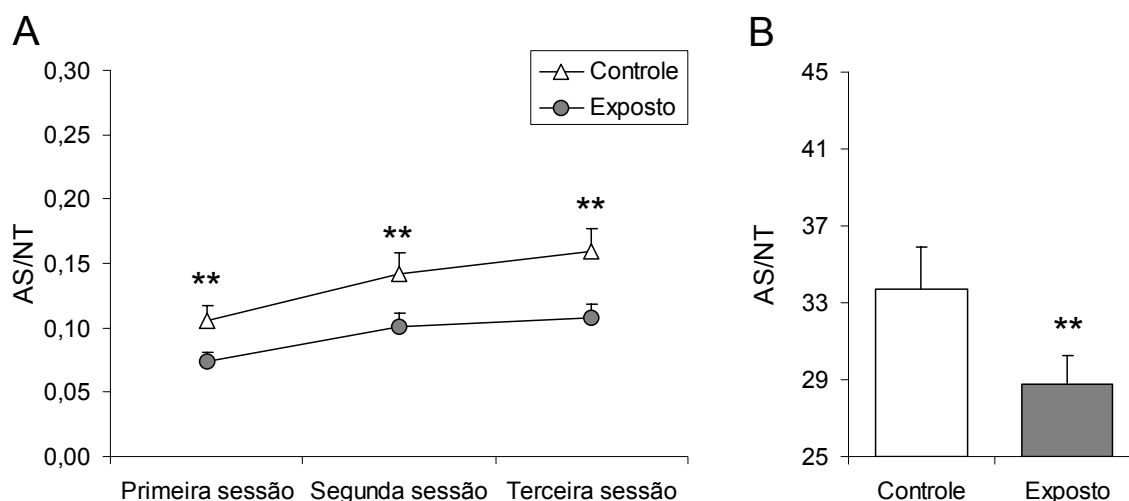


Figura 10. Médias da razão entre o número de alterações de sentido (AS) e o número total de deslocamentos (NT) para cada uma das três sessões (A) e compilados através das sessões (B) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo utilizados no estudo 2. Notar que os animais expostos ao chumbo alteraram menos o sentido de natação que os controles. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, ** $P < 0,01$.

De modo interessante, como evidenciado na Figura 11, o efeito do chumbo sobre a razão entre o número de alternâncias de sentido e a atividade natatória foi dependente da consistência da lateralidade (interação Tratamento \times LIS: $F = 8,90$; $gl = 1/99$; $p < 0,01$). Entre os animais classificados como não consistentes, os valores de AS/NT do grupo exposto foram significativamente menores que os do grupo controle nas três sessões experimentais. Em contraste, nos consistentemente lateralizados não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o exposto.

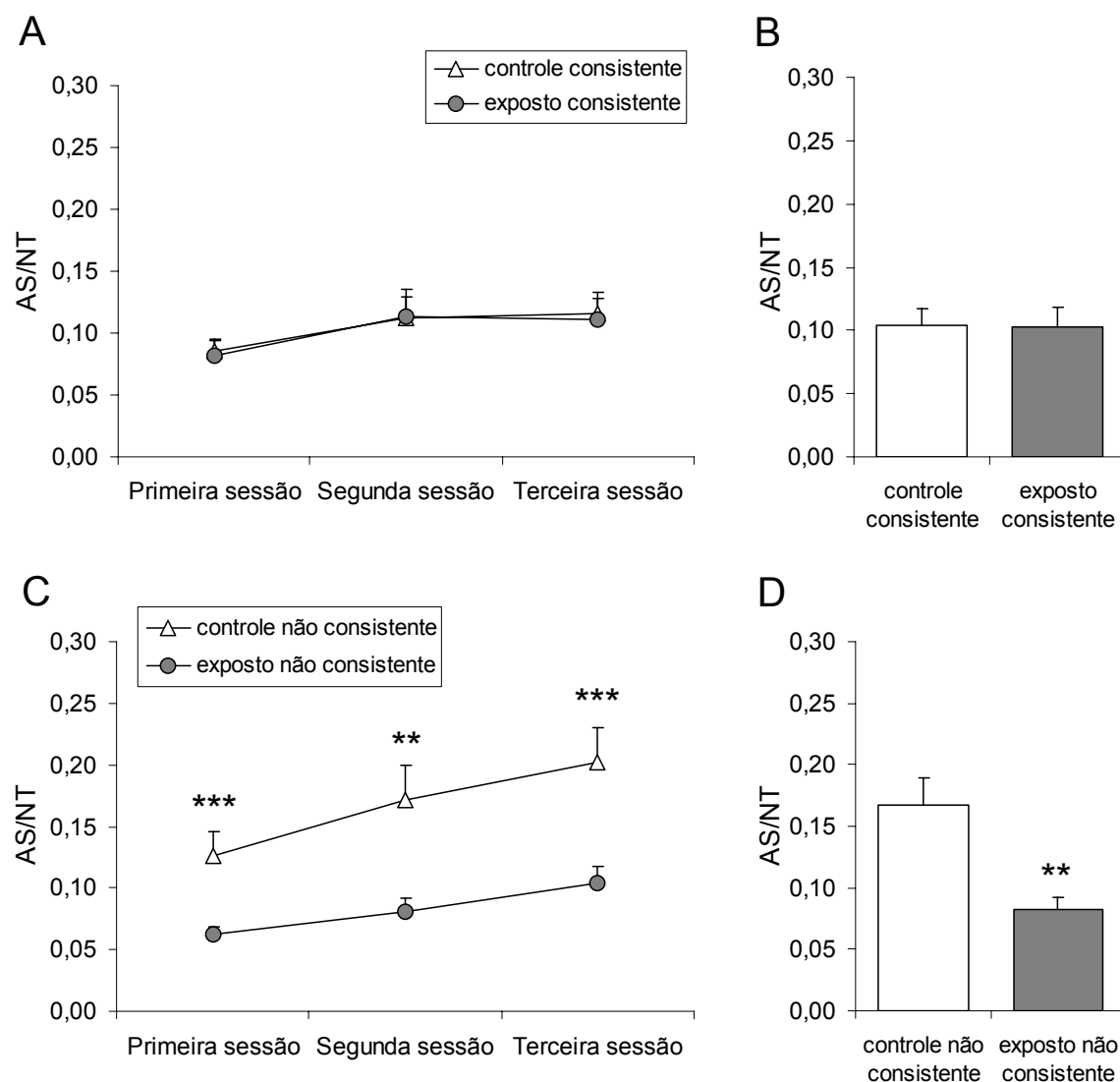


Figura 11. Médias da razão entre o número de alterações de sentido (AS) e o número total de deslocamentos (NT) para cada uma das três sessões (A e C) e compilados através das sessões (B e D) dos camundongos dos grupos controle e exposto ao chumbo classificados como consistentes (A e B) e não consistentes (C e D). Notar que os efeitos do chumbo foram evidentes no grupo de animais não consistentes. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: Grupo Controle vs. Grupo Exposto, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.7. Efeitos da intensidade da intoxicação com chumbo

Para NT, as ANOVAs indicaram um efeito significativo da intensidade da intoxicação ($F= 5,57$; $gl = 2/83$; $P < 0,01$). Este efeito pode ser explicado pelo fato que ambos os grupos expostos ($PbS<40$ e $PbS>60$) apresentaram uma atividade natatória maior que o grupo controle nas três sessões (Figura 12A). Para AS/NT, as ANOVAs indicaram um efeito significativo da intensidade da intoxicação ($F= 4,56$; $gl = 2/82$; $P < 0,05$). Este efeito pode ser explicado pelo fato que ambos os grupos expostos ($PbS<40$ e $PbS>60$), apresentaram uma redução das alterações de sentido corrigidas pela atividade natatória em relação ao grupo controle, nas três sessões (Figura 12B).

As ANOVAs conduzidas para NT também indicaram uma tendência à significância estatística na interação Intensidade da intoxicação \times LIS ($F = 2,68$; $gl = 2/82$; $P < 0,07$). Este resultado sugere que o efeito da intensidade da intoxicação foi mais acentuado no grupo de animais não consistentes (Figura 13). Entre os animais não consistentes, os animais do grupo controle tiveram uma atividade natatória significativamente menor que a dos grupos $PbS<40$ e $PbS>60$ nas três sessões experimentais. No grupo de animais consistentemente lateralizados, não foram observadas diferenças entre os controles e os expostos.

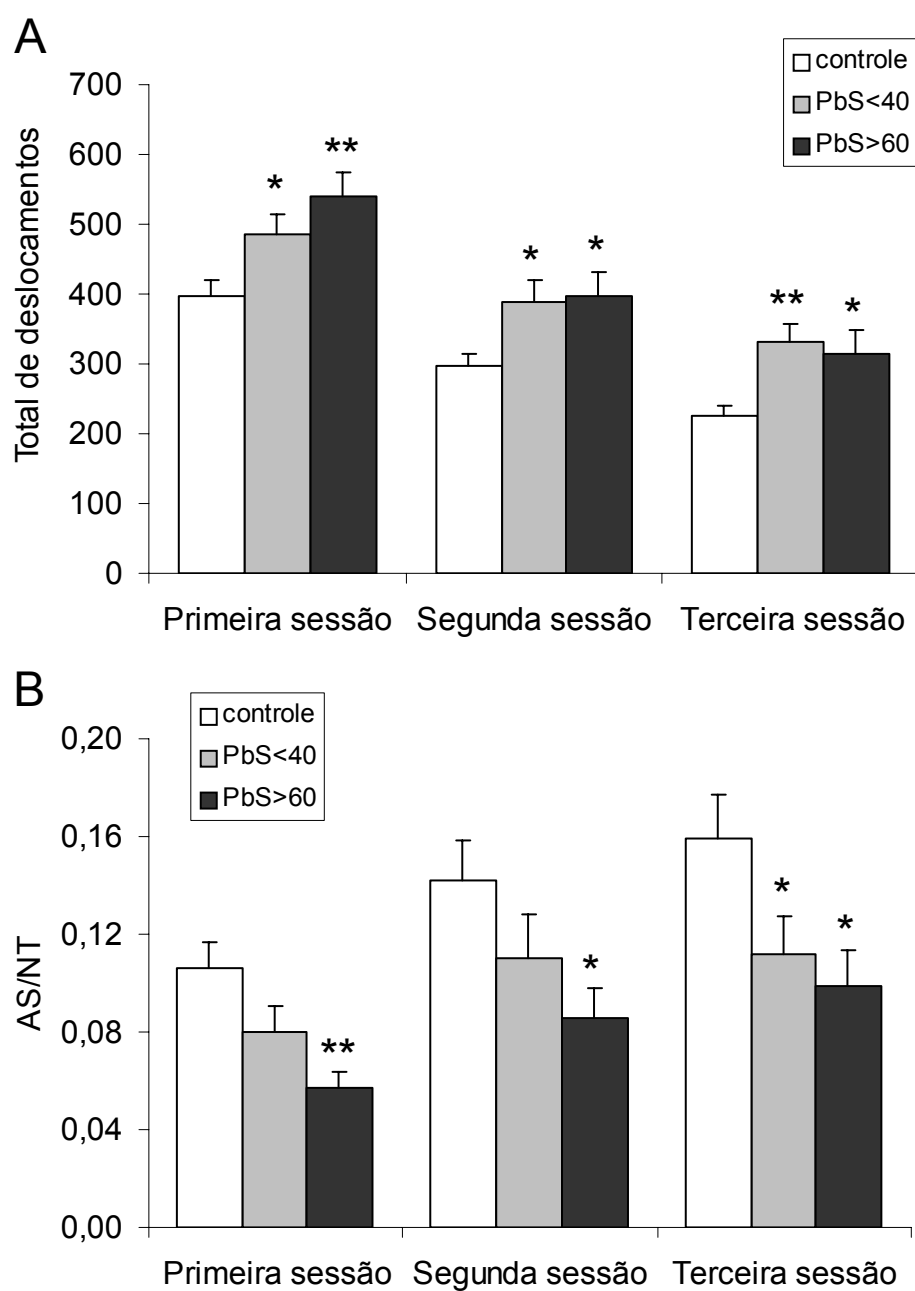


Figura 12. Médias do número total de deslocamentos (A) e da razão entre o número de alterações de sentido e o número total de deslocamentos (B) dos animais do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60) para cada uma das três sessões de nado livre. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: comparação com o grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

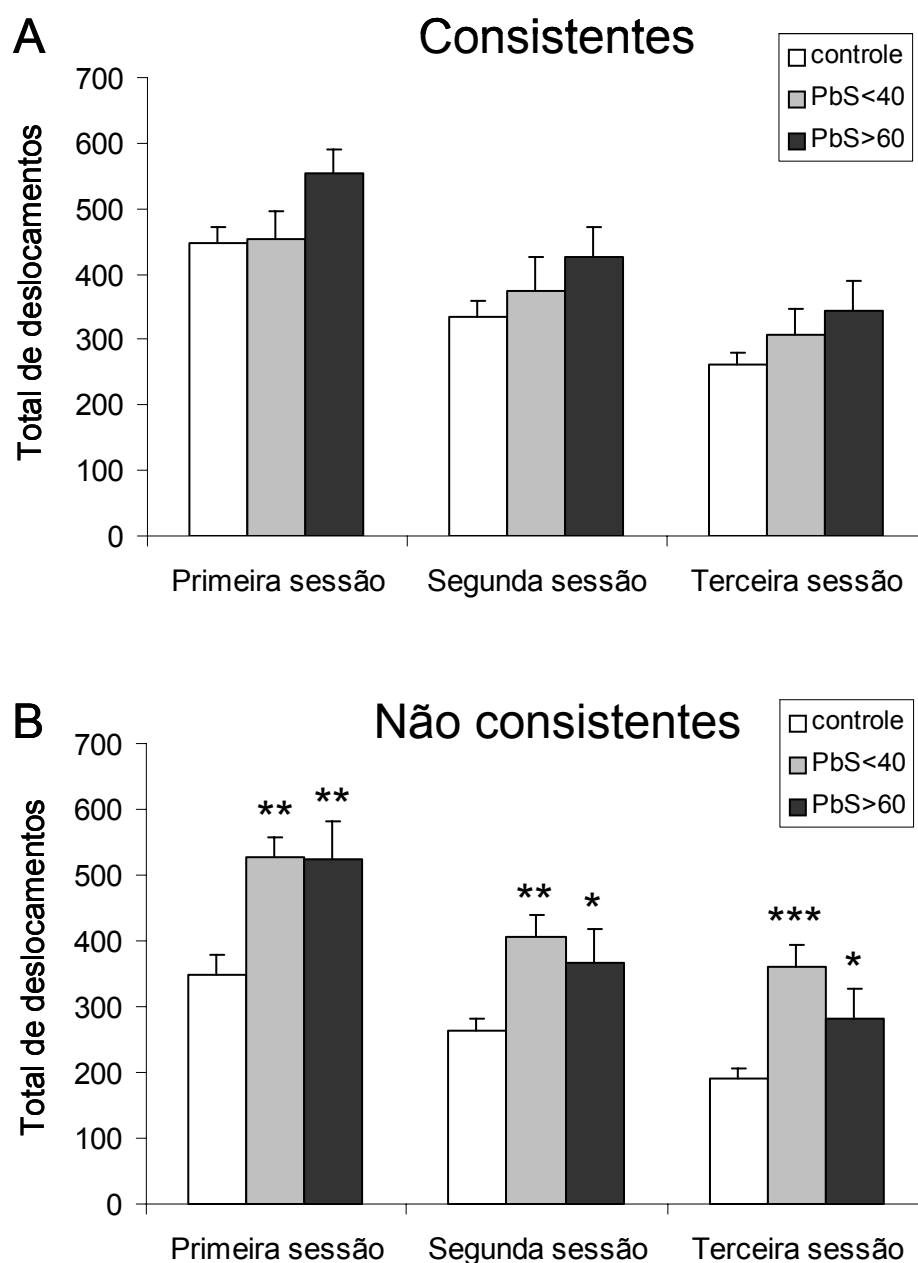


Figura 13. Médias do número total de deslocamentos para cada uma das três sessões de nado livre dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60) classificados como consistentes (A) e não consistentes (B). Notar que os efeitos do chumbo foram mais pronunciados nos animais não consistentes (B). Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: comparação com o grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

As ANOVAs conduzidas para AS/NT também indicaram interação significativa entre Intensidade da intoxicação e LIS ($F = 5,57$; $gl = 2/82$; $P < 0,01$). Este resultado sugere que o efeito da intensidade da intoxicação foi mais acentuado no grupo de animais não consistentes (Figura 14). Entre os animais não consistentes, os animais do grupo controle

tiveram valores de AS/NT maiores que o dos grupos PbS<40 e PbS>60 ao longo das três sessões experimentais. No grupo de animais consistentemente lateralizados, não foram observadas diferenças entre os controles e os expostos.

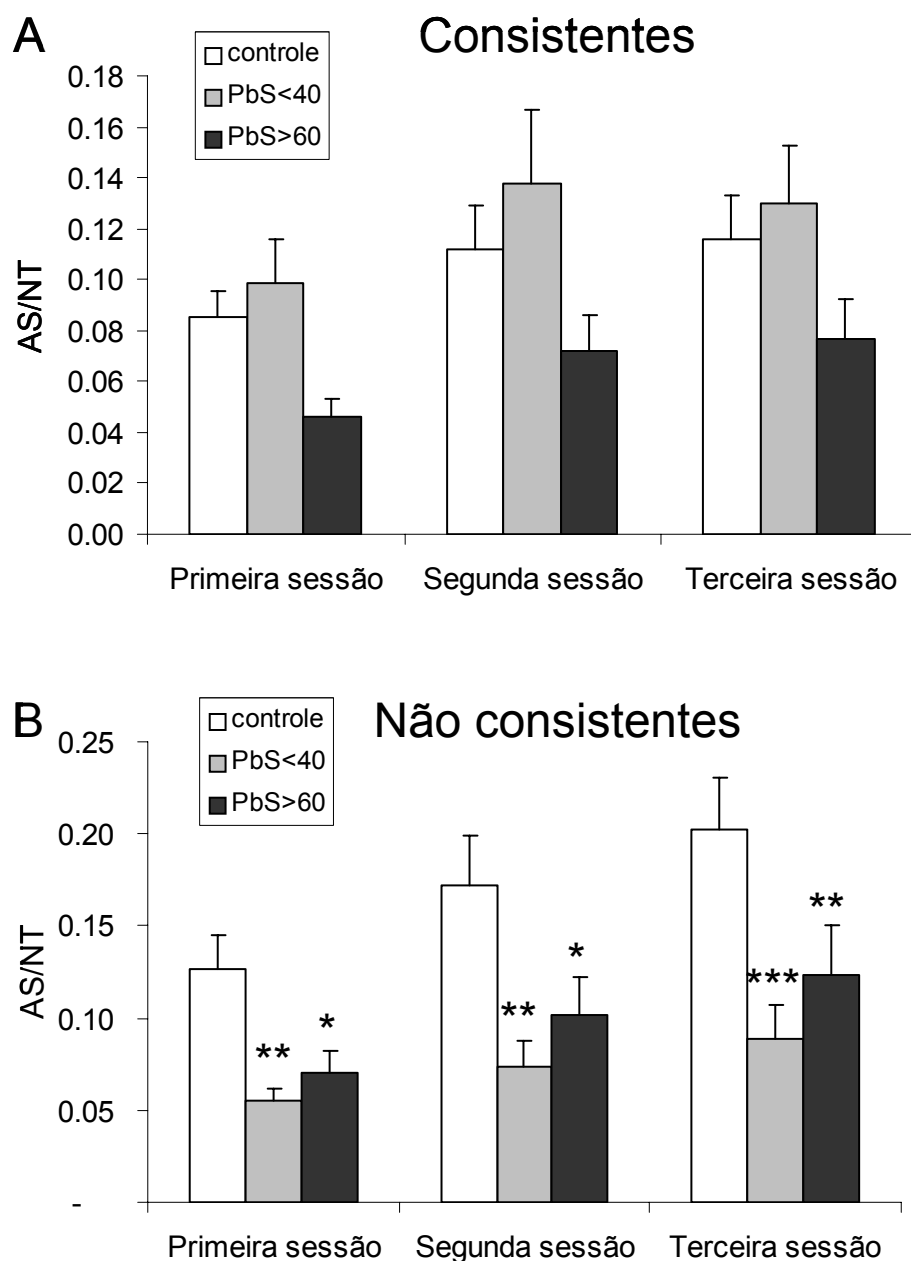


Figura 14. Médias da razão entre o número de alterações de sentido e o número total de deslocamentos (AS/NT) para cada uma das três sessões de nado livre dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60) classificados como consistentes (A) e não consistentes (B). Notar que os efeitos do chumbo foram mais pronunciados nos animais não consistentes. Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: comparação com o grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutathiona no cérebro de camundongos Suíços.

4.3.1. Chumbo em Sangue

Com relação ao Pb-S, as ANOVAs univariadas indicaram um efeito do tratamento altamente significativo ($F = 242,7$; $df = 3/44$; $P < 0,001$). As análises *post hoc* indicaram que todos os grupos diferiram significativamente entre si (Figura 15).

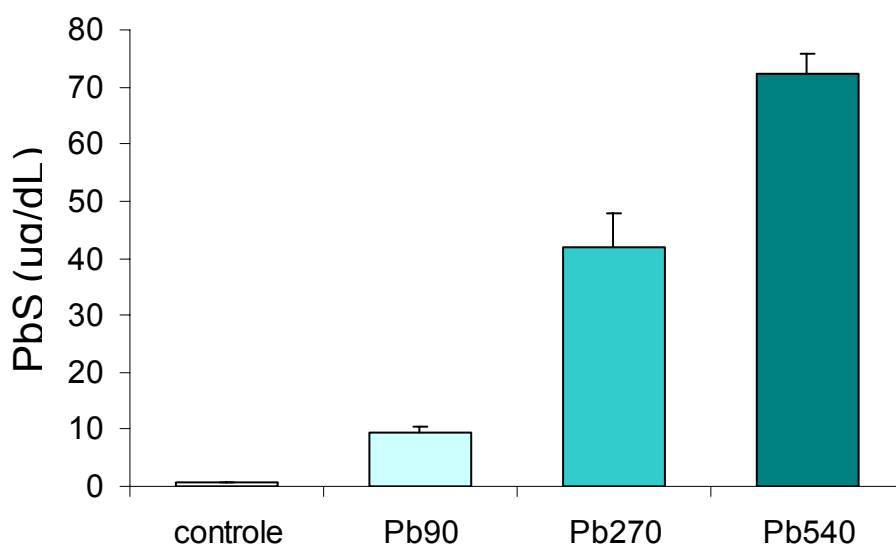


Figura 15. Médias de chumbo em sangue (PbS) dos grupos controle, exposto a 90 ppm em chumbo (Pb90), exposto a 270 ppm em chumbo (Pb270) e exposto a 540 ppm em chumbo (Pb540). Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média.

4.3.2. Glutathiona no cérebro

Quando os animais foram classificados pela solução a qual foram expostos, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Expostos e o Controle para as variáveis glutathiona total e para GSH. Entretanto, houve efeito significativo do tratamento para as variáveis GSSG ($F = 11,7$, $df = 3/45$, $P < 0,001$) e %GSSG ($F = 11,8$, $df = 3/45$, $P < 0,001$). Em relação a estas duas variáveis, os grupos Pb270ppm e Pb540ppm apresentaram valores significativamente maiores em relação ao controle e ao grupo

Pb90ppm, sendo que este último grupo não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura16).

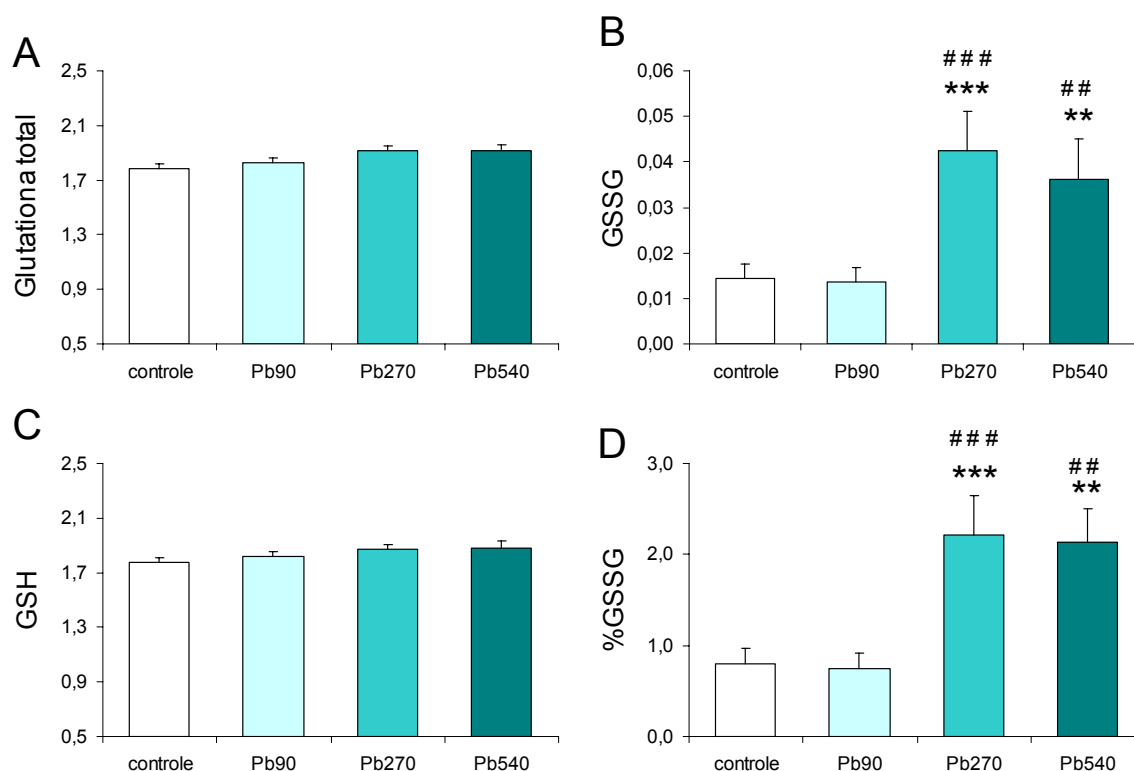


Figura 16. Médias de glutathiona total (A), glutathiona oxidada (B), glutathiona reduzida (C) e percentual de glutathiona oxidada (D) em relação à glutathiona total dos grupos controle, exposto a 90 ppm em chumbo (Pb90), exposto a 270 ppm em chumbo (Pb270) e exposto a 540 ppm em chumbo (Pb540). Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. Teste FLSD: comparação com o grupo controle, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; comparação com o grupo Pb90, # $P < 0,01$; ### $P < 0,001$.

Quando os animais do grupo exposto foram classificados em função do nível de intoxicação, as ANOVAs indicaram efeitos significativos do tratamento para glutathiona total ($F = 4,7$, $df = 2/26$, $P = 0,02$), GSSG ($F = 6,9$, $df = 2/26$, $P = 0,005$) e %GSSG ($F = 8,6$, $df = 2/26$, $P = 0,002$). Para a glutathiona total (Figura 17A), o grupo Pb-S>60 apresentou aumento significativo em relação ao controle ($P = 0,003$). Para GSSG e %GSSG (Figuras 17B e 17D), o grupo Pb-S>60 apresentou aumento significativo em relação ao controle e ao grupo Pb-S<40. Para nenhuma variável houve diferença significativa entre o grupo Pb-S<40 e o controle. Para GSH as ANOVAs não indicaram diferenças significativas entre os grupos (Figura17C).

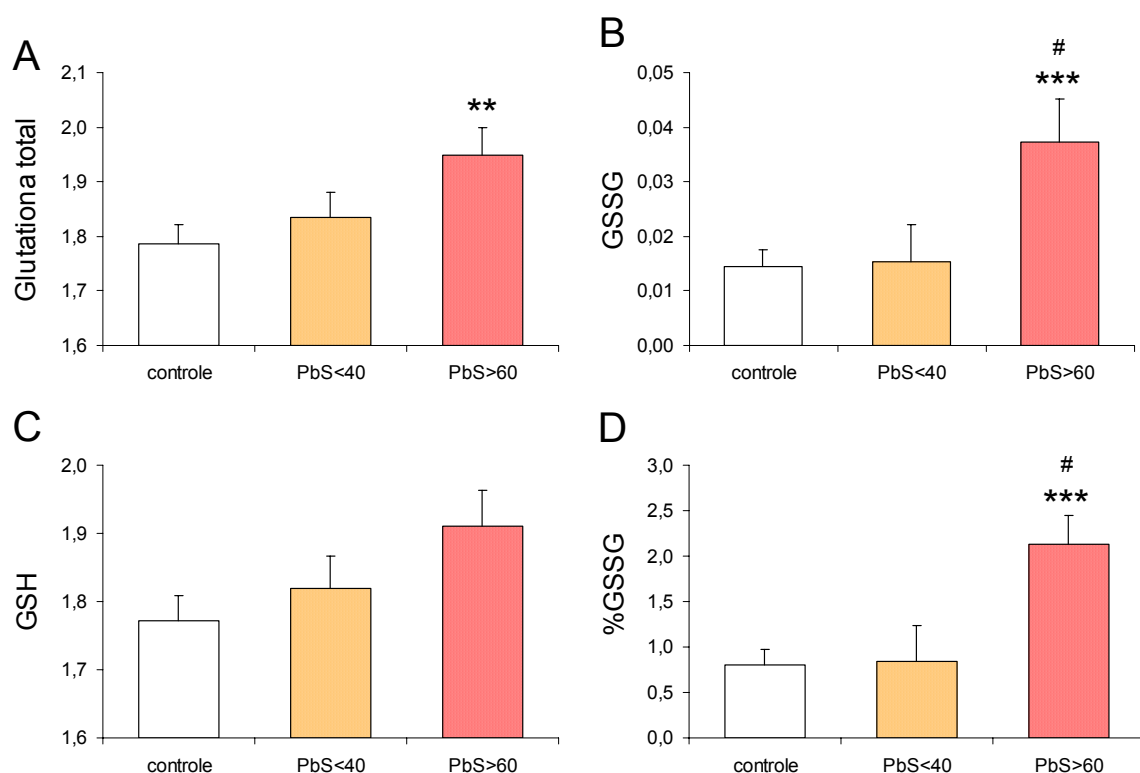


Figura 17. Médias de glutathiona total (A), glutathiona oxidada (B), glutathiona reduzida (C) e percentual de glutathiona oxidada (D) em relação à glutathiona total dos camundongos do grupo controle e dos grupos expostos ao chumbo com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$ (PbS<40) e superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (PbS>60). Linhas verticais representam 1/2 erro padrão da média. FLSD: comparação com o grupo controle, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; comparação com o grupo PbS<40, # $P < 0,05$.

A análise de correlação de Pearson (bicaudal) entre os níveis de Pb-S e as variáveis glutathiona total, GSH, GSSG e %GSSG mostrou-se significativa para todas as variáveis ($p < 0,05$), mas o nível de correlação foi maior para a glutathiona oxidada com $R = 0,57$ ($p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos Suíços em testes de campo aberto e de nado livre.

5.1.1. Resumo dos resultados do estudo 1.

No primeiro estudo avaliamos os efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a atividade locomotora de camundongos adultos nos testes de campo aberto e de nado livre. Resumidamente, enquanto no campo aberto não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo exposto e o grupo controle, no teste de nado livre os animais expostos ao chumbo apresentaram maior atividade natatória que o grupo controle. O tempo de imobilidade no nado livre não foi afetado pelo tratamento com o chumbo. Para ambos os testes, as medidas de locomoção não se relacionaram com os níveis de Pb-S e nem com a duração da exposição.

5.1.2. Ausência de diferenças entre os animais expostos ao chumbo e seus respectivos controles na atividade locomotora no teste de campo aberto.

Em relação à medida da atividade locomotora no teste de campo aberto, a ausência de diferenças entre os animais do grupo exposto e controle está em acordo com uma série de outros estudos, em que a exposição ao chumbo ocorreu durante a adolescência ou idade adulta.(Correa et al. 1999;Nieto-Fernandez et al. 2006;Rice 1996b;Salinas e Huff 2002). Em contrapartida, alguns estudos demonstraram que roedores expostos ao chumbo durante a gestação e lactação, normalmente apresentaram hiperatividade (Moreira et al. 2001; Rodrigues et al. 1996;Silbergeld e Goldberg, 1974 a,b;Trombini et al., 2001). Resultados semelhantes têm sido descritos em humanos expostos ao chumbo durante a infância (Bellinger 2008,Nigg, 2008). Estes dados reforçam a idéia de que, durante o desenvolvimento inicial, o sistema nervoso é mais susceptível às ações deletérias do chumbo (Costa et al. 2004;Lidsky e Schneider, 2003). Em acordo com esta idéia, o chumbo é capaz de interferir em uma série de eventos do desenvolvimento neural como,

diferenciação neuronal, sinaptogênese, formação da mielina e morte programada (Costa et al. 2004; Lidsky e Schneider, 2003). Além disso, a taxa de absorção gastrointestinal do chumbo em crianças é maior do que em adultos (Aykin-Burns et al. 2003).

Apesar do fato de que a exposição precoce ao chumbo promova danos severos sobre o desenvolvimento subsequente do sistema nervoso, deve-se ter cautela antes de generalizar que os riscos da exposição ao chumbo durante a vida adulta são pequenos. Vale a pena ressaltar que a toxicidade do chumbo, geralmente atribuída a sua habilidade de ligar-se a biomoléculas, de substituir cátions e induzir estresse oxidativo (Ahamed e Siddiqui, 2007; Garza et al. 2006; Hsu e Guo, 2002; Lidsky e Schneider 2003), tem o potencial de interferir com a função das células nervosas independentemente da idade do sujeito. Em acordo com esta idéia, um número crescente de estudos tem demonstrado que a exposição cumulativa ao chumbo durante a idade adulta também promove alterações neurocomportamentais (Kosnett et al. 2007; Murata et al. 2008; Shih et al. 2006; 2007). Em particular, déficits cognitivos e motores vêm sendo amplamente descritos em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo (Bleecker et al. 2003; Milanov e Kolev 2001; Shih et al. 2007). De modo interessante, a análise da atividade locomotora no teste de nado livre revelou uma marcante diferença entre os animais do grupo exposto e do grupo controle. Os animais expostos ao chumbo apresentaram maior atividade natatória que os do grupo controle.

5.1.3. Aumento da atividade locomotora e diminuição do número de alterações de sentido do grupo exposto ao chumbo no teste de nado livre.

Enquanto no teste de campo aberto os animais passam boa parte do tempo sobre os retângulos situados nas quinas do recipiente do teste (Ennaceur et al., 2009), durante a sessão de nado livre, o comportamento dos camundongos é caracterizado pelo nado vigoroso ao longo de toda a extensão da borda do recipiente, acompanhado pela tentativa de escalar a parede do recipiente (Krahe et al. 2001; Schmidt et al. 1999). Em camundongos normais, este comportamento voltado para o escape randomiza o sentido dos deslocamentos angulares, resultando em um grande número de alternâncias de sentido (Krahe et al., 2001; Filgueiras e Manhães, 2004; 2005; Manhães et al. 2007; Schmidt et al. 1999; West et al. 1986).

Esta condição aversiva do teste de nado livre é uma característica importante para o estudo dos efeitos da exposição ao chumbo. De modo geral é bem aceita a idéia que o estresse exacerba a toxicidade de muitas substâncias (Hougaard e Hansen 2007; Relyea e Mills 2001), inclusive do chumbo (Bellinger 2008; Glass et al. 2009). Em humanos, a exposição simultânea a altos níveis de estresse ambiental e ao chumbo, ao longo da vida, têm sido usada para explicar o fato de que os efeitos deletérios da exposição ao chumbo sejam mais pronunciados em populações com baixo nível sócio econômico (Cory-Slechta et al. 2008; Glass et al. 2009; White et al. 2007). Em ratos, o estresse agudo induzido pela novidade, contenção ou frio tem se mostrado capaz de influenciar o desempenho dos animais em testes de reforço com esquema de intervalo fixo (Virgolini et al. 2005; Virgolini et al. 2006). Desta forma, é possível especular que a prevalência de resultados não significativos no teste de campo aberto, envolvendo a exposição ao chumbo durante a adolescência e idade adulta, deve-se ao fato de que este teste, quando comparado àquele do nado livre, não oferece um ambiente tão aversivo.

Alguns autores têm sugerido que a influência do estresse na neurotoxicidade do chumbo pode ser explicada, em grande parte, pelos efeitos prejudiciais do chumbo na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema dopaminérgico (Virgolini et al. 2005; Virgolini et al. 2006; Virgolini et al. 2008a; Virgolini et al. 2008b; White et al. 2007).. Vale mencionar que a liberação de glicocorticóides e a transmissão dopaminérgica atuam na regulação das funções neuroendócrinas, da atividade locomotora e das emoções (Fietta and Fietta 2007; Metz 2007; Pani et al. 2000; Rodrigues et al. 2009; Scornaiencki et al. 2009) e, portanto, tem um papel fundamental na modulação da resposta ao estresse.

A exposição ao chumbo é capaz de afetar a resposta ao estresse, especialmente por aumentar a responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Servatius et al. 1994; Virgolini et al. 2005). A exposição ao frio promove um aumento em torno de 75% nos níveis de corticosterona em ratos expostos do desmame a vida adulta a uma solução de 150 ppm em chumbo e não afeta os níveis desse hormônio nos ratos controle (Virgolini et al. 2005). Em testes de nado livre, uma significativa redução da temperatura corporal (de 37,5 para 31 °C) tem sido descrita em camundongos submetidos a sessões de 6 minutos com a água a temperatura de 23 °C (Thierry et al. 1986). Embora neste estudo não tenhamos avaliado os níveis de corticosterona, é razoável supor que os animais tratados

com chumbo apresentem um aumento significativo dos níveis de corticosterona quando submetidos ao teste de nado livre.

O sistema dopaminérgico também é afetado de modo marcante pela exposição ao chumbo (Cory-Slechta 1995;Gedeon et al. 2001;Ma et al. 1999;Tavakoli-Nezhad et al. 2001). Após o desmame, a exposição crônica a baixos níveis de chumbo promove um declínio significativo da função dopaminérgica no núcleo acumbente de ratos (Gedeon et al. 2001). De modo semelhante, a exposição subcrônica ao chumbo (250 ppm e 500 ppm em chumbo), provocou uma redução marcante no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos, tanto na substância negra como na área do tegumento ventral (Tavakoli-Nezhad et al. 2001). Durante o estresse, a liberação de dopamina do sistema mesocortical pode agir de forma compensatória ou adaptativa, como resposta de *feedback* negativo, prevenindo a atividade excessiva do eixo HPA (Sullivan and Dufresne 2006). De particular interesse para este estudo, alguns autores sugerem que a depleção dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal é responsável pelo aumento da reatividade ao estresse observado em algumas desordens neurocomportamentais como a esquizofrenia (Scornaiencki et al. 2009). Além disso, a redução da atividade dopaminérgica responde, em grande parte, pela hiperatividade locomotora observadas em roedores (Kabuki et al. 2008) e humanos (Gilden e Marusich 2009) e, talvez, contribua para os problemas de atenção observados em crianças expostas ao chumbo (Ma et al. 1999;Russell, 2002;Sagvolden et al. 2005).

Desta forma, considerando que o chumbo é capaz de comprometer a função dos principais sistemas controladores da resposta ao estresse, é razoável supor que as diferenças nos resultados entre os grupos expostos ao chumbo e controle no teste de nado livre possam estar associadas com uma resposta inadequada à situação aversiva. Neste sentido, a hiperatividade locomotora e o menor número de alterações de sentido observados nos animais intoxicados pelo chumbo, podem refletir um comportamento estereotipado. De acordo com esta idéia, a perseveração tem sido descrita como uma consequência da intoxicação pelo chumbo em humanos e roedores (Rice 1996a). De fato, a dificuldade dos animais desengajarem um comportamento, pode levar a uma redução das alternâncias de sentido que, por sua vez, proporcionaria um aumento do número de deslocamentos realizados durante a sessão.

5.1.4. Imobilidade.

Em camundongos, a medida de imobilidade no teste de nado forçado (teste de Porsolt) tem sido extensivamente utilizada para avaliar os efeitos da exposição ao chumbo do desmame a vida adulta (Mantovani et al., 1999; Soeiro et al, 2007; Stewart et al., 1995; 1996). Particularmente, uma redução significativa do tempo de imobilidade tem sido descrita nos animais expostos ao chumbo sendo este efeito interpretado como um efeito antidepressivo do chumbo (Mantovani et al., 1999; Soeiro et al, 2007; Stewart et al., 1995; 1996). Em contraste, no nosso estudo, o tempo de imobilidade não diferiu entre os animais expostos e os controles. Esta discrepância pode estar relacionada às diferenças entre o recipiente usado no teste de Porsolt e em nosso estudo. No recipiente geralmente utilizado no teste de Porsolt (altura do recipiente = 25cm, diâmetro = 10cm e a altura da coluna de água = 6cm) os camundongos têm dificuldade em nadar pela superfície e, portanto, ficam a maior parte do tempo com as patas posteriores apoiadas no fundo do recipiente. Em nosso teste, o recipiente é mais largo (diâmetro do recipiente = 21cm) e os animais não conseguem tocar o fundo (altura da coluna de água = 16cm). De modo interessante, foi demonstrado que quando os animais não conseguem tocar o fundo do recipiente, apresentam tempos de imobilidade menores do que em quando conseguem tocar o fundo (Borsini et al., 1986). Além disso, a atividade natatória e as tentativas de escalar a parede do recipiente são mais prováveis em águas mais profundas (Detke e Lucki 1996) e em recipientes maiores (Barros e Ferigolo 1998). Em acordo com esta idéia, enquanto os animais ficam imóveis entre 50% a 70% do tempo no teste de Porsolt (Barros e Ferigolo 1998; Mantovani et al. 1999; Soeiro et al. 2007; Stewart et al. 1995; 1996), no nosso paradigma, a imobilidade representa aproximadamente 10% da sessão experimental (Krahe et al. 2002; Filgueiras et al. 2006).

5.1.5. Efeito do sexo.

Em nosso estudo, os efeitos do chumbo relacionados às medidas de locomoção não se mostraram sexo-dependentes. Uma possibilidade para explicar a ausência de diferenças, estaria relacionada às flutuações nos níveis de hormônios ovarianos durante o ciclo estral, que poderiam aumentar a variabilidade dos dados nas fêmeas e mascarar os efeitos do chumbo. Neste caso, a variabilidade dos dados do grupo de fêmeas deveria ser

maior do que a observada no grupo de machos. Esta hipótese foi avaliada para os animais testados tanto no campo aberto quanto no nado livre, através do teste de Levene's para igualdade de variâncias. A comparação das variâncias entre machos e fêmeas, não revelou diferenças significativas tanto para o teste de campo aberto quanto para o nado livre. Além disso, um estudo realizado em nosso laboratório sugere que, em camundongos Suíços, o número total de deslocamentos não varia em função das fases do ciclo estral (Rebeca 1999).

5.1.6. PbS, tempo de exposição e atividade locomotora no teste de nado livre.

A exposição ou tratamento dos animais com solução de acetato de chumbo por via oral, através da água consumida pelos animais, é uma das formas de tratamento mais utilizadas para estudar em roedores os efeitos da exposição ao chumbo durante a vida adulta. Entretanto, a concentração da solução e a duração da exposição do animal durante a exposição variam muito entre os estudos. Adicionalmente, em alguns estudos não são medidos os níveis de chumbo no organismo. Estas diferenças metodológicas podem resultar na grande variabilidade dos resultados e, em alguns casos, explicar as contradições entre diferentes estudos. Sendo assim, decidimos expor os animais a duas concentrações de soluções de chumbo (180ppm e 540ppm em Pb^{2+}), por um período de exposição de 60 a 90 dias.

Apesar da grande variabilidade nos níveis de PbS, estes foram compatíveis com aqueles encontrados em exposições ocupacionais, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Ahamed e Siddiqui 2007a,b; Apostoli et al. 2002; Araujo et al. 1999; Blando et al. 2007; Kasperczyk et al. 2008; Paoliello e Capitani, 2007; Chen et al. 2005; Thanapop et al., 2007). Interessante que, as alterações comportamentais no teste de nado livre não se relacionaram com as doses de PbS e nem com a duração da exposição. Quando os resultados foram analisados de acordo com o nível de intoxicação, ($PbS < 40$ e $PbS > 60 \mu g/dL$), não observamos diferenças significativas das variáveis comportamentais entre estes grupos, porém ambos diferiram do grupo controle. Além disso, os modelos de regressão falharam em encontrar uma relação significativa entre as medidas de comportamento e os níveis de PbS. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que

no teste de nado livre, o limite de detecção das alterações na atividade locomotora induzidas pelo chumbo está em doses menores que 40 µg/dL.

Apesar do valor de 40 µg/dL corresponder ao recomendado pelas legislações americana e brasileira para o trabalhador retornar ao seu posto de trabalho (OSHA e MT), o valor limite de PbS para o início dos efeitos adversos causados pelo chumbo em adultos ainda é tema de discussão (Gilbert e Weiss 2006; Goodman et al. 2002; Shih et al. 2007). No Brasil e em outros países em desenvolvimento, as condições de trabalho em pequenas fábricas e reformadoras de baterias e o status socioeconômico dos trabalhadores, os mantêm sobre constante estresse e expostos diariamente a doses elevadas de chumbo, tornando difícil prever a influência do estresse sobre os danos promovidos pelo chumbo no sistema nervoso. Adicionalmente, considerando que as alterações do chumbo sobre as vias dopaminérgicas estão associadas a diversos distúrbios comportamentais, tais como, hiperatividade, déficits de atenção e de aprendizado/memória, pode ser que, mesmo em doses de Pb-S menores do que 40 µg/dL, possam ocorrer efeitos comportamentais nestes trabalhadores. Considerando o caráter aversivo do teste de nado livre, este modelo pode ser interessante para avaliar a relação entre estresse ambiental e a toxicidade do chumbo, especialmente em baixos níveis de intoxicação.

5.2. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo considerando a lateralidade comportamental de camundongos Suíços medida em teste de nado livre.

5.2.1. Resumo dos resultados do estudo 2.

No segundo estudo, utilizamos o teste de nado livre para avaliar se exposição ao chumbo da adolescência à vida adulta afeta a lateralidade rotacional e se os efeitos do chumbo estão associados à consistência da lateralidade. Para tanto, os animais foram submetidos a três sessões experimentais. Da primeira para a terceira sessão de nado livre, houve marcante redução da atividade natatória e aumento do número de alternâncias de sentido corrigido pela atividade natatória. Apesar disso, os animais intoxicados foram mais ativos e fizeram menos alternâncias do que os controles em todas as sessões. Além disso, a magnitude dos efeitos do chumbo no teste de nado livre variou em função da

consistência da lateralidade, sendo os resultados mais pronunciados no grupo de animais não consistentes (com menor lateralidade).

5.2.2. Redução da atividade natatória ao longo das sessões experimentais.

Em testes de nado livre, a redução da atividade locomotora ao longo de repetidas sessões tem sido amplamente descrita em camundongos (Krahe et al. 2001;2002;Filgueiras e Manhães, 2004;2005;Manhães et al. 2007;Schmidt et al. 1999) e ratos (Denenberg et al. 1990;West et al. 1986). Várias hipóteses têm sido elaboradas para explicar esta redução na atividade. West e colaboradores (1986), sugeriram que esta redução da atividade poderia ser consequência do fato de os animais, ao longo de sessões repetidas de nado livre, aprenderem a nadar de modo mais eficiente (com menor gasto de energia) aumentando o tempo de flutuação passiva (imobilidade). Contudo, apesar do tempo de imobilidade aumentar com a repetição das sessões (Alonso et al, 1991; Krahe et al, 2002; Porsolt, 1981; Willner, 1990), a hipótese de uma simples relação inversa entre estas medidas não tem sido suportada. A duração da imobilidade não se correlaciona com as medidas de deslocamento angular em nenhuma das sessões experimentais (Alonso et al, 1991; Krahe et al., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que algumas drogas antidepressivas, que diminuem significativamente o tempo de imobilidade, não aumentam a atividade natatória (Armario et al, 1988).

De particular interesse para este estudo, tem sido sugerido que a redução de atividade ao longo das sessões está relacionada ao fenômeno de habituação, que é caracterizado pela diminuição de uma resposta comportamental à apresentação repetida de um estímulo (Bures et al., 1976; Christensson e Garwicz, 2005; Leussis, 2006). Em roedores, a habituação a um novo ambiente tem sido associada a alterações no comportamento exploratório ou na atividade locomotora ao longo do tempo de uma sessão ou de repetidas sessões (Leussis, 2006). Considerando que, na primeira exposição ao teste de nado livre as tentativas de escape do animal são mais evidentes e que estas diminuem com as exposições subsequentes (Armario et al. 1988;Thierry et al., 1984), a redução da atividade natatória pode estar relacionada à habituação à situação adversa do teste (Whimbey e Denenberg 1967; Schmidt et al, 1999; Krahe et al, 2001). Em acordo com esta idéia, tem sido sugerido que uma resposta comportamental relacionada ao medo

é mais alta durante a exposição inicial e diminui a medida que o animal se habitua com a situação experimental (Leppänen et al., 2006; Whimbey e Denenberg, 1967).

Ao longo das sessões experimentais observamos, além da redução da atividade natatória, um marcante aumento no número de alterações de sentido corrigido pela atividade total (AS/NT) e no percentual de rotação para o lado preferido (%LP). Este resultado pode estar relacionado ao fato de que o número de voltas completas (deslocamentos angulares de 360°) realizado pelos animais cai de modo marcante ao longo das sessões experimentais (Filgueiras e Manhães 2004; Schmidt et al. 1999). Desta forma, os menores valores de AS/NT e %LP na primeira sessão decorrem, respectivamente, do fato de que os animais ficam a maior parte do tempo circulando de modo ininterrupto ao longo de toda a extensão do recipiente e não têm uma preferência muito clara por um dos lados. Conforme se habitua à situação aversiva do teste, os animais vão parando de circular de modo ininterrupto na borda do recipiente de teste e o número relativo de alterações de sentido aumenta e os animais vão nadando cada vez mais para um dos lados.

Considerando que vários estudos têm demonstrado que a exposição ocupacional ao chumbo também é capaz de comprometer o aprendizado e memória (Chen et al., 2005; Chuang et al. 2005; Lindgren et al. 2003; Sanz et al. 2007; Stewart et al. 1999) seria esperado que o chumbo afetasse a habituação. Contudo, a ausência de interações entre a sessão experimental e a exposição ao chumbo, sugere fortemente que, pelo menos para as doses utilizadas neste estudo, o chumbo não afetou os mecanismos de habituação. A ausência de diferenças entre os animais expostos e os controles, com relação à queda de atividade natatória ao longo das sessões, está em acordo com outros estudos que sugerem que os mecanismos neurais envolvidos com a habituação não são afetados pelo chumbo (Mantovani et al. 1999). Vale mencionar que, em animais, os efeitos da exposição ao chumbo durante a vida adulta nos mecanismos de memória e aprendizado são pouco estudados e os resultados obtidos mostram-se contraditórios. Apesar da exposição ao chumbo afetar vários mecanismos moleculares que são classicamente envolvidos com mecanismos de aprendizado e memória (Ma et al. 1997; Struzyńska et al. 2005; Zhu et al. 2005), os resultados obtidos no labirinto aquático de Morris não apontaram diferenças significativas entre animais expostos e não expostos (Gilbert et al. 2005).

5.2.3. Efeitos do chumbo na consistência da lateralidade.

As assimetrias funcionais são divididas em especializações hemisféricas e comportamentos lateralizados (Geschwind e Galaburda, 1984; Lent e Schmidt, 1996). Diferentemente das especializações hemisféricas, os comportamentos lateralizados podem ser mais diretamente observados pelo pesquisador, sendo apresentados pelo indivíduo durante a realização de determinadas tarefas (Filgueiras e Manhães, 2004, 2005; Manhães et al., 1993, 2003, 2005; Marchant e McGrew, 1996; Rogers e Bradshaw, 1996; Schmidt et al., 1991). Esta lateralidade é geralmente expressa na forma de um favorecimento sistemático de um dos lados como, por exemplo, na escrita, em que a grande maioria dos humanos utiliza preferencialmente a mão direita (Schmidt e Höfke, 1989; Annett, 2002; Elliot e Roy, 1996). Contudo, a lateralidade não está restrita aos aspectos quantitativos do uso ou da habilidade no uso de uma determinada parte do corpo. De fato, tanto humanos como animais tendem, durante o deslocamento, a rodar preferencialmente mais para um lado do que para o outro (Filgueiras e Manhães 2004, 2005; Scharine e McBeath 2002; Schmidt et al. 1999). Assim sendo, os comportamentos lateralizados podem apresentar-se também no relacionamento do indivíduo com o espaço/ambiente que o cerca. Especula-se que comportamentos lateralizados apresentam, em muitos casos, especializações hemisféricas subjacentes como fato gerador e que estas, por sua vez, decorreriam de assimetrias morfológicas e bioquímicas (Beaton 1997; Galaburda 1994; Kertesz 1994; Sun e Walsh 2006). Em geral, o sentido preferencial de rotação tem sido associado com assimetrias bioquímicas nas vias dopaminérgicas do sistema nigroestriado, sendo que o indivíduo roda preferencialmente em direção contralateral ao lado com maior quantidade de dopamina e/ou atividade dopaminérgica (Fedrowitz et al. 2000; Schwarting e Huston 1996).

Vários autores têm sugerido que a estabilidade da lateralidade é um fator determinante para a utilização de um comportamento como “ferramenta” para estudo das assimetrias cerebrais (Noonan e Axelrod 1989; Lent e Schmidt 1993; Schmidt 1994). Neste sentido, em nosso laboratório temos utilizado o comportamento rotacional de nado livre para diferenciar animais com preferências rotacionais consistentes, de animais que alteram a preferência ao longo de repetidas sessões experimentais (Schmidt et al. 1999; Krahe et al. 2001; 2002). Schmidt e colaboradores (1999) têm sugerido que a estabilidade do sentido preferencial de deslocamento, ao longo de repetidas sessões experimentais, é produto de

assimetrias cerebrais, que possibilitam ao animal nadar preferencialmente para um dos lados. Como o grau de lateralidade nos animais consistentes foi maior do que nos não consistentes (Schmidt et al. 1999), pode-se esperar que os animais consistentes também apresentem uma assimetria cerebral mais acentuada. Em acordo com esta suposição, a hemisferectomia unilateral em idade adulta (condição de extrema assimetria) promove um aumento significativo na magnitude das preferências rotacionais e faz com que 91% dos animais sejam classificados como consistentemente lateralizados (Krahe et al. 2001).

Desta forma, o aumento no número de machos consistentemente lateralizados observado no grupo exposto, sugere que o chumbo aumenta as assimetrias dopaminérgicas associadas com a lateralidade rotacional de um modo sexo-dependente. Contudo, como não existem estudos avaliando os efeitos do chumbo nas assimetrias dopaminérgicas, esta possibilidade carece de suporte experimental capaz de validá-la. De modo interessante, alterações nos níveis de dopamina e seus metabólitos foram mais pronunciados em camundongos machos adultos expostos ao chumbo durante o período gestacional (Leasure et al. 2008).

Em humanos, um número crescente de estudos vem demonstrando que os efeitos tóxicos de vários metais não se manifestam igualmente entre homens e mulheres (Vahter et al. 2007). Indivíduos do sexo masculino apresentam maior risco de apresentar distúrbios neurológicos relacionados à exposição precoce ao chumbo, como déficits de atenção e motores (Bhattacharya et al. 2006; Ris et al. 2004). Contudo, diferenças com relação à cinética, modo de ação e susceptibilidade ao chumbo têm sido utilizadas para fundamentar as diferenças sexuais (Vahter et al. 2007). Em geral, os homens têm níveis de chumbo em sangue mais altos que as mulheres, não apenas pela maior exposição como também pelo hematócrito mais alto (Becker et al. 2002). Além disso, nas mulheres a relação entre armazenamento e mobilização do chumbo nos ossos talvez esta sujeita à mesma influência dos mecanismos hormonais que controlam os níveis de cálcio nos ossos (Vahter et al. 2007). Além disso, enquanto a variabilidade da concentração sanguínea de chumbo em sangue nos homens parece depender exclusivamente de fatores ambientais, em mulheres reflete em grande parte os fatores genéticos possivelmente ligados à absorção e armazenamento do chumbo (Bjorkman et al. 2000).

5.2.4. Consistência da lateralidade como um fator determinante da susceptibilidade aos efeitos neurocomportamentais do chumbo.

Em nosso estudo, a consistência da lateralidade se mostrou um fator determinante na manifestação dos efeitos neurocomportamentais do chumbo no teste de nado livre. Particularmente, os efeitos do chumbo na atividade locomotora e nas alterações de sentido foram mais pronunciados no grupo de animais não consistentes. Considerando que a consistência da lateralidade pode estar diretamente associada com a magnitude das assimetrias cerebrais, nossos resultados sugerem que os animais menos “assimétricos” são mais vulneráveis aos efeitos neurocomportamentais do chumbo no teste de nado livre. Esta suposição, contudo, se baseia na premissa que as assimetrias rotacionais se estabelecem antes do início do período de exposição ao chumbo. Em acordo com esta idéia, o padrão de conectividade do corpo caloso, que afeta de modo marcante o estabelecimento das assimetrias rotacionais (Filgueiras e Manhães 2004; 2005; Manhães et al. 2007), adquire o padrão adulto por volta do 15º dia pós-natal em ratos e camundongos (Lent e Schmidt 1993; Ivy et al. 1979).

Seria igualmente possível supor que o chumbo, além de afetar a atividade locomotora e a capacidade de trocar o sentido de natação, tenha também tornado os animais menos lateralizados. Contudo, esta possibilidade é pouco provável, uma vez que o efeito do chumbo na consistência da lateralidade foi o de aumentar o número de animais consistentes, o que sugere um aumento da magnitude das assimetrias rotacionais. Além disso, o aumento no número de animais consistentes foi restrito aos machos. Vale mencionar que, o fato de os efeitos do chumbo serem mais pronunciados no grupo de animais não consistentes não dependeu do sexo dos animais.

Do ponto de vista evolutivo, a lateralização cerebral tem sido associada com um aumento da capacidade funcional do cérebro, uma vez que a especialização de um hemisfério para uma determinada função libera o outro hemisfério para desempenhar funções adicionais (Vallortigara e Rogers 2005). Além disso, o aumento da assimetria cerebral evita atrasos decorrentes da lenta transferência de informações entre os hemisférios (Ringo et al. 1994), previne conflitos entre os hemisférios (Vallortigara 2000) e evita processos redundantes (Hirnstein et al. 2008). Enquanto um circuito neural está processando uma tarefa específica em um hemisfério, a área homóloga no outro

hemisfério pode desempenhar tarefas diferentes ou complementares, permitindo assim, um uso mais eficiente da capacidade cerebral (Hirnstein et al. 2008).

De particular interesse para este estudo, a redução da magnitude da lateralidade tem sido associada com alterações no desempenho em testes comportamentais aversivos (Alonso e Navarro 1997) e estados psicopatológicos associados com estresse (Boscarino e Hoffman 2007). Em humanos, têm sido sugerido que indivíduos com menor grau de lateralização, apresentam maior probabilidade de desenvolver transtorno por estresse pós-traumático (Boscarino e Hoffman 2007). Alonso e Navarro (1997) estudaram a resposta comportamental de ratos adultos ao estresse, cuja lateralidade foi previamente avaliada no labirinto em T (um teste cuja preferência por um dos braços do T é associada com assimetrias dopaminérgicas), e observaram que os animais com menor grau de lateralização apresentaram maior reatividade ao estresse. Considerando que o chumbo prejudica o funcionamento dos principais sistemas envolvidos com a modulação da resposta ao estresse e afeta a função de vários sistemas neurotransmissores, é razoável supor que os animais menos lateralizados tenham mais dificuldade de lidar com a situação aversiva do teste de nado livre e, portanto, seu comportamento seja mais claramente afetado.

5.3. Estudo dos efeitos da exposição subcrônica ao chumbo sobre a oxidação da glutathiona no cérebro de camundongos Suíços.

5.3.1. Resumo dos resultados do estudo 3.

No estudo 3 avaliamos os efeitos do chumbo sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) no cérebro. Quando os resultados foram analisados considerando o nível de intoxicação, observamos que nos animais com PbS<40 não houve alteração das concentrações de glutathiona no cérebro. Em contrapartida, os animais com PbS>60 apresentaram aumento significativo dos níveis de glutathiona oxidada, contudo sem alteração das concentrações de GSH.

5.3.2. Considerações metodológicas

Na determinação do GSH e GSSG, a manipulação das amostras representa o maior problema, frequentemente levando a superestimativa de GSSG. O bloqueio dos grupos tiol (SH) com 2-metil-vinilpiridina, como utilizado neste estudo, atua prevenindo este processo (Pastore et al. 2003, Araujo et al. 2008). A garantia da qualidade analítica, relacionada à oxidação de GSH à GSSG durante os procedimentos pré-analíticos e analíticos, foi conferida observando os resultados de GSSG nos animais controles, que deveriam estar ao redor de 1% da glutathiona total. Neste estudo, o %GSSG para o grupo controle foi de $0,8\mu\text{M} \pm 0,7$ ou razão GSH/GSSG > 100 e para o grupo 90ppm o resultado foi semelhante, mostrando que os procedimentos pré-analíticos e analíticos foram confiáveis.

5.3.3. Efeitos do chumbo sobre os níveis de glutathiona reduzida e oxidada

Os sistemas antioxidantes que envolvem a glutathiona (Glutathiona redutase e Glutathiona peroxidase) são os sistemas endógenos mais importantes para proteção das células contra os radicais livres (Griffith 1999;Anderson 1998). A depleção de GSH deixa a célula mais susceptível à ação dos radicais livres, possibilitando o desenvolvimento de doenças neurológicas, como o mal de Parkinson (Schulz et al. 2000). Apesar dos efeitos tóxicos do chumbo serem, em grande parte, atribuídos a sua capacidade de causar estresse oxidativo, a relação entre os distúrbios do balanço pró-oxidante/antioxidante e as consequências neurocomportamentais da intoxicação pelo chumbo ainda é pouco conhecida (Gurer-Orhan et al. 2004).

O fato de o grupo com PbS superior a 60 $\mu\text{g/dL}$ apresentar um aumento significativo de GSSG e de %GSSG em relação aos grupos controle e PbS <40 $\mu\text{g/dL}$ é particularmente surpreendente. Embora o tecido neural tenha sido capaz de manter o seu potencial redutor nas doses de chumbo em sangue inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$, foram observadas marcantes alterações comportamentais no teste de nado livre. Além disso, quando a capacidade de manutenção do potencial redutor da glutathiona foi comprometido pela intoxicação com doses superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$, as alterações neurocomportamentais não se mostraram mais pronunciadas que aquelas causadas pelas doses inferiores a 40 $\mu\text{g/dL}$. Desta forma, nossos dados sugerem que as alterações neurocomportamentais induzidas pelo chumbo

no teste de nado livre não estão associadas aos níveis de estresse oxidativo relacionados à glutathiona.

Não podemos descartar, contudo, a possibilidade que baixos níveis de estresse oxidativo causados pelo chumbo, incapazes de alterar o balanço GSH/GSSG, sejam capazes de comprometer o comportamento dos camundongos em teste de nado livre. Neste caso, o grau de estresse oxidativo produzido pelas doses de chumbo utilizadas neste estudo, podem ser superiores ao mínimo necessário para comprometer a função neural. Nesta condição, um aumento da dose de chumbo em sangue não corresponderia a um aumento proporcional do efeito comportamental e, portanto, não seriam observadas diferenças significativas entre os grupos PbS>60 e PbS<40.

6 - CONCLUSÕES

Com base neste estudo podemos concluir:

- 1) A exposição subcrônica ao chumbo da adolescência à vida adulta não afetou a atividade locomotora de camundongos Suíços no teste de campo aberto. Em contraste, no teste de nado livre os animais expostos ao chumbo foram hiperativos. Além disso, no teste nado livre, os animais expostos ao chumbo apresentaram um menor número de alterações de sentido.
- 2) A consistência de lateralidade medida ao longo de três sessões de nado livre se mostrou um fator determinante para a neurotoxicidade do chumbo. Particularmente, tanto a hiperatividade quanto a diminuição do número de alterações de sentido induzidas pelo chumbo foram significativamente mais pronunciadas no grupo de animais não consistentemente lateralizados.
- 3) No teste de nado livre, os efeitos comportamentais do chumbo não diferiram entre os animais com níveis de chumbo em sangue inferiores a 40 µg/dL e superiores a 60 µg/dL.
- 4) No cérebro, o chumbo não altera a concentração de glutathione reduzida, contudo aumenta a de glutathione oxidada somente em animais com níveis de chumbo em sangue superiores a 60 µg/dL.

A exposição ao chumbo ainda permanece como um sério problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Apesar do número crescente de estudos mostrando déficits neurocomportamentais em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo, os mecanismos envolvidos com a manifestação destes transtornos permanecem pouco conhecidos. Desta forma, o uso do teste de nado livre, um modelo simples e de baixo custo, pode abrir grandes possibilidades, não somente de investigação dos mecanismos biológicos envolvidos com a toxicidade do chumbo, mas também na elaboração de estratégias para proteção e/ou reversão dos seus efeitos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adonaylo,VN, Oteiza,PI. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 1999a;135: 77-85.
- Adonaylo,VN, Oteiza,PI. Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology* 1999b;132: 19-32.
- Ahamed,M, Siddiqui,MK. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clin. Nutr.* 2007a;26: 400-408.
- Ahamed,M, Siddiqui,MK. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta* 2007b;383: 57-64.
- Alonso, S.J., Castellano, M.A., Afonso, D., Rodriguez, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open-field activity. *Physiol. Behav.*, v.49, p.69-72, 1991.
- Alonso,SJ, Navarro,E, Santana,C, Rodriguez,M. Motor lateralization, behavioral despair and dopaminergic brain asymmetry after prenatal stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997;58: 443-448.
- Anderson,ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 1998;111-112: 1-14.
- Annett, M. Handedness and brain asymmetry. East Sussex: Psychology Press, 2002.
- Apostoli,P, Baj,A, Bavazzano,P, Ganzi,A, Neri,G, Ronchi,A, Soleo,L, Di,LL, Spinelli,P, Valente,T, Minoia,C. Blood lead reference values: the results of an Italian polycentric study. *Sci. Total Environ.* 2002;287: 1-11.
- Araujo,UC, Pivetta,FR, Moreira,JC. [Occupational lead exposure assessment: a proposal for a strategy to monitor prevention of clinical and subclinical effects]. *Cad. Saude Publica* 1999;15: 123-131.
- Armario, A., Gavaldà, A., Martí, O. Forced swimming test in rats: Effects of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *Eur. J. Pharmacol.*, v.158, p.207-212, 1988.
- ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Register). Toxicological Profile for Lead. 2005.
- Aykin-Burns,N, Laegeler,A, Kellogg,G, Ercal,N. Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 2003;44: 417-420.
- Barros, H.M.T., Ferigolo, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: Gender differences. *Neurosci. Biobehav., Rev.* v.23, p.279-286, 1998.
- Beaton AA. The relation of planum temporale asymmetry and morphology of the corpus callosum to handedness, gender, and dyslexia: a review of the evidence. *Brain Lang* 1997;60:255-322.
- Becker,JB, Robinson,TE, Lorenz,KA. Sex differences and estrous cycle variations in amphetamine-elicited rotational behavior. *Eur. J. Pharmacol.* 1982;80: 65-72.

Belforte,JE, Magarinos-Azcone,C, Armando,I, Buno,W, Pazo,JH. Pharmacological involvement of the calcium channel blocker flunarizine in dopamine transmission at the striatum. *Parkinsonism. Relat Disord.* 2001;8: 33-40.

Bellinger,DC. Lead. *Pediatrics* 2004;113: 1016-1022.

Bellinger,DC. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr. Opin. Pediatr.* 2008;20: 172-177.

Bjorklund A., Kirik, D., Rosenblad, C., Georgievska, B., Lundberg, C, Mandel, R.J. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.*, v.886, p.82-98, 2000.

Blando,JD, Lefkowitz,DK, Valiante,D, Gerwel,B, Bresnitz,E. Survey of current lead use, handling, hygiene, and contaminant controls among New Jersey industries. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2007;4: 539-546.

Bleecker,ML, Ford,DP, Celio,MA, Vaughan,CG, Lindgren,KN. Impact of cognitive reserve on the relationship of lead exposure and neurobehavioral performance. *Neurology* 2007;69: 470-476.

Bleecker,ML, Ford,DP, Lindgren,KN, Scheetz,K, Tiburzi,MJ. Association of chronic and current measures of lead exposure with different components of brainstem auditory evoked potentials. *Neurotoxicology* 2003;24: 625-631.

Borsini, F., Volterra, G., Meli, A. Does the behavioral "despair" test measure despair. *Physiol. Behav.*, v.38, p.385-386, 1986.

Boscarino JA, Hoffman SN. Consistent association between mixed lateral preference and PTSD: confirmation among a national study of 2490 US Army Vietnam veterans. *Psychosom Med.* 2007 May;69(4):365-9.

Boules,M, Warrington,L, Fauq,A, McCormick,D, Richelson,E. Antiparkinson-like effects of a novel neurotensin analog in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;428: 227-233.

Bowers,TS, Beck,BD. What is the meaning of non-linear dose-response relationships between blood lead concentrations and IQ? *Neurotoxicology* 2006;27: 520-524.

Bracha,HS. Asymmetric rotational (circling) behavior, a dopamine-related asymmetry: preliminary findings in unmedicated and never-medicated schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 1987;22: 995-1003.

Brown,RC, Lockwood,AH, Sonawane,BR. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ. Health Perspect.* 2005;113: 1250-1256.

Canfield,RL, Henderson,CR, Jr., Cory-Slechta,DA, Cox,C, Jusko,TA, Lanphear,BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N. Engl. J. Med.* 2003;348: 1517-1526.

Carey,RJ, Dai,H, Gui,J. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology (Berl)* 1998;137: 241-246.

Carlson,JN, Glick,SD. Cerebral lateralization as a source of interindividual differences in behavior. *Experientia* 1989;45: 788-798.

Carlson,JN, Glick,SD. Brain laterality as a determinant of susceptibility to depression in an animal model. *Brain Res.* 1991;550: 324-328.

Carpenter,DO. Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2001;14: 209-218.

Carvalho,FM, Silvany Neto,AM, Tavares,TM, Costa,AC, Chaves,CR, Nascimento,LD, Reis,MA. [Blood lead levels in children and environmental legacy of a lead foundry in Brazil]. *Rev. Panam. Salud Publica* 2003;13: 19-23.

CDC. Centers for Disease Control. Preventing Lead Poisoning in Young Children. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1991. Ref Type: Generic

Chen,SS, Chen,TJ, Lin,CH, Tseng,YT, Lai,SL. Neurobehavioral changes in Taiwanese lead-exposed workers. *J. Occup. Environ. Med.* 2005;47: 902-908.

Chiodo,LM, Jacobson,SW, Jacobson,JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol. Teratol.* 2004;26: 359-371.

Christensson M, Garwicz M.Ontogenesis of within-session locomotor habituation in the open field.*Neuroreport.* 2005 Aug 22;16(12):1319-23.

Chuang Hy, Chao Ky, Tsai Sy. Reversible neurobehavioral performance with reductions in blood lead levels--a prospective study on lead workers. *Neurotoxicol Teratol.* 2005 May-Jun;27(3):497-504. Epub 2005 Feb 12.

Clarkson,TW. Metal toxicity in the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 1987;75: 59-64.

Correa,M, Miquel,M, Sanchis-Segura,C, Aragon,CM. Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol* 1999;19: 43-49.

Correa,M, Roig-Navarro,AF, Aragon,CM. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci.* 2004;74: 2009-2021.

Cory-Slechta,DA. Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995;35: 391-415.

Cory-Slechta,DA, Virgolini,MB, Rossi-George,A, Thiruchelvam,M, Lisek,R, Weston,D. Lifetime consequences of combined maternal lead and stress. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008;102: 218-227.

Cory-Slechta,DA, Virgolini,MB, Thiruchelvam,M, Weston,DD, Bauter,MR. Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 2004;112: 717-730.

Costa,LG, Aschner,M, Vitalone,A, Syversen,T, Soldin,OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004;44: 87-110.

Crusio,WE. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav. Brain Res.* 2001;125: 127-132.

Dawirs,RR, Teuchert-Noodt,G. A novel pharmacological concept in an animal model of psychosis. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl* 2001; 10-17.

de Freitas,CU, De Capitani,EM, Gouveia,N, Simonetti,MH, de Paula E Silva MR, Kira,CS, Sakuma,AM, de Fatima Henriques,CM, Duran,MC, Tiglea,P, de Abreu,MH. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. *Environ. Res.* 2007;103: 338-344.

Decker,S, Grider,G, Cobb,M, Li,XP, Huff,MO, El-Mallakh,RS, Levy,RS. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion

in the development of an animal model for bipolar illness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2000;24: 455-462.

Denenberg,VH, Talgo,NW, Waters,NS, Kenner,GH. A computer-aided procedure for measuring swim rotation. *Physiol Behav.* 1990;47: 1023-1025.

Detke, M.J, Lucki, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav. Brain Res.*, v.73, p.43-46, 1996.

Elliot, D., Roy, E.A. Manual asymmetries in motor performance. Boca Raton: CRC Press, 1996.

Fedrowitz,M, Potschka,H, Richter,A, Loscher,W. A microdialysis study of striatal dopamine release in the circling rat, a genetic animal model with spontaneous lateralized rotational behavior. *Neuroscience* 2000;97: 69-77.

Fietta,P, Fietta,P. Glucocorticoids and brain functions. *Riv. Biol.* 2007;100: 403-418.

Filgueiras,CC, Manhães,AC. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behav. Brain Res.* 2004;155: 13-25.

Finkelstein,Y, Markowitz,ME, Rosen,JF. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1998;27: 168-176.

Flora,SJ, Kumar,D, Das,GS. Interaction of zinc, methionine or their combination with lead at gastrointestinal or post-absorptive level in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 1991;68: 3-7.

Flora,SJ, Pande,M, Mehta,A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem. Biol. Interact.* 2003;145: 267-280.

Galaburda, A.M. Anatomic basis of cerebral dominance. In: DAVIDSON, R.J. e HUGDAHL, K. (Orgs.). *Brain asymmetry*. Cambridge: MIT Press, 1994. p. 51-74.

Garza,A, Vega,R, Soto,E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med. Sci. Monit.* 2006;12: RA57-RA65.

Gedeon,Y, Ramesh,GT, Wellman,PJ, Jadhav,AL. Changes in mesocorticolimbic dopamine and D1/D2 receptor levels after low level lead exposure: a time course study. *Toxicol. Lett.* 2001;123: 217-226.

Geschwind, N., Galaburda, A.M. *Cerebral dominance*. Cambridge: Harvard University Press, 1984.

Gidlow,DA. Lead toxicity. *Occup. Med. (Lond)* 2004;54: 76-81.

Gilbert Me, Kelly Me, Samsam Te, Goodman Jh. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. : *Toxicol Sci.* 2005 Aug;86(2):365-74.

Gilbert,SG, Weiss,B. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 microg/dL. *Neurotoxicology* 2006;27: 693-701.

Gilden,DL, Marusich,LR. Contraction of time in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychology.* 2009;23: 265-269.

Glass,TA, Bandeen-Roche,K, McAtee,M, Bolla,K, Todd,AC, Schwartz,BS. Neighborhood psychosocial hazards and the association of cumulative lead dose with cognitive function in older adults. *Am. J. Epidemiol.* 2009;169: 683-692.

Glick,SD, Cox,RD. Nocturnal rotation in normal rats: correlation with amphetamine-induced rotation and effects of nigrostriatal lesions. *Brain Res.* 1978;150: 149-161.

Goyer,RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ. Health Perspect.* 1996;104: 1050-1054.

Griffith,OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27: 922-935.

Gulson,BL, Pounds,JG, Mushak,P, Thomas,BJ, Gray,B, Korsch,MJ. Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *J. Lab Clin. Med.* 1999;134: 631-640.

Gurer,H, Ercal,N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 2000;29: 927-945.

Hougaard,KS, Hansen,AM. Enhancement of developmental toxicity effects of chemicals by gestational stress. A review. *Neurotoxicol. Teratol.* 2007;29: 425-445.

Hsu,JM. Lead toxicity as related to glutathione metabolism. *J. Nutr.* 1981;111: 26-33.

Hsu,PC, Guo,YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 2002;180: 33-44.

Kabuki,Y, Yamane,H, Hamasu,K, Furuse,M. Different locomotor activities and monoamine levels in the brains of Djungarian hamsters (*D. sungorus*) and Roborovskii hamsters (*D. roborovskii*). *Exp. Anim* 2008;57: 447-452.

Kamel,F, Umbach,DM, Hu,H, Munsat,TL, Shefner,JM, Taylor,JA, Sandler,DP. Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.* 2005;2: 195-201.

Kasperczyk,A, Kasperczyk,S, Horak,S, Ostalowska,A, Grucka-Mamczar,E, Romuk,E, Olejek,A, Birkner,E. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;228: 378-384.

Kertesz, A. Localization and neuroimaging in neuropsychology. San Diego: Academic Press, 1994.

Kim,D, Carlson,JN, Seegal,RF, Lawrence,DA. Differential immune responses in mice with left- and right-turning preference. *J Neuroimmunol.* 1999;93: 164-171.

Klimkeit,EI, Bradshaw,JL. Anomalous lateralisation in neurodevelopmental disorders. *Cortex* 2006;42: 113-116.

Kosnett,MJ, Wedeen,RP, Rothenberg,SJ, Hipkins,KL, Materna,BL, Schwartz,BS, Hu,H, Woolf,A. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 2007;115: 463-471.

Krahe,TE, Filgueiras,CC, Caparelli-Dáquer,EM, Schmidt,SL. Contralateral rotatory bias in the free-swimming test after unilateral hemispherectomy in adult Swiss mice. *Int. J. Neurosci.* 2001;108: 21-30.

Krahe,TE, Filgueiras,CC, Schmidt,SL. Effects of rotational side preferences on immobile behavior of normal mice in the forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2002;26: 169-176.

Lanphear,BP, Dietrich,K, Auinger,P, Cox,C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep.* 2000;115: 521-529.

Lanphear,BP, Hornung,R, Khoury,J, Yolton,K, Baghurst,P, Bellinger,DC, Canfield,RL, Dietrich,KN, Bornschein,R, Greene,T, Rothenberg,SJ, Needleman,HL, Schnaas,L, Wasserman,G, Graziano,J, Roberts,R. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ. Health Perspect.* 2005;113: 894-899.

Lasky,RE, Luck,ML, Parikh,NA, Laughlin,NK. The effects of early lead exposure on the brains of adult rhesus monkeys: a volumetric MRI study. *Toxicol. Sci.* 2005;85: 963-975.

Leasure,JL, Giddabasappa,A, Chaney,S, Johnson,JE, Jr., Pothakos,K, Lau,YS, Fox,DA. Low-level human equivalent gestational lead exposure produces sex-specific motor and coordination abnormalities and late-onset obesity in year-old mice. *Environ. Health Perspect.* 2008;116: 355-361.

Lent, R., Schmidt, S.L. The ontogenesis of the forebrain commissures and the determination of brain asymmetries. *Prog. Neurobiol.*, v.40, p.249-276, 1993.

Leppanen,PK, Ravaja,N, Ewalds-Kvist,SB. Twenty-three generations of mice bidirectionally selected for open-field thigmotaxis: selection response and repeated exposure to the open field. *Behav. Processes* 2006;72: 23-31.

Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(7):1045-64.

Lidsky,TI, Schneider,JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain* 2003;126: 5-19.

Lyon,N, Satz,P. Left turning (swivel) in medicated chronic schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 1991;4: 53-58.

Ma,T, Chen,HH, Ho,IK. Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. *Toxicol. Lett.* 1999;105: 111-121.

Manhães,AC, Abreu-Villaça,Y, Schmidt,SL, Filgueiras,CC. Neonatal transection of the corpus callosum affects rotational side preference in adult Swiss mice. *Neurosci. Lett.* 2007;415: 159-163.

Manhães,AC, Krahe,TE, Caparelli-Dáquer,E, Ribeiro-Carvalho,A, Schmidt,SL, Filgueiras,CC. Neonatal transection of the corpus callosum affects paw preference lateralization of adult Swiss mice. *Neurosci. Lett.* 2003;348: 69-72.

Manhães,AC, Schmidt,SL, Caparelli-Dáquer,EM. Paw preference in mice with callosal defects induced by prenatal gamma irradiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1993;26: 1213-1218.

Manhães,AC, Schmidt,SL, Filgueiras,CC. Callosal agenesis affects consistency of laterality in a paw preference task in BALB/cCF mice. *Behav. Brain Res.* 2005;159: 43-49.

Mantovani,M, Matteussi,AS, Rodrigues,AL. Antidepressant-like effect of lead in adult mice. *Braz. J Med. Biol. Res.* 1999;32: 1555-1560.

Meng,XM, Zhu,DM, Ruan,DY, She,JQ, Luo,L. Effects of chronic lead exposure on 1H MRS of hippocampus and frontal lobes in children. *Neurology* 2005;64: 1644-1647.

Metz,GA. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev. Neurosci.* 2007;18: 209-222.

Meziane,H, Ouagazzal,AM, Aubert,L, Wietzych,M, Krezel,W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav.* 2007;6: 192-200.

Milanov,I, Kolev,P. Clinical and electromyographic examinations of patients with tremor after chronic occupational lead exposure. *Occup. Med. (Lond)* 2001;51: 157-162.

Moreira,EG, Vassilieff,I, Vassilieff,VS. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol. Teratol.* 2001;23: 489-495.

MT-NR-7. Ministério do Trabalho - Norma Regulamentadora 7 - Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional (PCMSO). 2001.
Ref Type: Generic

Murata,K, Iwata,T, Dakeishi,M, Karita,K. Lead Toxicity: Does the Critical Level of Lead Resulting in Adverse Effects Differ between Adults and Children? *J Occup. Health* 2008.

Nielsen,DM, Crosley,KJ, Keller,RW, Jr., Glick,SD, Carlson,JN. Left and right 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex differentially affect voluntary ethanol consumption. *Brain Res.* 1999;823: 59-66.

Nieto-Fernandez,FE, Ruiz,A, Ntukogu,N, Nodimelle,L, Pryor,SC. Short term lead exposure induces a stress-like response in adult mice. *Med. Sci. Monit.* 2006;12: BR325-BR329.

Nigg,JT, Kottnerus,GM, Martel,MM, Nikolas,M, Cavanagh,K, Karmaus,W, Rappley,MD. Low blood lead levels associated with clinically diagnosed attention-deficit/hyperactivity disorder and mediated by weak cognitive control. *Biol. Psychiatry* 2008;63: 325-331.

Noonan, M., Axelrod, S. Behavioral bias and left-right response differentiation in the rat. *Behav. Neural Biol.*, v.52, p.406-410, 1989.

Onalaja,AO, Claudio,L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ. Health Perspect.* 2000;108 Suppl 1: 23-28.

Pani,L, Porcella,A, Gessa,GL. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Mol. Psychiatry* 2000;5: 14-21.

Paoliello,MM, De Capitani,EM. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. *Environ. Res.* 2007;103: 288-297.

Patra,RC, Swarup,D, Dwivedi,SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001;162: 81-88.

Patrick,L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* 2006;11: 114-127.

Pocock,SJ, Smith,M, Baghurst,P. Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ* 1994;309: 1189-1197.

Porsolt, R.D. Behavioral despair. In: Enna, S.J., Malick, J.B. e Richelson, E. (Orgs.). *Antidepressants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*. New York: Raven press, 1981. p.121-139.

Prut,L, Belzung,C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;463: 3-33.

Quiterio,SL, da Silva,CR, Vaitsman,DS, Martinhon,PT, Moreira,MF, Araujo,UC, Mattos,RC, Santos,LS. [Use of dust and air as indicators of environmental pollution in areas adjacent to a source of stationary lead emission]. *Cad. Saude Publica* 2001;17: 501-508.

Rebeca,R. Influência do Ciclo Estral e da Consistência da Lateralidade no Comportamento Rotacional em Nado Livre de Camundongos Suíços Adultos. In: Programa de Pós-Graduação em Biociências Nucleares da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, editor. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: 1999.

Relyea,RA, Mills,N. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2001;98: 2491-2496.

Rice,DC. Behavioral effects of lead: commonalities between experimental and epidemiologic data. *Environ. Health Perspect.* 1996a;104 Suppl 2: 337-351.

Rice,DC. PCBs and behavioral impairment: are there lessons we can learn from lead? *Neurotoxicol. Teratol.* 1996b;18: 229-232.

Robinet,PM, Bardo,MT. Dopamine D3 receptors are involved in amphetamine-induced contralateral rotation in 6-OHDA lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001;70: 43-54.

Rodrigues,AL, Rocha,JB, Mello,CF, Souza,DO. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.* 1996;79: 150-156.

Rodrigues,SM, Le Doux,JE, Sapolsky,RM. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 2009.

Rogers, L.J., Bradshaw, J.L. Motor asymmetries in birds and nonprimate animals. In: Elliott D. e Roy E.A. (Orgs.). *Manual asymmetries in motor performance*. New York: CRC Press, 1996. p. 3-31.

Sagvolden,T, Russell,VA, Aase,H, Johansen,EB, Farshbaf,M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 2005;57: 1239-1247.

Salinas,JA, Huff,NC. Lead and spatial vs. cued open field performance. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002;24: 551-557.

Sandhir,R, Gill,KD. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995;48: 91-97.

Sanz P, Nogué S, Vilchez D, Vilchez J, Casal A, Logroscino G. Progressive supranuclear palsy-like parkinsonism resulting from occupational exposure to lead sulphate batteries. *J Int Med Res.* 2007 Jan-Feb;35(1):159-63.

Schmidt,SL, Filgueiras,CC, Krahe,TE. Effects of sex and laterality on the rotatory swimming behavior of normal mice. *Physiol Behav.* 1999;65: 607-616.

Schnaas,L, Rothenberg,SJ, Flores,MF, Martinez,S, Hernandez,C, Osorio,E, Velasco,SR, Perroni,E. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 2006;114: 791-797.

Schucht,P, Raineteau,O, Schwab,ME, Fouad,K. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 2002;176: 143-153.

Schwartz,RK, Huston,JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog. Neurobiol.* 1996;49: 215-266.

Scornaiencki,R, Cantrup,R, Rushlow,WJ, Rajakumar,N. Prefrontal cortical D1 dopamine receptors modulate subcortical D2 dopamine receptor-mediated stress responsiveness. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2009; 1-14.

Servatius,RJ, Ottenweller,JE, Bergen,MT, Soldan,S, Natelson,BH. Persistent stress-induced sensitization of adrenocortical and startle responses. *Physiol Behav.* 1994;56: 945-954.

Shih,RA, Glass,TA, Bandeen-Roche,K, Carlson,MC, Bolla,KI, Todd,AC, Schwartz,BS. Environmental lead exposure and cognitive function in community-dwelling older adults. *Neurology* 2006;67: 1556-1562.

Shih,RA, Hu,H, Weisskopf,MG, Schwartz,BS. Cumulative lead dose and cognitive function in adults: a review of studies that measured both blood lead and bone lead. *Environ. Health Perspect.* 2007;115: 483-492.

Silbergeld,EK, Goldberg,AM. Hyperactivity: a lead-induced behavior disorder. *Environ. Health Perspect.* 1974a;7: 227-232.

Silbergeld,EK, Goldberg,AM. Lead-induced behavioral dysfunction: an animal model of hyperactivity. *Exp. Neurol.* 1974b;42: 146-157.

Skerfving,S, Nilsson,U, Schutz,A, Gerhardsson,L. Biological monitoring of inorganic lead. *Scand. J. Work Environ. Health* 1993;19 Suppl 1: 59-64.

Schmidt, S.L., Höfke, A.A. Laterality of Brazilian adults and its performance in learning a second language. *Soc. Neurosci. Abstr.*, v.15, p.1061, 1989.

Schmidt, S.L., Manhães, A.C., De Moraes, V.Z. The effects of partial and total callosal agenesis on the paw preference performance in the BALB/cCF mouse. *Brain Res.*, v.545, p.123-130, 1991.

Schmidt S.L. Three different animal models of early callosal defects: morphological and behavioral studies. In: Lassonde, M. e Jeeves, M.A. (Orgs.). *Callosal agenesis*. New York: Academic Press, 1994. p. 147-154.

Steiner,H, Bonatz,AE, Huston,JP, Schwarting,R. Lateralized wall-facing versus turning as measures of behavioral asymmetries and recovery of function after injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra. *Exp. Neurol.* 1988;99: 556-566.

Stewart,PW, Blaine,C, Cohen,M, Burrigh,RG, Donovan,PJ. Acute and longer term effects of meso-2,3 dimercaptosuccinic acid (DMSA) on the behavior of lead-exposed and control mice. *Physiol Behav.* 1996;59: 849-855.

Stewart,PW, Burrigh,RG, Donovan,PJ. DMSA chelation during co-exposure to lead: increased locomotor activity in lead-exposed mice but not controls. *Physiol Behav.* 1995;57: 863-867.

Stewart Wf, Schwartz Bs, Simon D, Bolla Ki, Todd Ac, Links J. Neurobehavioral function and tibial and chelatable lead levels in 543 former organolead workers. *Neurology.* 1999 May 12;52(8):1610-7.

Struzyńska L, Chalimoniuk M, Sulkowski G. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain. *Neurochem Int.* 2005 Oct;47(5):326-33.

Sullivan,RM, Dufresne,MM. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Res.* 2006;1076: 49-59.

Sun,T, Walsh,CA. Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7: 655-662.

Szczerbak,G, Nowak,P, Kostrzewa,RM, Brus,R. Maternal lead exposure produces long-term enhancement of dopaminergic reactivity in rat offspring. *Neurochem. Res.* 2007;32: 1791-1798.

Tavakoli-Nezhad,M, Barron,AJ, Pitts,DK. Postnatal inorganic lead exposure decreases the number of spontaneously active midbrain dopamine neurons in the rat. *Neurotoxicology* 2001;22: 259-269.

Tejani-Butt,S, Kluczynski,J, Pare,WP. Strain-dependent modification of behavior following antidepressant treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003;27: 7-14.

Thanapop,C, Geater,AF, Robson,MG, Phakthongsuk,P, Viroonudomphol,D. Exposure to lead of boatyard workers in southern Thailand. *J Occup. Health* 2007;49: 345-352.

Thierry,B, Steru,L, Simon,P, Porsolt,RD. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology (Berl)* 1986;90: 284-285.

Tong,S, Von Schirnding,YE, Prapamontol,T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull. World Health Organ* 2000;78: 1068-1077.

Toscano,CD, Guilarte,TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005;49: 529-554.

Trombini,TV, Pedroso,CG, Ponce,D, Almeida,AA, Godinho,AF. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001;68: 743-751.

Ueno,KI, Togashi,H, Mori,K, Matsumoto,M, Ohashi,S, Hoshino,A, Fujita,T, Saito,H, Minami,M, Yoshioka,M. Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behav. Pharmacol.* 2002;13: 1-13.

Vallortigara, G., Rogers, L.J. Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behav. Brain Sci.*, v. 28, p. 575-633, 2005.

Virgolini,MB, Bauter,MR, Weston,DD, Cory-Slechta,DA. Permanent alterations in stress responsivity in female offspring subjected to combined maternal lead exposure and/or stress. *Neurotoxicology* 2006;27: 11-21.

Virgolini,MB, Chen,K, Weston,DD, Bauter,MR, Cory-Slechta,DA. Interactions of chronic lead exposure and intermittent stress: consequences for brain catecholamine systems and associated behaviors and HPA axis function. *Toxicol. Sci.* 2005;87: 469-482.

Virgolini,MB, Rossi-George,A, Lisek,R, Weston,DD, Thiruchelvam,M, Cory-Slechta,DA. CNS effects of developmental Pb exposure are enhanced by combined maternal and offspring stress. *Neurotoxicology* 2008a;29: 812-827.

Virgolini,MB, Rossi-George,A, Weston,D, Cory-Slechta,DA. Influence of low level maternal Pb exposure and prenatal stress on offspring stress challenge responsivity. *Neurotoxicology* 2008b;29: 928-939.

Waldner,R, Puschban,Z, Scherfler,C, Seppi,K, Jellinger,K, Poewe,W, Wenning,GK. No functional effects of embryonic neuronal grafts on motor deficits in a 3-nitropropionic acid rat model of advanced striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *Neuroscience* 2001;102: 581-592.

West,CA, Reid,KH, Schurr,A. A simple rapid swim test to determine spatial preference in the rat. *Physiol Behav.* 1986;36: 393-395.

Whimbey,AE, Denenberg,VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol.* 1967;63: 500-504.

White,LD, Cory-Slechta,DA, Gilbert,ME, Tiffany-Castiglioni,E, Zawia,NH, Virgolini,M, Rossi-George,A, Lasley,SM, Qian,YC, Basha,MR. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007;225: 1-27.

Whittaker,SG. Lead exposure in radiator repair workers: a survey of Washington State radiator repair shops and review of occupational lead exposure registry data. *J Occup. Environ. Med.* 2003;45: 724-733.

Willner, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.*, v.45, p.425-455, 1990.

Wright,NJ, Thacher,TD, Pfitzner,MA, Fischer,PR, Pettifor,JM. Causes of lead toxicity in a Nigerian city. *Arch. Dis. Child* 2005;90: 262-266.

Zhu Z-W, Yang R-L , Dong G-J, Zhao Z. Study on the neurotoxic effects of low-level lead exposure in rats. *J Zhejiang Univ SCI* (2005) 6B(7):686-692.