

MAGDA HELENA SORATTO HEITICH FERRAZZA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, DE ESTRESSE
OXIDATIVO, DA FUNÇÃO TIREOIDIANA, RENAL E HEPÁTICA NA
INTOXICAÇÃO POR CHUMBO**

JOINVILLE – SC

2017

MAGDA HELENA SORATTO HEITICH FERRAZZA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, DE ESTRESSE
OXIDATIVO, DA FUNÇÃO TIREOIDIANA, RENAL E HEPÁTICA NA
INTOXICAÇÃO POR CHUMBO**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Delwing de Lima.

JOINVILLE – SC

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

F381a	Ferrazza, Magda Helena Soratto Heitich Avaliação das alterações hematológicas, de estresse oxidativo, da função tireoidiana, renal e hepática na intoxicação por chumbo/ Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2017. 162 f. : il. ; 30 cm Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville) 1. Intoxicação por chumbo. 2. Stress oxidativo. 3. Chumbo no organismo. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Título. CDD 363.1791
-------	--

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB14/1437

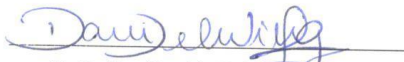
Termo de Aprovação

“Avaliação das Alterações Hematológicas, de Estresse Oxidativo, da Função Tiroideana, Renal e Hepática na Intoxicação por Chumbo”

por

Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

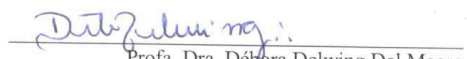
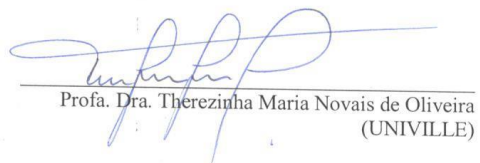


Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)
Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro
(FURB)
Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
(UNIVILLE)

Joinville, 13 de dezembro de 2017

*Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.
Fernando Pessoa*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos docentes: orientadora Prof^a. Dr^a. Daniela Delwing de Lima e ao Prof^o. Me. Eduardo Manoel Pereira, professores que exercem com carinho e responsabilidade a grande tarefa de auxiliar a construção do conhecimento, com certeza me proporcionaram neste mestrado o sentimento de aprendizado, realização e sucesso, a vocês expesso o meu carinho e gratidão. Agradeço à toda minha família, principalmente aos meus pais, Antônio e Marcolina, pelo apoio e compreensão. Ao meu eterno colega de graduação e esposo Sergio, que em todos os momentos esteve ao meu lado me apoiando e incentivado, meus filhos Guilherme e Gustavo, quero agradecer pelo grande apoio em todos os momentos e declarar que vocês são a minha grande fonte de inspiração para buscar sempre mais essa fonte do saber. Amo vocês. Aos meus companheiros de pesquisa e análises laboratoriais, Thayna, Maitê, Indianara, Eloise, Geraldo, Luiz, Matheus, Tales: a ajuda de vocês foi essencial para o meu trabalho. Ao grande companheiro de pesquisa, Victor Hugo Joaquim, pela disponibilidade, apoio e troca de conhecimentos. Aos meus colegas de mestrado, especialmente a Simone de Kassia Wendt pelo companheirismo e amizade. Ao patologista Dr. Antonio Scaramello e a doutoranda Sara Barauna pela grande ajuda com as leituras histológicas. A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos e em especial a professora Therezinha Maria Novais de Oliveira por me apresentar a Toxicologia como ponto fundamental para o elo Saúde e Meio Ambiente. As funcionárias da secretaria do mestrado, pela disponibilidade de sempre. Aos membros da banca pelas contribuições. UNIVILLE

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A intoxicação por chumbo (Pb) é um problema de saúde pública, pois apresenta elevada toxicidade ao organismo atuando sob vários alvos bioquímicos como o sistema nervoso central, hematopoiético e renal. As principais fontes de emissão do Pb para o ambiente provêm de ações antrópicas e a intoxicação ocupacional requer atenção. O estresse oxidativo (EO) é considerado um possível mecanismo molecular envolvido. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações hematológicas, de estresse oxidativo, as alterações hormonais relacionadas à tireoide e a função renal e hepática em ratos Wistar expostos por 35 dias frente a três doses diferentes de Acetato de chumbo. Para tanto utilizou-se uma amostra de ratos machos Wistar (n total = 86), com 60 dias de idade. Os animais foram expostos a 16 mg/kg, 64 mg/Kg e 128 mg/Kg de acetato de Pb e solução salina (grupo controle) durante 35 dias, via gavagem. Foram realizadas análises no sangue, fígado, rim e estruturas cerebrais de danos em lipídeos por avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS); de dano proteico através do conteúdo total de sulfidrilas e de carbonilação proteica, da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Foram avaliadas também a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e da Na^+K^+ -ATPase em estruturas cerebrais, parâmetros hematológicos, dosagem dos hormônios tireoestimulante (TSH) e tiroxina livre (T4L), de enzimas hepáticas como a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGO) e gama glutamil transferase (γ GT), bem como dosagem de ureia, creatinina, potássio (K^+) e desidrogenase láctica (LDH). Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo post-hoc de Duncan, quando indicado ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que, na dose de 16mg/Kg observou-se aumento na atividade de GSH-Px em eritrócitos, na dose de 64mg/Kg foram observados aumento de TBA-RS em rim e fígado, aumento de proteínas carboniladas em plasma, diminuição da atividade da CAT e SOD em eritrócitos e da SOD em hipocampo, aumento da GSH-Px em eritrócitos e diminuição em cerebelo. Com relação aos parâmetros hematológicos, houve uma diminuição do volume corpuscular médio (VCM) e aumento dos reticulócitos. Na dose de 128mg/kg

verificou-se aumento de TBA-RS em fígado e rim e proteínas carboniladas em plasma, diminuiu a CAT em eritrócitos, cerebelo e fígado e aumento em córtex cerebral e rim. Diminuição da atividade da SOD em eritrócitos, córtex cerebral, hipocampo e aumento em cerebelo e rim. Quanto à atividade da GSH-Px observou-se aumento em eritrócito e diminuição em córtex cerebral e cerebelo. O Pb (128mg/kg) também aumentou a atividade da AChE em hipocampo e diminuiu a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em hipocampo e cerebelo. Com relação aos parâmetros hematológicos, o Pb (128mg/kg) diminuiu a hemoglobina (Hg) e aumentou o Red Cell Distribution Width (RDW), diminuiu o VCM e aumentou os reticulócitos. Considerando a função tireoidiana, o Pb na dose de 128mg/kg diminuiu o T4I. As enzimas hepáticas, as dosagens de creatinina, K^+ e LDH não apresentaram alterações significativas, somente a ureia apresentou alteração em 64mg/Kg e 128mg/kg. Assim, conclui-se que a intoxicação por Pb, causa alterações a nível hematológico, renal, hepático e tireoidiano e que o EO pode ser um dos mecanismos envolvido nestas alterações.

Palavras-chaves: chumbo, alterações hematológicas, estresse oxidativo, tireoide, hepatotóxico, nefrotóxico.

ABSTRACT

Lead poisoning (Pb) is a public health problem because it presents high toxicity to the organism acting under several biochemical targets such as the central nervous system, hematopoietic and renal. The main sources of emission to the environment come from anthropic actions and occupational intoxication requires attention. Oxidative stress (ES) is considered a possible molecular mechanism involved. Therefore, the objective of this study was to evaluate hematological alterations, oxidative stress, thyroid, hepatic and renal function during 35 days exposure to lead acetate in Wistar rats versus three different doses of lead acetate. For this purpose a sample of male Wistar rats ($n = 86$) at 60 days of age was used. The animals were exposed to 16 mg / kg, 64 mg / kg and 128 mg / kg of Pb acetate and saline solution (control group) for 35 days, via gavage. Blood, liver, kidney and brain structures of lipid damage were evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. The activity of acetylcholinesterase (AChE) and Na + K + -ATPase in brain structures, hematological parameters, thyroid stimulating hormone (TSH) and free thyroxine (T4L), liver enzymes such as glutamic oxalacetic transaminase (TGO) , glutamic-pyruvic transaminase (GOT) and gamma glutamyl transferase (γ GT), as well as urea, creatinine, potassium (K +) and lactate dehydrogenase (LDH). The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) of one route, followed by Duncan post-hoc, when indicated ($p < 0.05$). The results showed that at the dose of 16mg/Kg, we observed increase of TBA-RS and GSH-PX in , increase of carbonylated proteins in erythrocytes and plasma, decrease of CAT and SOD in erythrocytes, and SOD also in hippocampus, GSH-PX increase in erythrocytes and decrease in cerebellum, as for hematological parameters there was a decrease in mean corpuscular volume (MCV) and increase in reticulocytes. In 128mg / kg increased TBA-RS in liver and kidney and carbonylated proteins in plasma and erythrocyte, decreased CAT in erythrocytes, cerebellum and liver and increased in cerebral cortex and kidney. SOD decreased in erythrocytes, cerebral cortex, and hippocampus increased in cerebellum and kidney. GSH-PX increased in erythrocyte, decreasing in cerebral cortex and cerebellum. AChE activity increased in

hippocampus and Na + K + ATPase decreased in hippocampus and cerebellum. Hemoglobin (Hg) and VCM decreased and reticulocytes and Red Cell Distribution Width (RDW) increased. T4I decreased in this dose. In the evaluation of the parameters of oxidative stress in kidney and liver, TBA-RS increased in liver and kidney at doses of 64mg / kg 128mg / dl and sulfhydryl and carbonylated proteins showed no alterations. Antioxidant enzymes, Pb (128mg / kg) decreased CAT decreased in liver and increased CAT, SOD and GSH-Px in kidney.

Hepatic enzymes, creatinine, K + and LDH levels did not show significant changes. Only, urea increased at 64mg/Kg and 128mg/Kg. Thus, it is concluded that the PB poisoning even at lower doses causes hematological, renal, hepatic and thyroid changes and that OE may be one of the mechanisms involved in these alterations.

Keywords: Exposure to lead, hematological changes, oxidative stress, thyroid, hepatotoxicity, nephrotoxicity.

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 01: Compostos Orgânicos de chumbo e sua utilização

Figura 02: Toxicocinética do chumbo

Figura 03: Interferência do chumbo na síntese do Heme.

Figura 04: Localização anatômica de glândula tireoide e estruturas adjacentes

Figura 05: Formação dos hormônios da tireoide

Figura 06: Possíveis mecanismos pelos quais o chumbo pode provocar estresse oxidativo.

Figura 07: Doenças relacionadas aos Radicais Livres

Figura 08: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).

Figura 09: Reação de Fenton e Haber-Weiss

Figura 10: Equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante

Figura 11: Possível mecanismo de genotoxicidade causado pelo chumbo

Figura 12: Dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio mediado pela enzima Superoxidodismutase.

Figura 13: Redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio em água.

Figura 14: Ciclo da glutathione alternando entre sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01: Níveis mínimos de chumbo onde foram observados efeitos para saúde.

Quadro 01: Parâmetros para Controle Biológico da Exposição Ocupacional a Alguns Agentes Químicos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.c – antes de Cristo

d.c- depois de Cristo

ALA- Ácido aminolevulínico

ALAD- Desidratase do Ácido aminolevulínico

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry

ATP- Adenosina trifosfato

CAT- Catalase

CT- Controle

CPIII- Coproporfirina III

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DNPM- Departamento Nacional de produção Mineral

EO- Estresse oxidativo

ERO- Espécies reativas de oxigênio

IBMP- Índice permitido máximo

ICZ- Instituto de metais não ferrosos

GGT-Gamaglutamiltransferase

GSH- Glutathione reduzida

GSSG- Glutathione Oxidada

GSH-Px- Glutathione peroxidase

Hg- Hemoglobina

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

LDH- Lactato desidrogenase

Na- Sódio

NO₃- Peroxinitrito

K- Potássio

O₂- Oxigênio

O₂[•]- Radical superóxido

OH- Radical hidroxil

OMS- Organização Mundial de Saúde

Pb- Chumbo

PBS- Sulfeto de chumbo

PPIX- Protoporfirina IX

RDW- Red Cell Distribution Width

RL- Radicais Livres

RNA- Ácido Ribonucleico

ROO⁰- Radical peroxil

SOD- Superóxido dismutase

-SH- Grupos sulfidrilas

-SS- Pontes de dissulfeto

TBA-RS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGO- Transaminase glutâmico oxalacética

TGP- Transaminase glutâmico pirúvica

TSH-Hormônio tireoestimulante

T4L- Tiroxina 4 livre

VCM- Volume corpuscular médio

ZPP- Zinco protoporfirina IX globina

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 INTERDISCIPLINARIEDADE	18
4 REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 METAIS PESADOS.....	19
4.2 CHUMBO: ASPECTOS GERAIS	20
4.2.1 Fontes de Emissão.....	21
4.3 EFEITOS DO Pb NA BIOTA.....	25
4.4 TOXICOCINÉTICA DO Pb	27
4.4.1 Absorção do Pb.....	27
4.4.2 Distribuição do Pb.....	28
4.4.3 Eliminação do Pb	30
4.5 TOXICIDADE DO Pb.....	30
4.5.1 Efeitos Neurológicos.....	32
4.5.2 Efeitos Hematológicos.....	33
4.5.3 O Pb e o Sistema Hepático	37
4.5.4 O Pb e a Função Tireoidiana	38
4.5.5 O Pb e a função Renal.....	41
4.6 O Pb E O ESTRESSE OXIDATIVO	42
4.6.1 Radicais Livres	44
4.6.2 Propriedades dos radicais livres	46

4.6.3 Estresse Oxidativo	48
4.6.4 Sistema de defesa Antioxidante	52
4.6.4.1 Propriedades dos Antioxidantes enzimáticos	52
4.6.4.2 Sistema de defesa não enzimático.....	54
5 ARTIGO CIENTÍFICO	54
6 METODOLOGIA	55
6.1 MODELO EXPERIMENTAL	55
6.1.1 Animais.....	55
6.1.2 Tratamento	56
6.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	58
6.2.1 Preparação do sangue total.	58
6.2.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma	58
6.2.3 Preparação do tecido	58
6.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS	59
6.3.1 Análise dos parâmetros Hematológicos	59
6.3.2 Análise da Concentração de Chumbo	59
6.3.3 Análise dos Parâmetros de Estresse Oxidativo e de Atividade Enzimática.....	60
6.3.3.1 TBA-RS	60
6.3.3.2 Proteínas Carboniladas	60
6.3.3.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas	61
6.3.3.4 Catalase (CAT).....	61
6.3.3.5 Glutathione Peroxidase (GSH-PX)	61
6.3.3.6 Superóxido Dismutase (SOD)	62
6.3.3.7 Ensaio da Atividade da Acetilcolinesterase	62
6.3.3.8 Na ⁺ K ⁺ -ATPase	62
6.3.3.9 Dosagem de Proteínas.....	63

6.3.4 Dosagem dos Hormônios Tireoidianos.....	63
6.3.5 Dosagem das enzimas TGO, TGP E GGT.....	63
6.3.6 Dosagem de LDH.....	63
6.3.7 Dosagem de Potássio	64
6.3.8 Dosagem de Creatinina e Ureia.....	64
6.3.9 Análise estatística	64
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
7.1 ARTIGO I.....	65
7.2 ARTIGO II.....	87
7.3 ARTIGO III.....	125
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERÊNCIAS.....	147

1 INTRODUÇÃO

A exposição das populações humanas a uma variedade de metais tóxicos encontrados no meio ambiente é um problema de saúde pública e devido ao amplo emprego industrial destes metais, a exposição ocupacional constitui uma das principais formas de intoxicação (FLORA, G. et al., 2012). Dentre os metais pesados tóxicos de maior preocupação está o chumbo (Pb) (LU, Y. et al., 2015). Os efeitos da intoxicação por Pb são conhecidos desde a antiguidade e tornou-se foco de pesquisas no século 18, durante a revolução industrial quando este metal foi amplamente utilizado devido as suas qualidades (SUDJAROEN; SUWANNAHONG, 2017).

Há um crescente interesse no papel da exposição ao Pb ocupacional e ambiental, principalmente pelo fato deste metal não apresentar caráter de biodegradabilidade (ARANTES et al., 2016). Uma vez introduzido no organismo, o Pb é capaz de bioacumular-se e promover uma série de disfunções em sistemas como o hematopoiético, hepático, renal e principalmente no sistema nervoso central (CHEN et al., 2015). Muitas medidas de prevenção contra a exposição ao Pb já foram aceitas em todo o mundo, como a eliminação do Pb da gasolina, em tintas e pigmentos. No entanto, as principais fontes antropogênicas de Pb permanecem, tais como atividades de mineração, fundição, fabricação artesanal de cristais, indústrias cerâmicas, baterias automotivas, e nos últimos anos o gerenciamento impróprio de resíduos sólidos, representando uma ameaça para o ecossistema e a saúde humana devido à liberação contínua de metais pesados tóxicos (AGRAWAL et al., 2015).

Os principais países produtores de Pb primário são os países que possuem as maiores reservas naturais como a China, Austrália, Estados Unidos, Peru e Rússia. O Brasil possui pequena reserva, representando somente 0,2% da produção mundial, sendo em sua maior parte obtida a partir de reciclagem de material utilizado, especialmente de baterias automotivas (BRAZIL, 2006). O estado de Santa Catarina tem a região Sul afetada pela contaminação por Pb devido à extração mineral e produção de energia a partir da queima do carvão através das termelétricas. Esta região possui ainda indústrias de produtos químicos, tais como tintas e cerâmicas, que possuem potenciais fontes ocupacionais de exposição ao Pb (LIMA et al., 2001).

Vários estudos têm indicado a prevalência de alterações em alvos bioquímicos causados pelo Pb. Um dos mecanismos pelos quais o Pb exerce seu efeito tóxico está associado à indução do estresse oxidativo (EO) (ANTONIO-GARCI, 2008; ERGURHAN-ILHAN et al., 2008; SIRIVARASAI et al., 2015; MATOVIĆ et al., 2015a; ABDULMAJEED et al., 2016). Estudos relacionados aos efeitos hematológicos revelam que o sistema hematopoiético sofre os primeiros efeitos adversos observados clinicamente, levando a anemia de leve a moderada em adultos e em crianças com características mais severas (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004; MINOZZO et al., 2009; CHEN et al., 2015; KALAHASTHI; BARMAN, 2016; DAI et al., 2017). Com relação ao fígado, estudos experimentais demonstram aumento da atividade das enzimas hepáticas indicando dano à membrana dos hepatócitos, comprometendo assim a função hepática (JEON et al., 2015; MATOVIĆ et al., 2015b; XU et al., 2016) e no sistema renal as pesquisas caracterizam uma redução da função do rim devido a disfunção tubular reversível e nefropatia intersticial irreversível em casos de níveis altos de intoxicação (CHEN et al., 2011; CONTERATO et al., 2014; LU, Y. et al., 2015). O Pb pode estar envolvido na formação deficitária dos hormônios tireoidianos através de mecanismos como a interrupção do transporte de iodo e inativação de enzimas (PEKCICI et al., 2010; HENRICHS et al., 2010; LUO; HENDRYX, 2014; KAHN et al., 2014; JURDZIAK et al., 2017). Embora seja bem conhecido que o Pb exerça efeitos tóxicos sobre o sistema hematopoiético, hepático e renal poucos estudos tem correlacionado a interferência deste metal na formação dos hormônios tireoidianos e ainda não há consenso nos resultados encontrados. Este estudo sugere que o EO esteja envolvido no mecanismo de toxicidade do Pb, mas maiores estudos ainda são necessários para buscar alternativas na prevenção ou tratamento para tais agravos. Uma possível fonte para diversidade de descobertas podem ser as diferenças no tempo de exposição, concentração de Pb utilizada nos modelos experimentais, via de exposição que levam a diferentes formas de absorção e intensidade da exposição ao Pb em diferentes indivíduos. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações hematológicas, de EO, as alterações hormonais relacionadas à tireoide e a função hepática e renal em modelo experimental animal que apresenta vantagens sobre o fornecimento de informações do organismo como um todo. Assim, ratos Wistar de 60 dias foram expostos por 35 dias a três concentrações diferentes de Acetato de Pb para

aproximar-se da reprodução de uma ampla faixa de exposição semelhantes aos diferentes graus de exposição ocupacional que atingem seres humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações hematológicas, de estresse oxidativo, as alterações hormonais relacionadas à tireoide e a função renal e hepática em ratos Wistar de 60 dias expostos por 35 dias frente a três concentrações diferentes de Acetato de chumbo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a concentração de chumbo em tecido (fígado) dos animais, ao final dos 35 dias de exposição.
- 2) Avaliar os parâmetros hematológicos da linhagem vermelha ao final dos 35 dias de exposição.
- 3) Verificar o efeito da exposição ao Pb sobre substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e carbonilas em plasma, fígado, rim e estruturas cerebrais (cerebelo, córtex cerebral e hipocampo) de ratos de 60 dias de idade;
- 4) Verificar o efeito da exposição ao Pb sobre a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos, fígado, rim e estruturas cerebrais de ratos de 60 dias de idade;
- 5) Verificar o efeito da exposição ao Pb sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e Na^+K^+ -ATPase em estruturas cerebrais de ratos de 60 dias de idade;
- 6) Avaliar a concentração de hormônio tireoestimulante (TSH) e tiroxina 4 livre (T4L) em soro de ratos de 60 dias de idade após exposição ao Pb;
- 7) Avaliar as dosagens de lactato desidrogenase (LDH), ureia, creatinina e de potássio ao final de 35 dias de exposição ao Pb em ratos de 60 dias de idade;

8) Verificar as dosagens de transaminase glutâmicas oxalacéticas (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e gamaglutamiltransferase (γ GT) ao final de 35 dias de exposição ao Pb em ratos de 60 dias de idade;

3 INTERDISCIPLINARIEDADE

A poluição ambiental por metais pesados é um dos graves problemas enfrentados pela população mundial, estando presente nas regiões industriais e agrícolas. O Pb é um dos metais pesados mais encontrado na natureza. As principais fontes de emissão para o ambiente provêm de ações antrópicas onde se destacam as fábricas de baterias automotivas, as ligas metálicas, os pigmentos de tintas, as fábricas de projéteis, a mineração, a fundição e o aditivo antidetonante para gasolina. Alguns compostos de Pb utilizados na indústria foram reduzidos ou eliminados, tendo como maior exemplo a proibição como aditivo na gasolina adotada em muitos países. Embora o uso tenha sido reduzido ou eliminado, os componentes de Pb utilizados em diversos compartimentos ambientais e consequentemente a exposição humana deixaram um passivo ao meio ambiente bastante significativo e seus efeitos tóxicos levam a intoxicação a este metal a ser considerada pela OMS como um sério problema de saúde pública.

Atualmente estamos diante de um sério problema com a formação de lixões tecnológicos poluindo com metais pesados solos e rios. A intoxicação por Pb apresenta elevada toxicidade ao organismo, atuando sob vários alvos bioquímicos, afetando assim muitos sistemas do organismo.

Devido ao exposto, faz-se necessário pesquisas, como deste projeto, a fim de se esclarecer os mecanismos envolvidos na intoxicação causada pelo Pb, onde o conhecimento de áreas como a toxicologia, biologia, bioquímica, hematologia e endocrinologia possam trabalhar de forma interdisciplinar no estudo de tratamentos, e principalmente na busca de soluções para a diminuição do uso do Pb como agente intoxicante, visando um futuro sustentável do meio ambiente e dos indivíduos sem o comprometimento de gerações futuras.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 METAIS PESADOS

Os metais pesados são identificados como elementos químicos de densidade maior que 5g/cm (FLORA, G. et al., 2012). Esses elementos são encontrados naturalmente no ambiente, em concentrações muito baixas, devido a processos pedogênicos em rochas, ação do intemperismo e no material de origem do solo (MANZINI, 2010). Entre os principais metais pesados encontram-se alguns essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até o ser humano como o sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio. Embora considerados essenciais para o desempenho de vários processos bioquímicos, todos são considerados potencialmente tóxicos quando encontrados em concentrações elevadas. Enquanto outros, como arsênico, Pb, cádmio, mercúrio, titânio, estanho e tungstênio não possuem funções biológicas conhecidas e geralmente prejudicam os organismos por interagir formando complexos estáveis e danificando sistemas biológicos. A ação tóxica dos metais pesados está diretamente associada à dose, tempo de exposição, forma física e química do elemento, via de absorção e organismo vivo envolvido (SILVEIRA; PERES, 2013). Um sério problema ambiental está relacionado às características dos metais pesados que apresentem alta reatividade e são bioacumuláveis, ficando retidos no ecossistema. Esses metais pesados, quando absorvidos pelo organismo interagem com as proteínas sendo transportados pelo sangue até os tecidos onde podem ser biotransformados ou estocados (ARANTES et al., 2016).

A ação tóxica destes metais acontece por dois mecanismos de ação: formação de complexos com grupos funcionais das enzimas e a combinação com as membranas celulares alterando ou impedindo o transporte de substâncias essenciais. Alguns destes metais podem ainda competir com metais essenciais unindo-se a sítios fisiológicos, mimetizando a sua função e assim originando a bioacumulação destes metais pesados no organismo. Os efeitos tóxicos exercidos podem incluir a morte do organismo e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (FLORA, G. et al., 2012).

4.2 CHUMBO: ASPECTOS GERAIS

O Pb (do latim *plumbum*) é um elemento químico de símbolo Pb, número atômico 82, número de massa 207,19 e densidade específica de 11,35. É um metal azulado ou cinza-prateado que apresenta dois estados de oxidação +2 e +4, sendo mais comum o primeiro. Na tabela periódica pertence ao grupo 14 ou IVA. Este metal possui ponto de fusão de 327,5°C e ponto de volatilização de 1740°C, segundo dados da Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR) (ASTDR,2011). O Pb é o metal tóxico mais ubíquo, detectável em todos os sistemas do meio ambiente. Ocorre na crosta terrestre com uma concentração média de 13mg/Kg. Existem áreas dispersas no globo, naturalmente enriquecidas em Pb, como rochas fosfatadas e sedimentos marinhos. Pode ser encontrado tanto no estado livre como em associação com outros elementos químicos. A principal fonte natural de Pb é o minério galena, uma combinação com o enxofre formando sulfeto de Pb (PbS). O Pb pode estar presente em concentrações traços no carvão, petróleo e associado aos minerais de outros metais. (LI et al., 2016). Antigas civilizações já utilizavam o Pb sob várias formas, como a população do Império Romano, no século V a.C, utilizando as reservas da Península Ibérica para área de engenharia sanitária, confeccionando tubulações e torneiras para o transporte de água, fabricação de utensílios domésticos como jarras e copos, produtos de beleza e também para correção da acidez no vinho, através da adição de acetato de Pb (açúcar de Pb).

A peça mais antiga de Pb descoberta pelos arqueólogos data de 3800 a. C e está em exposição no Museu Britânico, segundo dados do Instituto de Metais Não Ferrosos (ICZ). Há evidências de que os chineses já manipulavam este metal por volta de 3000 a. C e os fenícios em 2000 a. C. Os alquimistas consideravam o Pb o mais velho dos metais e associava este metal ao planeta Saturno, motivo pelo qual até os dias de hoje a intoxicação pelo Pb é conhecida como Saturnismo.

Os alemães a partir de 700 d.C. iniciam a exploração do Pb, juntamente com a prata, nas minas existentes nas montanhas de Hartz, no vale do Reno e na Boêmia a partir do século XIII. A Grã-Bretanha prospera com indústrias de fundições deste metal a partir do século XVII (ICZ, 2016)

4.2.1 Fontes de Emissão

Os níveis de Pb no meio ambiente advêm de pequenas contribuições dos processos naturais como intemperismo das rochas, formação de aerossóis continentais, marinhos ou emissões vulcânicas. As principais fontes de emissão para o ambiente provêm de ações antrópicas onde se destacam as fábricas de baterias de automóveis, as ligas metálicas, os pigmentos de tintas, as fábricas de projéteis, a mineração, a fundição, aditivo antidetonante para gasolina e atualmente o lixo eletrônico (CHEN et al., 2015). As características físico químicas deste metal como alta resistência a corrosão, boa ductilibilidade, apresentar-se sólido a temperatura ambiente e ser um mau condutor elétrico fazem do Pb um elemento importante para fabricação de forros para cabos elétricos, tubulações conduítes, soldas para dispositivos elétricos, radiadores de automóveis, inseticidas e mantas protetoras para aparelhos de raios-X, blindando a radiação. Alguns compostos de Pb podem ainda ser adicionados às cerâmicas, plásticos, vidros e argamassas, conforme descrito na figura 01 (ASTDR, 2011).

Novos compostos organoplúmbicos têm-se desenvolvido na última década para aplicações como catalisadores na fabricação de espumas de poliuretano, como agente inibidor de incrustações presente nas tintas utilizadas em cascos de navio, como agentes biocidas contra bactérias gram positivas, protetor para madeiras contra ataque das brocas e fungos marinhos, preservadores de algodão contra a decomposição e do mofo, agentes anti-helmínticos e molusquicidas. O Pb tem sido utilizado também como agente redutor do desgaste nos lubrificantes e inibidores da corrosão do aço (BRAZIL, 2006)

Figura 1: Compostos Orgânicos de Pb e sua utilização

COMPOSTOS ORGÂNICOS DE Pb		
Acetato de Pb	$\text{Pb} (\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	tinturas de cabelo
Estearato de Pb	$\text{Pb} (\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)_2$	secante (lacas, vernizes, graxas, ceras)
Chumbo tetraetila	$\text{Pb} (\text{C}_2\text{H}_5)_4$	antidetonante para gasolina, reações de etilação
Chumbo tetrametila	$\text{Pb} (\text{CH}_3)_4$	antidetonante para gasolina

Fonte: ASTDR, 2011

Na última década, as reservas mundiais atingiram 87 Mt (milhões de toneladas) e as brasileiras 127 Kt (mil toneladas), representando uma pequena percentagem da reserva global. A produção mundial de minério/concentrado de Pb chegou a 5,5 Mt no último ano (SILVA; TEIXEIRA, 2009). Os principais países produtores de Pb primário são os países que possuem as maiores reservas do mundo como a China, produzindo 2,9 Mt, a Austrália, 720 Kt, os Estados Unidos da América (EUA), 355 Kt, o Peru, 270 Kt e a Rússia, com produção de 159 Kt. A produção brasileira de concentrado de Pb, segundo o Departamento Nacional de produção Mineral (DNPM), no ano de 2016 foi de 11 Kt, representando 0,2% da produção mundial. O Brasil não possui produção primária de Pb metálico refinado. O concentrado de Pb produzido no país é subproduto do Zinco, produto principal da Mina Morro Agudo em Minas Gerais (GEOLOGIA et al., 2010). A grande produção de Pb no Brasil é conhecida como produção secundária, obtida a partir de reciclagem de material usado especialmente de baterias automotivas, indústrias e telecomunicações. As usinas refinadoras estão localizadas nas regiões Nordeste (PE), Sul (RS e PR) e Sudeste (SP, RJ e MG) com uma capacidade instalada em torno de 160 Kt/ano (BRAZIL, 2006).

O estado de Santa Catarina tem a região Sul afetada pela contaminação por metais pesados, dentre eles o Pb. Esta região do estado possui como uma de suas características econômicas a indústria de extração mineral, bem como a produção de energia a partir do carvão através de termoeletricas. O perfil econômico do Sul do estado de Santa Catarina caracteriza-se ainda pela indústria de produtos químicos, tais como tintas e cerâmicas, que possuem potenciais fontes ocupacionais de exposição ao Pb (LIMA et al., 2001).

Atualmente o Pb é reconhecido como um poluente global, pois está presente em toda a biosfera. O uso extensivo de compostos orgânicos como o Pb tetraetila e tetrametila como aditivos na gasolina (agente antidetonante) e o seu eficiente transporte atmosférico resultaram na presença deste metal em ecossistemas de todo o globo, mesmo distantes de fontes antrópicas ou naturais. Estes compostos orgânicos foram utilizados em diversos países por mais de 50 anos, chegando ao máximo de seu consumo até década de 70 (HERNBERG, 2000). O Brasil foi um dos países pioneiros a proibir a utilização do Pb como aditivo para gasolina, sendo eliminado totalmente em 1992. A especificação brasileira, semelhante à dos países que proíbem o uso do Pb, define um teor máximo de 0,005g/L. Esta quantidade não significa que ainda exista presença ou tolerância, sendo apenas o limite inferior de detecção do método de análise Standard Test (ANP N0 06/99, 1999).

Neste contexto, através deste método (Method for Lead in Gasoline by Atomic Absorption Spectroscopy) (ASTM D-3237), nas especificações mundiais onde aparece o limite de 0,005g/L, significa que as gasolinas são isentas de Pb de acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2016).

Entre as diversas aplicações do Pb, o uso em baterias pela indústria automotiva é responsável por 56% do total da sua produção, sendo a atividade antropogênica a que mais utiliza este metal (MAZOTO et al., 2014). As baterias, apesar dos avanços tecnológicos são os equipamentos mais eficazes para “armazenamento” de energia elétrica. As placas das baterias automotivas exigem um metal, como o Pb, de baixo ponto de fusão e alta resistência à corrosão e certas propriedades elétricas. Nessas baterias, conhecidas como acumuladores ácidos, o eletrodo negativo é de Pb poroso e o positivo de dióxido de Pb. A indústria de baterias é a maior fornecedora de Pb para reciclagem. Do Pb presente nas baterias, 80% pode ser recuperado em indústrias de fundição. (BASIT et al., 2015). No Brasil, uma das principais formas de

exposição e contaminação pelo Pb é a atividade de reciclagem de baterias automotivas quando o processo ocorre em pequenas indústrias que não utilizam a devida proteção aos trabalhadores. (COSTA et al., 2001).

Importantes atividades antropogênicas como indústrias metalúrgicas, fundições, incineradores de resíduos, usinas de produção de energia por meio de queima de carvão, ou óleo são fontes localizadas de Pb, levando a contaminação ambiental significativa. A maior parte desta contaminação, quando lançada ao solo e na água, tende a se concentrar próxima às fontes devido à baixa solubilidade dos composto de Pb em água. Entretanto, as emissões atmosféricas de Pb geram uma dispersão bastante significativa porque uma fração de 20% permanece em suspensão no ar por um longo tempo, podendo ser transportada para longas distâncias de suas fontes emissoras. O tempo de permanência do Pb na atmosfera e o alcance de sua contaminação são dependentes de fatores como topografia, força dos ventos, altura das chaminés das indústrias, concentração de material particulado presente e ocorrência de precipitação (BORGHINI et al., 2015).

Fontes importantes de exposição ao Pb nos dias de hoje acontecem pela ingestão de alimentos ou água devido a canalizações mais antigas que contém soldas de Pb sendo que o pH ácido da água pode levar ao deslocamento deste metal (CAMPBELL et al., 2016). O ato de levar as mãos à boca por crianças que vivem em ambientes contaminados, construções antigas pintadas com tintas à base de Pb, contaminações ocupacionais, poeiras de Pb transportadas para casa por trabalhadores industriais nas roupas e sapatos e ainda algumas atividades como pintura de vitrais e confecção de utensílios e obras de arte em cerâmica são consideradas importantes fontes de exposição (AYKIN-BURNS et al., 2003).

Mudanças ao longo do tempo em relação ao uso de compostos de Pb aconteceram em decorrência de estudos que demonstram sua toxicidade, assim como com outros metais (AHRENS et al., 2016). Alguns compostos de Pb utilizados na indústria foram reduzidos ou eliminados, como pigmentos em tintas, inseticidas, isolante de cabos e encanamentos e como aditivo na gasolina. Embora o uso tenha sido reduzido ou eliminado, os componentes de Pb utilizados em diversos compartimentos ambientais e consequentemente a exposição humana deixaram um passivo ao meio ambiente bastante significativo e seus efeitos tóxicos levam a intoxicação a este metal a ser considerada como um sério problema de saúde

pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o Pb como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana e classificada pela ATSDR como o segundo elemento dentre as substâncias mais tóxicas (ASTDR, 2016).

4.3 EFEITOS DO Pb NA BIOTA

O Pb tem como característica química marcante a baixa solubilidade no ambiente. Os sais inorgânicos de Pb precipitam e se depositam no solo e sedimentos adsorvendo fortemente as partículas. A biota pode incorporar o metal diretamente da deposição atmosférica ou de forma indireta após a sua transferência do solo ou da água para plantas e animais (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Estudos demonstram que plantas podem assimilar o Pb do ar e dos solos e que as características químicas dos solos como pH, concentração e matéria orgânica presente influenciam os teores de Pb acumulado (PREET et al., 2016). Os organismos consumidores bioacumulam os compostos de Pb, correspondendo à soma sucessiva da incorporação deste metal por via direta ou indireta, entretanto a biomagnificação ao longo da cadeia trófica é muito baixa, portanto não afetando organismos que não foram diretamente expostos. (HOFFMAN, 1994). Organismos aquáticos de baixos níveis na cadeia trófica apresentam uma maior acumulação de chumbo do que os de maiores níveis, devido à metabolização e excreção do Pb serem mais rápidas, não transferindo assim o metal, de um nível trófico para o próximo, mas estes fatos não significam ausência de perigo (CAVALCANTE, 2009).

Os organismos aquáticos também podem ser incorporados por Pb e condições ambientais como temperatura, salinidade, pH e teor de matéria orgânica dissolvida influenciam nesta incorporação. Ensaio com organismos aquáticos demonstram que sais inorgânicos de Pb apresentaram toxicidade para organismos marinhos em concentração maior que 500 mg/L e de água doce quando a concentração apresentava-se maior que 40 mg/L. A toxicidade menor em águas marinhas com maior força iônica se deve provavelmente à menor solubilidade do Pb nestas condições físico-químicas.

O Pb pode acumular-se na parede celular de bactérias e plantas superiores. A translocação do Pb incorporado pelas raízes para outras partes da planta é pequena, sendo a maior parte retida em raízes e folhas. Somente quando altas doses deste metal estão presentes aos solos (100mg/Kg a 1000 mg/Kg) é que

efeitos tóxicos na fotossíntese e crescimento são observados (ARANTES et al., 2016).

Em animais, a dieta é fator importante para a absorção do Pb, sendo a distribuição ligada diretamente com o metabolismo do cálcio. A absorção do Pb pela mucosa intestinal possivelmente envolve a competição destes minerais por um mesmo mecanismo de transporte (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004).

Estudos com golfinhos demonstraram transferência do Pb das mães para seus filhotes durante a gestação e lactação (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). O Pb atravessa a barreira placentária e durante a gestação, a absorção intestinal pode aumentar devido à maior mobilização do Pb dos ossos e contribuindo para a elevação da concentração deste metal.

Estudos com pássaros relatam que apenas níveis elevados de sais inorgânicos na dieta (maiores que 100 mg/Kg) apresentam toxicidade com efeitos como diarreia, anorexia e perda de peso. Por outro lado, o Pb metálico, principalmente na forma de fragmentos bélicos é altamente tóxico quando ingerido pelos pássaros. Em estuários próximos de empreendimentos industriais que utilizam Pb na forma de Pb tetrametila, foram observados incidentes com mortandade de pássaros, sendo que estes apresentam elevados níveis de Pb na forma organometálica em seus fígados. Nos dias de hoje estes incidentes diminuíram devido à proibição do uso do Pb tetrametila na gasolina (BORGHINI et al., 2015).

Nos peixes, o Pb acumula-se em maior quantidade nas brânquias e na pele devido à adsorção, e no fígado, nos rins e nos ossos acumula-se com o aumento da idade. Nos ovos de peixe o Pb está presente na superfície, não atingindo o embrião enquanto que em moluscos este metal se acumula nas conchas carbonáticas e não nos seus tecidos em proporção às concentrações de Pb nos sedimentos. Estudos mostram que nos estágios mais jovens dos peixes, estes são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos, apresentando sinais típicos como deformidade na espinha e o escurecimento na região caudal. (ARANTES et al., 2016). Além disso, a contaminação por Pb pode alterar a estrutura de comunidades biológicas por conta da susceptibilidade de populações presentes no ecossistema.

No Brasil, de acordo com a portaria MS 2914/2011, o limite para o Pb na água potável é de 0,01 mg/L. Nos EUA a abordagem é diferente, pois quando mais de

10% das amostras de água de uma estação de tratamento ultrapassar um valor de 0,0015 mg/L, mediadas são tomadas para reduzir os níveis de Pb (MS, 2011).

4.4 TOXICOCINÉTICA DO Pb

Existem dois grupos de compostos de Pb que apresentam diferenças quanto à toxicidade: o Pb inorgânico, como sais de Pb, e Pb metálico, e o Pb orgânico. A intoxicação pela forma inorgânica acontece predominantemente por via respiratória (rota mais importante na exposição ocupacional) e trato gastrointestinal. Esta forma de Pb inorgânico não sofre metabolização, mas é complexado com macromoléculas, sendo diretamente absorvido, distribuído e excretado (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004). Com relação ao Pb orgânico, a intoxicação é mais frequente através do Pb tetraetila e tetrametila, por apresentarem características lipossolúveis são facilmente absorvidos pela pele, trato gastrointestinal e pelos pulmões. Esta forma orgânica é metabolizada pelo fígado a Pb triálquil e Pb inorgânico, os quais são os responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (LUGATE; COSTA, 2013).

4.4.1 Absorção do Pb

A absorção do Pb no organismo é influenciada pela via de exposição, espécie química formada, dose, frequência, duração, solubilidade em água, e variações individuais fisiológicas como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional e ainda pela suscetibilidade do organismo exposto (ARANTES et al., 2016).

De acordo com Li et al. (2016), a ingestão deficitária de cálcio, ferro, fósforo e de proteínas pode influenciar um aumento da absorção de Pb, sugerindo a existência de um mecanismo adaptativo, pois a absorção se torna progressivamente menor à medida que a ingestão destes elementos aumenta. Já a ingestão de vitamina C reduz a absorção do Pb, provavelmente por facilitar a absorção do ferro. (LI et al., 2016).

Com relação à absorção do Pb pelo trato gastrointestinal, essa varia de 2% a 16% se ingerido com refeições, mas pode chegar a 60-80%, quando administrado em jejum. Nas condições de pH ácido do estômago, os ânions são importantes, no entanto, após a passagem do alimento para o intestino delgado, o metal liga-se a compostos orgânicos e a presença de ânions deixa de ser relevante (JUNIOR; JUNIOR, 2012).

As secreções gastrointestinais e as enzimas que participam da digestão possuem um papel significativo na conversão do Pb à forma disponível para ser absorvida. A absorção também é influenciada por diferenças funcionais que possam ocorrer, como o tempo exigido para o transporte do alimento no trato gastrointestinal (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004).

Importantes diferenças na absorção do Pb são observadas entre recém-nascidos, crianças e adultos. Estas diferenças resultam de características individuais na capacidade de absorver moléculas de determinado tamanho e na qualidade e quantidade de enzimas digestivas e secreção biliar (MAZOTO et al., 2014).

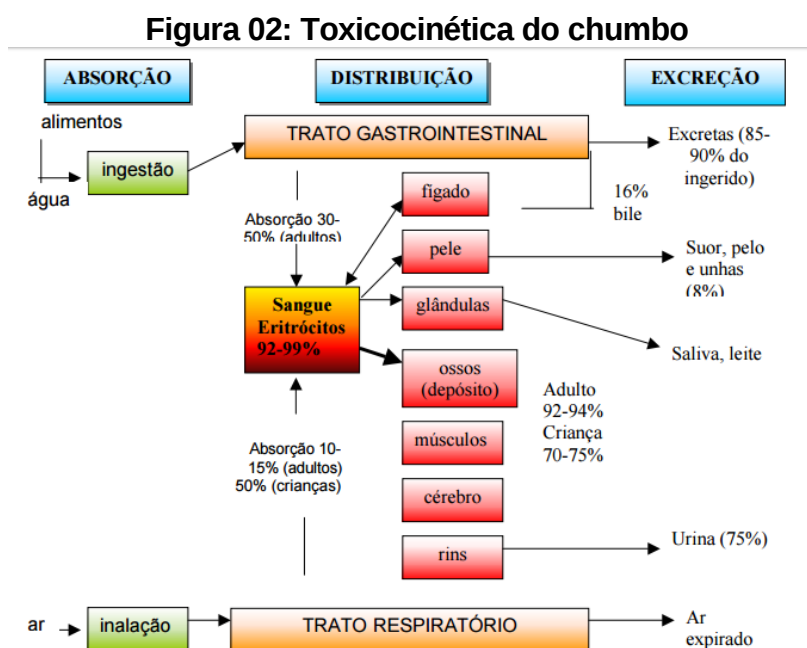
Os adultos sadios absorvem 5 a 15% do Pb ingerido e normalmente retêm menos de 5% do que absorvem. A absorção do Pb pelas crianças é maior que para os adultos, estimando-se uma média de 40 a 50%. As diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o acelerado desenvolvimento do sistema nervoso central, predispõem às crianças a maior absorção do Pb em relação aos adultos (LUGATE; COSTA, 2013).

4.4.2 Distribuição do Pb

Uma vez absorvido, o Pb se distribui entre o sangue, os tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos mineralizados como ossos e dentes (ATSDR, 2016). No compartimento sanguíneo o Pb tem uma meia-vida em torno de 36 dias e distribui-se de duas formas: uma delas não difusível, ligada aos eritrócitos e outra difusível no plasma. Em relação aos eritrócitos, o metal está associado em 95%, seja na superfície externa de suas membranas ou no meio intracelular ligado a proteínas, como a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e a hemoglobina (SAFETY, 2016). Os restantes 5 %, são encontrados no plasma de forma livre ou associados à albumina, a γ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo sulfidrilas (cisteína, hemocisteína e cisteamina), sendo esta a fração potencialmente tóxica do metal, por ser capaz de alcançar os tecidos moles e órgãos alvos (AHRENS et al., 2016).

Do sangue, o Pb distribui-se ligado as proteínas para os tecidos moles como cérebro, fígado, rins e testículo. No sistema nervoso central este metal tende a concentrar-se na matéria cinzenta e em determinados núcleos. As maiores concentrações são encontradas no hipocampo, seguidas pelo cerebelo, córtex cerebral e medula. A meia-vida do Pb nos tecidos moles é em torno de 40 dias (COSTA et al., 2001). O Pb atravessa a placenta, de modo que os níveis de Pb no sangue do cordão umbilical são normalmente correlacionados com os níveis de Pb no sangue da mãe, apresentando-se um pouco mais baixos. Devido à hemodiluição gestacional, a dosagem de Pb materno diminui ligeiramente durante a gravidez. A acumulação de Pb nos tecidos fetais, incluindo o cérebro, é proporcional aos níveis maternos deste metal no sangue. (LA-LLAVE-LEÓN et al., 2016). O Pb pode ainda depositar-se nos ossos fazendo uma substituição do íon Ca^{2+} por serem estes íons de tamanhos similares (BASIT et al., 2015). O tecido ósseo é o principal sítio de estocagem de longo prazo, de onde o metal pode ser mobilizado, constituindo uma fonte importante de exposição interna.

O Pb nos ossos pode contribuir com 50% do Pb sanguíneo, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (FLORA, G. et al., 2012). A toxicidade do Pb pode ser explicada em parte, à sua capacidade de imitar o cálcio e substituí-lo em muitos processos celulares fundamentais que dependem deste íon (LUGATE; COSTA, 2013). A meia-vida do Pb nos ossos é em torno de 20 a 30 anos (RAMOS; COSTA, 2004)(SUN et al., 2017).



Fonte: Moreira, 2004

4.4.3 Eliminação do Pb

O Pb é eliminado por várias rotas, e independente da via de absorção, a excreção renal (75-80%) e gastrointestinal (excreção biliar 15%) são as vias de maior importância. Outras vias de menor eliminação são saliva, suor, cabelo e unhas (< 8%) (WHO, 1995, ATSDR, 2007). Uma vez que a concentração do Pb na urina reflete exposição atual, a medida deste parâmetro é bastante utilizada em saúde ocupacional como um teste de exposição (FERREIRA et al., 2011). A quantidade de Pb excretada, independente da rota de absorção apresenta alterações com a idade, características de exposição e depende de cada espécie. Estudo realizado sobre cinética do Pb, em adultos e crianças, demonstrou que as crianças apresentam uma taxa de excreção menor. Crianças até 02 anos de idade retém 34% da quantidade total do Pb absorvido, enquanto que esta retenção é de apenas 1% nos adultos (AYKIN-BURNS et al., 2003).

Uma via de eliminação deste metal na forma endógena é por meio do leite materno variando entre 10 a 30% da plumbemia materna, pois o Pb não se concentra no leite por não ser lipofílico (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004). O Pb atravessa a barreira transplacentária, passando assim da mãe para o feto. Portanto a exposição pode acontecer ainda na vida intrauterina (JUNIOR; JUNIOR, 2012).

4.5 TOXICIDADE DO Pb

Os efeitos tóxicos do Pb geram uma continuidade de efeitos clínicos observados até aos efeitos sutis ou bioquímicos. Os efeitos críticos, ou mais sensíveis observados em jovens e crianças, encontram-se ao nível do sistema nervoso (AHRENS et al., 2016). Em adultos, as exposições profissionais excessivas ou exposição acidental levam a neuropatia periférica, nefropatia crônica e hipertensão. Importantes alterações no sistema hematopoiético fornecem indicadores bioquímicos de exposição ao Pb. Outros órgãos alvos dos efeitos da intoxicação pelo Pb são o sistema gastrointestinal e o sistema reprodutivo (MOREIRA, FÁTIMA R.; MOREIRA, 2004), (BASIT et al., 2015). Os efeitos tóxicos do Pb e a sua quantidade mínima no sangue na qual o efeito é provavelmente observado são demonstrados na tabela 01.

Tabela 01: Níveis mínimos onde foram observados efeitos para saúde relacionados ao chumbo

Concentração de Chumbo em (µg/dl)		
EFEITO	CRIANÇAS	ADULTOS
NEUROLÓGICOS		
Encefalopatia	80-100	100-120
Déficit auditivo	20	_____
Déficit de QI	out/15	_____
Efeitos in útero	out/15	_____
Neuropatia periférica	40	40
HEMATOLÓGICOS		
Anemia	80-100	80-100
U-ALA	40	40
B-EPP	15	15
Inibição ALA	10	10
Inibição Py-5-N	10	_____
RENAIS		
Nefropatia	40	_____
Metabolismo da vitamina D	<30	_____
Pressão sanguínea	_____	30
Reprodução	_____	40

Fonte: (Moreira, 2004)

4.5.1 Efeitos Neurológicos

Dados da literatura citam que alta exposição ao Pb em crianças pode levar a efeitos neurológicos, neurocomportamentais e de desenvolvimento, clinicamente conhecido como encefalopatia que tem como sintomas letargia, vômitos, irritabilidade, perda de apetite e tonturas, progredindo para ataxia e um reduzido nível de consciência que pode evoluir para coma e morte (HOSSAIN et al., 2016). Este quadro clínico é acompanhado de perda neuronal e por um aumento de células gliais. A recuperação é frequentemente acompanhada de sequelas, incluindo epilepsia, atraso mental, e alguns casos de neuropatia óptica e cegueira (SCHNUR; JOHN, 2014). Estudos referem um déficit de 2 a 4 pontos de QI por cada $\mu\text{g/dl}$ de aumento do Pb no sangue dentro dos limites de 5 a 35 $\mu\text{g/dl}$ (WHO, 2016). O aumento do nível de Pb no sangue materno pode também contribuir para a redução da duração gestacional e do peso do nascituro (HOSSAIN et al., 2016). O desenvolvimento neurológico é altamente complexo e o Pb pode interferir nesta etapa. Um efeito morfológico de grande importância é um enfraquecimento da programação alimpada das ligações intercelulares, modificando os circuitos neuronais (WOJCIK, 2012).

O Pb interfere com os mecanismos sinápticos de liberação de transmissores por competir com o cálcio e também o zinco nos processos dependentes destes íons a nível sináptico e leva ao enfraquecimento de vários sistemas neurotransmissores como o colinérgico, o noradrenérgico, gabanérgico e dopaminérgico. Concentrações micromolares de Pb podem ativar a proteína cinase C nos microvasos do cérebro. Esta cinase cálcio-dependente atua como segundo mensageiro na regulação do metabolismo celular. O enfraquecimento resulta na desintegração da barreira hemato-encefálica. Segundo Junior (2012), o cérebro fetal pode ser sensível aos efeitos tóxicos do Pb devido à imaturidade da barreira-encefálica (JUNIOR; JUNIOR, 2012). Estudos mostram que um efeito clássico da intoxicação pelo Pb é a neuropatia periférica que apresenta como sintomas a paralisia dos extensores do pé e da mão. Nessa patologia observa-se que o Pb causa uma desmielinização segmental e possivelmente a degeneração axonal seguida da degeneração das células de Schwann (BASIT et al., 2015).

4.5.2 Efeitos Hematológicos

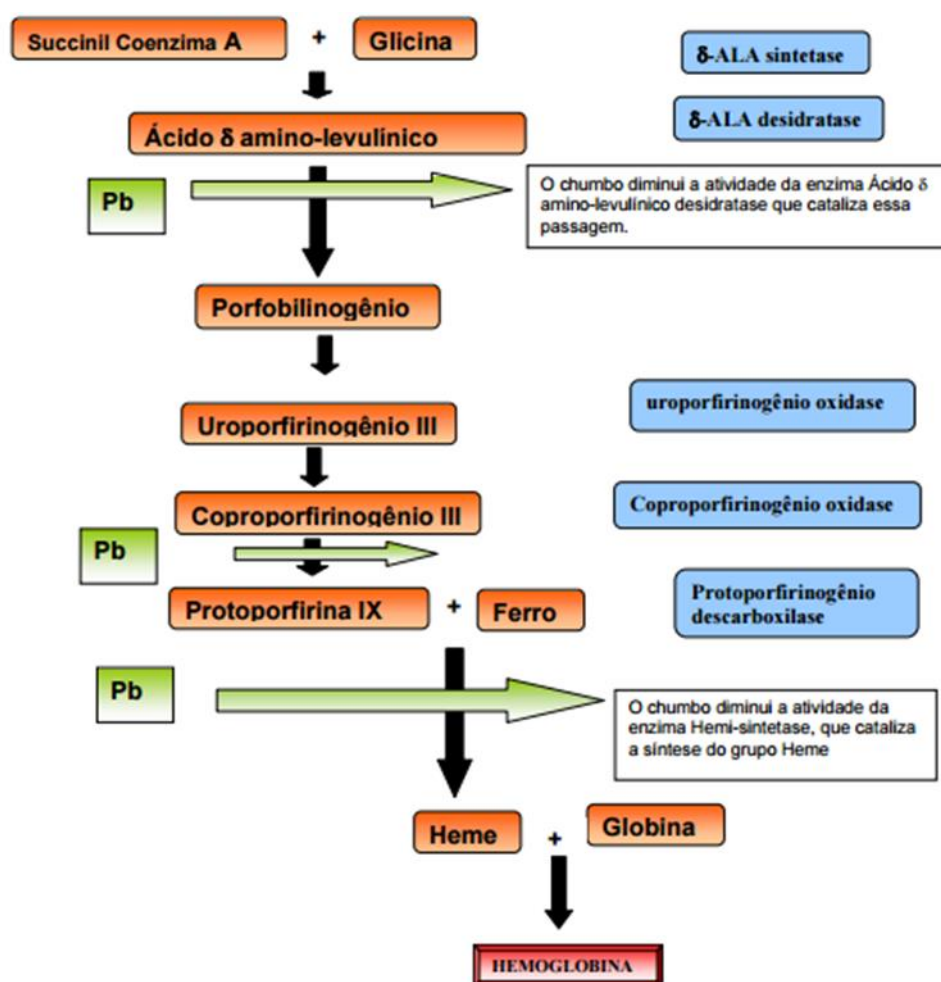
Com relação aos efeitos hematológicos, danos no sistema hematopoiético são os primeiros efeitos adversos observados nas intoxicações por Pb, levando a anemia de leve a moderada em adultos (os valores de hemoglobina variam de 8,0 a 12 g/dl) e algumas vezes podem ser severas em criança (MINOZZO et al., 2009), (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004). A toxicidade é devida a interferência do Pb em diferentes sistemas enzimáticos alterando a síntese do heme. O grupo Heme é essencial para todas as células aeróbicas e compõe a estrutura da hemoglobina e das hemoproteínas como mioglobina, citocromos, catalase e peroxidase (ARANTES et al., 2016). A síntese do grupo heme inicia a partir de moléculas de succinil coenzima A, proveniente do ciclo do ácido cítrico e oito moléculas de glicina, formando o primeiro intermediário, o ácido aminolevulínico (ALA) no interior da mitocôndria (SILVA, DA et al., 2001)(CALDEIRA et al., 2000).

A intoxicação pelo Pb, conhecida como Saturnismo, tanto aguda como crônica causa inibição da atividade da enzima pirimidina-5-nucleotidase e anemia hemolítica. A anemia resulta de dois defeitos básicos: redução do tempo de vida dos eritrócitos devido a maior fragilidade mecânica da membrana celular e enfraquecimento da síntese do heme devido à inibição da desidratase do ácido δ -aminolevulínico (ALA-D), via ligação direta deste metal com o grupo sulfidrila, essencial para a atividade catalítica desta enzima que previne a conversão do ácido δ -aminolevulínico em porfobilinogênio e ferroquelatase e que bloqueia a incorporação do ferro na protoporfirina IX para produzir o Heme, conforme demonstrado na figura 03. Os substratos do ALA, coproporfirinogênio/coproporfirina III (CPIII) e protoporfirina IX (PPIX) acumulam-se nos tecidos como efeito característico do Pb no organismo (FLORA, G. et al., 2012).

Devido ao seu baixo peso molecular, o ALA ultrapassa a barreira das membranas celulares, elevando-se no soro e sendo excretado na urina em quantidades crescente, o que leva a dosagem do ALA como um importante marcador biológico da intoxicação pelo Pb, utilizado principalmente em medicina ocupacional (BASIT et al., 2015). O índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) é de até 10,0 mg/g de creatinina (ARAUJO et al., 1999). Por outro lado, a PPIX não passa pelas membranas celulares, principalmente nos glóbulos vermelhos, onde se encontra 90% na forma de protoporfirinas eritrocitárias livres. Os 10% restantes são o CPIII e algumas uroporfirinas (MINOZZO et al., 2009).

Devido à inibição da síntese do heme, a PPIX acumulada produz a quelação dos íons zinco e manganês. Este complexo zinco-protoporfirina IX- globina (ZPP) formado nas células eritropoéticas aumenta na mesma proporção da exposição do organismo ao Pb, tornando-se um indicador funcional da disponibilidade de ferro durante a maturação eritrocítica. A intoxicação plúmbea, devido à inibição da síntese do heme apresenta um quadro semelhante à diminuição do ferro. O IBMP para o ZPP é de até 100 µg/dl segundo a Norma regulamentadora NR07, conforme descrito no Quadro 01.

Figura 03: Interferência do Pb na síntese do Heme.



Fonte: Leite e.M. A et al., Guia prático de monitorização biológica (1992)

De acordo com Failace (2015), o Pb inibe o transporte intracelular do ferro e o seu uso nas células eritropoiéticas, elevando assim o ferro nas células, no soro e na urina. O ferro não hemoglobínico (ferritina, hemossiderina) é então depositado nos eritrócitos com mitocôndrias danificadas e fragmentos impregnados de proteínas de alto peso molecular, além de ácido ribonucleico (RNA) e polissacarídeos que não são encontrados em eritrócitos normais. Este fenômeno resulta em formações conhecidas como pontilhados basófilos e podem ser visualizados por processo tintorial específico utilizado em exames de rotina como o hemograma (FAILACE, 2015).

A intoxicação por Pb também resulta na elevação dos reticulócitos devido à inibição da ribonuclease. Outros efeitos sobre os eritrócitos como inibição da atividade da ATPase na membrana, a perda de potássio e o nível reduzido de glutathione reduzem a vida média destes, levando há um aumento na produção destas células vermelhas, evidenciada pelo aumento de reticulócitos no sangue periférico e pela hiperplasia de células eritropoiéticas na medula óssea, com alterações na hemoglobinação, acúmulo do ferro não hemoglobínico e polissacarídeos, e ainda, evidencia-se o retardo na maturação da série vermelha. Estes efeitos na medula óssea refletem em indicadores precoces de efeitos similares em outros órgãos, como na síntese do citocromo hepático P450 que origina alterações importantes em crianças exposta de forma aguda ao Pb (LI et al., 2016).

**Quadro 01: Parâmetros para Controle Biológico da Exposição Ocupacional a
Alguns Agentes Químicos**

Agente Químico	Indicador Biológico		VR	IBMP	Método Analítico	Amostragem	Interpretação	Vigência
	Mat. Biológ.	Análise						
Anilina	Urina Sangue	p-aminofenol e/ou Metahemoglobina	Até 2%	50mg/g creat. 5%	CG E	FJ FJ0-1	EE SC+	
Arsênico	Urina	Arsênico	Até 10ug/g creat.	50ug/g creat.	E ou EAA	FS+T-6	EE	
Cádmio	Urina	Cádmio	Até 2ug/g creat.	5ug/g creat.	EAA	NC T- 6	SC	
Chumbo Inorgânico	Sangue Urina Sangue	Chumbo e Ác. delta amino levulínico ou Zincoprotoporfirina	Até 40ug/100 ml Até 4,5 mg/g creat. Até 40ug/100 ml	60ug/100 ml 10mg/g creat. 100ug/100 ml	EAA E HF	NC T-1 NC T-1 NC T-1	SC SC SC	
Chumbo Tetraetila	Urina	Chumbo	Até 50ug/g creat.	100ug/g creat.	EA A	FJ 0-1	EE	
Cromo Hexavalente	Urina	Cromo	Até 5 ug/g creat.	30ug/ creat.	EA A	FS	EE	
Diclorometano	Sangue	Carboxihemoglobina	Até 1% NF	3,5% NF	E	FJ 0-1	SC +	
Dimetilformamida	Urina	N-Metilformamida		40mg/g creat.	CG ou CLAD	FJ	EE	P-18
Dissulfeto de Carbono	Urina	Ác. 2-Tio-Tiazolidina		5mg/g creat.	CG ou CLAD	FJ	EE	P-25
Ésteres Organofosforados e Carbamatos	Sangue	Acetil-Colinesterase Eritrocitária ou Colinesterase Plasmática ou Colinesterase Eritrocitária e plasmática (sangue total)	Determinar a atividade pré-ocupacional	30% de depressão da atividade inicial 50% de depressão da atividade inicial 25% de depressão da atividade inicial		NC NC NC	SC SC SC	
Estireno	Urina Urina	Ác. Mandélico e/ou Ác. Fenil-Glioxílico		0,8g/g creat. 240mg/g creat.	CG ou CLAD CG ou CLAD	FJ FJ	EE EE	
Etil-Benzeno	Urina	Ác. Mandélico		1,5g/g creat.	CG ou CLAD	FS	EE	
Fenol	Urina	Fenol	20mg/g	250mg/g	CG ou	FJ 0-1	EE	

Fluór e Fluoretos	Urina	Fluoreto	creat. Até 0,5mg/g	creat. no início da jornada e 10mg/g creat. no final da jornada	CLAD IS	PP+	EE	
Mercúrio Inorgânico	Urina	Mercúrio	Até 5ug/g creat.	35ug/g creat.	EA A	PU T-12 12	EE	
Metanol	Urina	Metanol	Até 5mg/l	15mg/l	CG	FJ 0-1	EE	
Metil-Etil-Cetona	Urina	Metil-Etil-Cetona		2mg/l	CG	FJ	EE	P-12
Monóxido de Carbono	Sangue	Carboxihemoglobina	Até 1% NF	3,5 NF	E	FJ 0-1	SC +	
N-Hexano	Urina	2,5 Hexanodiona		5mg/g creat.	CG	FJ	EE	P-18
Nitrobenzeno	Sangue	Metahemoglobina	Até 2%	5%	E	FJ 0-1	SC +	
Pentaclorofenol	Urina	Pentaclorofenol		2mg/g creat.	CG ou CLAD	FS +	EE	
Tetracloroetileno	Urina	Ác. Tricloroacético		3,5mg/l	E	FS+	EE	
Tolueno	Urina	Ác. Hipúrico	Até 1,5g/g creat.	2,5 g/g creat.	CG ou CLAD	FJ - 1	EE	
Tricloroetano	Urina	Triclorocompostos Totais		40mg/g creat.	E	FS	EE	
Tricloroetileno	Urina	Triclorocompostos Totais		300mg/g creat.	E	FS	EE	
Xileno	Urina	Ác. Metil-Hipúrico		1,5g/g creat.	CG ou CLAD	FJ	EE	

Fonte: NR 07 Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994

4.5.3 O Pb e o Sistema Hepático

Com relação ao fígado, este é constituído por um grande grupo de células quimicamente reativas, com alta função metabólica, compartilhando substratos e energia. Este grupo de células é responsável pelo processamento e síntese de múltiplas substâncias que são transportadas para outras áreas do corpo para realizar inúmeras funções metabólicas (GUYTON, A. C; HALL, 2016). O meio ativo do fígado é bem conhecido por sua capacidade de detoxificar ou excretar na bile diversos fármacos ou xenobióticos como os metais que passam via bile para o intestino e assim são eliminados nas fezes (IBRAHIM et al., 2011). O Pb absorvido no estômago e no intestino delgado entra no fígado e no sistema circulatório através da veia porta (KASPERCZYK et al., 2013).

Os xenobióticos no fígado podem estar ligados a proteínas e submetidos à biotransformação mediada por enzimas microssomais que podem oxidar ou reduzir os compostos ou produzir conjugados. O citoplasma constitui a maior parte do hepatócito e contém enzimas como a aspartato aminotransferase (TGO) e a alanina aminotransferase (TGP), conhecidas como transaminases, e a isoenzima de lactato desidrogenase (LDH). Estas enzimas não são produzidas exclusivamente pelo fígado, porém é onde se encontram mais concentradas e são liberadas na circulação sanguínea quando a membrana do hepatócito está danificada. Estudos relatam que na intoxicação pelo Pb há um aumento na atividade destas enzimas, indicando dano à membrana dos hepatócitos, acompanhados de peroxidação lipídica, devido à formação de ERO (IBRAHIM et al., 2011; SOLIMAN et al., 2015). Por outro lado, algumas enzimas sofrem inibição, como a Na⁺ K⁺ ATPase, a ATP fosfohidrolase e a NAD sintetase. De acordo com Brattacharjee et al (2016), a colinesterase, enzima catalisadora da degradação da acetilcolina pode estar aumentada na intoxicação por Pb (BHATTACHARJEE et al., 2016).

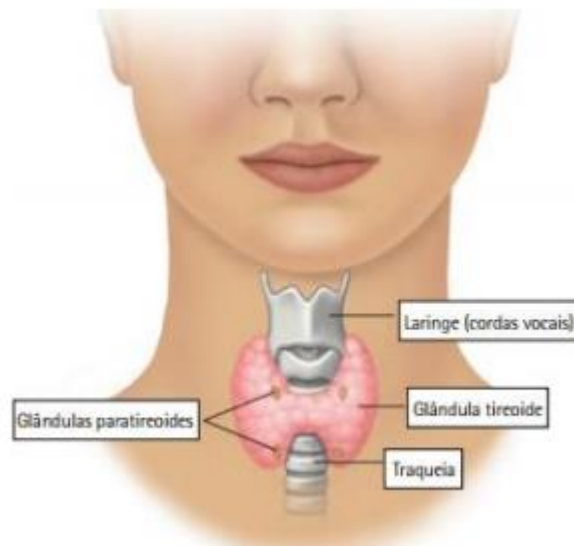
No fígado a intoxicação por metais pesados afeta os processos de biotransformação, observando-se redução na concentração do citocromo P450, podendo ocorrer hepatite tóxica em intoxicações severas (SOLIMAN et al., 2015).

Sob a influência da toxicidade do Pb, a conjugação da bilirrubina fica deficiente, segundo estudos que demonstram alteração no retículo endoplasmático por peroxidação dos lipídios. A bilirrubina tem um papel protetor contra estes danos oxidativos da membrana celular por estar ligada a albumina que faz o transporte dos ácidos graxos livres na circulação sanguínea, e acredita-se que a bilirrubina ligada à albumina evita a oxidação destes ácidos graxos, durante a exposição da proteína a ERO que causam a peroxidação lipídica (IBRAHIM et al., 2011).

4.5.4 O Pb e a Função Tireoidiana

De acordo com a literatura, a glândula tireoide é formada por dois lóbulos, direito e esquerdo, situados ântero-lateralmente à laringe e a traqueia, conforme demonstrado na figura 04. Esta glândula é composta de vários folículos fechados, que são preenchidos por uma substância secretora denominada coloide (GUYTON, A. C; HALL, 2016).

Figura 04: Localização anatômica da glândula tireoide e estruturas adjacentes



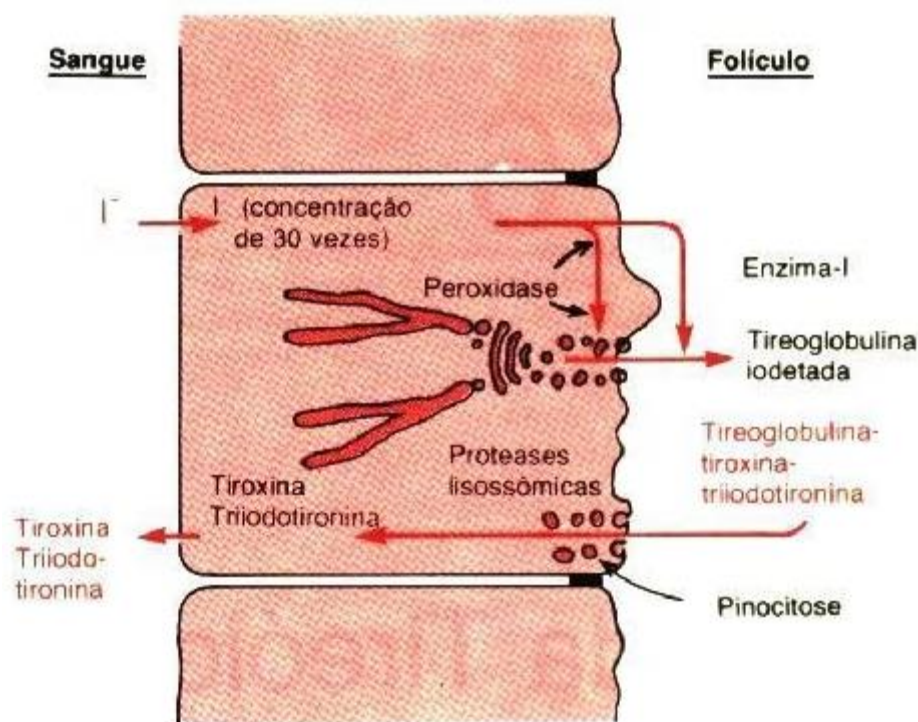
Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413979/2017/v18n1/a3446.pdf9979/2013/v18n1/a3446.pdf>

A formação dos hormônios secretados pela glândula tireoide tem início no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi das células cuboides que revestem os folículos, as quais secretam uma grande glicoproteína chamada tireoglobulina, que possui 70 aminoácidos tirosina em cada molécula. As tirosinas são os principais substratos e se combinam com o iodo para formar os hormônios tireoidianos tiroxina e triiodotironina (GERHARD et al., 1998). Para a formação destes hormônios é necessário a conversão dos íons iodeto para uma forma oxidada de iodo ou chamado iodo nascente. Esta conversão acontece porque desta forma o iodo consegue se combinar diretamente com a tirosina, pela ação da enzima peroxidase, acompanhada do H_2O_2 . A tirosina é iodada inicialmente para moniodotirosina e então para diiodotirosina. O acoplamento de uma molécula de moniodotirosina com uma diiodotirosina forma a tiiodotirosina (T3). O hormônio (T4) é formado quando moléculas de iodotirosinase acoplam uns aos outros, conforme observado na Figura 05.

Agentes químicos ambientais podem alterar a formação dos hormônios tireoidianos através de vários mecanismos, incluindo a interrupção do transporte de iodo e inativação da enzima peroxidase. Estudos realizados nos últimos anos demonstram que agentes químicos como bifenilospoliclorados, dioxinas e alguns pesticidas alteram as propriedades da glândula tireoide (LUO; HENDRYX, 2014). É possível que o sistema tireoidiano possa ser afetado por metais pesados como sugerem alguns estudos, mas os resultados obtidos em seres humanos são ainda escassos e inconsistentes (CHEN et al., 2013).

Estudos realizados em população com alta exposição ocupacional ao Pb relataram alteração do hormônio tireoestimulante (TSH) produzido na pituitária e níveis baixos de T3 e T3 livre (LI et al., 2016). De acordo com Wu et al (2016), em menor nível de Pb no sangue não foram encontrados efeitos significativos no metabolismo dos hormônios tireoidianos (WU et al., 2016).

Figura 05: Formação dos hormônios da tireoide



Fonte: Tratado de Fisiologia Médica- Guyton 13ª ed.

4.5.5 O Pb e a função Renal

O rim é um órgão primário de absorção do Pb e as alterações causadas pela intoxicação por este metal são caracterizadas por uma redução gradual da função renal e frequentemente hipertensão (LU, C. et al., 2015). Os efeitos tóxicos do Pb sobre os rins ocorrem na presença de níveis relativamente altos de Pb e se dividem principalmente em disfunção tubular renal reversível e nefropatia intersticial irreversível (SCHIFER et al., 2005). A disfunção reversível ocorre, na maior parte, em crianças sob exposição aguda, basicamente por via oral ao Pb e algumas vezes em trabalhadores expostos. As características da nefropatia aguda incluem corpos de inclusão nuclear, alterações fisiológicas na mitocôndria e citomegalia das células epiteliais dos túbulos proximais (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004). A nefropatia irreversível, um efeito direto da exposição crônica sobre os rins, é caracterizada por esclerose vascular, atrofia ou hiperplasia da célula tubular, fibrose intersticial progressiva, nenhum ou poucos corpos de inclusão e esclerose glomerular. A forma crônica é descrita principalmente em trabalhadores expostos, cuja exposição primária é por inalação. Em estágios iniciais dessa exposição excessiva, as alterações morfológicas e funcionais nos rins estão limitadas aos túbulos renais e são mais pronunciadas nas células tubulares proximais, cujos danos se manifestam por reabsorção reduzida de aminoácidos, glicose, fosfato e ácido cítrico (CHEN et al., 2011). Em casos severos, podem ocorrer hiperaminoacidúria, glicosúria e hipofosfatemia combinada com hiperfosfatúria. O diagnóstico de função alterada ou doença renal induzida por Pb é difícil, uma vez que não há indicadores específicos; os níveis de ureia e de creatinina no soro se tornam elevados somente depois da perda de dois terços da função renal (CONTERATO et al., 2014). Esses efeitos sobre a taxa de filtração glomerular e excreção de ácido úrico ocorrem em grupos de trabalhadores com média de Pb de mais de 52 a 72 $\mu\text{g.dL}^{-1}$. Os estudos já realizados fornecem evidências de que a nefropatia crônica está associada com níveis de Pb variando de 40 a mais de 100 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, enquanto que, em crianças, a nefropatia só ocorre com concentrações acima de 80 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, geralmente excedendo 120 $\mu\text{g.dL}^{-1}$. Há também evidências de uma associação entre a exposição ao Pb e a hipertensão, um efeito que pode ser mediado através dos mecanismos renais (MOREIRA, FÁTIMA RAMOS; MOREIRA, 2004).

4.6 O Pb E O ESTRESSE OXIDATIVO

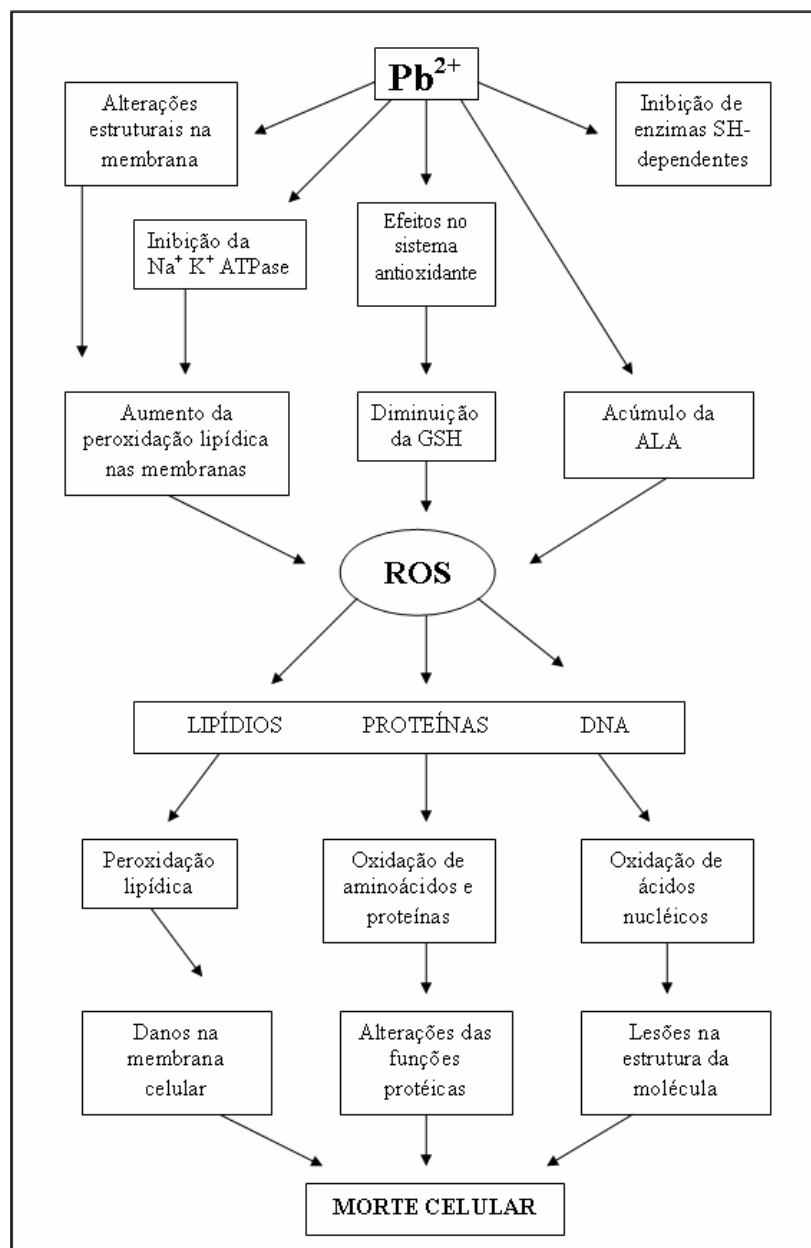
A toxicidade dos metais pesados envolvem mecanismos associados à indução de estresse oxidativo, seja por diminuir os níveis intracelulares de antioxidantes como a glutatona ou pela produção de ERO. Metais pesados, incluindo o Pb, afetam muitas enzimas, especialmente aquelas que possuem grupos sulfidrilas e no interior das células podem ocupar o lugar de elementos essenciais, como magnésio, cálcio, cobre e zinco (KAMIŃSKI; KURHALYUK, 2007).

A exposição aos metais pesados e sua correlação com a carcinogênese tem sido alvo de muitos estudos que demonstram o Pb como causa de reações mediadas por ERO, afetando a estrutura do DNA, causando peroxidação lipídica, modificação de proteínas, ativação de fatores de transcrição e distúrbios no sistema antioxidante da célula (AYKIN-BURNS et al., 2003)(FLORA, G. et al., 2012)(BORGHINI et al., 2015).

Alguns trabalhos têm demonstrado também que através de danos oxidativos o Pb pode induzir prejuízo cerebral por desregular o balanço oxidante/antioxidante das células nervosas (WEST et al., 1994; NEAL et al., 1997); (KAMIŃSKI; KURHALYUK, 2007).

A literatura mostra que o Pb é um agente tóxico para a estrutura e função das membranas celulares, principalmente em membranas de eritrócitos, pelo fato destas células apresentarem uma grande afinidade por este metal, sendo assim responsáveis por grande parte do metal presente na corrente sanguínea (HERNBERG, 2000).

Figura 06: Possíveis mecanismos pelos quais o Pb pode provocar estresse oxidativo.

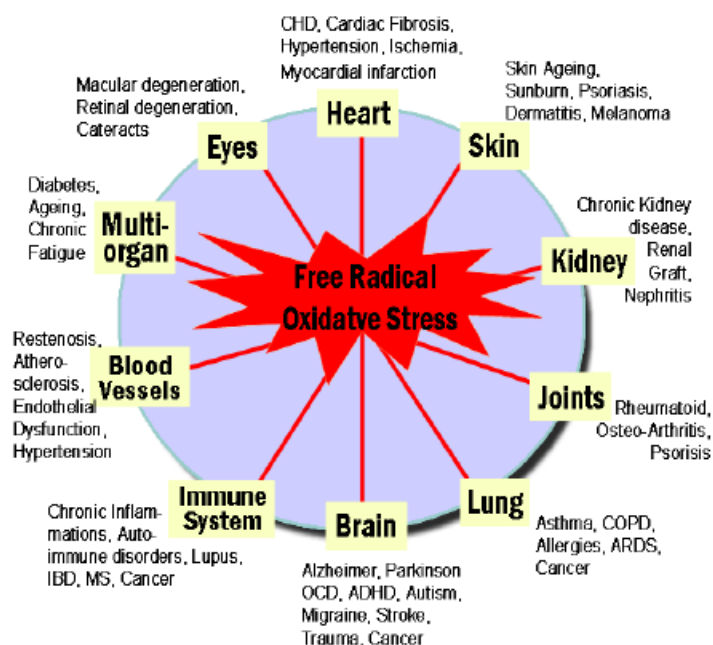


Fonte: GURER e HERCAL (2000).

4.6.1 Radicais Livres

O termo radical livre (RL) está relacionado ao átomo ou molécula altamente reativo, que apresenta número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo que este não emparelhamento de elétrons da última camada é o que confere alta reatividade (SHING et al., 2007). Os RL são formados em um cenário de reações de oxidação-redução, isto é, ou cede o elétron solitário, oxidando-se, ou recebe outro elétron, se reduzindo. Essa configuração eletrônica faz dos RL moléculas altamente instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente reativos. Devido à sua elevada reatividade, os RL podem capturar elétrons de outros compostos para atingir a estabilidade, assim a molécula atacada perde seu elétron e se torna um RL, dando início a uma reação em cadeia. Inerentes do metabolismo aeróbico, são importantes para as funções biológicas como a regulação do tônus vascular, e tem seu papel no aumento da transdução de sinais de vários receptores de membrana (DOBRAKOWSKI et al., 2016). Por outro lado, evidências encontradas em alguns estudos apontam à participação dos RL na patogênese e progressão de diversas doenças e processos fisiopatológicos como envelhecimento, aterosclerose (KAYAMA et al., 2015), obesidade (KEANEY, 2003) e inflamação (HO et al., 2015). Figura 07

Figura 07: Doenças relacionadas aos Radicais Livres

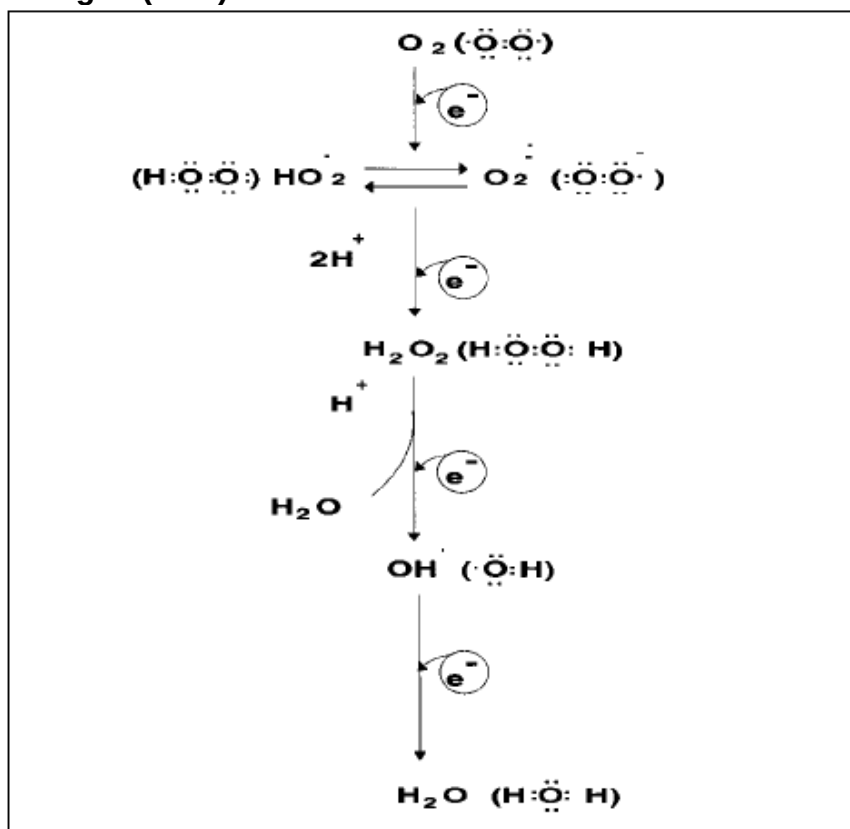


Fonte: <https://i.pinimg.com/originals/>

Dados mostram que quando as células utilizam oxigênio (O_2), elemento indispensável para vida, os RL são formados como derivados da produção de adenosina trifosfato (ATP), nas mitocôndrias, devido à cadeia transportadora de elétrons (KEHRER; KLOTZ, L., 2015). Estes subprodutos são ERO e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (RODRIGUES et al., 2014). O termo ERO representa o coletivo que incluem além dos RL, outras substâncias derivadas do O_2 , que não contém elétrons desemparelhados, mas que também possuem características quimicamente reativas (BRONCANO et al., 2009)

As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio. Na cadeia de transporte de elétrons, o O_2 sofre redução tetraivalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Neste processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 2013), conforme descrito na figura 08.

Figura 08: Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).



Fonte: (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

4.6.2 Propriedades dos radicais livres

RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$)

É formado após a primeira redução do O_2 , sendo o mais importante das ERO formado pelo processo enzimático de auto-oxidação e também por reações não enzimáticas de transferências de elétrons. Ocorre em quase todas as células aeróbicas, produzido dentro das mitocôndrias e sua reatividade em soluções aquosas é baixa. As enzimas envolvidas na produção de $O_2^{\cdot-}$ são a xantina oxidase, lipoxigenase, ciclo-oxigenase e oxidases dependentes de NADPH. Duas formas podem existir, tais como $O_2^{\cdot-}$ e radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$), que ocorre em pH baixo, representando a forma protonada do $O_2^{\cdot-}$, ou seja, possui o próton hidrogênio.

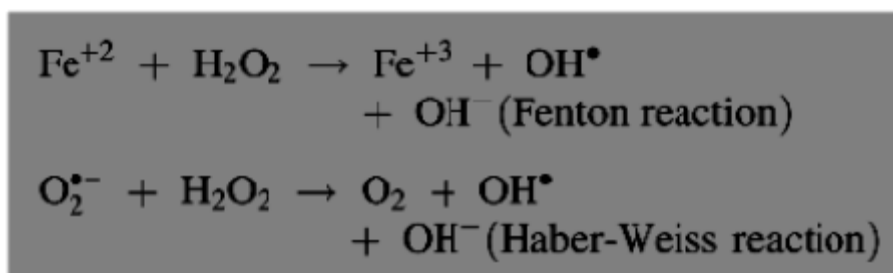
Existem evidências de que o $HO_2^{\cdot}$ é a forma mais reativa por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas, facilitando a entrada na camada fosfolipídica, onde muda para a forma carregada, $O_2^{\cdot-}$. Em condições de pH fisiológico, a forma mais comum é o $O_2^{\cdot-}$, podendo atuar como agente redutor de complexos de ferro, tais como o citocromo-C e ácido férrico-etileno diaminotetra acético. Pode atuar também como agente oxidante do ácido ascórbico e do tocoferol (FERREIRA; MATSUBARA, 1997); (KEHRER; KLOTZ, L.-O., 2015).

RADICAL HIDROXIL ($OH^{\cdot}$)

É considerado dentre as ERO a mais reativa, devido à combinação extremamente rápida do $OH^{\cdot}$ com metais ou outros radicais no próprio local onde é produzido. Pode reagir fortemente com moléculas orgânicas e inorgânicas, como o DNA, e se este estiver fixado em um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação do DNA (KEHRER; KLOTZ, L., 2015). O $OH^{\cdot}$ pode ainda inativar várias proteínas (enzimas e membranas celulares) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes de dissulfeto (-SS). Este radical pode também iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, acarretando lipoperoxidação (LUSHCHAK, 2012). Este radical é formado na reação de Fenton onde o H_2O_2 reage com íons de metais (Fe^{+2} ou Cu^{+}), geralmente ligados em complexos, com diferentes proteínas como a ferritina e a ceruloplasmina (proteínas transportadoras de ferro e cobre) ou outras moléculas.

Em condições de estresse, um excesso de $O_2^{\bullet -}$ libera ferro livre da ferritina e este metal livre participa na reação de Fenton para formar o $OH^{\bullet}$. O $OH^{\bullet}$ pode ainda ser formado em uma reação conhecida como Haber-Weiss onde o $O_2^{\bullet -}$ reage com o H_2O_2 (SCHNEIDER; OLIVEIRA, DE, 2004).

Figura 09: Reação de Fenton e Haber-Weiss



Fonte: Phaniendra, 2014

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 pode causar dano à célula em concentrações baixas (10 μM), e em níveis mais elevados pode inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Esta ERO tem vida longa e pode atravessar camadas lipídicas das membranas biológicas, pode ainda reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Ferro (Fe^{++}), sendo assim bastante tóxico para as células, pois esta toxicidade pode aumentar de dez para mil vezes quando houver a presença de ferro, como ocorre na hemocromatose transfusional. O H_2O_2 é formado *in vivo* em uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD); e as principais enzimas antioxidantes que podem eliminar o H_2O_2 são a catalase, glutational-peroxidase e as peroxirredoxinas (LUSHCHAK, 2012).

RADICAL PEROXIL ($ROO^{\bullet}$)

Este radical é derivado de oxigênio nos sistemas vivos. A forma mais simples de $ROO^{\bullet}$ é o radical peridroxil ($HOO^{\bullet}$) formado pela protonação do superóxido. Aproximadamente 0,3% do total de O_2 presente em uma célula típica estão na forma protonada. Ele é responsável por iniciar a peroxidação de ácidos graxos e está envolvido no desenvolvimento de tumores (SASSO et al., 2014).

PEROXINITRITO (ONOO•)

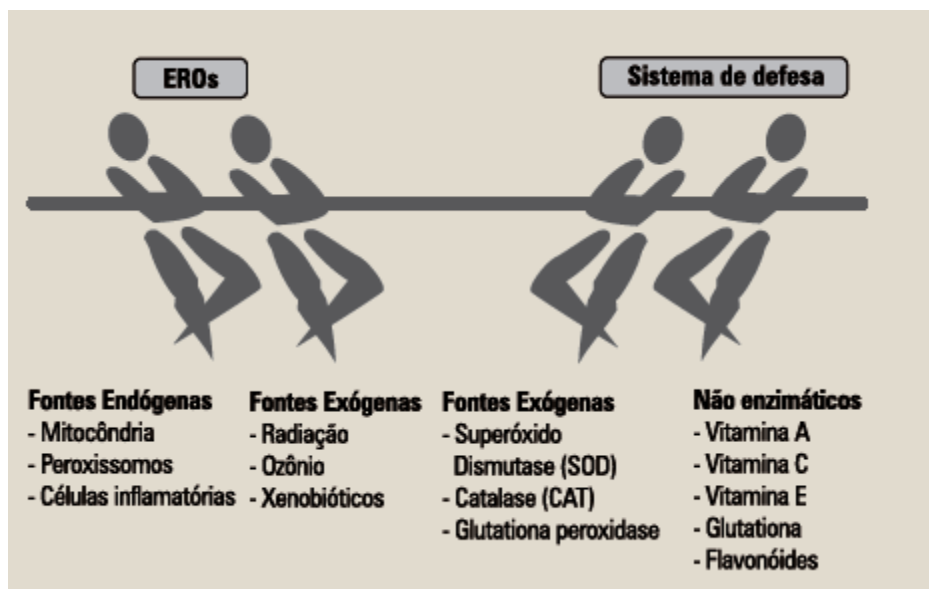
Formado pela reação entre $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico (NO). Altamente tóxico, pode reagir diretamente com o CO_2 para formar outro peroxi carboxilato nitroso bastante reativo ($ONOOCO_2$) ou ácido peroxinitroso (ONOOH) que pode sofrer uma ruptura homolítica formando $OH^{\bullet}$ e dióxido de nitrogênio (NO_2) ou ainda em uma reação para formar nitrato (NO_3). O ONOO• pode oxidar lipídeos, resíduos de metionina e tirosina em proteínas e o DNA para formar nitroguanina. Os resíduos de nitrotirosina podem ser utilizados como marcadores de danos celulares induzidos por ONOO• (LIMA, DE et al., 2012). O NO e ONOO• , juntamente com os íons nitrosônio (NO^+) e nitroxila (NO^-), são chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BARRA et al., 2010).

4.6.3 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é o termo utilizado para descrever os danos resultantes causados pelas ERO nas moléculas ou no organismo como um todo. O nível de EO é determinado pelo balanço entre a atividade pró-oxidante e a atividade antioxidante (LUSHCHAK, 2012). Sendo assim, podemos definir EO como o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, que resulta em aumento dos níveis de ERO e induz ao aumento de condições patológicas, por promover danos em muitos constituintes celulares, como lipídeos insaturados, DNA e proteínas. O balanço entre a produção e o consumo desses compostos é conhecido como regulação redox (RODRIGUES et al., 2014; SASSO et al., 2014; EGER et al., 2015).

A homeostase entre a formação e a degradação de ERO no organismo é mantida por moléculas e proteínas antioxidantes que removem as ERO e restauram o balanço oxidante/antioxidante (BREWER et al., 2013).

Figura 10: Equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante



Fonte: <http://cienciaecultura.bvs.br/>

De acordo com Santista et al (2005), fatores ambientais, como a poluição do ar, causam EO. As partículas inaladas com poluentes como o metal pesado Pb são altamente oxidantes e geram resposta inflamatória nos alvéolos, podendo até mesmo causar inflamação sistêmica com efeitos cardiovasculares (SANTISTA et al., 2005).

Os mecanismos pró-oxidantes estão relacionados tanto aos RL quanto as ERO e um dos principais mecanismos de lesão celular é a lipoperoxidação (XUE et al., 2011). A membrana celular é o componente das células mais suscetível à ação das ERO em decorrência da peroxidação lipídica que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade, levando a perda da seletividade na troca iônica e liberação de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído, levando muitas vezes a morte celular (PATLOLLA et al., 2011). A lipoperoxidação pode estar associada também aos mecanismos de envelhecimento; ao câncer, por causar o mau funcionamento do sistema de reparo do DNA; e ao aumento da toxicidade de xenobióticos, como o metal pesado Pb. (ABDEL-MONEIM et al., 2015).

Assim como a formação das ERO nem sempre é prejudicial, a lipoperoxidação possui produtos importantes na cascata da resposta inflamatória, a partir do ácido aracdônico, importante para formação das prostaglandinas (CUNHA, DA et al., 2011). Diversas funções fisiológicas são controladas por vias que envolvem sinalização da regulação redox, um exemplo é a produção aumentada de ERO em processos que envolvem adesão celular, como embriogênese, diferenciação, reparo e cicatrização. A apoptose programada, que regula o tempo de vida de células normais, pode ser induzida por ERO que atuam no DNA (VALKO et al., 2016).

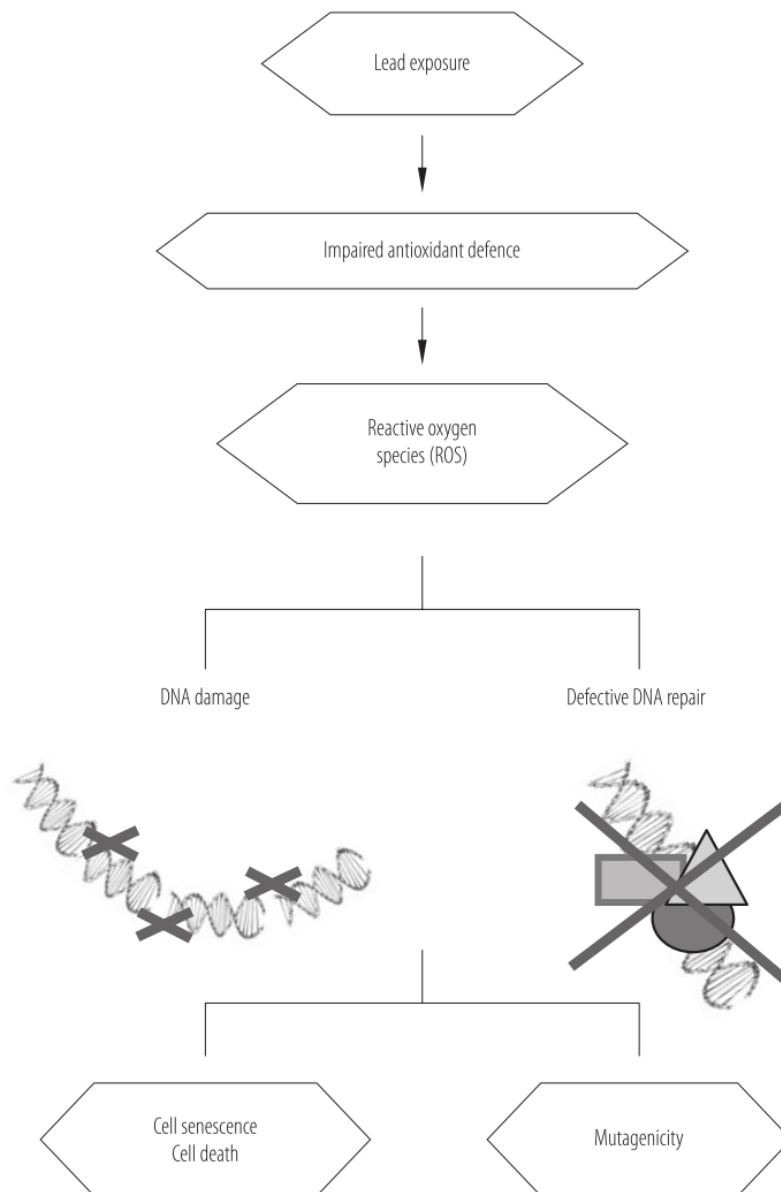
Outro mecanismo importante de lesão causado por ERO é o dano oxidativo ao ácidos nucleicos. O DNA mitocondrial é o mais vulnerável a ação das ERO, quando comparado ao DNA nuclear, pois está mais próximo do local gerador. O radical $\text{OH}^\bullet$ reage de forma direta com todos os componentes do DNA, tais como as bases purínicas e pirimídicas e também com o açúcar desoxirribose, resultando em quebras de cadeias simples e dupla do DNA. O $\text{OH}^\bullet$ abstrai átomos de hidrogênio para produzir uma série de bases de purinas bem como de pirimidinas modificadas, resultado de ligações cruzadas de proteínas no DNA (KAYAMA et al., 2015).

EROS podem lesar também diferentes RNAs, pois estes são mais propensos aos danos oxidativos do que o DNA, devido à sua natureza de cadeia simples. Estudos relatam que o produto 8-di-hidro-8-oxo-guanosina (8-oxoG), de dano ao RNA, encontra-se elevado em várias condições patológicas como a doença de Parkinson, aterosclerose, hemocromatose, doença de Alzheimer e miopatias (VALKO et al., 2016).

O EO pode causar danos também às proteínas pela ação do radical livre $\text{O}_2^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$ e alcóxila, hidroperoxi, bem como por espécies não radicais como H_2O_2 , O^3 , HOCl , oxigênio singlet, $\text{OONO}^\bullet$. Sabe-se que as espécies reativas oxidam aminoácidos presentes em proteínas originando a formação de ligações cruzadas de proteína – proteína, resultando na desnaturação e perda da função original desta proteína, perda de atividade enzimática, perda de função de receptores e de proteínas de transporte (KEHRER; KLOTZ, L.-O., 2015).

Estudos recentes pesquisam a genotoxicidade do Pb por meio do mecanismo de indução do EO. Os resultados ainda são conflitantes, mas apontam para danos ao DNA e inibição dos principais sistemas de reparo do DNA e, portanto, resultando em instabilidade genômica e acúmulo de mutações críticas (BORGHINI et al., 2015).

Figura 11: Possível mecanismo de genotoxicidade causado pelo Pb.



Fonte: (BORGHINI et al., 2015).

Ainda, o metal Pb quando combinado com outros agentes prejudiciais ao DNA como luz ultravioleta (UV), raios-X e alguns produtos químicos resulta em inibição da reparação do DNA, e um aumento da genotoxicidade é observado através da substituição do cálcio e zinco em enzimas envolvidas na replicação do DNA (SUN et al., 2017).

4.6.4 Sistema de defesa Antioxidante

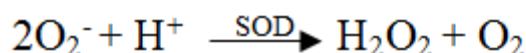
Substâncias pró-oxidantes são formadas constantemente em concentrações pequenas no metabolismo normal e por consequência desta produção as células possuem mecanismos para evitar o desequilíbrio oxidativo, o sistema de defesa antioxidante, impedindo assim o dano causado pelos mecanismos oxidantes (LEE et al., 2012).

Antioxidantes são definidos como substâncias que mesmo em baixas concentrações conseguem competir com substratos oxidantes e assim retardar ou inibir as reações de oxidação (HALLIWELL, 2013). A composição das defesas antioxidantes são diferentes de acordo como o tecido ou célula e didaticamente pode ser dividido em sistema de defesa enzimático e não enzimático (MAGRO et al., 2016).

4.6.4.1 Propriedades dos Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático incluem três sistemas já estudados, o primeiro refere-se à principal enzima, a SOD, apresentando-se como SOD-zinco-cobre, presente principalmente no citosol e SOD-manganês, presente na mitocôndria. É responsável por catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (BARREIROS; DAVID, 2006). Figura 12. Estudos evidenciam que a participação da SOD mitocondrial no sistema de defesa antioxidante é tão importante para a sobrevivência da célula que pode ser letal quando esta não está presente (LEBOVITZ et al., 1996)

Figura 12: Dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio mediado pela enzima Superóxido dismutase.

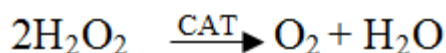


Fonte: (BRONCANO et al., 2009)

O segundo sistema de defesa é formado pela enzima catalase (CAT), uma enzima hemoproteínacitosólica, cuja função é degradar H_2O_2 formado durante a reação da dismutação do $O_2^{\cdot -}$ resultando em O_2 e água (BARREIROS; DAVID, 2006).

A atividade da CAT é fundamental quando os níveis de H_2O_2 encontram-se mais elevados, sendo assim considerada indispensável em condições de EO (VIGNESHKUMAR; PANDIAN, 2011).

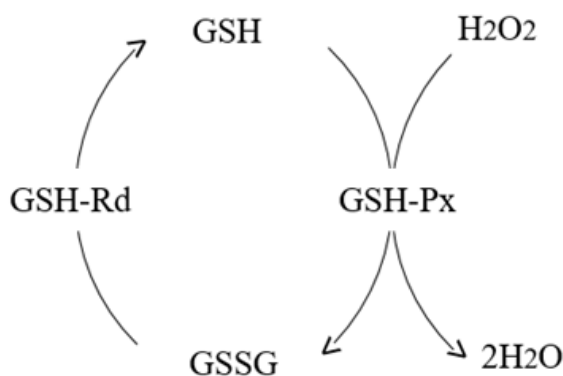
Figura 13: Redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio em água.



Fonte: (VIGNESHKUMAR; PANDIAN, 2011)

O terceiro sistema também realiza a redução do H_2O_2 em oxigênio e água, mas é composto por um cofator, a glutathiona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que está presente no organismo em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Durante a reação, a enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), na presença de selênio, oxida a GSH em GSSG, enquanto reduz o H_2O_2 em água. Após, a glutathiona redutase (GSH-Rd) regenera a GSSG em GSH, sua forma reduzida, para assim poder reiniciar o ciclo (BARREIROS; DAVID, 2006). Figura 14.

Figura 14: Ciclo da glutathiona alternando entre sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)



Fonte: Scotti, 2007

4.6.4.2 Sistema de defesa não enzimático

Por outro lado, o sistema de defesa não enzimático inclui compostos endógenos como a glutathiona reduzida (GSH), a bilirrubina, a ceruloplasmina, hormônios sexuais, a melatonina, a coenzima Q e o ácido úrico. A GSH tem uma importante atuação na biotransformação e eliminação de xenobióticos, resultando em uma das defesas das células contra o EO

As reações da GSH envolvem o grupo sulfidril por ser altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo em reações com compostos químicos eletrofílicos. A habilidade em doar elétrons a outros compostos faz da GSH um bom redutor. Existindo em abundância nos organismos aeróbicos na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuam de forma direta ou indireta em muitos processos biológicos, como a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (ZHAO; HOLMGREN, 2002). Além destes, outros antioxidantes de origem exógena e não enzimáticos são ingeridos por meio da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C, hidrossolúvel), α -tocoferol (vitamina E, lipossolúvel), b-caroteno que é precursor da vitamina A e flavonoides.

Estes compostos não enzimáticos atuam doando hidrogênio e elétrons, reduzindo metais de transição, desativando o oxigênio singlet, sequestrando os radicais peroxila, regenerando cofatores envolvidos nas reações de redução e oxidação (REDOX) e interagindo com as membranas, protegendo assim os danos originados pelos RL nos lipídeos, proteínas e DNA (BARREIROS; DAVID, 2006; KEHRER; KLOTZ, L., 2015).

O ácido ascórbico é um micronutriente solúvel em água e amplamente distribuído em todos os tecidos do corpo, atua como cofator em reações enzimáticas e também tem a função de reciclar outros antioxidantes, como a vitamina E e a GSH (HALLIWELL, 2013).

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados em forma de três artigos científicos que serão submetidos à publicação em revista específica e estão dispostos no Capítulo 7.

6 METODOLOGIA

Este estudo é experimental quantitativo, realizado no biotério e laboratório de práticas Farmacêuticas da Univille, que utilizou uma amostra de 86 ratos machos Wistar com idade de 60 dias.

Este projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais- CEUA/UNIVILLE, conforme documento Ofício Nº 004/2016 - PRPPG/CEP, sendo aprovado conforme CEUA nº 002/02016.

6.1 MODELO EXPERIMENTAL

6.1.1 Animais

O uso de modelos animais apresenta vantagens sobre o fornecimento de informações do organismo como um todo, fato que não é possível em metodologias como culturas em células ou pesquisas “*in vitro*”, mesmo com o progresso obtido nestas novas tecnologias ao longo dos últimos anos (SILVA JÚNIOR, 2013).

O modelo experimental quantitativo foi realizado com ratos Wistar de uma linhagem albina da família Muridae, gênero Rattus, espécie norvegicus e raça Wistar. Esta linhagem foi desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia em 1909 por Helen Dean King (GEORGE; SANTOS, 2011). Esta linhagem de ratos albinos é mundialmente utilizada em pesquisas científicas e sua importante utilidade deve-se ao fato de que inúmeras pesquisas já foram realizadas para obter dados fundamentais como curvas de crescimento, medidas do corpo e de vários órgãos individualmente originando tabelas com todos os dados sobre este animal e por possuírem semelhança fisiológica ao organismo humano (FERREIRA, 2002).

Ratos Wistar são característicos pelas orelhas alongadas, corpo fusiforme e uma cauda sempre menor que o comprimento corporal. As patas anteriores e posteriores possuem cinco dedos e não possuem glândulas sudoríparas e vesícula biliar como é característico de outros roedores. Adaptam-se melhor ao frio, procurando locais com sombras ou cavam tocas que costumam ser mais frias do que a superfície (HAYAKAWA et al., 2013). Em relação à reprodução, a puberdade se dá aos 30 dias e a maturidade sexual dos 50 aos 60 dias onde os animais

machos pesam em média 230 g e as fêmeas 160 g. A gestação dura de 20 a 22 dias e os desmame ocorre com 17 a 19 dias. O período reprodutivo permanece até os nove meses de idade (FERREIRA, 2002). A vida média do rato Wistar é de 03 anos (ANDREOLLO et al., 2012).

São considerados animais dóceis e quando mantidos em condições apropriadas apresentam boa capacidade de aprendizado, fácil manejo e alta taxa reprodutiva com ciclo curto. Estas características e o amplo conhecimento de sua fisiologia levam o rato Wistar a ser utilizado como modelo experimental para diversos propósitos de conhecimento científico (MELO et al., 2014)

Neste estudo foram utilizados ratos machos Wistar de 60 dias de idade. De acordo com estudos que relacionam a idade do rato com a idade humana, os animais de 60 dias são considerados jovens (ANDREOLLO et al., 2012).

Os animais provenientes da Univali (Itajaí), foram desmamados aos 21 dias de idade. Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados e aclimatados por sete dias, para adaptação em um novo meio. Ficaram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os animais ficaram mantidos em seis por gaiola. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996".

Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivissecção de animais de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais (Brasil, 2008).

6.1.2 Tratamento

6.1.2.1 Preparo das soluções de Acetato de Pb

As soluções de Acetato de Pb- $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ - foram preparadas no Biotério da UNIVILLE, seguindo o protocolo a seguir;

Primeiramente para preparo da solução mãe de 128 mg/ml, foram pesados 25,6 mg de Acetato de Pb, em um Becker e foram acrescentados quantidades suficientes para (qsp) 200 ml de água destilada. A partir desta solução mãe foram feitas diluições de 1:2 para obter uma solução de 64 mg/ml e diluição de 1:8 para obter uma solução de 16mg/ml. Para evitar a precipitação do acetato de Pb foi acrescentado 1ml de HCL 5N em cada solução (LUGATE; COSTA, 2013)

6.1.2.2 Procedimento de Intoxicação e formação de grupos Experimentais

O modelo de exposição ao Pb foi escolhido, levando em consideração que a DL50 para Acetato de Pb em ratos, via oral é de 4665 mg/Kg (ATSDR; SCIENCES, 2007) e as doses de 16 mg/Kg, 64 mg/Kg e 128 mg/Kg foram baseadas nas concentrações encontradas em exposições a humanos no meio ambiente, segundo a literatura. (CELIK et al., 2005; LUGATE; COSTA, 2013). Conforme CELIK et al. (2005), a exposição ambiental humana é de cerca de 140 mg/Kg e os animais toleraram nesse estudo até 500 mg/Kg por via oral. Desse modo, como se pretendia simular situação de intoxicação crônica de até 35 dias, optou-se por trabalhar com a dose máxima de 128 mg/Kg que se aproxima da de 140 mg/Kg devido à adaptação do modelo na instituição e possível risco de mortalidade dos animais. A ampla faixa de variação das doses foi selecionada no sentido de simular condições de exposição mais ou menos intensa, abrangendo um intervalo de oito vezes de diferença de exposição ao Acetato de Pb.

Os ratos machos Wistar de 60 dias, divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo controle (Ct) que recebeu solução salina, grupo Pb I que recebeu acetato de Pb na dose de 16mg/Kg, grupo Pb II que recebeu acetato de Pb na dose de 64 mg/Kg e grupo Pb III que recebeu acetato de Pb na concentração de 128 mg/Kg, por meio de gavagem, uma vez ao dia, por um período de 35 dias. O volume de solução administrado foi calculado semanalmente de acordo com o ganho ou perda de peso dos ratos, seguindo modelo previamente descrito na metodologia de exposição crônica em diferentes doses de acetato de chumbo, do estudo realizado por Costa em 2013 para avaliação de danos testiculares (LUGATE; COSTA, 2013) A administração por gavagem foi realizada com uma agulha ponto-bola para evitar danos ao esôfago e o animal foi mantido imobilizado

para que a agulha fosse introduzida lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago conforme o protocolo proposto no do Manual de Cuidados e procedimentos com Animais de Laboratório da USP (MENEZES, 2013).

6.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

6.2.1 Preparação do sangue total:

O sangue total para análise dos parâmetros hematológicos foi obtido de sangue dos ratos por meio de decapitação de acordo com Manual de Cuidados e procedimentos com Animais de Laboratório da USP, seguindo as normas da resolução N^o 1000 de 2012 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais (FEDERAL et al., 2012). O sangue foi acondicionado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético tri potássio (EDTA K3). O material foi conservado em geladeira por um período máximo de 24 horas.

6.2.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma:

Os eritrócitos e o plasma foram preparados segundo Delwing de Lima, 2017 a partir de amostras de sangue total obtidas dos ratos. O sangue total foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min e o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (DELWING-DE LIMA et al., 2017). Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 13,500 × g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

6.2.3 Preparação do tecido:

O fígado, rim e estruturas cerebrais foram removidas, descapsuladas e mantidas em gelo com tampão de solução salina (154 mMNaCl, 5 mM Tris–HEPES, pH 7.5) segundo Ferreira, 2012. O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em

tampão adequado, conforme metodologia padronizada, usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas, conteúdo total de sulfidrilas, atividade da acetilcolinesterase e Na⁺K⁺-ATPase (FERREIRA et al., 2012).

6.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS

6.3.1 Análise dos parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram mensurados por processo automático de leitura de luz e impedância elétrica por meio de automação com o aparelho Pentra 60 da marca Horiba ABX. Foram avaliados os parâmetros da série vermelha: hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), contagem de eritrócitos, RDW, índices referentes à concentração de hemoglobina, contagem de reticulócitos e análise microscópica do esfregaço sanguíneo para observação de presença de inclusões, alterações de forma e cor dos eritrócitos.

6.3.2 Análise da Concentração de Chumbo

A análise da concentração do chumbo em tecido (fígado) foi realizada através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica como descrito por Korecková-Sysalová (1997), utilizando um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (AAS5 EA, Carl Zeiss, Alemanha). Estas análises foram realizadas no Laboratório Pardini de Belo Horizonte, Minas Gerais especializado em análises toxicológicas em animais.

6.3.3 Análise dos Parâmetros de Estresse Oxidativo e de Atividade Enzimática

6.3.3.1 TBA-RS

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia de TBA-RS, mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. TBA-RS foi determinado pela absorbância a 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína (OHKAWA *et al.*, 1979).

6.3.3.2 Proteínas Carboniladas

A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Reznick e Packer (1993), o qual se baseia na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, que foi medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 µL de homogeneizado foi adicionado a tubo de ensaio contendo 400 µL de dinitrofenilhidrazina 10mM (preparado em HCl 2 M). Mantido no escuro durante 1 h e agitado em vórtex a cada 15 min. Depois disso, 500 µL de ácido tricloroacético a 20% foi adicionado a cada tubo. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento lavado com 1 mL de etanol: acetato de etila (1: 1, v / v), agitado em vórtex e centrifugado a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensionado em 600µL de guanidina 6M (preparado em solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3). A amostra foi submetida à vórtex e incubada a 60°C durante 15 min. Depois disso, centrifugada a 14000 rpm durante 3 min e o sobrenadante usado para medida da absorbância a 370 nm. Os resultados foram relatados como conteúdo de carbonila (nmol / mg de proteína) (REZNICK; PACKER, 1994).

6.3.3.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foram adicionados a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µl de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

6.3.3.4 Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ a 240 nm em meio de reação contendo 20 mM de H₂O₂, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio pH 7,0, e proteína 0,1-0,3mg / mL. Uma unidade é definida como 1µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT / mg de proteína (AEBI, 1984).

6.3.3.5 Glutationa Peroxidase (GSH-PX)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tert-butil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O meio continha GSH 2mM, GSH redutase 0,15U/ml, azida 0,4mM, tertbutyl- hidroperóxido 0,5mM e NADPH 0,1mM. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px / mg de proteína (WENDEL, 1981).

6.3.3.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, adicionou-se à 15 μ L de amostra, 215 μ L de uma mistura contendo tampão Tris 50 uM pH 8,2 e EDTA 1 μ M e 30 uM de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 uL de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatada como unidades de SOD / mg de proteína (MARKULND, 1985).

6.3.3.7 Ensaio da Atividade da Acetilcolinesterase

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da AChE e concentração proteica. A atividade da enzima AChE foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Ellman e colaboradores, (1961) com algumas modificações (ELLMAN et al., 1961).

6.3.3.8 Na^+, K^+ -ATPase

A mistura de reação para o ensaio de atividade de Na^+, K^+ -ATPase continha 5,0 mM de $MgCl_2$, 80,0 mM de NaCl, 20,0 mM de KCl e 40,0 mM de Tris-HCl, pH 7,4, num volume final de 200 μ L. A reação foi iniciada pela adição de ATP. Os controles foram tratados nas mesmas condições com a adição de ouabaína 1,0 mM. A atividade de Na^+, K^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios, conforme descrito por Wyse e colegas (WYSE et al., 1998). A liberação de fosfato inorgânico (Pi) foi medida pelo método de Chan e colegas (CHAN et al., 1986). A

atividade enzimática específica foi expressa como nmol Pi liberado por min por mg de proteína (CHAN et al., 1986; WYSE et al., 1998).

6.3.3.9 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão (LOWRY, 1951).

6.3.4 Dosagem dos Hormônios Tireoidianos

Foram realizadas a quantificação dos hormônios TSH e T4L por técnica de quimioluminescência através do aparelho Advia Centaur Immunassay System da Siemens. Os resultados foram expressos em $\mu\text{U/ml}$ para o TSH e ng/dl para o T4L. Estas análises foram realizadas no Laboratório Santa Helena de análises clínicas na cidade de Jaraguá do Sul.

6.3.5 Dosagem das enzimas TGO, TGP E GGT

Foram realizadas a quantificação das enzimas TGO, TGP, γGT por técnica enzimática através de automação em aparelho Flexor E 180. Os resultados foram expressos em UK (Unidades Karmem). Estas análises foram realizadas no Laboratório Santa Helena de análises clínicas na cidade de Jaraguá do Sul.

6.3.6 Dosagem de LDH

Foram realizadas a avaliação da atividade da enzima LDH por técnica enzimática (Wiener lab LDH-UV) através de automação em aparelho Flexor E L. Os resultados foram expressos em mg/dL . Estas análises foram realizadas no Laboratório Santa Helena de análises clínicas na cidade de Jaraguá do Sul.

6.3.7 Dosagem de Potássio

A dosagem do Potássio foi realizada em analisador de eletrólitos Select Ion⁺. Os resultados foram expressos em mg/dL. Estas análises foram realizadas no Laboratório Santa Helena de análises clínicas na cidade de Jaraguá do Sul.

6.3.8 Dosagem de Creatinina e Ureia

Foram realizadas a quantificação dos analitos ureia (enzimático UV cinético) e creatinina (cinética colorimétrica de Jaffe) através de automação em aparelho Flexor E 180. Os resultados foram expressos em mg/dL. Estas análises foram realizadas no Laboratório Santa Helena de análises clínicas na cidade de Jaraguá do Sul.

6.3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Os valores de “n” representaram o número de animais ou amostras utilizados em cada protocolo experimental.

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma via utilizando o programa IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 in a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Os gráficos foram estruturados no programa Graph Pad Prism.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 ARTIGO I

CRONIC ADMINISTRATION OF LEAD ALTERS MARKERS OF OXIDATIVE STRESS, AChE AND Na^+K^+ -ATPASE ACTIVITIES IN RAT BRAIN

Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza^b, Daniela Delwing-de Lima^{a,b}, Débora Delwing-Dal Magro^c, Eloisa Salamaia^a, Thales Ercole Guareschi^a, Luiz Felipe Erzinger^a, Cassiana Siebert^d, Tiago Marcon dos Santos^d, Angela TS Wyse^d

^aDepartamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brasil.

^dDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona

Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

Abstract

The Lead (Pb) poisoning is a public health issue, because it shows high levels of toxicity to the organism, working in many biochemists targets, been especially susceptible the central nervous system. The oxidative stress is considered a possible molecular mechanism involved in the Pb neurotoxicity. Whereas the brain structures vulnerability, this research investigated the effects of chronic exposure to Pb on oxidative stress parameters and on the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺K⁺-ATPase in brain structures of rats. Sixty-day-old male Wistar rats were expose to chronic administration of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) for 35 days by gavage. The levels of thiobarbituric acid reactive (TBA-RS), total sulfhydryl content, protein carbonyl content, activity of antioxidants enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), as well as acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺K⁺-ATPase were measured in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex. Results showed that chronic administration of Pb did not alters TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the cerebral structures studied. Furthermore, Pb (128 mg/Kg) increased SOD activity in the cerebellum and decreased in the cerebral cortex, and at dose of 64 mg/Kg and 128 mg/Kg in the hippocampus decreased SOD activity ; Pb (128 mg/Kg) decreased CAT activity in the cerebellum and increased in the cerebral cortex, also decreased GSH-Px activity in the cerebral cortex, while at 64mg/kg and 128mg/kg decreased this enzyme activity in the cerebellum. Moreover, Pb (128 mg/kg) increased AChE activity in the hippocampus and decreased Na⁺K⁺-ATPase activity in the cerebellum and hippocampus. In conclusion, Pb causes oxidative stress and compromises the activity of enzymes important for cerebral homeostasis, contributing to cerebral dysfunction caused by chronic exposure to Pb.

Keywords: Lead exposure, oxidative stress, brain structures, antioxidant enzymes, Na⁺K⁺-ATPase, acetylcholinesterase.

Introduction

The lead (Pb) intoxication is a public health issue, because it shows high levels of toxicity to the organism, working in many biochemists targets, been especially susceptible the central nervous system (CNS) to the damages caused by this (Bokara et al., 2008; Agrawal, 2015).

The main emission sources to the environment came from anthropic actions, such as automotive batteries factories, metal alloys, ink pigment, projectiles factories, mining, foundry and the antiknock additive to gas (Arantes et al., 2016).

With the increase of researches about the harmful effects of Pb, it has been increasing the willingness to minimize the use of this metal. However, in developing countries, the contamination continues due the interesting physicist chemical features of this metal. The high corrosion resistance, good ductility and because it shows solid in ambience temperature. Such features make this metal an important element to industrial purposes, especially to make acid-lead batteries and it reconditioning (Barkur and Bairy, 2015).

The Pb absorption in the organism is influenced by the exposure path, it chemical species, dose, frequency, duration, water solubility, and individual differences as age, gender, life style, physiological and nutritional condition, also by the susceptibility of the exposure organism (Arantes et al., 2016). Researches shows that children have the Pb absorption five times bigger than adult organism, due the deficit of the blood-brain barrier in a developing organism (Junior and Junior, 2012; Hossain et al., 2016).

Once the Pb absorbed, it spreads into the blood, and soft tissues (Kidneys, bone marrow, liver and brain) and mineralized tissues as bones and teeth (Ahrens et al., 2016). In the bones, this metal can be mobilized, building an important source of internal contributing with 50% of the blood Pb, leading the organism to a systemic and continued exposure (Flora et al., 2012). In the CNS, this metal leads to concentrate in the gray matter in certain nucleus. The bigger concentrations are found in the hippocampus, followed by the cerebellum, cerebral cortex and bone marrow (Costa et al., 2001).

The presence of this metal in the biological system results in the generation of reactive oxygen specie (ROS), directly or indirectly causing lipids peroxidation (Abdulmajeed et al., 2016). The oxidative stress (OE) caused by the Pb toxicity

result in oxidative damages to essentials molecules, as such lipids, proteins and DNA, further leading to apoptosis neuronal, affecting the synaptic transmission in the CNS (BARKUR; BAIRY, 2015).

According to Halliwell (2012), the brain is vulnerable to the action of the ROS due the high oxidative activity metabolic, the presence of polyunsaturated fatty acid in the tissues and the lesser quantity of antioxidant enzymes when compared with other body tissues (Halliwell, 2012). Many researches show that the Pb exposure can cause neurologic damages like learning and memory process commitments, neuronal differentiation dysfunctions, neurogenesis, neuronal regeneration and locomotive activity commitment (Reckziegel et al., 2011). As such, the aim of the present study was to investigate the effects of chronic exposure to Pb on oxidative stress parameters and on the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and Na^+/K^+ -ATPase in brain structures of rats.

Materials and Methods

Animals and reagents

Sixty-day-old male Wistar rats (220-280g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the protocol number 002/2016- PRPPG/CEP. Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Chronic treatment with lead

Male Wistar rats (60 days) were treated with saline (control group) or Pb acetate (Sigma Aldrich), at doses of 16mg/kg, 64mg/kg and 128mg/kg, by gavage once a day for a period of 35 days (Lugate and Costa, 2013).

To avoid precipitation of Pb acetate was added 1 mL of 5N HCl in 1 L of water. The rats were divided into 4 groups (n=8), as follows: **Control group**: received 1 mL of saline by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (I)**: received 16mg/kg of Pb by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (II)**: received 64mg/kg of Pb by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (III)**: received 128mg/kg of Pb by gavage once a day for 35 days. These concentrations are sublethal taking into account the LD50 for Acetate of Pb orally of 4665 mg / kg (ATSDR; SCIENCES, 2007).

The animals were killed twelve hours after the last administration and the brain were removed.

Tissue preparation

After decapitation, the brain was removed, and the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus were dissected and kept chilled until homogenization. The cerebral structures were homogenized in ten volumes (1:10w/v) of appropriate buffer, according to the technique to be executed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuging at 800 x g for 10min at 4°C before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying the activity of antioxidant enzymes, damage to proteins, estimation of lipid peroxidation and cholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase activities.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) measurement

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa (Ohkawa et al., 1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, mainly by hydroxyl free radicals. Initially, homogenate in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

Total sulfhydryl content determination

The total thiol group concentration was determined by the method described by Aksenov and Markesbery (AKSENOV; MARKESBERY, 2001). 50 μ L of homogenate were added to 1mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 μ L of 10.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Total sulfhydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

Protein carbonyl content

Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (Reznick and Packer, 1994). Based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Initially, 200 μ L of homogenate were added to tubes containing 400 μ L of 10.0 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2.0 M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. After, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 x *g* for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 x *g* for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 μ L of 6M guanidine (prepared in a 20.0 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000 x *g* for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV). Results are reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi (AEBI, 1984). The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10.0 mM potassium phosphate buffer,

pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (Wendel, 1981), using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*butyl- hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. NADPH disappearance was monitored at 340 nm. One GSH-Px unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

Superoxide dismutase assay (SOD)

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process dependent on superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), which is a substrate for SOD (Markulend, 1985). Briefly, to 15 μL of each sample, 215 μL of a mixture containing 50.0 μM Tris buffer, pH 8.2, 1.0 μM EDTA and 30.0 μM CAT were added. Subsequently, 20.0 μL of pyrogallol were added and the absorbance was recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as a reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Acetylcholinesterase (AChE) activity assay

The cerebral structures were homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.5. The homogenate was centrifuged at 1000 $\times g$ for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant used for the determination of the AChE activity and protein concentration. AChE activity was determined according to the colorimetric method of Ellman, with some modifications (Ellman et al., 1961).

Na⁺,K⁺-ATPase activity assay

The reaction mixture for the Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 200 µL. The reaction was initiated by ATP addition. Controls were treated under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse (WYSE et al., 1998). Inorganic phosphate (Pi) release was measured by the method described by Chan et al. (1986). Enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein (Chan et al., 1986).

Protein determination

Protein determination was measured by the Lowry (Lowry, 1951) or Bradford (Bradford, 1976) methods.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). The graphs were structured in the GraphPad Prism 6 program. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Effects of chronic administration of Pb on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the brain of rats.

We initially verified the effects of chronic administration of different doses of Pb (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the brain (cerebellum, hippocampus and cerebral cortex) of rats. Fig. 1(A), shows that chronic administration of Pb did not alter the levels of TBA-RS [$F(3,20)=1.198$; $p > 0.05$], [$F(3,20)=1.294$; $p > 0.05$] and [$F(3,20)=1.684$; $p > 0.05$]; total sulfhydryl content (B) [$F(3,20)=1.436$; $p > 0.05$], [$F(3,20)=0.660$; $p > 0.05$] and [$F(3,20)=0.341$; $p > 0.05$]; and protein carbonyl content (C) [$F(3,20)=1.041$; $p > 0.05$], [$F(3,20)=0.657$; $p > 0.05$] and [$F(3,20)=1.115$; $p > 0.05$] in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex, respectively, of rats.

Effects of chronic administration of Pb on the activities of antioxidant enzymes in the brain of rats.

Subsequently, we analyzed the effects of chronic administration of Pb (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on the activities of SOD, CAT and GSH-Px in the brain of rats. As shown in Fig.2 (A), chronic administration of Pb (128mg/kg) significantly increased the activity of SOD in the cerebellum [$F(3,20)=16.527$; $p<0.001$] and decreased this enzyme's activity in the cerebral cortex [$F(3,20)=3.765$; $p<0.05$]; and, at dose of 64mg/Kg and 128mg/Kg, decreased SOD activity in the hippocampus [$F(3,20)=13.492$; $p<0.001$] of rats. With regard to CAT activity (Fig.2B), chronic administration of Pb (128mg/kg), in the cerebellum decreased [$F(3,20)=12.038$; $p<0.001$] and in the cerebral cortex [$F(3,20)=7.772$; $p<0.01$] increased this enzyme's activity, as compared to the control group. However, this enzyme's activity was not altered in the hippocampus [$F(3,20)=1.176$; $p>0.05$]. Regarding GSH-Px activity (Fig. 3C), chronic administration of Pb (64mg/Kg and 128mg/Kg) decreased this enzyme's activity in the cerebellum [$F(3,20)=14.428$; $p<0.001$] and at dose of 128mg/kg in the cerebral cortex [$F(3,20)=6.443$; $p<0.01$]. However, GSH-Px activity in the hippocampus [$F(3,20)=2.556$; $p>0.05$] was not altered by chronic administration.

Effects of chronic administration of Pb on the activities of AChE and Na^+, K^+ -ATPase in the brain of rats.

Finally, this study investigated the effects of chronic administration of Pb (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on the activity of AChE and chronic administration of Pb (128mg/Kg) on the activity of Na^+, K^+ -ATPase in the brain of rats. The activity of AChE (Fig. 3A) was increased by chronic administration (128mg/kg) only in the hippocampus [$F(3,20)=3.78$; $p<0.05$], while in the cerebellum [$F(3,20)=0.728$; $p>0.05$] and cerebral cortex [$F(3,20)=1.744$; $p>0.05$] of rats Pb did not change its activity. With regard to Na^+, K^+ -ATPase activity, chronic administration (128mg/kg) decreased its activity in the hippocampus [$T=2.723$; $p<0.01$] and cerebellum [$T=1.891$; $p<0.05$], but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex [$T=0.9141$; $p>0.05$] of rats.

Discussion

The Pb intoxication has taken many countries to make different actions to reduce the exposure, but the contamination through this metal remains high due the environmental and occupational sources (Phyu and Tangpong, 2014). Therefore, new researches are necessary to evaluate the mechanisms developed when this xenobiotic is found in the organism. The OE have been studied recently as one mechanism involved in Pb toxicity, because it induces cerebral loss and deregulating the balance oxidant/antioxidant of the nerve cells (Bokara et al., 2008; Reckziegel et al., 2011).

The goal of this research was to investigate the effects of chronic administration of different doses of Pb (16mg/kg, 64mg/kg and 128mg/kg) on OE markers and AChE and Na^+, K^+ -ATPase activities in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex of 60 days old Wistar rats. The brain structures chosen for this research became from the relevance study of its functions, since the hippocampus is fundamental to process emotions and memory associate information's; the cerebellum plays an important role in the motor learning, tonus controlling and volunteer movements (Bazrgar et al., 2015), and the cerebral cortex has an overlap of related functions as many processes of motor behavior, receiving information's of the body, complex coordination of movements, emotions, judgment, articulation and speak productions, hearing information, memory, multisensory information and processing and language comprehension (Barkur and Bairy, 2015).

Initially, this study showed that exposure to different doses of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/Kg, 128 mg/Kg) did not alters the levels of TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the cerebral structures studied. TBA-RS shows the malondialdehyde content, the richest aldehyde that results of the lipids degradation due the lipid peroxidation process (Abdel-Moneim et al., 2015). The carbonylated proteins are formed with many oxidant agents, as catalyzed reactions by metals. The sulfhydryl group is present in most sensible protein structure, and undergoes oxidation in the presence of OE. These parameters are used as markers of oxidative proteins damage (Velaga et al., 2014). In this study, it was not found indicatory oxidative damage in the lipids and proteins in the brain structures analyzed, considering the doses and time of exposure used, corroborating with the Bouta Dabrowska (1996) research, which was realized in the similar conditions of time and dose of Pb exposure (Bouta Dabrowska et al., 1996). Conversely, in others Pb

intoxication models (gavage, drinking water, intraperitoneal administration), some authors found increase in TBA-RS levels, protein carbonyl content and sulfhydryl content in the cerebral structures (Gautam et al., 2010; Lalith and Muralidhara, 2014; Nehru and kanwar, 2004; Reckziegel et al., 2011). These different results probably occurred due to different dose and time of administration used in the studies.

Considering the effects caused by chronic administration of Pb on antioxidant enzymes, results showed that Pb (128 mg/kg) increased the activity of SOD in the cerebellum and decreased this enzyme's activity in the cerebral cortex; and, at concentrations of 64 mg/Kg and 128 mg/Kg, decreased SOD activity in the hippocampus. Regarding the increases in SOD activity in the cerebellum, this can be associated with the inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase enzyme (ALAD), by Pb, causing 5-aminolevulinic acid (ALA) accumulation, generating superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and H_2O_2 , making it necessary to potentiate the removal mechanism of $O_2^{\cdot-}$ (Barkur and Bairy, 2015). Corroborating with our study, Tzümen et al. (2015) showed, with a similar Pb intoxication model, increase in SOD activity in the brain structures (Tüzmen et al., 2015). Also, this enzyme's activity decreased in the cerebral cortex in the dose of Pb (128 mg/Kg), and at dose of 64 mg/Kg and 128 mg/Kg decreased in the hippocampus. The SOD is responsible for catalyzing the superoxide radical dismutation into H_2O_2 and oxygen (Halliwell, 2012). Conversely, the decrease found in SOD activity in the hippocampus and cerebral cortex can be related to the enzyme consume, due to the excess of $O_2^{\cdot-}$, or due to the high affinity of the Pb with the sulfhydryl group (Prasanthi et al., 2010; Moneim, 2012). Likewise, can be due to the ability of Pb to mimic the function of others metals, as copper and zinc, cofactors of SOD cytosolic or manganese, cofactor of SOD mitochondrial, leading to changes in the concentration and function of this enzyme (Kamiński and Kurhalyuk, 2007; Prasanthi et al., 2010; Arantes et al., 2016). Similarly, Abdulmajeed et al. (2016) observed in an experimental model with Wistar rats, a decrease in the SOD activity in the brain structures (ABDULMAJEED et al., 2011). Others authors also found decrease in SOD activity in the hippocampus (Bokara et al., 2008; Ghareeb et al., 2010; Hosseinzadeh et al., 2013; Lalith and Muralidhara, 2014).

With regard to CAT activity, Pb (128mg/kg), decreased this enzyme activity in the cerebellum. CAT is an important heme iron enzyme which catalyzes directly the H_2O_2 decomposition. The Pb is known to reduce the iron absorption in the

gastrointestinal tract, inhibiting the heme synthesis, which can lead to a decreasing in CAT activity (Prasanthi, 2010). Many researches also showed CAT decreasing in the cerebellum (Bokara et al., 2008; Ghareeb et al., 2010; Baranowska-Bosiacka et al., 2011; Flora et al., 2012). In the cerebral cortex, Pb (128 mg/kg) increased CAT activity, demonstrating redox system unbalance, probably by the rise formation of H_2O_2 , acting as a signal to keep the higher activity of this enzyme, to increase the detox process.

Regarding GSH-Px activity, Pb (64 mg/Kg and 128 mg/Kg) decreased this enzyme's activity in the cerebellum and at dose of 128 mg/kg in the cerebral cortex, but didn't alter in the hippocampus. The decreases in this enzyme activity can be occurred due the increasing of H_2O_2 ; or could be related to the Pb competition with selenium, cofactor of GSH-Px, causing a decreasing in this enzyme activity (LU, C. et al., 2015). Bazrgar et al. (2015), also found similar results in GSH-Px activity in the cerebellum of new born rats. In addition, others researchers also found similar results about the GSH-Px decreasing in rats after the Pb exposure (Lalith and Muralidhara, 2014; Chibowska et al., 2016).

The results indicate that Pb causes significant changes in the activity of antioxidants enzymes, and that cerebellum and cerebral cortex were more susceptible to alterations in the enzymatic antioxidant system, when compared to the hippocampus, demonstrating that the oxidative potential is different in these regions, regarding the Pb exposure. According to Gastaldello et al. (2001), these variation can be related to differences in generation and maturation of cells (Gastaldello et al., 2001).

Also, these changes found in the antioxidant enzymes were dependent on the Pb dose used to the intoxication model. In the lowest dose (16 mg/Kg), was not found significant statistics, but in the dose of 64 mg/Kg it was observed changes in the SOD and GSH-Px activities. This changes show that the OE can happen even in lower Pb doses, what can come in the occupational exposure in adults or in children through the water, solo or air, reminding that in children the absorption is bigger due the higher CNS developing (Xu et al., 2016). Another important way of low concentration exposure is the internal one, because the Pb can deposit itself in the bones performing a Ca^{2+} substitution, leading the organism to a continued systemic exposure (Basit et al., 2015). In the higher dose of 128 mg/Kg, all evaluated

antioxidant enzymes presented significant changes, as well as AChE and Na^+, K^+ -ATPase activities.

Finally, results showed that chronic administration of Pb (128mg/kg) increased AChE activity in the hippocampus, while in the cerebellum and cerebral cortex did not change its activity. The AChE is a serine protease, responsible for interrupt the nerve synaptic streaming by the acetylcholine into choline and acetic acid. It is found mainly in the neuromuscular joints and cholinergic brain synapses, where its activity is involved in the cognitive process (Basha et al., 2012). Corroborating with our findings, studies conducted by Agrawal et al. (2015), Ghareeb et al. (2010) and Lalith and Muralidhara (2014), observed increases in the AChE activity, in the Pb presence, in the hippocampus (Ghareeb et al., 2010; Lalith and Muralidhara, 2014; Agrawal et al., 2015). One possible mechanism to explain the enzyme activity increasing can be related to the heavy metal interaction with the acetylcholine receiver, which affects the connection efficiency, resulting in the higher synthesis of AChE (Tsakiris et al., 2000). Furthermore, studies carried out by Reddy et al. (2003) also showed inalteration in the AChE activity in the cerebral cortex and cerebellum of rats exposure to Pb before and after the weaning (Reddy et al., 2003).

With regard to Na^+, K^+ -ATPase activity, chronic administration of Pb (128 mg/kg) decreased its activity in the hippocampus and cerebellum, but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex. Yücebilgiç (2003), also found lower levels of Na^+, K^+ -ATPase in the blood of workers exposure to Pb (Yücebilgiç et al., 2003). Yet, this Na^+, K^+ -ATPase decreasing in the cerebellum and in the hippocampus collaborate with preview studies with Pb intoxication brain evaluation, with similar study models (Antonio and Leret, 2000; et al., 2003). Furthermore, Moneim (2012), using an intraperitoneal Pb intoxication model, also found lower activity of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase in the cerebellum (Moneim, 2012).

Reduction on Na^+, K^+ -ATPase activity can be related to the brain damage caused by the excess of ROS, generated from Pb intoxication (Martini et al., 2014). Research carried out by Adefegha et al. (2016) and Sharma et al. (2009), analyzing the heavy metal effects in the CNS, found a significant diminish in the Na^+, K^+ -ATPase activity, probably associate with brain damages caused by the ROS generation (Sharma et al., 2009; Adefegha et al., 2016). The Na^+, K^+ -ATPase decreasing observed in our study could be related to the Pb interfering in the cell

energy metabolism, inhibiting the ATP syntheses, leading to the neuron dysfunction (Antonio et al., 2003). Another possible inhibition mechanism of Na^+,K^+ -ATPase can be the Pb interaction with the SH group current in its composition, suggesting that SH group is essential to this enzyme activity (Antonio and Leret, 2000).

Conclusion

In conclusion, the present study reinforces the hypothesis that intoxication with Pb causes OE and cerebral dysfunction, since it alters antioxidant enzymes, AChE and Na^+,K^+ -ATPase activities in the cerebral structures of rats. Furthermore, results did not show homogeneous reply between the different structures of the brain, consenting with other studies, showing that depending on the doses of exposure to Pb, it can have distinct effects in the different brain areas. Our study suggests that preventive measures against contamination by this metal, due to the environmental and occupational sources is extremely necessary, in order to protect the population from future brain impairment.

Conflict of interest

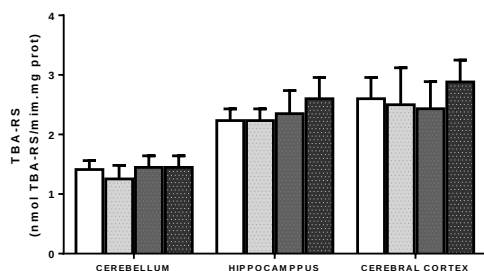
The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

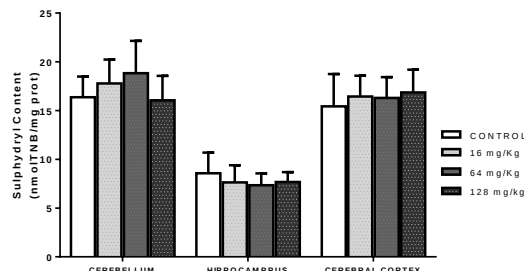
This work was supported by grants from University of the region Joinville.

ATTACHMENT

(A)



(B)



(C)

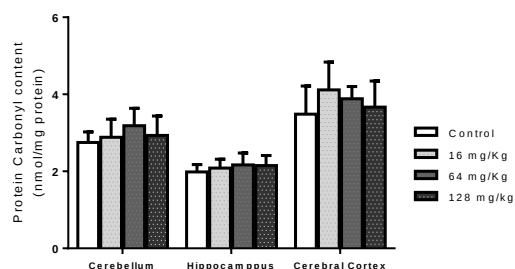
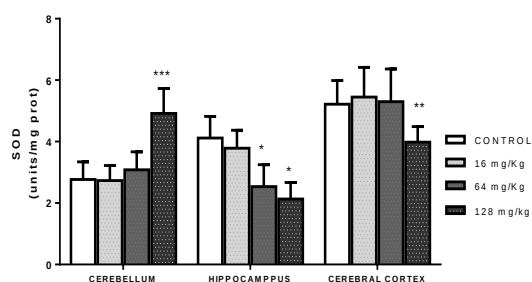
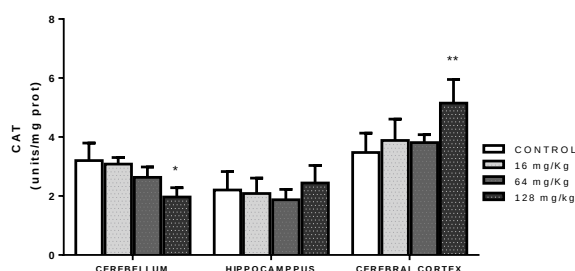


Figure 1: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulphydryl content (B) and protein carbonyl content (C) in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate.

(A)



(B)



(C)

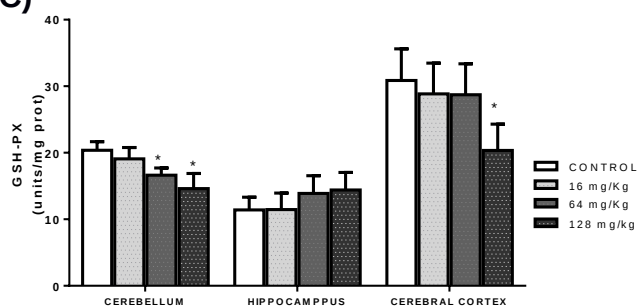


Figure 2: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on the activities of SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$, compared to control group (Duncan's multiple range test).

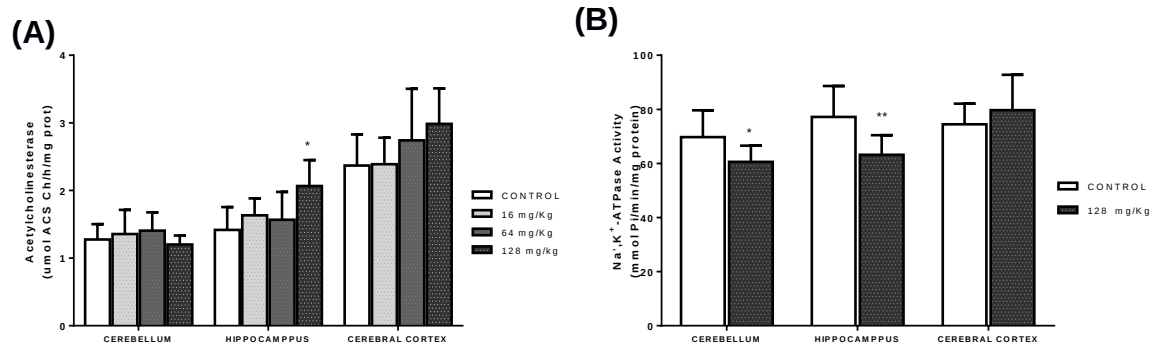


Figure 3: Effect of increasing concentrations of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on the activities of AChE (A) and Na⁺K⁺-ATPase (B) in the cerebellum, hippocampus and cerebral cortex of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$, compared to control group (Duncan's multiple range test).

References

- ABDEL-MONEIM, A. M.; EL-TOWEISSY, M. Y.; ALI, A. M.; et al. Curcumin Ameliorates Lead (Pb²⁺)-Induced Hemato-Biochemical Alterations and Renal Oxidative Damage in a Rat Model. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 206–220, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-015-0360-1>>. .
- ABDULMAJEED, W. I.; SULIEMAN, H. B.; ZUBAYR, M. O.; et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male Wistar rats- a preliminary study. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11011-015-9733-6>>. .
- ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G.; OMOJOKUN, O. S.; ADEFEGHA, O. M. ScienceDirect Alterations of Na⁺ / K⁺ -ATPase , cholinergic and antioxidant enzymes activity by protocatechuic acid in cadmium-induced neurotoxicity and oxidative stress in Wistar rats. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 559–568, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.017>>. .
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. CCR Press.
- AGRAWAL, S.; BHATNAGAR, P.; FLORA, S. J. S. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 208–216, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.013>>. .
- AHRENS, K. A.; HALEY, B. A.; ROSSEN, L. M.; LLOYD, P. C.; AOKI, Y. Housing Assistance and Blood Lead Levels: Children in the United States, 2005–2012. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 11, p. 2049–2056, 2016. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2016.303432>>. .
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001016366>>. .
- ANTONIO, M. T.; CORREDOR, L.; LERET, M. L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and / or cadmium. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 331–340, 2003.

ANTONIO, M. T.; LERET, M. L. Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. **life Sciences**, v. 67, p. 635–642, 2000.

ARANTES, F. P.; SAVASSI, L. A.; SANTOS, H. B.; GOMES, M. V. T.; BAZZOLI, N. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, n. 1, p. 137–147, 2016.

BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; et al. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. **Brain Research**, v. 35, p. 56–71, 2011.

BARKUR, R. R.; BAIRY, L. K. Assessment of oxidative stress in hippocampus, cerebellum and frontal cortex in rat pups exposed to lead (Pb) during specific periods of initial brain development. **Biological trace element research**, v. 164, n. 2, p. 212–8, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-0221-3>>. .

BASHA, D. C.; RANI, M. U.; DEVI, C. B.; KUMAR, M. R.; REDDY, G. R. International Journal of Developmental Neuroscience Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain : reversal effect of calcium co-administration. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 343–350, 2012. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.01.004>>. .

BASIT, S.; KARIM, N.; ALI, S. S.; et al. OCCUPATIONAL LEAD TOXICITY IN BATTERY WORKERS OF KARACHI. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 4, p. S284–S286, 2015. Disponível em: <<http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/7066>>. .

BAZRGAR, M.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; ELAHDADI SALMANI, M. Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 178–188, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.040>>. .

BOKARA, K. K.; BROWN, E.; MCCORMICK, R.; et al. Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. **BioMetals**, v. 21, n. 1, p. 9–16, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214713>>. .

BOUTA DABROWSKA B, STRUZYNSKA L AND RAFALOWSKA, U. Does Lead Provoke the Peroxidation Process in Rat Brain Synaptosomes ? **Molecular and Cellular**

Biochemistry, v. 29, p. 127–139, 1996.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269786906408>>. .

CHIBOWSKA, K.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; FALKOWSKA, A.; et al. Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2140, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2140>>. .

COSTA, C. H. DA; RUFINO, R.; LAPA E SILVA, J. R. [Inflammatory cells and their mediators in COPD pathogenesis]. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 55, n. 3, p. 347–54, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629358>>. .

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>>. .

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead : A review with recent updates. , v. 5, n. 2, p. 47–58, 2012.

GASTALDELLO, E.; JORDAO, G.; ROSA, D. M.; et al. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. **Toxicology**, v. 169, p. 145–151, 2001.

GAUTAM, P.; FLORA, S. J. S.; PH, D. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 563–570, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.008>>. .

GHAREEB, D. A.; HUSSIEN, H. M.; KHALIL, A. A. Toxicological & Environmental Chemistry Toxic effects of lead exposure on the brain of rats : Involvement of oxidative stress , inflammation , acetylcholinesterase , and the beneficial role of flaxseed extract. **Toxicology & Enviromental Chemistry**, , n. October 2014, p. 37–41, 2010.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox : less paradoxical now ? , 2012.

HOSSAIN, S.; PH, D.; BHOWMICK, S.; et al. NeuroToxicology Maternal lead exposure

decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress , in inflammatory response and apoptosis in the offspring rats. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 150–158, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.013>>. .

HOSSEINZADEH, S.; ROSHAN, V. D.; MAHJOUB, S. Continuous exercise training and curcumin attenuate changes in brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress induced by lead acetate in the hippocampus of male rats. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 2, p. 240–5, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2012.717230>>. .

JUNIOR, D. E. L.; JUNIOR, A. Absorption Levels and Morphological Features of Fetal Organs in Wistar Rats Treated with Lead Acetate. **Int. J. Morphological**, v. 30, p. 119–124, 2012.

KAMIŃSKI, P.; KURHALYUK, N. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Changes in Physiological Process of Free Radicals in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Chicks in Polluted Areas. **Polish J of Environ. Stud**, v. 16, n. 4, p. 555–562, 2007.

LALITH, V.; MURALIDHARA, K. Ameliorative Effects of Ferulic Acid Against Lead Acetate-Induced Oxidative Stress , Mitochondrial Dysfunctions and Toxicity in Prepubertal Rat Brain. **Neurochen Res**, v. 39, p. 2501–2515, 2014.

LOWRY, H. O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265,275, 1951.

LU, C.; YUAN, X.; LI, L.; et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Combined exposure to nano-silica and lead induced potentiation of oxidative stress and DNA damage in human lung epithelial cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 537–544, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.030>>. .

LUGATE, K.; COSTA, C. DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA , ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celula. , 2013.

MARKULEND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: B. R. CRC Press (Ed.); **Handbook for oxygen radical research**. p.243,247, 1985.

MARTINI, A.; WAGNER, R.; RISSO, E.; NARCISO, M.; MARTINEZ, C. B. R. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish**

Physiol Biochem, v. 40, p. 645–657, 2014.

MONEIM, A. E. A. Flaxseed Oil as a Neuroprotective Agent on Lead Acetate-Induced Monoaminergic Alterations and Neurotoxicity in Rats. **Biol trace Elem Res**, v. 148, p. 363–370, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>>. .

PHYU, M. P.; TANGPONG, J. Neuroprotective effects of xanthone derivative of *Garcinia mangostana* against lead-induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 151–156, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.035>>. .

PRASANTHI, R. P. J.; DEVI, C. B.; BASHA, D. C.; REDDY, N. S.; REDDY, G. R. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 161–7, 2010. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.002>>. .

RECKZIEGEL, P.; TIRONI, V.; BENVENÚ, D.; et al. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. **Toxicology Letters**, v. 203, p. 74–81, 2011.

REDDY, G. R.; BASHA, R.; DEVI, C. B.; et al. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, p. 347–352, 2003.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–63, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330417>>. .

SHARMA, D.; SETHI, A. P.; HUSSAIN, A. E. Curcumin counteracts the aluminium-induced ageing-related alterations in oxidative stress, Na⁺, K⁺ ATPase and protein kinase C in adult and old rat brain regions. **Biogerontology**, v. 10, p. 489–502, 2009.

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K. H.; STAVRIDIS, J. C. Protective Effect of L -Phenylalanine on Rat Brain Acetylcholinesterase Inhibition Induced by Free Radicals. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 103–106, 2000.

TÜZMEN, M. N.; YÜCEL, N. C.; KALBURCU, T.; DEMIRYAS, N. Effects of curcumin and

tannic acid on the aluminum- and lead-induced oxidative neurotoxicity and alterations in NMDA receptors. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 2, p. 120–127, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15376516.2014.997947>>. .

VELAGA, M. K.; YALLAPRAGADA, P. R.; WILLIAMS, D.; RAJANNA, S.; BETTAIYA, R. Hydroalcoholic Seed Extract of Coriandrum sativum (Coriander) Alleviates Lead-Induced Oxidative Stress in Different Regions of Rat Brain. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1–3, p. 351–363, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-9989-4>>. .

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. , 1981.

WYSE, A. T.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G.; et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p. 1719–21, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665589>>. .

XU, T.; GAO, X.; LIU, G. The Antagonistic Effect of Selenium on Lead Toxicity Is Related to the Ion Profile in Chicken Liver. **Biological Trace Element Research**, v. 169, n. 2, p. 365–373, 2016.

YÜCEBILGIÇ G ET ALL. Effects of Lead on Na⁺ + -K⁺ + ATPase and Ca⁺ + 2 ATPase Activities and Lipid Peroxidation in Blood of Workers. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p. 95–97, 2003.

7.2 ARTIGO II

Effects of Lead Poisoning on Hematopoietic system, Oxidative Stress Parameters and Thyroid Hormones in Rat wistar

Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza^b, Daniela Delwing-de Lima^a, Débora Delwing-Dal Magro^d, Eduardo Manoel Pereira^a, Matheus H. R. Mews, Maitê Beatriz Bruckheimer^a, Victor Hugo Joaquim^b

^aDepartment of Medicine, University of Joinville Region– UNIVILLE,
Paulo Malschitzki St, 10- Industrial Norte Zone, 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

^b Program of Pós-Graduation in Health and Environment, University of Joinville
Region– UNIVILLE, Paulo Malschitzki St, 10- Industrial Norte Zone, 89201-972,
Joinville, SC, Brazil.

^dDeparture of Natural Sciences, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade
Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC,
Brazil.

*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de
Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona
Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-
mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

The Lead poisoning, lead witch is a highly shared heavy metal in the environment, is a public health problem, because it represents the high toxicity to the organism leading too many biochemistry targets, especially the hematopoietic system which is very sensible to this metal damages. The aim of this research was to investigate the effects of the lead poisoning evaluating hematologic parameters, the oxidative stress and the thyroid function in male Wistar rats with 60 days old. The animals where expose to 16 mg/kg, 64 mg/Kg, 128 mg/Kg of lead acetate during 35 days by gavage. The control group of animals received saline. The hematologic parameters of this study showed in the 128mg/kg dose, the hemoglobin decreasing and the Red Cell Distribution Width (RDW) increasing. In the 64mg/Kg and 128mg/Kg doses there was the decreasing of the Medium Globular Volume (VCM) and the significant increasing of the reticulocytes. The erythrocytes have not shown any significant change. The oxidative biomarkers shown variation in the lead doses of 64mg/Kg e 128mg/Kg about the carbonate proteins, decreased the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and at doses of 16, 64 and 128 mg/kg increased the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), but did not alters the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) and total sulfhydryl content in the blood of rats. In the thyroid hormones evaluation, chronic administration of lead (128 mg/Kg) decreased the level of thyroxine 4 free (T4L) in the serum of rats, but none of the concentrations of lead altered the levels of thyroid stimulating hormone (TSH). Also, lead did not alter potassium and lactate dehydrogenase (LDH) in the serum of rats. Our research, showed a tendency to the anemic state due the hemoglobin decreasing and the reticulocytes increasing, indicating possible hemolysis, the OS presence, pointing the protein and the modification in the antioxidant system. Lastly, implies a thyroid function alteration, showed by the Ft4 decreasing.

KEYWORDS: Lead acetate, Oxidative stress, Haematological parameters, Thyroid hormones

INTRODUCTION

The Lead is a heavy metal highly distributed in the environment and even in low concentrations is harmful to the human beings and other living organisms (SUDJAROEN; SUWANNAHONG, 2017). Reseaches say that the lead can induce a variety of physiological and biochemistry dysfunctions and these changes configure the lead exposure as a serious public health problem (PEDROSO et al., 2017).

The main emission sources to the environment came from anthropic actions like in the automotive batteries factories, alloys, inks, projectiles factories, mining, foundry, gas antiknock additive and nowadays the recycling of electronic products (DAI et al., 2017). The general population can be expose through the food chain due the contamination, bu the lead releasing in the food containers or ceramic nail polishes, water sources contamination, home remedies and teas made with contaminated herbs and sub products of the recycling derivatives manufacture, also like the air contamination (SIRIVARASAI et al., 2015).

The lead is mainly absorbed through the respiratory gastrointestinal tract (LI et al., 2016). After the absorption it goes through the blood, where most of the current lead (95%) is connected to the erythrocytes, which makes this the main and primary target for the poisoning induction establishing a negative effect strait in the hemoglobin, probably by the increasing of the erythrofagocyte, hemolysis and splenic kidnapping or harm erythropoiesis (DAI et al., 2017). The blood distributes the lead to all the tissues, including the kidney cortex, liver, lungs, brain and bones (DOBRAKOWSKI et al., 2017).

The patogenetic of the lead is multifatorial. The toxicity can happen due the direct interruption of the enzyme activity or the inhibition through the mimicry of essentials minerals as calcium, zinc and selenium (FLORA, G. et al., 2012). The action mechanism of this xenobiotic involves oxidative damages, increasing the generation of oxygen reactive species (EROS) and consequently causing lipid peroxidation changing the function of the components of the defense system, modifying the antioxidant enzymes action (SUDJAROEN; SUWANNAHONG, 2017).

According to RANA (2014), many xenobiotic as the lead induce the toxicity in the glands through the inhibitions of specific enzymes of the hormone synthesis. However, the endocrine implication of the poisoning mechanism are not very clear

yet (RANA, 2014). The thyroid gland is responsible by the generation of the thyroid hormones, essentials for the homeostasis of the human body and the central nervous system, cardiovascular and reproductive and these controls the organism growth (JURDZIAK et al., 2017). This gland function is controlled by the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, through the regulation hormone mediation as the thyrotrophic releasing hormone (TRH) and the thyroid stimulant hormone (TSH) connected by a complex network of negatives feedbacks (HENRICHS et al., 2010). It is possible that the thyroid system can be affected by heavy metal as the study suggested, but the results in human beings are still few and inconsistent (CHEN et al., 2013).

Although many researches about the lead exposure indicates interferences in the enzymatic system, the biochemistry and molecular mechanisms of the lead toxicity are not very elucidated. The present research has the aim to evaluate the effects of the chronic exposure in three sublethal different doses of lead (14 mg/Kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) on the hematological system, oxidative stress parameters and thyroid function in male Wistar rats of 6 days old.

Materials and Methods

Animals and reagents

Sixty-day-old male Wistar rats (220-280g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the protocol number 002/2016– PRPPG/CEP. Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Chronic treatment with lead

Male Wistar rats of 60 days were treated with saline solution (control group) or lead acetate (Sigma Aldrich), at concentrations of 16mg/kg, 64mg/kg and 128mg/kg, by gavage once a day for a period of 35 days (LUGATE; COSTA, 2013). These concentrations are sublethal taking into account the LD50 for Acetate of Pb orally of 4665 mg / kg (ATSDR; SCIENCES, 2007).

The rats were divided into 4 groups, as follows: **Control group**: received 1 mL of saline by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (I)**: received 16mg/kg of lead by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (II)**: received 64mg/kg of lead by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (III)**: received 128mg/kg of lead by gavage once a day for 35 days.

The animals were killed twelve hours after the last administration and the blood was collected.

Erythrocyte and Plasma Preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from rats. Whole blood was collected and transferred to heparinized tubes. Blood samples were centrifuged at $1,000 \times g$, plasma was then removed by aspiration and frozen at -80°C until use in assays. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 μL of washed erythrocytes and frozen at -80°C until determination of the antioxidant enzyme activities. For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thaw three times, and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was diluted in order to achieve an approximate concentration of 0.5 mg/mL of protein (DELWING-DE LIMA et al., 2017).

Serum Preparation

The blood was rapidly collected, centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min and the serum was separated and used to the analyses of biochemical parameters.

Hematological parameters and on reticulocytes measurement

Hematological parameters were measured by automatic light reading and electrical impedance through automation with the Horiba ABX Pentra 60 .The parameters of the red series were evaluated: hemoglobin, VCM (mean corpuscular volume), erythrocyte count, RDW. Reticulocyte were counted by dilution of the whole blood in bright cresyl blue and in slide was counted reticulocytes (erythrocytes with a dark strand of inner RNA) relative to 1000 erythrocytes. By dividing by 10 the number of reticulocytes counted we obtain the percentage of reticulocytes.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) measurement

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, mainly by hydroxyl free radicals. In this technique, plasma in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. TBA-RS content was calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein(OHKAWA et al., 1979).

Total sulfhydryl content determination

The total thiol group concentration was determined according to the method described byAksenov and Markesbery (2001). Initially, 50 µl of homogenate was added to 1mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 µL of 10.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Total sulfhydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein(AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

Protein carbonyl content

Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (1994). In this method, protein carbonyls react with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Initially, 200 μ L of homogenate was added to plastic tubes containing 400 μ L of 10.0 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2.0 M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 μ L of 6M guanidine (prepared in a 20.0 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Finally, samples were centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results are reported as carbonyl content (nmol/mg protein)(REZNICK; PACKER, 1994).

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method described by Aebi (1984). The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10.0 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1 μ mol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein(AEBI, 1984).

Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981) using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butyl- hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein(WENDEL, 1981).

Superoxide dismutase assay (SOD)

The method used is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ($O_2^{\cdot-}$), which is a substrate for SOD (Marklund 1985). Briefly, to 15 μ L of each sample, 215 μ L of a mixture containing 50.0 μ M Tris buffer, pH 8.2, 1.0 μ M EDTA and 30.0 μ M CAT were added. Subsequently, 20.0 μ L of pyrogallol were added and the absorbance was immediately recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a spectrophotometer. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as a reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein (MARKULND, 1985).

Protein determination

Protein determination was measured by the Lowry et al. (1951) or Bradford (1976) methods (LOWRY, 1951; BRADFORD, 1976).

Dosage of Thyroid Hormones

Thyroid stimulating hormone (TSH) and free thyroxine 4 (T4L) were quantified by the chemiluminescence methodology in the Advia Centaur Immunassay System from Siemens. The results were expressed in μ U / ml for TSH and ng / dl for T4L.

LDH activity assay

LDH enzyme was quantified by enzymatic technique (Wiener lab LDH-UV) through automation in Flexor E L apparatus. The results were expressed in mg / dl.

Potassium Dosage

The potassium dosage was performed on a Select Ion + electrolyte analyzer. The results were expressed in mg/dl.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Effects of chronic administration of lead on hematological parameters in the blood of rats

Initially, we analyzed the effects of chronic administration of different doses of lead (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, mean corpuscular volume (VCM), red cell distribution width (RDW) and reticulocytes in the blood of rats. As shown in Figure 1, chronic administration of lead (128mg/kg) significantly diminished hemoglobin (B) [$F(3,72)=1.227$; $p < 0.05$] and increased RDW (C) [$F(3,72)=4.204$; $p < 0.01$], as compared to the control group, and, at doses of 64mg/Kg and 128mg/Kg, decreased VCM (D) [$F(3,72)=109.2$; $p < 0.001$] and increased reticulocytes (E) [$F(3,74)=114.0$; $p < 0.001$] in the blood of rats. However, chronic administration of lead did not alter the number of erythrocytes (A) [$F(3,72)=2.003$; $p > 0.05$].

Effects of chronic administration of lead on biomarkers of oxidative stress in the blood of rats

Next, we verified the effects of chronic administration of different concentrations of lead (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the plasma and on the activities of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px in the erythrocytes of rats. Figure 2A shows that chronic administration of lead did not alter the levels of TBA-RS [$F(3,20)=0.340$; $p > 0.05$] and total sulfhydryl content (B) [$F(3,20)=2.602$; $p > 0.05$], but significantly enhanced protein carbonyl content (C) [$F(3,20)=6.002$; $p < 0.01$] in the plasma of 60-day-old rats, at doses of 64 and 128mg/kg. As can be seen in Figure 3, chronic administration of lead (64 and 128mg/kg) significantly decreased the activity of SOD (A) [$F(3,20)=5.646$; $p < 0.01$] and CAT (B) [$F(3,20)=12.378$; $p < 0.001$] in the

erythrocytes of rats. Conversely, chronic administration of lead (16, 64 and 128mg/kg) increased the activity of GSH-Px(C) [$F(3,20)=7.460$; $p<0.01$], as compared to the control group.

Effects of the chronic administration of lead on markers of thyroid function in the serum of rats

Subsequently, this study investigated the effects of chronic administration of lead (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on the levels of thyroid stimulating hormone (TSH) and thyroxine 4 free (T4L) in the serum of rats. Chronic administration of lead (128mg/Kg) decreased the level of T4L (Figure 4A) [$F(3,72)=5.490$; $p<0.01$] in the serum of rats, but none of the doses of lead altered the levels of TSH (Figure 4B) [$F(3,75)=0.206$; $p>0.05$], as compared to the control group.

Effects of the chronic administration of lead on biochemical parameters in the serum of rats

Finally, this study evaluated the effects of chronic administration of lead (16mg/Kg, 64mg/Kg and 128mg/Kg) on the levels of potassium and lactate dehydrogenase (LDH) in the serum of rats. As can be seen in Figure 5A, chronic administration of lead did not alter the levels of potassium [$F(3,72)=1.572$; $p>0.05$] and the value of LDH activity (Figure 5B) [$F(3,71)=0.9797$; $p>0.05$] in these rats, as compared to the control group.

Discussion

The present study demonstrated that chronic administration of different doses of lead (16 mg/Kg, 64 mg/kg and 128 mg/Kg) had significant consequences on hematological parameters, since chronic administration of lead (128 mg/Kg) diminished hemoglobin and increased RDW. Also, at doses of 64 mg/Kg and 128 mg/Kg, decreased VCM and increased reticulocytes number in the blood of rats. However, chronic administration of Pb did not alter the numbers of erythrocytes. These results corroborate with previous researches which suggested that lead interfered in the enzymatic system of the heme synthesis,

hinder the hemoglobin generation (FLORA, S. J. S. et al., 2012; CHEN et al., 2015; SUDJAROEN; SUWANNAHONG, 2017). The lead inhibits the ALAD, an important enzyme in the heme biosynthesis, this takes to an accumulation of Acid δ -aminolevulínico (ALA), which induces to an oxygen reactive species generation (ROS), this is one of the mechanisms involved in the initial stage of poisoning induced by lead (MATOVIĆ et al., 2015a). Another mechanism is the lead action, hinder the iron absorption, essential element to the hemoglobin production, through the competitive inhibition complicating the intracellular transportation and it's usage in the erythropoietin cells. Therefore it is also speculated that lead can affect the hemoglobin because it interferes in the iron mechanism (CHEN et al., 2015). Regarding the RDW increasing, it was observed after 35 days of lead exposure, this can be the first clue of the erythropoiesis disturb to notice microcytic cells, confirmed in our study by the decreasing of (CHEN et al., 2015; SUDJAROEN; SUWANNAHONG, 2017; MAZUMDAR et al., 2017; DAI et al., 2017). The reticulocytosis observed in our research collaborates to studies about occupational exposure to Lead, in which the authors showed a higher percentage of reticulocytes in peripheral blood in work people (KHAN et al., 2008; YE et al., 2013; BASIT et al., 2015; KALAHASTHI; BARMAN, 2016). Similar studies, using Wistar rats as experimental model also showed a reticulocytes increasing (SILVEIRA; PERES, 2013; PANOV et al., 2015; OKEDIRAN et al., 2016). The reticulocytes count is an indirect indicator of the erythropoietin activity, important blood marker. Li et al. (2016) reports that the lead poisoning is associated to the reticulocytes increasing due the enzymes inhibitions such as the ribonucleic and ATPase of the erythrocyte membrane leading to the K^+ loss and reducing the medium lifetime of this cell (LI et al., 2016). According to the erythrocytes unaltered, it can be related to the medium life time of the erythrocytes of 120 days, once that our study used an intoxication period of 35 days, not being able to have enough time to have an erythrocyte changes (KALAHASTHI; BARMAN, 2016). Considering the hematological finds observes, the routine blood exam is seen as an important ally in the poisoning diagnostics, including the lead.

Dates showed that the lead toxicity involves associate mechanisms of oxidative stress (KAMIŃSKI; KURHALYUK, 2007). In the present study chronic administration of lead did not alters the levels of TBA-RS and total sulfhydryl content, but enhanced

protein carbonyl content in the plasma of rats, at doses of 64 and 128 mg/kg, indicating protein damage. According to Velaga et al. (2014), the carbonate proteins are generated by several oxidant agents, including catalyzed reactions by metals. (VELAGA et al., 2014). About antioxidant enzymes, chronic administration of lead (64 and 128 mg/kg) decreased the activity of SOD and CAT in the erythrocytes, and lead (16, 64 and 128 mg/kg) increased the activity of GSH-Px. Literature dates show that the lead promotes a ROS generation, increasing the hydrogen peroxide levels, hydroxyl radicals and superoxide (DOBRAKOWSKI et al., 2016). The decreasing in the SOD activity, observed in our study, can be related to the enzyme consumption by high levels of superoxide or assign to the high affinity of the lead to the sulfidriles group (PRASANTHI et al., 2010; BASIT et al., 2015). ON the other hand, it can be related to a competition of the lead, mimetizing the metals function (cooper and zinc), presented as cofactors to the SOD systolic, or of the manganese to the mitochondrial SOD (PRASANTHI et al., 2010; ARANTES et al., 2016). The observed decreasing of the CAT activity can be due the lower iron absorption by the gastrointestinal tract caused by the lead, therefore inhibiting the heme synthesis and decreasing the enzyme concentration (PRASANTHI et al., 2010). Dehkordi in a recent study, used an experimental model with Wistar rats poisoned with 1000 ppm lead acetate for 35 days, via gavage, observed an increasing of TBA-RS, different results, however also showed a decreasing of CAT activity (DEHKORDI et al., 2017). Sirivarasai (2015), in research to evaluate the risks of chronic diseases as high blood pressure, observed a correlation between high levels of lead with CAT and SOD decreasing in hypertensive (SIRIVARASAI et al., 2015). Also collaboration with our results, Dewanjee et al. (2013), in and chronic experimental model (40 days) with Wistar rats intoxicated with lead acetate, 5 mg/Kg, orally, reported the SOD and CAT decreasing. Regarding the increasing of the GSH-Px activity it can be associated to an adaptive mechanism, as consequence of the oxidative stress induced by lead (BARKUR; BAIRY, 2015). Agreeing to our results, clinical studies confirm the increasing in the GSH-Px activity as a result of the lead action (ERGURHAN-ILHAN et al., 2008). Also, other studies of lead poisoning that evaluated antioxidant activity in brain structures of Wistar rats showed the increasing of GSH-Px activity (ERGURHAN-ILHAN et al., 2008).

Subsequently, this study investigated the effects of chronic administration of lead on the levels of hormones related to thyroid gland, TSH and FT4 in the serum rats. The association of the increasing serum levels of lead with the reduction of the thyroid function is not clear yet, once that there are not many studies in this research area and these differ regarding the results. There way, there are no consensus about the effects of the lead in the thyroid physiology (PEKCICI et al., 2010). The thyroid hormones are essential to the metabolism regulation, to transform nutrients into energy, keeping this way a normal function of the cardiovascular, reproductive and nevous system (WAJNER et al., 2008). The mechanisms of thyroid toxicity can involve direct effects in the interruption of the thyroid hormones generation or indirectly by influenciating the thyroid glands through enzyme inhibition as the 5 deiodinase or liver microsomal enzymes as T4-UDP-glucuroniltransferase. These mechanisms can decrease the levels of thyroid hormones by inhibiting the synthesis or the negative feedback due the TSH increasing (RANA, 2014).

According to Doumouchsis et al.(2009), in a review study, they found researches that reported a decreasing of Triiodothyronine (T3) and thyroxin (T4), suggesting an association to lead exposure with thyroid hormones changes (DOUMOUCTSIS et al., 2009). In a study of Kahn (2014), realized with pregnant women who live in lead contaminated areas, the results suggests that the serum levels of lead above normal can be related to the decreasing of the thyroid function due the decreasing absorption of iodine by the thyroid tissue, related to the autoimmune answer (KAHN et al., 2014). Other study with work people expose, relates the negative association of duration of the lead with serum levels of thyroxin and FT4, suggesting the thyroid function can be depress as result of an intense exposure in a long time (LI et al., 2016). Also, Singh (2000), in a study with work people that manipulate gas bombs and make mechanism repairs in cars, established a correlation between the lead serum levels and work time, with a decreasing of thyroid hormones. According to Nie (2017), in a Chinese population study, found correlation between the lead serum levels with the TSH increase and Hypothyroidism, evidenced by the T4 decreasing, but only between the women (NIE et al., 2017). Still collaborating with our results, Ibraim (2012), in research with albino rats and using an intoxication model of lead poisoning with three sublethal doses (1/20, 1/40 and 1/60 of LD50) showed the decreasing of the thyroid hormones in all

the three concentrations. However, in other studies realized with work people or expose population, where not observed any significant tendency change of the thyroid function associated to the lead exposure (GENNART et al., 1992; MENDY et al., 2013; CHEN et al., 2015; WU et al., 2016).

Conclusion

This study contributed with information's to the comprehension of the changes caused by lead poisoning. Our results suggests that the lead exposure increases the risks of hematological changes, pointed by the hemoglobin and VCM decreasing, contributing to an anemic status; and due the reticulocytosis, suggesting the presence of hemolysis. These results confirm the significance of the hematological routine exam, with has low costs, being useful to the clinical selection of lead poisoning cases. In the OS parameters evaluation, where observed an alteration in the redox system, observed due the protein damage (protein carbonization) and an important change in the antioxidant system, suggesting the OS can be one of the involved mechanisms in the lead poisoning. In the hormones evaluation, the results suggests a decreasing in the thyroid function, however, current researches still do not bring any consensus about the effects of lead in the thyroid physiology. There is necessary other future studies in human beings and animal model researches using different concentrations and exposure time to major clarification.

Conflict of interest

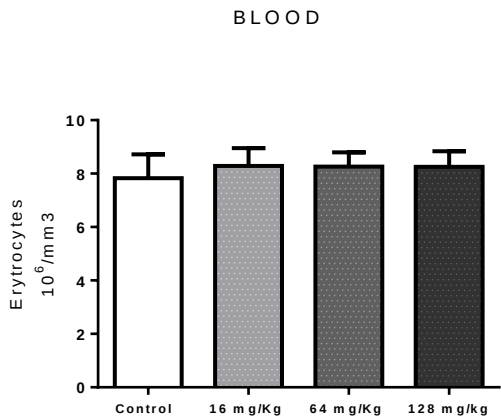
The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

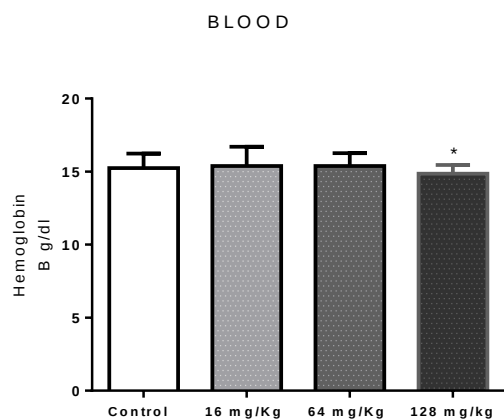
This work was supported by grants from University of the region Joinville.

Attachment

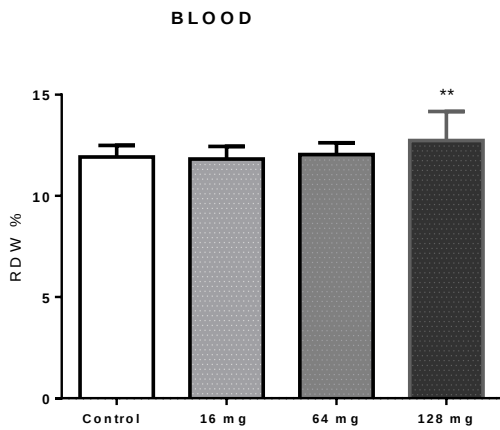
(A)



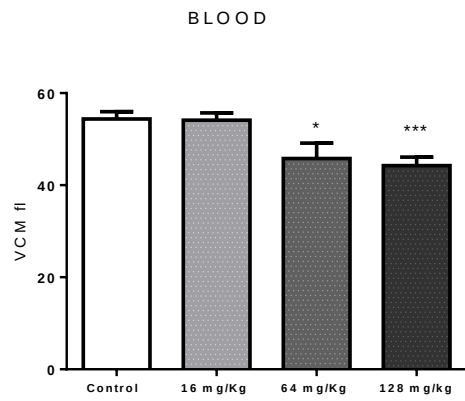
(B)



(C)



(D)



(E)

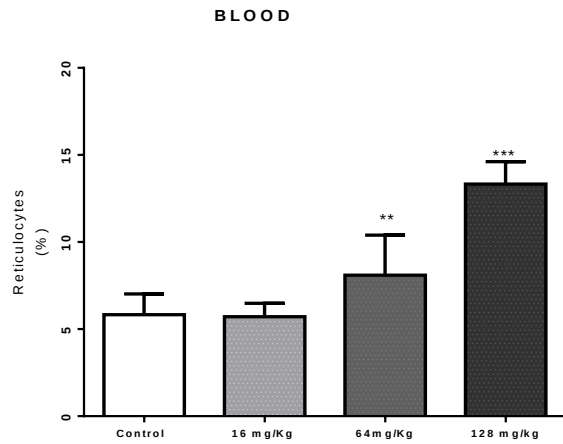


Figure 1: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on Eritrocytes number (A), hemoglobin content (B), RDW (C), VCM (D) and reticulocytes number (E) in the blood of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate.

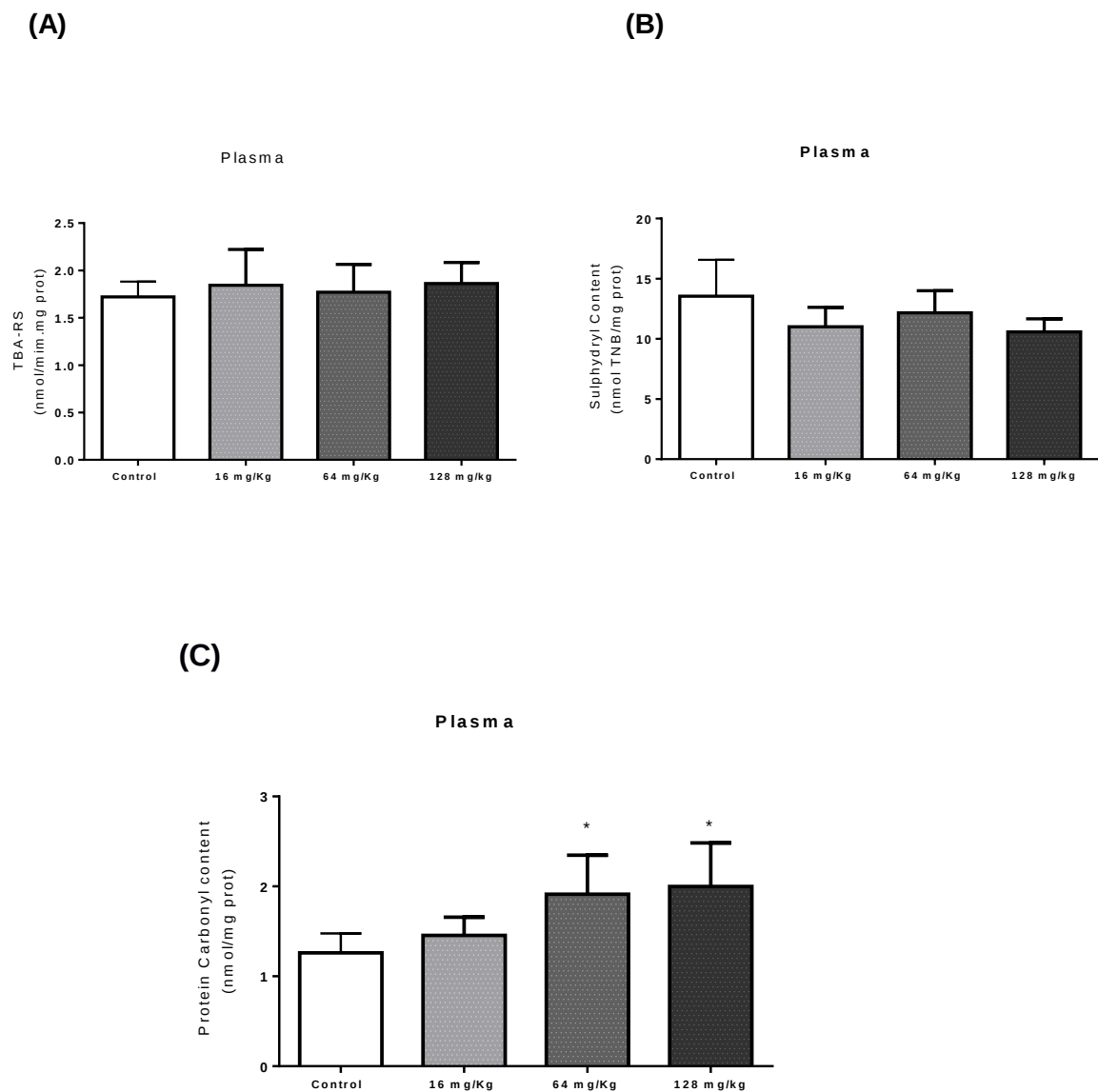
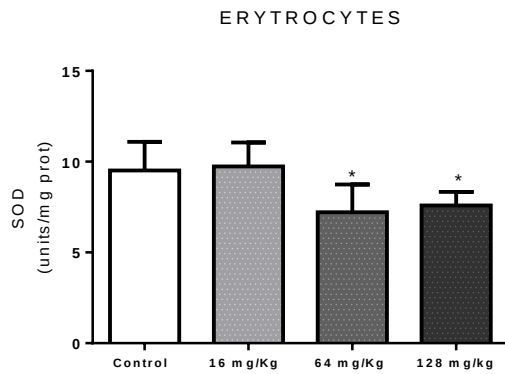
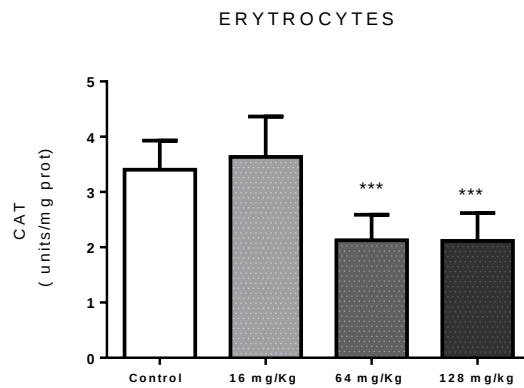


Figure 2: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulphydryl content (B) and protein carbonyl content (C) in the plasma of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. *P<0.05, compared to control group (Duncan's multiple range test)

(A)



(B)



(C)

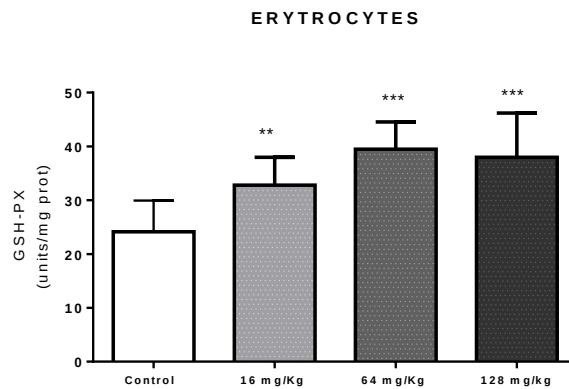


Figure 3: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on the activities of SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) in the erythrocytes of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$, compared to control group (Duncan's multiple range test).

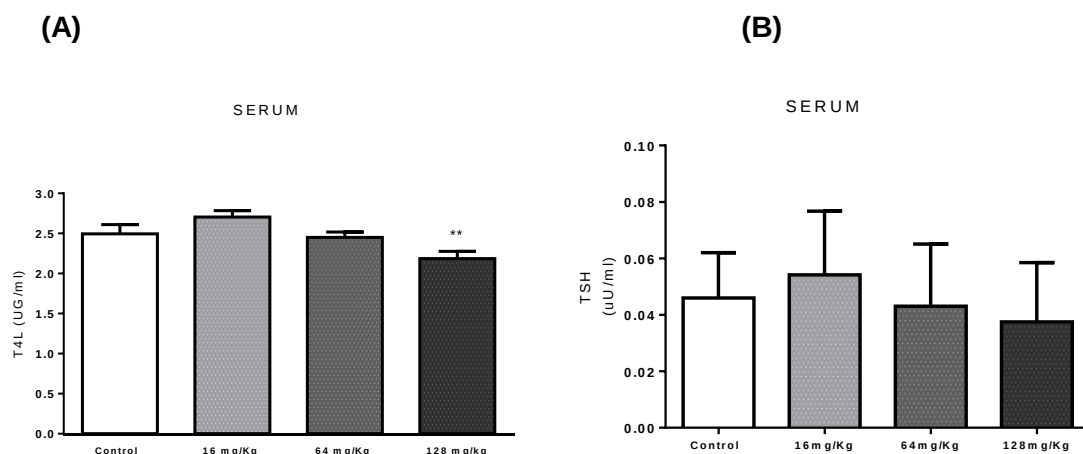


Figure 4: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on the T4 L dosage (A) and TSH dosage (B) in serum of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. **P<0.01, compared to control group (Duncan's multiple range test).

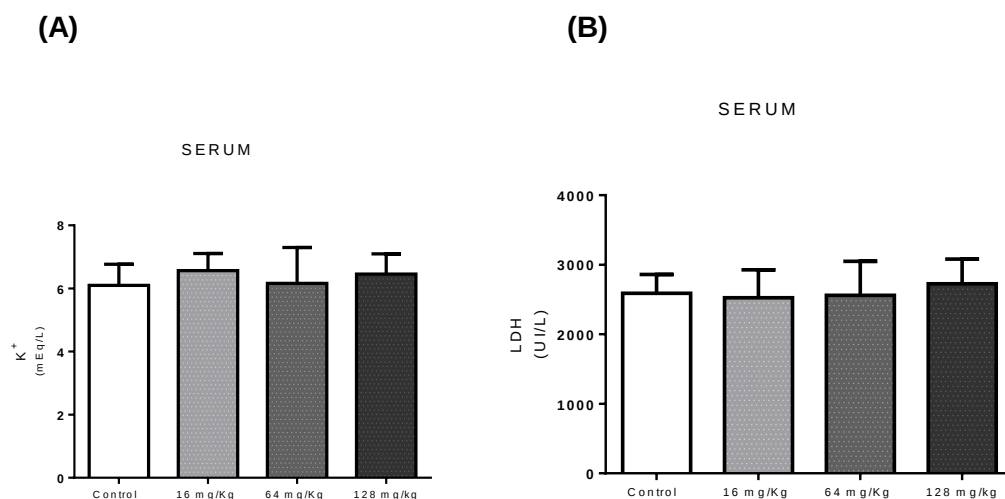


Figure 5: Effect of increasing concentrations of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on K⁺ dosage (A) and on the activities of LDH (B) in the serum of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. *P<0.05, compared to control group (Duncan's multiple range test).

References

- ABDEL-MONEIM, A. M.; EL-TOWEISSY, M. Y.; ALI, A. M.; et al. Curcumin Ameliorates Lead (Pb²⁺)-Induced Hemato-Biochemical Alterations and Renal Oxidative Damage in a Rat Model. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 206–220, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-015-0360-1>>. .
- ABDULMAJEED, W. I.; SULIEMAN, H. B.; ZUBAYR, M. O.; et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male Wistar rats- a preliminary study. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11011-015-9733-6>>. .
- ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G.; OMOJOKUN, O. S.; ADEFEGHA, O. M. ScienceDirect Alterations of Na⁺ / K⁺ -ATPase , cholinergic and antioxidant enzymes activity by protocatechuic acid in cadmium-induced neurotoxicity and oxidative stress in Wistar rats. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 559–568, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.017>>. .
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. CCR Press.
- AGRAWAL, S.; BHATNAGAR, P.; FLORA, S. J. S. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 208–216, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.013>>. .
- AHRENS, K. A.; HALEY, B. A.; ROSSEN, L. M.; LLOYD, P. C.; AOKI, Y. Housing Assistance and Blood Lead Levels: Children in the United States, 2005–2012. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 11, p. 2049–2056, 2016. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2016.303432>>. .
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001016366>>. .
- AL-OTAIBI, W. R.; VIRK, P.; ELOBEID, M. Ameliorative potential of stem bromelain on lead-induced toxicity in Wistar rats. **Acta biologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p.

149–60, 2015. Disponível em: <<http://www.akademaii.com/doi/abs/10.1556/018.66.2015.2.2>>. .

ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. DOS; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202012000100011&lng=pt&tlng=pt>. .

ANP Nº 06/99. Regulamento Técnico Gasolinas Automotivas. , 1999.

ANTONIO-GARCI, M. T. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats : Involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. , v. 46, p. 2089–2095, 2008.

ANTONIO, M. T.; CORREDOR, L.; LERET, M. L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and / or cadmium. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 331–340, 2003.

ANTONIO, M. T.; LERET, M. L. Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. **life Sciences**, v. 67, p. 635–642, 2000.

ARANTES, F. P.; SAVASSI, L. A.; SANTOS, H. B.; GOMES, M. V. T.; BAZZOLI, N. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, n. 1, p. 137–147, 2016.

ARAUJO, U. C.; PIVETTA, F. R.; MOREIRA, J. C. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 1, p. 123–132, 1999.

ATSDR, C. D. C.; SCIENCES, H. H. Chumbo - ToxFAQs™. **Chumbo- ToxFAQs**, v. CAS Nº 743, p. 1–2, 2007.

AYKIN-BURNS, N.; LAEGELER, A.; KELLOGG, G.; ERCAL, N. Oxidative Effects of Lead in Young and Adult Fisher 344 Rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 417–420, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00244-002-2023-4>>. .

BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; et al. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by

perinatal exposure to lead. **Brain Research**, v. 35, p. 56–71, 2011.

BARKUR, R. R.; BAIRY, L. K. Assessment of oxidative stress in hippocampus, cerebellum and frontal cortex in rat pups exposed to lead (Pb) during specific periods of initial brain development. **Biological trace element research**, v. 164, n. 2, p. 212–8, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-0221-3>>.

BARRA, K.; BARBOSA, F.; MARIA, N.; et al. Estresse oxidativo: conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Divulgação. , v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASHA, D. C.; RANI, M. U.; DEVI, C. B.; KUMAR, M. R.; REDDY, G. R. International Journal of Developmental Neuroscience Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain: reversal effect of calcium co-administration. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 343–350, 2012. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.01.004>>.

BASIT, S.; KARIM, N.; ALI, S. S.; et al. OCCUPATIONAL LEAD TOXICITY IN BATTERY WORKERS OF KARACHI. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 4, p. S284–S286, 2015. Disponível em: <<http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/7066>>.

BAZRGAR, M.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; ELAHDADI SALMANI, M. Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 178–188, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.040>>.

BHATTACHARJEE, T.; BHATTACHARJEE, S.; CHOUDHURI, D. Hepatotoxic and Nephrotoxic effects of chronic low dose exposure to a mixture of heavy metals- Lead, Cadmium and Arsenic. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 39–47, 2016.

BOKARA, K. K.; BROWN, E.; MCCORMICK, R.; et al. Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. **BioMetals**, v. 21, n. 1, p. 9–16, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214713>>.

BORGHINI, A.; GIANICOLO, E. A.; ANDREASSI, M. G. Usefulness of biomarkers as

intermediate endpoints in health risks posed by occupational lead exposure. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 29, n. 2, p. 167–178, 2015. Disponível em: <<http://www.journalssystem.com/ijomeh/USEFULNESS-OF-BIOMARKERS-AS-INTERMEDIATE-r-nENDPOINTS-IN-HEALTH-RISKS-OF-OCCUPATIONAL-LEAD-EXPOSURE,58529,0,2.html>>. .

BOUTA DABROWSKA B, STRUZYNSKA L AND RAFALOWSKA, U. Does Lead Provoke the Peroxidation Process in Rat Brain Synaptosomes? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 29, p. 127–139, 1996.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-bye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAZIL, D. Mineral Business. , 2006.

BREWER, A. C.; MUSTAFI, S. B.; MURRAY, T. V. A.; RAJASEKARAN, N. S.; BENJAMIN, I. J. Reductive Stress Linked to Small HSPs, G6PD, and Nrf2 Pathways in Heart Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 1114–1127, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4914>>. .

BRINK, L. A.; TALBOTT, E. O.; MARSH, G. M.; et al. Revisiting Nonresidential Environmental Exposures and Childhood Lead Poisoning in the US: Findings from Kansas, 2000–2005. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jeph/2016/8791686/>>. .

BRONCANO, J. M.; PETRÓN, M. J.; PARRA, V.; TIMÓN, M. L. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in Latissimus dorsi muscle of Iberian pigs. **Meat science**, v. 83, n. 3, p. 431–7, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

CALDEIRA, C.; MATTOS, R. D. C. O. D. C.; MEYER, A.; MOREIRA, J. C. Limites de aplicabilidade da determinação do ácido delta-aminolevulínico urinário como teste screening na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 225–230, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000100023&lng=pt&tlng=pt>. .

CAMPBELL, C.; GREENBERG, R.; MANKIKAR, D.; ROSS, R. A Case Study of Environmental Injustice: The Failure in Flint. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, p. 951, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/10/951>>. .

CAVALCANTE, A. L. M. Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento Ambiental do Chumbo. **Ministério da Saúde FIOCRUZ**, p. 59, 2009.

CELIK, A.; OGENLER, O.; CÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411–5, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135535>>. .

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269786906408>>. .

CHEN, A.; KIM, S. S.; CHUNG, E.; DIETRICH, K. N. Thyroid Hormones in Relation to Lead , Mercury , and Cadmium Exposure in the National Health and Nutrition Examination Survey , 2007 – 2008. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 2, p. 181–187, 2013.

CHEN, J.; MERCER, G.; ROTH, S. R.; et al. Sub-chronic lead exposure alters kidney proteome profiles. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1616–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247988>>. .

CHEN, X.; ZHOU, H.; LI, X.; et al. Effects of lead and cadmium co-exposure on hemoglobin in a Chinese population. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 758–63, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.005>>. .

CHIBOWSKA, K.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; FALKOWSKA, A.; et al. Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2140, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2140>>. .

CONTERATO, G. M. M.; AUGUSTI, P. R.; SOMACAL, S.; et al. Effect of lead acetate on cytosolic thioredoxin reductase activity and oxidative stress parameters in rat kidneys. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 2, p. 96–100, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651309>>. .

CONTERATO, G. M. M.; QUATRIN, A.; SOMACAL, S.; et al. Acute exposure to low lead levels and its implications on the activity and expression of cytosolic thioredoxin reductase in the kidney. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 114, n. 6, p. 476–84, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bcpt.12183>>. .

COSTA, C. H. DA; RUFINO, R.; LAPA E SILVA, J. R. [Inflammatory cells and their mediators in COPD pathogenesis]. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 55, n. 3, p. 347–54, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629358>>. .

CUNHA, A. A. DA; FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, M. J. DA; et al. Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 153–160, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-011-0930-2>>. .

DAI, Y.; HUO, X.; ZHANG, Y.; et al. Elevated lead levels and changes in blood morphology and erythrocyte CR1 in preschool children from an e-waste area. **The Science of the total environment**, v. 592, p. 51–59, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.080>>. .

DEHKORDI, A. J.; MOHEBBI, A. N.; ASLANI, M. R.; GHOREYSHI, S. M. Evaluation of nanoselenium (Nano-Se) effect on hematological and serum biochemical parameters of rat in experimentally lead poisoning. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 4, p. 421–427, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327116651124>>. .

DELWING-DE LIMA, D.; FRÖHLICH, M.; DALMEDICO, L.; et al. Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 2, p. 359–368, 2017. Metabolic Brain Disease. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-016-9915-x>>. .

DOBRAKOWSKI, M.; BORÓN, M.; KASPERCZYK, S.; et al. The analysis of blood lead levels changeability over the 5-year observation in workers occupationally exposed to lead. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 6, p. 469–477, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233716674380>>. .

DOBRAKOWSKI, M.; PAWLAS, N.; HUDZIEC, E.; et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and oxidative stress in individuals with subacute occupational exposure to lead. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 235–

240, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.008>>. .

DOUMOCHTSIS, K. K.; DOUMOCHTSIS, S. K.; DOUMOCHTSIS, E. K.; PERREA, D. N. The effect of lead intoxication on endocrine functions. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 32, n. 2, p. 175–183, 2009.

EGER, G. A.; FERREIRA, V. V.; BATISTA, C. R.; et al. Original Article. , v. 35, n. 1, p. 49–54, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>>. .

ERGURHAN-ILHAN, I.; CADIR, B.; KOYUNCU-ARSLAN, M.; et al. Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. **Pediatrics International**, v. 50, n. 1, p. 45–50, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-200X.2007.02442.x>>. .

FEDERAL, C.; VETERIN, D. E. M.; VETERIN, M. Resolução N° 1000 , De 11 De Maio De 2012. , 2012.

FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, A. A. DA; MACHADO, F. R.; et al. Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 174–83, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882227>>. .

FERREIRA, A. L. A. .; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, B. Criação e Manejo de Ratos. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**, p. 388 p., 2002.

FERREIRA, J.; TORRES, R.; FERREIRA, J.; TORRES, R. Exposição profissional ao Chumbo. Análise da indução de efeitos genotóxicos. , 2011.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 47–58, 2012. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/intox.2012.5.issue-2/v10102-012-0009-2/v10102-012-0009-2.xml>>. .

FLORA, S. J. S.; GAUTAM, P.; KUSHWAHA, P. Lead and Ethanol Co-Exposure

Lead to Blood Oxidative Stress and Subsequent Neuronal Apoptosis in Rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 47, n. 2, p. 92–101, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/alcalc/article-lookup/doi/10.1093/alcalc/agr152>>. .

FLORA, S. J. S.; PANDE, M.; BHADAURIA, S.; KANNAN, G. M. Combined administration of taurine and meso 2 , 3-dimercaptosuccinic acid in the. **Human & experimental toxicology**, v. 23, p. 157–167, 2004.

GASTALDELLO, E.; JORDAO, G.; ROSA, D. M.; et al. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. **Toxicology**, v. 169, p. 145–151, 2001.

GAUTAM, P.; FLORA, S. J. S.; PH, D. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 563–570, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.008>>. .

GENNART, J. P.; BUCHET, J. P.; ROELS, H.; et al. Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese. **American journal of epidemiology**, v. 135, n. 11, p. 1208–19, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1626539>>. .

GEOLOGIA, S. D. E.; MINERAÇÃO, E.; MUNDIAL, B. E TRANSFORMAÇÃO MINERAL . MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME Juarez Fontana dos Santos. , 2010.

GEORGE, T.; SANTOS, H. B. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. , v. 15, p. 209–214, 2011.

GERHARD, I.; WAIBEL, S.; DANIEL, V.; RUNNEBAUM, B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 3, p. 301–309, 1998.

GHANWAT, G. Effect of Vitamin C Supplementation on Blood Lead Level, Oxidative Stress and Antioxidant Status of Battery Manufacturing Workers of Western Maharashtra, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 4, p. 8–11, 2016. Disponível em: <http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2016&volume=10&issue=4&page=BC08&issn=0973-709x&id=7528>. .

GHAREEB, D. A.; HUSSIEN, H. M.; KHALIL, A. A. Toxicological & Environmental Chemistry Toxic effects of lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress , inflammation , acetylcholinesterase , and the beneficial role of

flaxseed extract. **Toxicology & Environmental Chemistry**, , n. October 2014, p. 37–41, 2010.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **GUYTON**. 13 ed Else ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>>. .

HAYAKAWA, K.; MIMURA, Y.; TACHIBANA, S.; FURUYA, M. A Study for collecting background data on Wistar Hannover [Crl : WI (Han)] rats in general toxicity studies - comparative data to Sprague Dawley rats -. , v. 38, n. 6, p. 855–873, 2013.

HENRICHS, J.; BONGERS-SCHOKKING, J. J.; SCHENK, J. J.; et al. Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4227–34, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534757>>. .

HERNBERG, S. Lead Poisoning in a Historical Perspective. , v. 254, n. February, p. 244–254, 2000.

HO, Y.; LIN, Y.; WU, C. J.; et al. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of Biomedical Science**, p. 1–14, 2015. Journal of Biomedical Science. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>>. .

HOFFMAN, D. J. ET AL. **Handbook of Ecotoxicology**. 1994.

HOSSAIN, S.; PH, D.; BHOWMICK, S.; et al. NeuroToxicology Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress , in fl ammatory response and apoptosis in the offspring rats. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 150–158, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.013>>. .

HOSSEINZADEH, S.; ROSHAN, V. D.; MAHJOUB, S. Continuous exercise training and curcumin attenuate changes in brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress induced by lead acetate in the hippocampus of male rats. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 2, p. 240–5, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2012.717230>>. .

IBRAHIM, N. M.; EWEIS, E. A.; EL-BELTAGI, H. S.; ABDEL-MOBDY, Y. E.

RETRACTED ARTICLE: The Effect of Lead Acetate Toxicity on Experimental Male Albino Rat. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1–3, p. 1120–1132, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-011-9149-z>>. .

IBRAHIM, N. M.; EWEIS, E. A.; EL-BELTAGI, H. S.; ABDEL-MOBDY, Y. E. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 41–46, 2012. Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)>. .

JADHAV, S. H.; SARKAR, S. N.; PATIL, R. D.; TRIPATHI, H. C. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 4, p. 667–677, 2007.

JEON, G. J.; PARK, J.; KIM, M. S.; et al. A Case of Lead Poisoning with Drug-induced Liver Injury after Ingestion of Herbal Medicine. , v. 65, n. 6, p. 375–378, 2015.

JUNIOR, D. E. L.; JUNIOR, A. Absorption Levels and Morphological Features of Fetal Organs in Wistar Rats Treated with Lead Acetate. **Int. J. Morphological**, v. 30, p. 119–124, 2012.

JURDZIAK, M.; GAĆ, P.; POREBA, M.; et al. Concentration of Thyrotropic Hormone in Persons Occupationally Exposed to Lead, Cadmium and Arsenic. **Biological Trace Element Research**, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1096-x>>. .

KAHN, L. G.; LIU, X.; RAJOVIC, B.; et al. Blood lead concentration and thyroid function during pregnancy: results from the Yugoslavia Prospective Study of Environmental Lead Exposure. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 10, p. 1134–40, 2014. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/1307669>>. .

KALAHASTHI, R.; BARMAN, T. Effect of Lead Exposure on the Status of Reticulocyte Count Indices among Workers from Lead Battery Manufacturing Plant. **Toxicological Research**, v. 32, n. 4, p. 281–287, 2016. Disponível em: <<http://www.toxicolres.org/journal/view.html?doi=10.5487/TR.2016.32.4.281>>. .

KAMIŃSKI, P.; KURHALYUK, N. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Changes in Physiological Process of Free Radicals in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Chicks in Polluted Areas. **Polish J of Environ. Stud**, v. 16, n. 4, p. 555–562, 2007.

KARAMALA, S.; CH, S.; Y, A.; TS, C.; PIDUGU, S. Hematobiochemical changes of lead Poisoning and amelioration with *Ocimum sanctum* in wistar albino rats. **Veterinary World**, v. 4, n. 6, p. 260, 2011. Disponível em: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.4/June - 2011/6.html>>. .

KASPERCZYK, A; DZIWISZ, M.; OSTAŁOWSKA, A; SWIETOCHOWSKA, E.; BIRKNER, E. Function of the liver and bile ducts in humans exposed to lead. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 8, p. 787–96, 2013. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.endeavour.edu.au:2048/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=8fecc91e-a304-479c-80de-493deabf8df5@sessionmgr4005&vid=2&hid=4205>>. .

KAYAMA, Y.; RAAZ, U.; JAGGER, A.; et al. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/25234/>>. .

KEANEY, J. F. Obesity and Systemic Oxidative Stress: Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 434–439, 2003. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>>. .

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–798, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2015.1074159>>. .

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–98, 2015.

KHAN, D. A.; QAYYUM, S.; SALEEM, S.; KHAN, F. A. Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers. **Toxicology and industrial health**, v. 24, n. 9, p. 611–8, 2008. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233708098127>>. .

LA-LLAVE-LEÓN, O.; SALAS PACHECO, J. M.; ESTRADA MARTÍNEZ, S.; et al. The relationship between blood lead levels and occupational exposure in a pregnant population. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 1231, 2016. Disponível em: <<http://bmcpublikealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-016-3902-3>>. .

LALITH, V.; MURALIDHARA, K. Ameliorative Effects of Ferulic Acid Against Lead Acetate-Induced Oxidative Stress , Mitochondrial Dysfunctions and Toxicity in Prepubertal Rat Brain. **Neurochen Res**, v. 39, p. 2501–2515, 2014.

LEBOVITZ, R. M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9782–9787, 1996.

LEE, R.; MARGARITIS, M.; CHANNON, K. M.; ANTONIADES, C. Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations. **Current Medical Chemistry**, v. 19, p. 2504–2520, 2012.

LI, Y.; QIN, J.; WEI, X.; et al. The Risk Factors of Child Lead Poisoning in China: A Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 296, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/3/296>>. .

LIMA, D. D. DE; DELWING, F.; CRUZ, J. G. P. DA; WYSE, A. T. S.; MAGRO, D. D.-D. Protective effect of antioxidants on blood oxidative stress caused by arginine. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 250–258, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.2010.00909.x>>. .

LIMA, M. C.; GIACOMELLI, M. B. O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F. D.; BARRERA, P. B. Especificação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método Tessier. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 734–742, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000600005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

LOWRY, H. O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265,275, 1951.

LU, C.; YUAN, X.; LI, L.; et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Combined exposure to nano-silica and lead induced potentiation of oxidative stress and DNA damage in human lung epithelial cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 537–544, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.030>>. .

LU, Y.; LIU, X.; DENG, Q.; et al. Continuous Lead Exposure Increases Blood Pressure but Does Not Alter Kidney Function in Adults 20-44 Years of Age in a Lead-Polluted Region of China. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 40, n. 3, p.

207–214, 2015. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000368496>>. .

LUGATE, K.; COSTA, C. **DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA , ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA** Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em **Biologia Celula**, 2013.

LUO, J.; HENDRYX, M. Relationship between blood cadmium, lead, and serum thyroid measures in US adults - The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. **International journal of environmental health research**, v. 24, n. 2, p. 125–136, 2014.

LUSHCHAK, V. I. **OXIDATIVE STRESS – ENVIRONMENTAL INDUCTION AND DIETARY**. 1st ed. 2012.

MAGRO, D. D.; ROECKER, R.; JUNGES, G. M.; et al. ScienceDirect Protective effect of green tea extract against proline-induced oxidative damage in the rat kidney. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1422–1427, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.057>>. .

MANZINI, F. F. METAIS PESADOS : FONTE E AÇÃO TOXICOLÓGICA. In: A. A. da N. da A. Paulista (Ed.); . p.800–815, 2011. São Paulo.

MARKULND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: B. R. CRC Press (Ed.); **Handbook for oxygen radical research**. p.243,247, 1985.

MARTINI, A.; WAGNER, R.; RISSO, E.; NARCISO, M.; MARTINEZ, C. B. R. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiol Biochem**, v. 40, p. 645–657, 2014.

MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130–140, 2015a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515000575>>. .

MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130–140, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>>. .

MAZOTO, L.; MENDON, R.; MAGALH, V.; ILDES, C.; FR, R. Perfil de exposição ao chumbo em crianças escolares da rede municipal da cidade do Rio de Janeiro ,

Brasil The lead exposure profile of municipal public schoolchildren in the city of Rio de. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.; Recife**, v. 14, n. 4, p. 413–421, 2014.

MAZUMDAR, I.; GOSWAMI, K.; ALI, M. S. Status of Serum Calcium, Vitamin D and Parathyroid Hormone and Hematological Indices Among Lead Exposed Jewelry Workers in Dhaka, Bangladesh. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 110–116, 2017. Springer India. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12291-016-0582-9>>. .

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 10, n. 4, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.scienciaplana.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/295>>. .

MENDY, A.; GASANA, J.; VIEIRA, E. R. Low blood lead concentrations and thyroid function of American adults. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 23, n. 6, p. 461–473, 2013.

MENEZES, S. M. P. N. J. M. F. E. W. DE. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. **Usp**, p. 234 p., 2013.

MINOZZO, R.; WAGNER, S. C.; SANTOS, C. H.; DEIMLING, L. I.; MELLO, R. S. Prevalência de anemia em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao chumbo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 94–97, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000200011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

MONEIM, A. E. A. Flaxseed Oil as a Neuroprotective Agent on Lead Acetate-Induced Monoaminergic Alterations and Neurotoxicity in Rats. **Biol trace Elem Res**, v. 148, p. 363–370, 2012.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167–181, 2004.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 251–260, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422004000200015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

NIE, X.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; et al. Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 320–328, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116328445>>. .

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>>. .

OKEDIRAN, B. S.; KASALI, O. B.; OMOTAINSE, S. O.; AKINLOYE, O. A.; STATE, O. HAEMATO-BIOCHEMICAL ALTERATIONS AS BIOMARKERS OF LEAD INDUCED TOXICITY IN MALE WISTAR RATS. **Bangl. J. vet med**, v. 14, p. 227–232, 2016.

ORISAKWE, O. E.; NWACHUKWU, E.; OSADOLOR, H. B.; AFONNE, O. J.; OKOCHA, C. E. Liver and kidney function tests amongst paint factory workers in Nkpor, Nigeria. **Toxicology and industrial health**, v. 23, n. 3, p. 161–5, 2007. Disponível em: <[http://search.proquest.com/docview/223268374?accountid=12528%5Cnhttp://mona-sh-](http://search.proquest.com/docview/223268374?accountid=12528%5Cnhttp://mona-sh-dc05.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.8-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:healthcompleteshell&atitle=L)

[dc05.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.8-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:healthcompleteshell&atitle=L](http://search.proquest.com/docview/223268374?accountid=12528%5Cnhttp://mona-sh-dc05.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.8-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:healthcompleteshell&atitle=L)>. .

OZKAYA AHMET, SAHIN ZAFER, D. U. AND O. M. Effects of Naringenin on Oxidative Stress and Histopathological Changes in the Liver of Lead Acetate Administered Rats. **Journal Biochem Molecular Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 244–248, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865641>>. .

PANOV, V. G.; KATSNELSON, B. A.; VARAKSIN, A. N.; et al. Further development of mathematical description for combined toxicity: A case study of lead–fluoride combination. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 297–307, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750015000219>>. .

PATLOLLA, A. K.; BERRY, A.; TCHOUNWOU, P. B. Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 189–

199, 2011.

PEDROSO, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; FONSECA, M. M.; OLIVEIRA, V. A.; PEREIRA, M. E. Effects of Zinc and N-Acetylcysteine in Damage Caused by Lead Exposure in Young Rats. **Biological Trace Element Research**, p. 1–10, 2017. Biological Trace Element Research. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1009-z>>. .

PEKCICI, R.; KAVLAĞOĞLU, B.; YILMAZ, S.; ŞAHİN, M.; DELİBAŞI, T. Effects of lead on thyroid functions in lead-exposed workers. **Open Medicine**, v. 5, n. 2, p. 215–218, 2010. Disponível em: <[internal-pdf://142.86.163.118/Pekcici-2010-Effects of lead on thyroid functi.pdf%5Cnhttps://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77952766775&partnerID=40&md5=23ef7fb9d197e94e239ad9945a99b26b](internal-pdf://142.86.163.118/Pekcici-2010-Effects%5Cof%20lead%20on%20thyroid%20function.pdf)
<http://www.degruyter.com/dg/viewarticle.fullcontentlink:p>>. .

PHYU, M. P.; TANGPONG, J. Neuroprotective effects of xanthone derivative of *Garcinia mangostana* against lead-induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 151–156, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.035>>. .

PRASANTHI, R. P. J.; DEVI, C. B.; BASHA, D. C.; REDDY, N. S.; REDDY, G. R. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 161–167, 2010. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.002>>. .

PREET, G.; SIDHU, S.; PAL, H.; BATISH, D. R. Plant Physiology and Biochemistry Effect of lead on oxidative status , antioxidative response and metal accumulation in *Coronopus didymus*. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 105, p. 290–296, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.019>>. .

RAMOS, F.; COSTA, J. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004.

RANA, S. V. S. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - A review. **Biological Trace Element Research**, v. 160, n. 1, p. 1–14, 2014.

RECKZIEGEL, P.; TIRONI, V.; BENVEGNÚ, D.; et al. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment.

Toxicology Letters, v. 203, p. 74–81, 2011.

REDDY, G. R.; BASHA, R.; DEVI, C. B.; et al. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat.

International Journal of Developmental Neuroscience, v. 21, p. 347–352, 2003.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–63, 1994.

Disponível

em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330417>>. .

RIZWAN, S.; NAQSHBANDI, A.; KHAN, F. Dietary Flaxseed Oil Supplementation Mitigates the Effect of Lead on the Enzymes of Carbohydrate Metabolism, Brush Border Membrane, and Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. **Biological Trace**

Element Research, v. 153, n. 1–3, p. 279–290, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613149>>. .

RODRIGUES, A. F.; ROECKER, R.; JUNGES, G. M.; et al. Hypoxanthine induces oxidative stress in kidney of rats: protective effect of vitamins E plus C and allopurinol. **Cell Biochemistry & Function**, v. 32, n. 2014, p. 387–394, 2014.

SAFETY, T. O. Adult Blood Lead Levels in Minnesota. **Clinical and Health Affairs**, v. 47, n. April, p. 47–51, 2016.

SANTISTA, B.; CARSON, Q. R.; SILENCIOSA, P.; MULLER, P.; CUBAT, E. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional. **Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional**, v. mar, p. 1–13, 2005.

SASSO, S.; DALMEDICO, L.; MAGRO, D. D.; WYSE, A. T. S.; LIMA, D. D. Effect of N -acetylarginine , a metabolite accumulated in hyperargininemia , on parameters of oxidative stress in rats: protective role of vitamins and. **Cell Biochemistry & Function**, v. 32, n. July, p. 511–519, 2014.

SCHIFER, T. D. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Informa**, v. 17, n. 5/6, p. 67–72, 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–316, 2004.

SCHNUR, J.; JOHN, R. M. Childhood lead poisoning and the new Centers for Disease Control and Prevention guidelines for lead exposure. **Journal of the**

American Association of Nurse Practitioners, v. 26, n. 5, p. 238–247, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/2327-6924.12112>>. .

SHARMA, D.; SETHI, Æ. P.; HUSSAIN, Æ. E. Curcumin counteracts the aluminium-induced ageing-related alterations in oxidative stress , Na + , K + ATPase and protein kinase C in adult and old rat brain regions. **Biogerontology**, v. 10, p. 489–502, 2009.

SHING, C. M.; PEAKE, J. M.; AHERN, S. M.; et al. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 677–685, 2007. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/H07-051>>. .

SILVA, B. C. E.; TEIXEIRA, J. A. D. A. B. Chumbo. **DNPM Publicações**, , n. 71, p. 18, 2009.

SILVA, C. H. DA; MOREIRA, J. C.; LIMA, J. S. DE; FREITAS, C. M. DE. **Uso de Indicadores de Dose Interna e de Efeito como Ferramentas para Avaliação da Exposição ao Chumbo**, 2001. Disponível em: <<http://teses.icict.fiocruz.br/pdf/silvachm.pdf>>. .

SILVA JÚNIOR, A. F. DA. Intoxicação Crônica Experimental Com Alumínio : Padrões Degenerativos , Comportamentais E Terapia Experimental Com Magnésio Após Lesão Hipocampal. , p. 116, 2013.

SILVEIRA, M. F.; PERES, J. A. Intoxicação plumbífera aguda no tecido cardíaco em ratos Wistar. **Rev Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 11, p. 45–50, 2013.

SIRIVARASAI, J.; KAOJARERN, S.; CHANPRASERTYOTHIN, S.; et al. Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. **BioMed research international**, v. 2015, p. 856319, 2015. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793211>>. .

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de janeiro: Editora Interciência, 2013.

SOLIMAN, M. M.; BAIOMY, A. A.; YASSIN, M. H. Molecular and Histopathological Study on the Ameliorative Effects of Curcumin Against Lead Acetate-Induced Hepatotoxicity and Nephrototoxicity in Wistar Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 167, n. 1, p. 91–102, 2015.

SUDJAROEN, Y.; SUWANNAHONG, K. Biomarker related lead exposure of industrial battery's workers. **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v. 10,

n. 1, p. 194, 2017. Disponível em: <<http://www.atmph.org/text.asp?2017/10/1/194/196523>>. .

SUN, H.; WANG, N.; NIE, X.; et al. Lead Exposure Induces Weight Gain in Adult Rats, Accompanied by DNA Hypermethylation. (N. Aykin-Burns, Ed.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169958, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0169958>>. .

TKACHENKO, H.; KURHALYUK, N. Role of L-arginine against lead toxicity in liver of rats with different resistance to Hypoxia. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1319–1325, 2011.

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K. H.; STAVRIDIS, J. C. Protective Effect of L -Phenylalanine on Rat Brain Acetylcholinesterase Inhibition Induced by Free Radicals. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 103–106, 2000.

TÜZMEN, M. N.; YÜCEL, N. C.; KALBURCU, T.; DEMIRYAS, N. Effects of curcumin and tannic acid on the aluminum- and lead-induced oxidative neurotoxicity and alterations in NMDA receptors. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 2, p. 120–127, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15376516.2014.997947>>. .

VALKO, M.; JOMOVA, K.; RHODES, C. J.; KUC, K. **Redox - and non - redox - metal - induced formation of free radicals and their role in human disease**. 2016.

VELAGA, M. K.; YALLAPRAGADA, P. R.; WILLIAMS, D.; RAJANNA, S.; BETTAIYA, R. Hydroalcoholic Seed Extract of Coriandrum sativum (Coriander) Alleviates Lead-Induced Oxidative Stress in Different Regions of Rat Brain. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1–3, p. 351–363, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-9989-4>>. .

VIGNESHKUMAR, B.; PANDIAN, S. K. Catalase Activity and Innate Immune Response of Caenorhabditis elegans Against the Heavy Metal Toxin Lead. **environmental Toxicology**, p. 313–322, 2011.

WAJNER, S. M.; WAGNER, M. DOS S.; FERNANDES, N. S.; MAIA, A. L. O papel dos Hormônios Tireoidianos na Função Testicular. **Revista HCPA**, v. 28, n. 1, p. 41–48, 2008.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase**. 1981.

WOJCIK, D. Case Study : Chronic Lead Toxicity. , v. 31, n. 3, p. 16–20, 2012.

WU, Y.; GU, J.-M.; HUANG, Y.; et al. Dose-Response Relationship between Cumulative Occupational Lead Exposure and the Associated Health Damages: A 20-Year Cohort Study of a Smelter in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 328, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/3/328>>. .

WYSE, A. T.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G.; et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p. 1719–21, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665589>>. .

XU, T.; GAO, X.; LIU, G. The Antagonistic Effect of Selenium on Lead Toxicity Is Related to the Ion Profile in Chicken Liver. **Biological Trace Element Research**, v. 169, n. 2, p. 365–373, 2016.

XUE, H.-Y.; GAO, G.-Z.; LIN, Q.-Y.; JIN, L.-J.; XU, Y.-P. Protective Effects of Aucubin on H₂O₂-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Phytotherapy Research**, , n. April, p. n/a-n/a, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.3562>>. .

YE, H. H.; JEONG, J. U.; BAEK, N. J.; et al. A Case of Lead Poisoning due to a Mixture of Talisman Ash. , p. 2–7, 2013.

YÜCEBILGIÇ G ET ALL. Effects of Lead on Na⁺ -K⁺ + ATPase and Ca⁺ + 2 ATPase Activities and Lipid Peroxidation in Blood of Workers. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p. 95–97, 2003.

ZHAO, R.; HOLMGREN, A. A Novel Antioxidant Mechanism of Ebselen Involving Ebselen Diselenide, a Substrate of Mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39456–39462, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

7.3 ARTIGO III

Effects of chronic exposure to lead in the kidney and liver: Evaluation of oxidative stress parameters in male rats

Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza^b, Daniela Delwing-de Lima^a, Débora Delwing-Dal Magro^d, Gustavo Heitich Ferrazza^c, Indiana Rodrigues Cruz^a, Sara Barauna^d

^aDepartamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

^c Centro de Ciências da Saúde, Curso de Graduação Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^dDepartamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

The lead (PB) is a heavy metal highly distributed in the environment due to its natural occurrence and the industry jobs. The liver and the kidney have an important role in the PB removal and they became targets in the toxicity of this metal. This study has as aim to evaluate the kidney and liver functions in the lead poisoning using Pb acetate in the doses of 16mg/Kg, 64mg/kg and 128mg/Kg for 35 days in male Wistar rats. In this evaluation it was realized Pb dosage in the liver, oxidative stress parameters such as reactive substance to thiobarbituric (TBA-RS), sulfidril, carbonate protein and the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-PX) in the kidney and liver and the biochemistry parameters, creatinine, urea, Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) in the serum. The results showed that in the liver the Pb dosage increased in all three doses as a dependent answer. In relation to the oxidative stress parameters, it was found an increase in the TBA-RS in the doses of 64mg/kg and 128mg/Kg in the liver and kidney of rats. The CAT activity decreased in the dose of 128mg/Kg and the SOD and GSH-PX activity have not changed in the liver. In the kidney CAT, SOD and GSH-PX activity increased in the dose of 128mg/Kg. The biochemistry parameters AST, ALT, GGT and creatinine did not show any change and the urea presented an increasing in the doses of 64mg/kg and 128mg/kg. Our study suggests that the Pb causes liver and kidney damages and the OS can be involved in the toxicity mechanism of this metal.

INTRODUCTION

The lead (Pb) is a heavy metal highly distributed in the environment due to its natural occurrence and the industry jobs (SCHIFER et al., 2005) and the most important exposure via is through the food ingestion or contaminated soil, while in the occupational exposure, the main contamination via is the inhalation. (BASIT et al., 2015). The liver and kidney have important roles in the Pb removal and because of this they became targets of this metal toxicity action (OZKAYA AHMET, SAHIN ZAFER, 2016). The Pb can accumulate in many organs of the body as liver, kidney and bones causing cell damage (AL-OTAIBI et al., 2015). The kidney is a primary target organ of Pb absorption (CHEN et al., 2011). The chronic exposure to this metal results in lower glomerular filtration function, nephropathy of proximal tubules and can evolve into irreversible interstitial nephropathy (SCHIFER et al., 2005). The Pb conjugates itself with the glutathione of the liver and accumulates in the hepatic cells (SOLIMAN et al., 2015), this effect can lead to the development of hepatic dysfunction (IBRAHIM et al., 2012). Researches show that in the lead intoxication there is an increasing of the enzymes Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT) and the lactate dehydrogenase isoenzyme (LDH) indicating damage in the hepatocyte membrane (BHATTACHARJEE et al., 2016).

Recent studies have been suggesting that lead can cause physiological disturbances by direct or indirect action with formation of oxygen reactive species (ROS) and the reduction of antioxidant enzymes, leading to a condition called oxidative stress (ABDULMAJEED et al., 2016). The nephrotoxic and hepatic effects due to the acute or occupational exposure to Pb had already been reported in many studies but the chronic exposure, few ones brought information about the subclinical effects of

the environment exposure in low levels of Pb and the action on the kidneys and liver still are controversy. The aim of this study was to evaluate the changes in the liver, kidney and on the OS parameters in male Wistar rats of 60 days old, exposure orally for 35 days in three different concentrations of Pb, Allowing the perspective of extrapolation to different exposure levels.

MATERIALS AND METHODS

Animals and reagents

Sixty-day-old male Wistar rats (220-280g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the protocol number 002/2016- PRPPG/CEP. Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Chronic treatment with lead

Male Wistar rats (60 days) were treated with saline (control group) or lead acetate (Sigma Aldrich), at concentrations of 16mg/kg, 64mg/kg and 128mg/kg, by gavage once a day for a period of 35 days (LUGATE; COSTA, 2013). These doses are sublethal taking into account the LD50 for Acetate of Pb orally of 4665 mg / kg (ATSDR; SCIENCES, 2007).

To avoid precipitation of lead acetate was added 1 mL of 5N HCl in 1 L of water. The rats were divided into 4 groups (n=8), as follows: **Control group:** received 1 mL of saline by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (I):** received 16mg/kg of lead by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (II):** received 64mg/kg

of lead by gavage once a day for 35 days; **Treatment group (III):** received 128mg/kg of lead by gavage once a day for 35 days.

The animals were killed twelve hours after the last administration, the blood was collected and liver and kidney were removed.

Tissue preparation

Liver and kidney were removed, decapsulated and maintained on ice with saline buffer (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5) according to Ferreira, 2012. The homogenate (15%) (w / v) was prepared in suitable buffer, according to standard methodology, using Potter-Elvehjem homogenizer (5 pulses). The homogenate was centrifuged at 3,000 xg at 4 ° C for 15 minutes to remove cellular debris and the supernatant was stored in aliquots and stored at -80 ° C for the determination of the activity of antioxidant enzymes, TBA-RS, carbonylated proteins, total sulfhydryl content, acetylcholinesterase activity and Na + K + -ATPase (FERREIRA et al., 2012).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) measurement

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa (Ohkawa et al., 1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, mainly by hydroxyl free radicals. Initially, homogenate in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein (OHKAWA et al., 1979).

Total sulfhydryl content determination

The total thiol group concentration was determined by the method described by Aksenov and Markesbery (AKSENOV; MARKESBERY, 2001). 50 µl of homogenate were added to 1mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The reaction was started

by the addition of 30 μ L of 10.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Total sulfhydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

Protein carbonyl content

Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (Reznick and Packer, 1994). Based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Initially, 200 μ L of homogenate were added to tubes containing 400 μ L of 10.0 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2.0 M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. After, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 μ L of 6M guanidine (prepared in a 20.0 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV). Results are reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi (AEBI, 1984). The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10.0 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1 μ mol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (Wendel, 1981), using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. . The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15

U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*butyl- hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. NADPH disappearance was monitored at 340 nm .One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

Superoxide dismutase assay (SOD)

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ($O_2^{\cdot-}$), which is a substrate for SOD (Markulend, 1985). Briefly, to 15 μ L of each sample, 215 μ L of a mixture containing 50.0 μ M Tris buffer, pH 8.2, 1.0 μ M EDTA and 30.0 μ M CAT were added. Subsequently, 20.0 μ L of pyrogallol were added and the absorbance was recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as a reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Protein determination

Protein determination was measured by the Bradford (BRADFORD, 1976) methods.

Dosage of Creatinine and Urea

Quantification of urea (enzymatic kinetic UV) and creatinine (Jaffe colorimetric kinetics) by automation in Flexor E 180 was performed. Results were expressed as mg/dL.

Dosage of TGO, TGP and γ GT enzymes

Quantification of the TGO, TGP and γ GT enzymes was performed by enzymatic technique through automation in Flexor E 180. The results were expressed in UK (Karmem units).

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). The graphs were structured in the GraphPad Prism 6 program. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

Effects of chronic administration of Pb on the levels of Pb in the liver of rats.

We initially verified the effects of chronic administration in different doses of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) in the levels of Pb in the liver of rats. Fig. 1 shows that chronic administration of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) increased the levels of Pb in liver [$F(3,20)=13.86$; $p < 0.001$].

Effects of chronic administration of Pb on biomarkers of oxidative stress in the liver of rats.

Subsequently, we verified the effects of chronic administration of different doses of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) on TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the liver of rats. Fig. 2(A), shows that chronic administration of Pb (64 mg/kg and 128 mg/kg) increased the levels of TBA-RS [$F(3,20)=11.164$; $p < 0.001$], but did not alter total sulfhydryl content (B) [$F(3,20)=2.279$; $p > 0.05$] and protein carbonyl content (C) [$F(3,20)=0.450$; $p > 0.05$]. With respect to antioxidant enzymes, chronic administration of Pb (128 mg/kg) decreased CAT activity (E) [$F(3,20)=4.010$; $p < 0.05$], but did not alter SOD (D) [$F(3,20)=1.585$; $p > 0.05$] and GSH-Px (F) activities [$F(3,20)=1.759$; $p > 0.05$] in the liver of rats, when compared to the control group.

Effects of chronic administration of Pb on biomarkers of oxidative stress in the kidney of rats.

Next, we analyzed the effects of chronic administration of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) on TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and on the activities of SOD, CAT and GSH-Px in the kidney of rats. As shown in Fig.3 (A), chronic administration of Pb (64 mg/kg and 128 mg/kg) significantly increased TBA-RS (A) [$F(3,20)=15.484$; $p<0.001$] in the kidney of rats. However, total sulfhydryl content (B) [$F(3,20)=1.209$; $p>0.05$] and protein carbonyl content (C), by chronic administration of Pb (16mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) were not altered, when compared to the control group. Regarding antioxidants enzymes, chronic administration of Pb (128 mg/kg) increased SOD (D) [$F(3,20)=4.046$; $p<0.05$], CAT (E) [$F(3,20)=6.080$; $p<0.01$] and GSH-Px (F) [$F(3,20)=7.494$; $p<0.01$] activities in the kidney of rats.

Effects of the chronic administration of Pb on biochemical parameters in the serum of rats.

Finally, this study evaluated the effects of chronic administration of Pb (16 mg/Kg, 64 mg/Kg and 128 mg/Kg) on hepatic biomarkers, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl-transpeptidase (γ GT), and renal biomarkers, creatinine and urea in the serum of rats. As can be seen in Figure 4 (A), chronic administration of Pb not alter AST [$F(3,72)=1,545$; $p>0.05$], ALT (B) [$F(3,72)=1,282$; $p>0.05$] and γ GT (C) [$F(3,72)=0,292$; $p>0.05$]. Regarding renal biomarkers, chronic administration of Pb (16mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) not alter creatinine (D) [$F(3,72)=2,446$; $p>0.05$] and while chronic administration of Pb (64mg/kg and 128 mg/kg) increased urea (F) [$F(3,36)=27,81$; $p<0.0001$].

DISCUSSION

The Pb intoxication effect can change the renal and hepatic function, depending of the exposure concentration of the organism. The results found suggest that the

toxic effects of Pb can be connected to OS, induced by this metal capacity to increase the prooxidant and change the antioxidant enzymes (GHANWAT, 2016)

In the evaluation of the effects of the chronic administration of Pb in the doses (16mg/Kg, 64 mg/Kg e 128 mg/Kg) regarding the Pb levels in the rat's livers, our study evidenced the dependent dose with the increasing in the three doses. All groups of intoxicated rats showed rise of Pb concentration in the tissue, regarding the control group. The biomarkers analysis of OS in the liver showed an increasing of prooxidant substance, as TBA-RS, it increased in the doses of 64mg/Kg and 128mg/Kg, by the other hand, it was not found significant changes on sulfhydryl and carbonate protein. TBA-RS reflects to the malondialdehyde content, the most abundant aldehyde resultant of the lipid degradation due the lipid peroxidation process (ABDEL-MONEIM et al., 2015). Tkachenko (2011) studies of the hepatic evaluation in intoxicated rats by Pb nitrate, showed TBA-RS increasing (TKACHENKO; KURHALYUK, 2011).

Regarding the antioxidant enzymes, the Pb administration in the 128mg/Kg dose decreased significantly the CAT activity, but it did not changed the SOD and GSH-PX activities in the rat's livers, when compared to the control group. The CAT is an important iron heme enzyme which catalysis directly the hydrogen peroxide decompose generated at the end of the electrons transportation chain. The Pb is known because it reduces the iron absorption in the gastrointestinal tract inhibiting therefore the heme synthesis leading to and CAT activity decreased (PRASANTHI et al., 2010). Ozkya (2016) studies in which rats were intoxicated with Pb 500 ppm/L in drinking water during 30 days showed a CAT activity increasing (OZKAY AHMET, SAHIN ZAFER, 2016).

The evaluation of biochemistry parameters in the liver such as, the evaluated enzymes AST, ALT and GGT did not show any significantly changes in the intoxications period of 35 days in none dose. This results collaborate with Jadhav (2007) Studies where Wistar rats where intoxicated during three different times 30, 60 and 90 days. In the 30 days period, similar to our study, there was any change in the enzymes AST and ALT, only in the longer periods there was a significant increase (JADHAV et al., 2007). Orisakwe (2007) in comparative analysis between expose work people to ink containing Pb and control group of student also did not

found significant changes of AST and ALT enzymes (ORISAKWE et al., 2007). These enzymes are released in the blood in high quantities when there is damage in the hepatocyte membrane, changing its permeability (SOLIMAN et al., 2015). There is low correlation between the lesion level of the hepatocytes and the transaminases level (IBRAHIM et al., 2012).

The kidney is the first target of Pb absorption and a chronic intoxication can lead to OS induction and nephrotoxicity can be observed (CHEN et al., 2011). The results regarding the OS biomarkers in the kidney showed significant changes. In the 64mg/Kg and 128mg/Kg exposure doses it was found an increasing of TBA-RS, suggesting lipid peroxidation. In the sulfhydryl parameters and carbonate protein it was not found any change in none dose tested. Flora (2010) studies with a Pb intoxication model in Wistar rats exposed to 0,1% of Pb in drinking water found an increasing of TBA-Rs and a significant decreasing of the GSH-Px activity in the kidney (FLORA et al., 2010).

Regarding the antioxidant enzyme activity it was found in the 128mg/Kg dose important activity increasing of SOD, CAT and GSH-PX, showing an unbalance of the redox system in the kidney in the analyzed rats. The SOD is an important enzyme because it catalyzes the dismutation of the superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$) in hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 (HALLIWELL, 2013). This increase found in our study can be related to the high presence of $O_2^{\cdot -}$ (PRASANTHI et al., 2010; MONEIM, 2012). The CAT and GSH-PX also presented higher activity, probably due to the high concentration of H_2O_2 . Conterato (2007) studies of Pb intoxication in rats with two exposure doses 25mg/kg and 50mg/Kg, showed a SOD increase in both doses and a CAT increase only in the higher dose. The creatinine concentration did not show change in both doses tested (CONTERATO et al., 2007) collaborating with our results, in the kidney, creatinine did not show any significant change, while urea evidenced and increase urea in the 64mg/Kg and 128mg/Kg doses. Karamala (2011) in an experimental model with Wistar rats exposed to Pb acetate in the dose of 60mg/Kg during 12 weeks showed creatinine increase (KARAMALA et al., 2011). In addition, Rizwan (2013) studies with 25mg/kg intoxicated rats intraperitoneal via during 4 days showed an increasing of creatinine and urea (RIZWAN et al., 2013).

CONCLUSION

We concluded with this study that the administration of lead acetate, causes liver and kidney damages and OS can be one of the evolved mechanisms of toxicity. Such studies are relevant to provide information about the Pb intoxication in a subclinical period, to help the health public and environment control actions.

ATTACHMENT

(A)

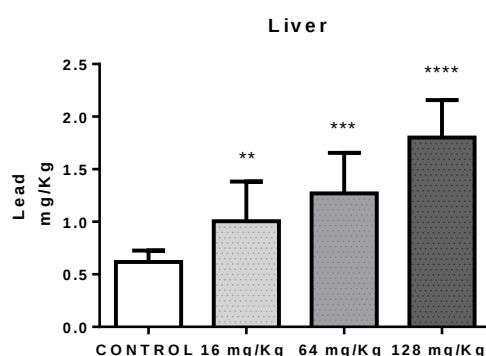
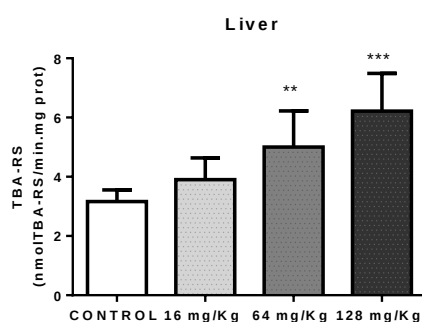
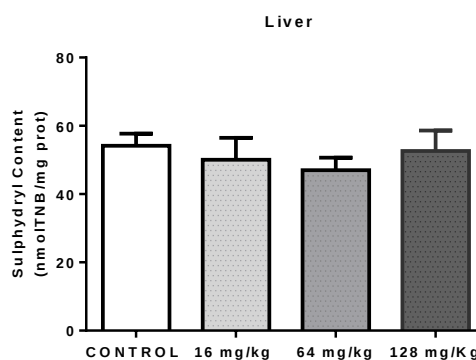


Figure 1: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on the Pb dosage (A) in liver of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared to control group (Duncan's multiple range test).

(A)



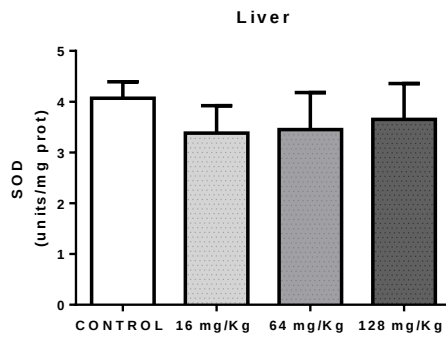
(B)



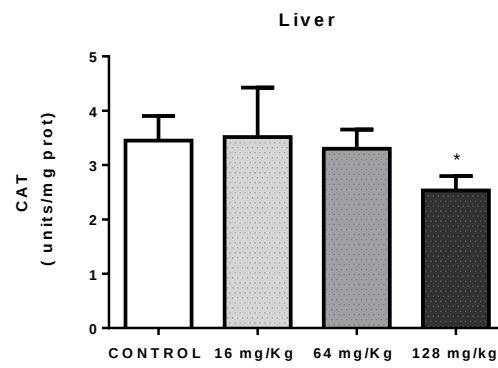
(C)



(D)



(E)



(F)

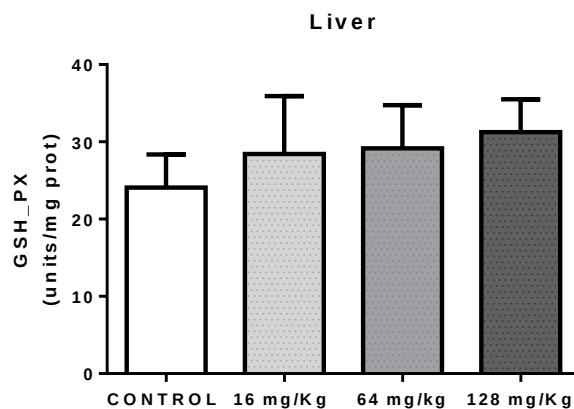
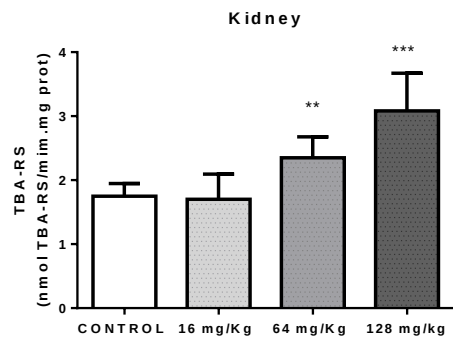


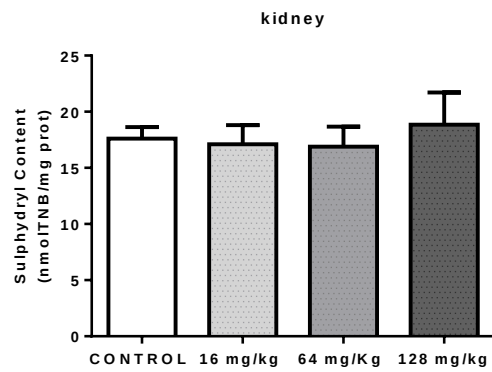
Figure 2: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulfhydryl content (B), protein carbonyl content (C), SOD (D), CAT (E) and GSH-Px activities (F) in the liver of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8

independent experiments (animals) performed in duplicate. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to control group (Duncan's multiple range test).

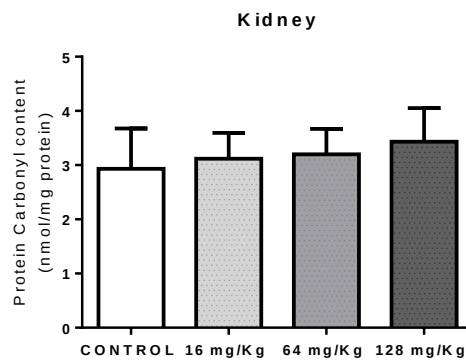
(A)



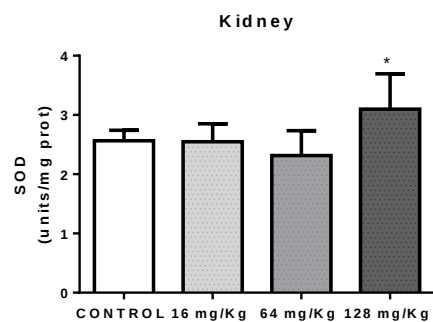
(B)



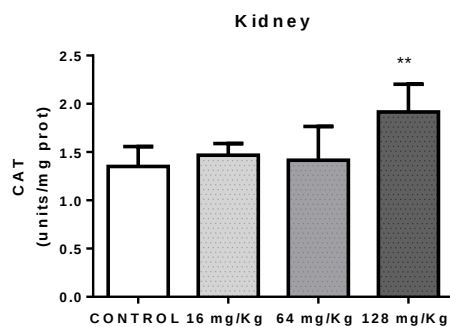
(C)



(D)



(E)



(F)

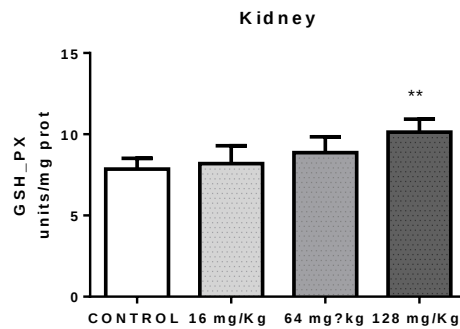
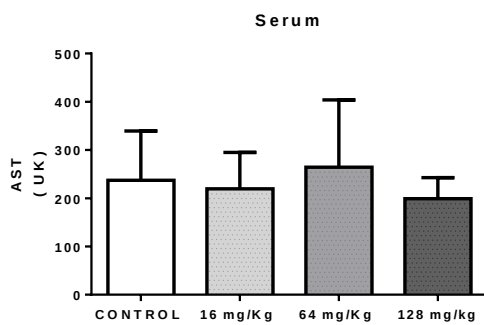
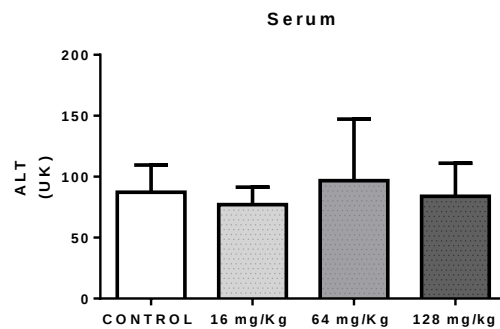


Figure 3: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulfhydryl content (B), protein carbonyl content (C), SOD (D), CAT (E) and GSH-Px activities (F) in the Kidney of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control group (Duncan's multiple range test).

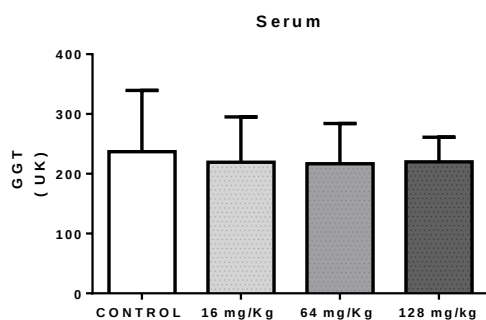
(A)



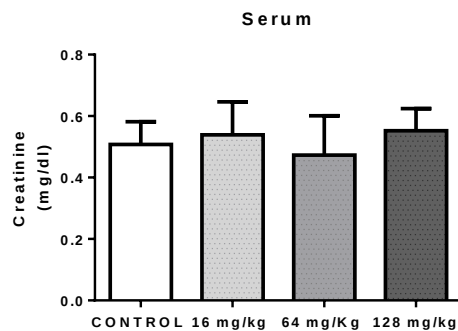
(B)



(C)



(D)



(E)

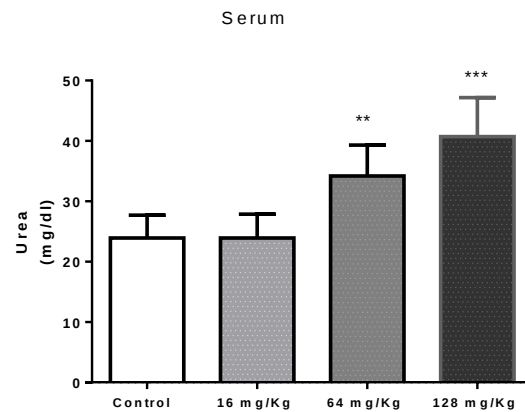


Figure 4: Effect of increasing doses of Pb acetate (16 mg/kg, 64 mg/kg and 128 mg/kg) on AST (A), ALT (B), γ GT (C), Creatine (D), Urea (E) in the Kidney of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 8 independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control group (Duncan's multiple range test).

REFERENCES

- ABDEL-MONEIM, A. M.; EL-TOWEISSY, M. Y.; ALI, A. M.; et al. Curcumin Ameliorates Lead (Pb²⁺)-Induced Hemato-Biochemical Alterations and Renal Oxidative Damage in a Rat Model. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 206–220, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-015-0360-1>>. .
- ABDULMAJEED, W. I.; SULIEMAN, H. B.; ZUBAYR, M. O.; et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male Wistar rats- a preliminary study. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11011-015-9733-6>>. .
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. CCR Press.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001016366>>. .
- AL-OTAIBI, W. R.; VIRK, P.; ELOBEID, M. Ameliorative potential of stem bromelain on lead-induced toxicity in Wistar rats. **Acta biologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p. 149–60, 2015. Disponível em: <<http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/018.66.2015.2.2>>. .
- BASIT, S.; KARIM, N.; ALI, S. S.; et al. OCCUPATIONAL LEAD TOXICITY IN BATTERY WORKERS OF KARACHI. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 4, p. S284–S286, 2015. Disponível em: <<http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/7066>>. .
- BHATTACHARJEE, T.; BHATTACHARJEE, S.; CHOUDHURI, D. Hepatotoxic and Nephrotoxic effects of chronic low dose exposure to a mixture of heavy metals- Lead, Cadmium and Arsenic. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 39–47, 2016.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CHEN, J.; MERCER, G.; ROTH, S. R.; et al. Sub-chronic lead exposure alters kidney proteome profiles. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1616–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247988>>. .
- CONTERATO, G. M. M.; AUGUSTI, P. R.; SOMACAL, S.; et al. Effect of lead acetate on cytosolic thioredoxin reductase activity and oxidative stress parameters in rat kidneys. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 2, p. 96–100, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651309>>. .
- FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, A. A. DA; MACHADO, F. R.; et al. Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 174–83, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882227>>. .
- FLORA, S. J. S.; PANDE, M.; BHADARIA, S.; KANNAN, G. M. Combined administration of taurine and meso 2, 3-dimercaptosuccinic acid in the. **Human & experimental toxicology**, v. 23, p. 157–167, 2004.
- GHANWAT, G. Effect of Vitamin C Supplementation on Blood Lead Level, Oxidative Stress and Antioxidant Status of Battery Manufacturing Workers of Western Maharashtra, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 4, p. 8–11, 2016. Disponível em: <http://jcdmr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-

709x&year=2016&volume=10&issue=4&page=BC08&issn=0973-709x&id=7528>. .

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>>. .

IBRAHIM, N. M.; EWEIS, E. A.; EL-BELTAGI, H. S.; ABDEL-MOBDY, Y. E. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 41–46, 2012. Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)>. .

JADHAV, S. H.; SARKAR, S. N.; PATIL, R. D.; TRIPATHI, H. C. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 4, p. 667–677, 2007.

KARAMALA, S.; CH, S.; Y, A.; TS, C.; PIDUGU, S. Hematobiochemical changes of lead Poisoning and amelioration with Ocimum sanctum in wistar albino rats. **Veterinary World**, v. 4, n. 6, p. 260, 2011. Disponível em: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.4/June - 2011/6.html>>. .

LOWRY, H. O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265,275, 1951.

LUGATE, K.; COSTA, C. **DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA , ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA** Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celula, 2013.

MARKULND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: B. R. CRC Press (Ed.); **Handbook for oxygen radical research**. p.243,247, 1985.

MONEIM, A. E. A. Flaxseed Oil as a Neuroprotective Agent on Lead Acetate-Induced Monoaminergic Alterations and Neurotoxicity in Rats. **Biol trace Elem Res**, v. 148, p. 363–370, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>>. .

ORISAKWE, O. E.; NWACHUKWU, E.; OSADOLOR, H. B.; AFONNE, O. J.; OKOCHA, C. E. Liver and kidney function tests amongst paint factory workers in Nkpor, Nigeria. **Toxicology and industrial health**, v. 23, n. 3, p. 161–5, 2007. Disponível em: <http://search.proquest.com/docview/223268374?accountid=12528%5Cnhttp://mona-sh-dc05.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:healthcompleteshell&atitle=L>. .

OZKAYA AHMET, SAHIN ZAFER, D. U. AND O. M. Effects of Naringenin on Oxidative Stress and Histopathological Changes in the Liver of Lead Acetate Administered Rats. **Journal Biochem Molecular Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 244–248, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865641>>. .

PRASANTHI, R. P. J.; DEVI, C. B.; BASHA, D. C.; REDDY, N. S.; REDDY, G. R. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 161–167, 2010. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.002>>. .

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–63, 1994. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330417>>. .

RIZWAN, S.; NAQSHBANDI, A.; KHAN, F. Dietary Flaxseed Oil Supplementation Mitigates the Effect of Lead on the Enzymes of Carbohydrate Metabolism, Brush Border Membrane, and Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. **Biological Trace Element Research**, v. 153, n. 1–3, p. 279–290, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613149>>. .

SCHIFER, T. D. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Informa**, v. 17, n. 5/6, p. 67–72, 2005.

SOLIMAN, M. M.; BAIOMY, A. A.; YASSIN, M. H. Molecular and Histopathological Study on the Ameliorative Effects of Curcumin Against Lead Acetate-Induced Hepatotoxicity and Nephrototoxicity in Wistar Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 167, n. 1, p. 91–102, 2015.

TKACHENKO, H.; KURHALYUK, N. Role of L-arginine against lead toxicity in liver of rats with different resistance to Hypoxia. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1319–1325, 2011.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase**. 1981.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os metais pesados de maior preocupação em relação à intoxicação e contaminação ambiental, encontramos o Pb que atualmente é considerado um poluente global, pois está presente em toda a biosfera (AGRAWAL et al., 2015). O uso de compostos orgânicos deste metal como aditivos na gasolina, com o ápice na década de 70 resultou em grande passivo ambiental devido ao eficiente transporte atmosférico que levou o Pb para locais distantes das fontes antrópicas ou naturais. (BRINK et al., 2016). Atualmente a atenção se volta para os lixões eletrônicos, pois alguns países ainda não possuem regulamentações apropriadas e por consequência está acontecendo à poluição de solos e rios. (ARANTES et al., 2016).

A intoxicação por Pb é reconhecida pela OMS como um grave problema de saúde pública, pois este xenobiótico apresenta elevada toxicidade ao organismo, uma vez que afeta vários alvos bioquímicos causando alterações a nível hematopoiético, renal, hepático e principalmente ao SNC. (FLORA, S. J. S. et al., 2012). Seu amplo emprego na indústria para produção de baterias, aditivos de tintas, queima de combustíveis fósseis e produtos eletrônicos constitui a exposição a este metal como sério problema de saúde ocupacional (AGRAWAL et al., 2015). Uma das repercussões importantes da intoxicação por Pb é a anemia que pode apresentar-se moderada em adultos e algumas vezes podem ser severas em crianças. Alterações neurológicas também são relatadas com maior severidade em crianças, que podem variar de déficit de QI a efeitos neurocomportamentais graves (HOSSAIN et al., 2016). Devido à severidade da exposição em longo prazo ao Pb, vários países estão adotando políticas de diminuição do uso do Pb em processos industriais, em consequência de estudos que comprovam o seu efeito tóxico (PHYU; TANGPONG, 2014).

O presente estudo avaliou as alterações hematológicas, de EO, alterações hormonais da tireoide e funções renal e hepática na exposição ao Pb, utilizando três concentrações diferentes de Acetato de Pb para aproximar-se da reprodução de uma ampla faixa de exposição semelhantes aos diferentes graus de exposição ocupacional que atingem seres humanos.

Os resultados nos evidenciaram na avaliação dos parâmetros EO em estruturas cerebrais que o PB induz ao desequilíbrio da homeostase redox,

evidenciado principalmente por alterações das enzimas antioxidantes. Em hipocampo nosso estudo encontrou aumento da enzima AChE, podendo interferir nas ações do sistema colinérgico. Alterações na enzima Na^+, K^+ ATPase em cerebelo e hipocampo demonstram que o Pb pode alterar o gradiente de concentração celular levando a disfunção dos neurônios. Estas alterações estruturas cerebrais aconteceram na dose intermediária de (64mg/Kg) e na concentração máxima (128mg/Kg), sugerindo que a exposição ao Pb em concentrações abaixo das encontradas em áreas ocupacionais podem causar danos ao SNC e o EO é um dos mecanismos envolvidos neste processo de toxicidade.

Na avaliação dos parâmetros hematológicos, os resultados demonstraram para a dose máxima (128mg/Kg) uma diminuição da hemoglobina, diminuição do tamanho dos eritrócitos o que levou a um RDW também aumentado e ainda um aumento dos reticulócitos evidenciado nas doses intermediária e máxima. Estes resultados subclínicos indicam que a intoxicação por Pb interfere na síntese das células vermelhas por interferência da formação do heme o que resultou na diminuição da hemoglobina e o aumento significativo dos reticulócitos sugerem que o PB induz á hemólise. Estes achados hematológicos chamam a atenção para a importância dos exames de rotina de baixo custo como o hemograma, onde estas alterações poderiam auxiliar na triagem de diagnósticos de intoxicação por PB.

A análise de EO em plasma e eritrócitos resultou em aumento de proteínas carboniladas nas doses intermediária e alta, indicando dano proteico. Em relação às enzimas antioxidantes em eritrócitos, nosso estudo evidenciou nas três doses a alteração de GSH-PX indicando aumento de H_2O_2 induzido pelo Pb mesmo em dose baixa de 16 mg/Kg. As enzimas SOD e CAT diminuíram nas doses de 64mg/Kg e 128 mg/Kg sugerindo interferência do Pb na ação enzimática por afinidade com grupo sulfidril ou mimetização com metais cofatores.

Avaliando a função tireoidiana encontramos uma diminuição do hormônio T4I na dose máxima sugerindo que o Pb possa interferir na ação da tireoide, dificultando a síntese da tiroxina ou a incorporação do iodo presente neste hormônio.

A função renal e hepática apresentaram alterações na exposição ao Pb evidenciada pelos resultados alterados dos parâmetros de EO como aumento de TBA-RS em fígado e rim nas doses 64mg/Kg e 128mg/kg, sugerindo liperoxidação lipídica e alteração das enzimas antioxidantes que na concentração de 128 mg/Kg,

diminuiu CAT no fígado e no rim as três enzimas SOD, CAT e GSH-PX) apresentaram aumento. As transaminases e γ GT não apresentaram alterações frente às três doses, no tempo utilizado de 35 dias. Na avaliação da função renal, a creatinina também não alterou, mas a uréia aumentou nas doses intermediária e máxima.

Alterações dos parâmetros de EO foram observadas em todos os alvos de estudo levando a entender que o efeito tóxico do Pb está relacionado ao mecanismo de indução de EO. Nosso estudo sugere que doses semelhantes às encontradas no meio ambiente poluído por Pb, possam resultar em alterações bioquímicas subclínicas que levam às sérias doenças. Estes resultados auxiliam na tomada de decisões de medidas preventivas para a diminuição do uso do Pb por fontes antrópicas, reduzindo assim a contaminação ambiental, a fim de proteger a população de efeitos nocivos à saúde, bem como da contaminação da biota.

Existe a necessidade de mais estudos, principalmente os relacionados ao estudo da tireoide, onde os resultados já publicados são controversos e também dados sobre a real exposição da população a contaminação por este metal, pois as estatísticas já publicadas demonstram apenas uma parcela do problema, geralmente não considerando a intoxicação subclínica, que neste estudo foi demonstrada pelo modelo de intoxicação ao Pb em ratos, mas pode ser extrapolada para efeitos em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A. M.; EL-TOWEISSY, M. Y.; ALI, A. M.; et al. Curcumin Ameliorates Lead (Pb²⁺)-Induced Hemato-Biochemical Alterations and Renal Oxidative Damage in a Rat Model. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 1, p. 206–220, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-015-0360-1>>. .
- ABDULMAJEED, W. I.; SULIEMAN, H. B.; ZUBAYR, M. O.; et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male Wistar rats- a preliminary study. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11011-015-9733-6>>. .
- ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G.; OMOJOKUN, O. S.; ADEFEGHA, O. M. ScienceDirect Alterations of Na⁺ / K⁺ -ATPase , cholinergic and antioxidant enzymes activity by protocatechuic acid in cadmium-induced neurotoxicity and oxidative stress in Wistar rats. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 559–568, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.017>>. .
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. CCR Press.
- AGRAWAL, S.; BHATNAGAR, P.; FLORA, S. J. S. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 208–216, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.013>>. .
- AHRENS, K. A.; HALEY, B. A.; ROSSEN, L. M.; LLOYD, P. C.; AOKI, Y. Housing Assistance and Blood Lead Levels: Children in the United States, 2005–2012. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 11, p. 2049–2056, 2016. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2016.303432>>. .
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001016366>>. .
- AL-OTAIBI, W. R.; VIRK, P.; ELOBEID, M. Ameliorative potential of stem bromelain on lead-induced toxicity in Wistar rats. **Acta biologica Hungarica**, v. 66, n. 2, p. 149–60, 2015. Disponível em: <<http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/018.66.2015.2.2>>. .
- ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. DOS; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202012000100011&lng=pt&tlng=pt>. .
- ANP N0 06/99. Regulamento Técnico Gasolinas Automotivas. , 1999.

ANTONIO-GARCI, M. T. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats : Involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. , v. 46, p. 2089–2095, 2008.

ANTONIO, M. T.; CORREDOR, L.; LERET, M. L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and / or cadmium. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 331–340, 2003.

ANTONIO, M. T.; LERET, M. L. Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. **life Sciences**, v. 67, p. 635–642, 2000.

ARANTES, F. P.; SAVASSI, L. A.; SANTOS, H. B.; GOMES, M. V. T.; BAZZOLI, N. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 88, n. 1, p. 137–147, 2016.

ARAUJO, U. C.; PIVETTA, F. R.; MOREIRA, J. C. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 1, p. 123–132, 1999.

ATSDR, C. D. C.; SCIENCES, H. H. Chumbo - ToxFAQs™. **Chumbo- ToxFAQs**, v. CAS N0 743, p. 1–2, 2007.

AYKIN-BURNS, N.; LAEGELER, A.; KELLOGG, G.; ERCAL, N. Oxidative Effects of Lead in Young and Adult Fisher 344 Rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 417–420, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00244-002-2023-4>>. .

BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; et al. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. **Brain Research**, v. 35, p. 56–71, 2011.

BARKUR, R. R.; BAIRY, L. K. Assessment of oxidative stress in hippocampus, cerebellum and frontal cortex in rat pups exposed to lead (Pb) during specific periods of initial brain development. **Biological trace element research**, v. 164, n. 2, p. 212–8, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-0221-3>>. .

BARRA, K.; BARBOSA, F.; MARIA, N.; et al. Estresse oxidativo: conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Divulgação. , v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASHA, D. C.; RANI, M. U.; DEVI, C. B.; KUMAR, M. R.; REDDY, G. R. International Journal of Developmental Neuroscience Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain: reversal effect of calcium co-administration. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 343–350, 2012. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.01.004>>. .

BASIT, S.; KARIM, N.; ALI, S. S.; et al. OCCUPATIONAL LEAD TOXICITY IN BATTERY WORKERS OF KARACHI. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 31, n. 4, p. S284–S286, 2015. Disponível em: <<http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/7066>>. .

BAZRGAR, M.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; ELAHDADI SALMANI, M. Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 178–188, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.040>>. .

BHATTACHARJEE, T.; BHATTACHARJEE, S.; CHOUDHURI, D. Hepatotoxic and Nephrotoxic effects of chronic low dose exposure to a mixture of heavy metals- Lead, Cadmium and Arsenic. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 39–47, 2016.

BOKARA, K. K.; BROWN, E.; MCCORMICK, R.; et al. Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. **BioMetals**, v. 21, n. 1, p. 9–16, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214713>>. .

BORGHINI, A.; GIANICOLO, E. A.; ANDREASSI, M. G. Usefulness of biomarkers as intermediate endpoints in health risks posed by occupational lead exposure. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 29, n. 2, p. 167–178, 2015. Disponível em: <<http://www.journalssystem.com/ijomeh/USEFULNESS-OF-BIOMARKERS-AS-INTERMEDIATE-r-n-ENDPOINTS-IN-HEALTH-RISKS-OF-OCCUPATIONAL-LEAD-EXPOSURE,58529,0,2.html>>. .

BOUTA DABROWSKA B, STRUZYNSKA L AND RAFALOWSKA, U. Does Lead Provoke the Peroxidation Process in Rat Brain Synaptosomes? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 29, p. 127–139, 1996.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAZIL, D. Mineral Business. , 2006.

BREWER, A. C.; MUSTAFI, S. B.; MURRAY, T. V. A.; RAJASEKARAN, N. S.; BENJAMIN, I. J. Reductive Stress Linked to Small HSPs, G6PD, and Nrf2 Pathways in Heart Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 1114–1127, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4914>>. .

BRINK, L. A.; TALBOTT, E. O.; MARSH, G. M.; et al. Revisiting Nonresidential Environmental Exposures and Childhood Lead Poisoning in the US: Findings from Kansas, 2000–2005. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jep/2016/8791686/>>. .

BRONCANO, J. M.; PETRÓN, M. J.; PARRA, V.; TIMÓN, M. L. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in Latissimus dorsi muscle of Iberian pigs. **Meat science**, v. 83, n. 3, p. 431–7, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422006000100021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

CALDEIRA, C.; MATTOS, R. D. C. O. D. C.; MEYER, A.; MOREIRA, J. C. Limites de aplicabilidade da determinação do ácido delta-aminolevulínico urinário como teste screening na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 225–230, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000100023&lng=pt&tlng=pt>. .

CAMPBELL, C.; GREENBERG, R.; MANKIKAR, D.; ROSS, R. A Case Study of Environmental Injustice: The Failure in Flint. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, p. 951, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/10/951>>. .

CAVALCANTE, A. L. M. Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento Ambiental do Chumbo. **Ministério da Saúde FIOCRUZ**, p. 59, 2009.

CELIK, A.; OGENLER, O.; CÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411–5, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135535>>. .

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269786906408>>. .

CHEN, A.; KIM, S. S.; CHUNG, E.; DIETRICH, K. N. Thyroid Hormones in Relation to Lead , Mercury , and Cadmium Exposure in the National Health and Nutrition Examination Survey , 2007 – 2008. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 2, p. 181–187, 2013.

CHEN, J.; MERCER, G.; ROTH, S. R.; et al. Sub-chronic lead exposure alters kidney proteome profiles. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1616–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247988>>. .

CHEN, X.; ZHOU, H.; LI, X.; et al. Effects of lead and cadmium co-exposure on hemoglobin in a Chinese population. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 758–63, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.005>>. .

CHIBOWSKA, K.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; FALKOWSKA, A.; et al. Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2140, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2140>>. .

CONTERATO, G. M. M.; AUGUSTI, P. R.; SOMACAL, S.; et al. Effect of lead acetate on cytosolic thioredoxin reductase activity and oxidative stress parameters in rat kidneys. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 2, p. 96–100, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651309>>. .

CONTERATO, G. M. M.; QUATRIN, A.; SOMACAL, S.; et al. Acute exposure to low lead levels and its implications on the activity and expression of cytosolic thioredoxin

reductase in the kidney. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 114, n. 6, p. 476–84, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bcpt.12183>>. .

COSTA, C. H. DA; RUFINO, R.; LAPA E SILVA, J. R. [Inflammatory cells and their mediators in COPD pathogenesis]. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 55, n. 3, p. 347–54, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629358>>. .

CUNHA, A. A. DA; FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, M. J. DA; et al. Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 153–160, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-011-0930-2>>. .

DAI, Y.; HUO, X.; ZHANG, Y.; et al. Elevated lead levels and changes in blood morphology and erythrocyte CR1 in preschool children from an e-waste area. **The Science of the total environment**, v. 592, p. 51–59, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.080>>. .

DEHKORDI, A. J.; MOHEBBI, A. N.; ASLANI, M. R.; GHOREYSHI, S. M. Evaluation of nanoselenium (Nano-Se) effect on hematological and serum biochemical parameters of rat in experimentally lead poisoning. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 4, p. 421–427, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327116651124>>. .

DELWING-DE LIMA, D.; FRÖHLICH, M.; DALMEDICO, L.; et al. Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 2, p. 359–368, 2017. Metabolic Brain Disease. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-016-9915-x>>. .

DOBRAKOWSKI, M.; BORÓN, M.; KASPERCZYK, S.; et al. The analysis of blood lead levels changeability over the 5-year observation in workers occupationally exposed to lead. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 6, p. 469–477, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233716674380>>. .

DOBRAKOWSKI, M.; PAWLAS, N.; HUDZIEC, E.; et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and oxidative stress in individuals with subacute occupational exposure to lead. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 235–240, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.008>>. .

DOUMOUCTSIS, K. K.; DOUMOUCTSIS, S. K.; DOUMOUCTSIS, E. K.; PERREA, D. N. The effect of lead intoxication on endocrine functions. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 32, n. 2, p. 175–183, 2009.

EGER, G. A.; FERREIRA, V. V.; BATISTA, C. R.; et al. Original Article. , v. 35, n. 1, p. 49–54, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>>. .

ERGURHAN-ILHAN, I.; CADIR, B.; KOYUNCU-ARSLAN, M.; et al. Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. **Pediatrics International**, v. 50, n. 1, p. 45–50, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-200X.2007.02442.x>>. .

FEDERAL, C.; VETERIN, D. E. M.; VETERIN, M. Resolução Nº 1000 , De 11 De Maio De 2012. , 2012.

FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, A. A. DA; MACHADO, F. R.; et al. Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 174–83, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882227>>. .

FERREIRA, A. L. A. .; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, B. Criação e Manejo de Ratos. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**., p. 388 p., 2002.

FERREIRA, J.; TORRES, R.; FERREIRA, J.; TORRES, R. Exposição profissional ao Chumbo. Análise da indução de efeitos genotóxicos. , 2011.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 47–58, 2012. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/intox.2012.5.issue-2/v10102-012-0009-2/v10102-012-0009-2.xml>>. .

FLORA, S. J. S.; GAUTAM, P.; KUSHWAHA, P. Lead and Ethanol Co-Exposure Lead to Blood Oxidative Stress and Subsequent Neuronal Apoptosis in Rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 47, n. 2, p. 92–101, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/alcalc/article-lookup/doi/10.1093/alcalc/agr152>>. .

FLORA, S. J. S.; PANDE, M.; BHADAURIA, S.; KANNAN, G. M. Combined administration of taurine and meso 2 , 3-dimercaptosuccinic acid in the. **Human & experimental toxicology**, v. 23, p. 157–167, 2004.

GASTALDELLO, E.; JORDAO, G.; ROSA, D. M.; et al. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. **Toxicology**, v. 169, p. 145–151, 2001.

GAUTAM, P.; FLORA, S. J. S.; PH, D. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 563–570, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.008>>. .

GENNART, J. P.; BUCHET, J. P.; ROELS, H.; et al. Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese. **American journal of epidemiology**, v. 135, n. 11, p. 1208–19, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1626539>>. .

GEOLOGIA, S. D. E.; MINERAÇÃO, E.; MUNDIAL, B. E TRANSFORMAÇÃO MINERAL . MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME Juarez Fontana dos Santos. , 2010.

GEORGE, T.; SANTOS, H. B. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. , v. 15, p. 209–214, 2011.

GERHARD, I.; WAIBEL, S.; DANIEL, V.; RUNNEBAUM, B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 3, p. 301–309, 1998.

GHANWAT, G. Effect of Vitamin C Supplementation on Blood Lead Level, Oxidative Stress and Antioxidant Status of Battery Manufacturing Workers of Western Maharashtra, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 4, p. 8–11, 2016. Disponível em: <http://jcd.r.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2016&volume=10&issue=4&page=BC08&issn=0973-709x&id=7528>. .

GHAREEB, D. A.; HUSSIEN, H. M.; KHALIL, A. A. Toxicological & Environmental Chemistry Toxic effects of lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress , inflammation , acetylcholinesterase , and the beneficial role of flaxseed extract. **Toxicology & Environmental Chemistry**, , n. October 2014, p. 37–41, 2010.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **GUYTON**. 13 ed Else ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x>>. .

HAYAKAWA, K.; MIMURA, Y.; TACHIBANA, S.; FURUYA, M. A Study for collecting background data on Wistar Hannover [Crl : WI (Han)] rats in general toxicity studies - comparative data to Sprague Dawley rats -. , v. 38, n. 6, p. 855–873, 2013.

HENRICHS, J.; BONGERS-SCHOKKING, J. J.; SCHENK, J. J.; et al. Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4227–34, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534757>>. .

HERNBERG, S. Lead Poisoning in a Historical Perspective. , v. 254, n. February, p. 244–254, 2000.

HO, Y.; LIN, Y.; WU, C. J.; et al. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of Biomedical Science**, p. 1–14, 2015. Journal of Biomedical Science. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>>. .

HOFFMAN, D. J. ET AL. **Handbook of Ecotoxicology**. 1994.

HOSSAIN, S.; PH, D.; BHOWMICK, S.; et al. NeuroToxicology Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress , in fl ammatory response and apoptosis in the offspring rats. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 150–158, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.013>>. .

HOSSEINZADEH, S.; ROSHAN, V. D.; MAHJOUN, S. Continuous exercise training and curcumin attenuate changes in brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress induced by lead acetate in the hippocampus of male rats. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 2, p. 240–5, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2012.717230>>. .

IBRAHIM, N. M.; EWEIS, E. A.; EL-BELTAGI, H. S.; ABDEL-MOBDY, Y. E. RETRACTED ARTICLE: The Effect of Lead Acetate Toxicity on Experimental Male Albino Rat. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1–3, p. 1120–1132, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-011-9149-z>>. .

IBRAHIM, N. M.; EWEIS, E. A.; EL-BELTAGI, H. S.; ABDEL-MOBDY, Y. E. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 41–46, 2012. Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)>. .

JADHAV, S. H.; SARKAR, S. N.; PATIL, R. D.; TRIPATHI, H. C. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 4, p. 667–677, 2007.

JEON, G. J.; PARK, J.; KIM, M. S.; et al. A Case of Lead Poisoning with Drug-induced Liver Injury after Ingestion of Herbal Medicine. , v. 65, n. 6, p. 375–378, 2015.

JUNIOR, D. E. L.; JUNIOR, A. Absorption Levels and Morphological Features of Fetal Organs in Wistar Rats Treated with Lead Acetate. **Int. J. Morphological**, v. 30, p. 119–124, 2012.

JURDZIAK, M.; GAĆ, P.; POREBA, M.; et al. Concentration of Thyrotropic Hormone in Persons Occupationally Exposed to Lead, Cadmium and Arsenic. **Biological Trace Element Research**, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1096-x>>. .

KAHN, L. G.; LIU, X.; RAJOVIC, B.; et al. Blood lead concentration and thyroid function during pregnancy: results from the Yugoslavia Prospective Study of Environmental Lead Exposure. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 10, p. 1134–40, 2014. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/1307669>>. .

KALAHASTHI, R.; BARMAN, T. Effect of Lead Exposure on the Status of Reticulocyte Count Indices among Workers from Lead Battery Manufacturing Plant. **Toxicological Research**, v. 32, n. 4, p. 281–287, 2016. Disponível em: <<http://www.toxicolres.org/journal/view.html?doi=10.5487/TR.2016.32.4.281>>. .

KAMIŃSKI, P.; KURHALYUK, N. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Changes in Physiological Process of Free Radicals in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Chicks in Polluted Areas. **Polish J of Environ. Stud**, v. 16, n. 4, p. 555–562, 2007.

KARAMALA, S.; CH, S.; Y, A.; TS, C.; PIDUGU, S. Hematobiochemical changes of lead Poisoning and amelioration with *Ocimum sanctum* in wistar albino rats. **Veterinary World**, v. 4, n. 6, p. 260, 2011. Disponível em: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.4/June - 2011/6.html>>. .

KASPERCZYK, A; DZIWISZ, M.; OSTAŁOWSKA, A; SWIETOCHOWSKA, E.; BIRKNER, E. Function of the liver and bile ducts in humans exposed to lead. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 8, p. 787–96, 2013. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.endeavour.edu.au:2048/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=8fecc91e-a304-479c-80de-493deabf8df5@sessionmgr4005&vid=2&hid=4205>>. .

KAYAMA, Y.; RAAZ, U.; JAGGER, A.; et al. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/25234>>. .

KEANEY, J. F. Obesity and Systemic Oxidative Stress: Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 434–439, 2003. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>>. .

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–798, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2015.1074159>>. .

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–98, 2015.

KHAN, D. A.; QAYYUM, S.; SALEEM, S.; KHAN, F. A. Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers. **Toxicology and industrial health**, v. 24, n. 9, p. 611–8, 2008. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233708098127>>. .

LA-LLAVE-LEÓN, O.; SALAS PACHECO, J. M.; ESTRADA MARTÍNEZ, S.; et al. The relationship between blood lead levels and occupational exposure in a pregnant population. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 1231, 2016. Disponível em: <<http://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-016-3902-3>>. .

LALITH, V.; MURALIDHARA, K. Ameliorative Effects of Ferulic Acid Against Lead Acetate-Induced Oxidative Stress , Mitochondrial Dysfunctions and Toxicity in Prepubertal Rat Brain. **Neurochen Res**, v. 39, p. 2501–2515, 2014.

LEBOVITZ, R. M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9782–9787, 1996.

LEE, R.; MARGARITIS, M.; CHANNON, K. M.; ANTONIADES, C. Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations. **Current Medical Chemistry**, v. 19, p. 2504–2520, 2012.

LI, Y.; QIN, J.; WEI, X.; et al. The Risk Factors of Child Lead Poisoning in China: A Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 296, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/3/296>>. .

LIMA, D. D. DE; DELWING, F.; CRUZ, J. G. P. DA; WYSE, A. T. S.; MAGRO, D. D.-D. Protective effect of antioxidants on blood oxidative stress caused by arginine. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 250–258, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.2010.00909.x>>. .

LIMA, M. C.; GIACOMELLI, M. B. O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F. D.; BARRERA, P. B. Especificação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método Tessier. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 734–742, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000600005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

LOWRY, H. O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265,275, 1951.

LU, C.; YUAN, X.; LI, L.; et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Combined exposure to nano-silica and lead induced potentiation of oxidative stress and DNA damage in human lung epithelial cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 537–544, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.030>>. .

LU, Y.; LIU, X.; DENG, Q.; et al. Continuous Lead Exposure Increases Blood Pressure but Does Not Alter Kidney Function in Adults 20-44 Years of Age in a Lead-Polluted Region of China. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 40, n. 3, p. 207–214, 2015. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000368496>>. .

LUGATE, K.; COSTA, C. **DANOS TESTICULARES EM RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DOSES DE CHUMBO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA , ULTRAESTRUTURAL E BIOQUÍMICA** Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celula, 2013.

LUO, J.; HENDRYX, M. Relationship between blood cadmium, lead, and serum thyroid measures in US adults - The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. **International journal of environmental health research**, v. 24, n. 2, p. 125–136, 2014.

LUSHCHAK, V. I. **OXIDATIVE STRESS – ENVIRONMENTAL INDUCTION AND DIETARY**. 1st ed. 2012.

MAGRO, D. D.; ROECKER, R.; JUNGES, G. M.; et al. ScienceDirect Protective effect of green tea extract against proline-induced oxidative damage in the rat kidney. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1422–1427, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.057>>. .

MANZINI, F. F. METAIS PESADOS : FONTE E AÇÃO TOXICOLÓGICA. In: A. A. da N. da A. Paulista (Ed.); . p.800–815, 2011. São Paulo.

MARKULND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: B. R. CRC Press (Ed.); **Handbook for oxygen radical research**. p.243,247, 1985.

MARTINI, A.; WAGNER, R.; RISSO, E.; NARCISO, M.; MARTINEZ, C. B. R. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiol Biochem**, v. 40, p. 645–657, 2014.

MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130–140, 2015a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515000575>>. .

MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130–140, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>>. .

MAZOTO, L.; MENDON, R.; MAGALH, V.; ILDES, C.; FR, R. Perfil de exposição ao chumbo em crianças escolares da rede municipal da cidade do Rio de Janeiro , Brasil The lead exposure profile of municipal public schoolchildren in the city of Rio de. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.; Recife**, v. 14, n. 4, p. 413–421, 2014.

MAZUMDAR, I.; GOSWAMI, K.; ALI, M. S. Status of Serum Calcium, Vitamin D and Parathyroid Hormone and Hematological Indices Among Lead Exposed Jewelry Workers in Dhaka, Bangladesh. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 110–116, 2017. Springer India. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12291-016-0582-9>>. .

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 10, n. 4, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.scientiaplana.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/295>>. .

MENDY, A.; GASANA, J.; VIEIRA, E. R. Low blood lead concentrations and thyroid function of American adults. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 23, n. 6, p. 461–473, 2013.

MENEZES, S. M. P. N. J. M. F. E. W. DE. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. **Usp**, p. 234 p., 2013.

MINOZZO, R.; WAGNER, S. C.; SANTOS, C. H.; DEIMLING, L. I.; MELLO, R. S. Prevalência de anemia em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao chumbo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 94–97, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000200011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

MONEIM, A. E. A. Flaxseed Oil as a Neuroprotective Agent on Lead Acetate-Induced Monoaminergic Alterations and Neurotoxicity in Rats. **Biol trace Elem Res**, v. 148, p. 363–370, 2012.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167–181, 2004.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 251–260, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422004000200015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

NIE, X.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; et al. Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 320–328, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116328445>>. .

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269779907383>>. .

OKEDIRAN, B. S.; KASALI, O. B.; OMOTAINSE, S. O.; AKINLOYE, O. A.; STATE, O. HAEMATO-BIOCHEMICAL ALTERATIONS AS BIOMARKERS OF LEAD INDUCED TOXICITY IN MALE WISTAR RATS. **Bangl. J. vet med**, v. 14, p. 227–232, 2016.

ORISAKWE, O. E.; NWACHUKWU, E.; OSADOLOR, H. B.; AFONNE, O. J.; OKOCHA, C. E. Liver and kidney function tests amongst paint factory workers in Nkpor, Nigeria. **Toxicology and industrial health**, v. 23, n. 3, p. 161–5, 2007. Disponível em: <http://search.proquest.com/docview/223268374?accountid=12528%5Cnhttp://mona-sh-dc05.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/MUA/MUL_SERVICES_PAGE?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:healthcompleteshell&atitle=L>. .

OZKAYA AHMET, SAHIN ZAFER, D. U. AND O. M. Effects of Naringenin on Oxidative Stress and Histopathological Changes in the Liver of Lead Acetate Administered Rats. **Journal Biochem Molecular Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 244–248, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865641>>. .

PANOV, V. G.; KATSNELSON, B. A.; VARAKSIN, A. N.; et al. Further development of mathematical description for combined toxicity: A case study of lead–fluoride combination. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 297–307, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750015000219>>. .

PATLOLLA, A. K.; BERRY, A.; TCHOUNWOU, P. B. Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 189–199, 2011.

PEDROSO, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; FONSECA, M. M.; OLIVEIRA, V. A.; PEREIRA, M. E. Effects of Zinc and N-Acetylcysteine in Damage Caused by Lead Exposure in Young Rats. **Biological Trace Element Research**, p. 1–10, 2017. Biological Trace Element Research. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1009-z>>. .

PEKCICI, R.; KAVLAĞOĞLU, B.; YILMAZ, S.; ŞAHİN, M.; DELİBAŞI, T. Effects of lead on thyroid functions in lead-exposed workers. **Open Medicine**, v. 5, n. 2, p. 215–218, 2010. Disponível em: <[internal-pdf://142.86.163.118/Pekcici-2010-Effects of lead on thyroid functi.pdf%5Cnhttps://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-](internal-pdf://142.86.163.118/Pekcici-2010-Effects%5Cnhttps://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-)>. .

s2.0-77952766775&partnerID=40&md5=23ef7fb9d197e94e239ad9945a99b26b
<http://www.degruyter.com/dg/viewarticle.fullcontentlink:p>>. .

PHYU, M. P.; TANGPONG, J. Neuroprotective effects of xanthone derivative of *Garcinia mangostana* against lead-induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 151–156, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.035>>. .

PRASANTHI, R. P. J.; DEVI, C. B.; BASHA, D. C.; REDDY, N. S.; REDDY, G. R. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 161–167, 2010. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.002>>. .

PREET, G.; SIDHU, S.; PAL, H.; BATISH, D. R. Plant Physiology and Biochemistry Effect of lead on oxidative status , antioxidative response and metal accumulation in *Coronopus didymus*. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 105, p. 290–296, 2016. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.019>>. .

RAMOS, F.; COSTA, J. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004.

RANA, S. V. S. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - A review. **Biological Trace Element Research**, v. 160, n. 1, p. 1–14, 2014.

RECKZIEGEL, P.; TIRONI, V.; BENVEGNÚ, D.; et al. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. **Toxicology Letters**, v. 203, p. 74–81, 2011.

REDDY, G. R.; BASHA, R.; DEVI, C. B.; et al. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, p. 347–352, 2003.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–63, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330417>>. .

RIZWAN, S.; NAQSHBANDI, A.; KHAN, F. Dietary Flaxseed Oil Supplementation Mitigates the Effect of Lead on the Enzymes of Carbohydrate Metabolism, Brush Border Membrane, and Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. **Biological Trace Element Research**, v. 153, n. 1–3, p. 279–290, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613149>>. .

RODRIGUES, A. F.; ROECKER, R.; JUNGES, G. M.; et al. Hypoxanthine induces oxidative stress in kidney of rats: protective effect of vitamins E plus C and allopurinol. **Cell Biochemistry & Function**, v. 32, n. 2014, p. 387–394, 2014.

SAFETY, T. O. Adult Blood Lead Levels in Minnesota. **Clinical and Health Affairs**, v. 47, n. April, p. 47–51, 2016.

SANTISTA, B.; CARSON, Q. R.; SILENCIOSA, P.; MULLER, P.; CUBAT, E. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional. **Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional**, v. mar, p. 1–13, 2005.

SASSO, S.; DALMEDICO, L.; MAGRO, D. D.; WYSE, A. T. S.; LIMA, D. D. Effect of N -acetylarginine , a metabolite accumulated in hyperargininemia , on parameters of oxidative stress in rats: protective role of vitamins and. **Cell Biochemistry & Function**, v. 32, n. July, p. 511–519, 2014.

SCHIFER, T. D. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Informa**, v. 17, n. 5/6, p. 67–72, 2005.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–316, 2004.

SCHNUR, J.; JOHN, R. M. Childhood lead poisoning and the new Centers for Disease Control and Prevention guidelines for lead exposure. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 26, n. 5, p. 238–247, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/2327-6924.12112>>. .

SHARMA, D.; SETHI, Æ. P.; HUSSAIN, Æ. E. Curcumin counteracts the aluminium-induced ageing-related alterations in oxidative stress , Na + , K + ATPase and protein kinase C in adult and old rat brain regions. **Biogerontology**, v. 10, p. 489–502, 2009.

SHING, C. M.; PEAKE, J. M.; AHERN, S. M.; et al. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 677–685, 2007. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/H07-051>>. .

SILVA, B. C. E.; TEIXEIRA, J. A. D. A. B. Chumbo. **DNPM Publicações**, , n. 71, p. 18, 2009.

SILVA, C. H. DA; MOREIRA, J. C.; LIMA, J. S. DE; FREITAS, C. M. DE. **Uso de Indicadores de Dose Interna e de Efeito como Ferramentas para Avaliação da Exposição ao Chumbo**, 2001. Disponível em: <<http://teses.iciet.fiocruz.br/pdf/silvachm.pdf>>. .

SILVA JÚNIOR, A. F. DA. Intoxicação Crônica Experimental Com Alumínio : Padrões Degenerativos , Comportamentais E Terapia Experimental Com Magnésio Após Lesão Hipocampal. , p. 116, 2013.

SILVEIRA, M. F.; PERES, J. A. Intoxicação plumbífera aguda no tecido cardíaco em ratos Wistar. **Rev Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 11, p. 45–50, 2013.

SIRIVARASAI, J.; KAOJARERN, S.; CHANPRASERTYOTHIN, S.; et al. Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. **BioMed research international**, v. 2015, p. 856319, 2015. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793211>>. .

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**.

Rio de janeiro: Editora Interciência, 2013.

SOLIMAN, M. M.; BAIOMY, A. A.; YASSIN, M. H. Molecular and Histopathological Study on the Ameliorative Effects of Curcumin Against Lead Acetate-Induced Hepatotoxicity and Nephrototoxicity in Wistar Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 167, n. 1, p. 91–102, 2015.

SUDJAROEN, Y.; SUWANNAHONG, K. Biomarker related lead exposure of industrial battery's workers. **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 194, 2017. Disponível em: <<http://www.atmph.org/text.asp?2017/10/1/194/196523>>. .

SUN, H.; WANG, N.; NIE, X.; et al. Lead Exposure Induces Weight Gain in Adult Rats, Accompanied by DNA Hypermethylation. (N. Aykin-Burns, Ed.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169958, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0169958>>. .

TKACHENKO, H.; KURHALYUK, N. Role of L-arginine against lead toxicity in liver of rats with different resistance to Hypoxia. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1319–1325, 2011.

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K. H.; STAVRIDIS, J. C. Protective Effect of L -Phenylalanine on Rat Brain Acetylcholinesterase Inhibition Induced by Free Radicals. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 103–106, 2000.

TÜZMEN, M. N.; YÜCEL, N. C.; KALBURCU, T.; DEMIRYAS, N. Effects of curcumin and tannic acid on the aluminum- and lead-induced oxidative neurotoxicity and alterations in NMDA receptors. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 2, p. 120–127, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15376516.2014.997947>>. .

VALKO, M.; JOMOVA, K.; RHODES, C. J.; KUC, K. **Redox - and non - redox - metal - induced formation of free radicals and their role in human disease**. 2016.

VELAGA, M. K.; YALLAPRAGADA, P. R.; WILLIAMS, D.; RAJANNA, S.; BETTAIYA, R. Hydroalcoholic Seed Extract of Coriandrum sativum (Coriander) Alleviates Lead-Induced Oxidative Stress in Different Regions of Rat Brain. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1–3, p. 351–363, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-9989-4>>. .

VIGNESHKUMAR, B.; PANDIAN, S. K. Catalase Activity and Innate Immune Response of Caenorhabditis elegans Against the Heavy Metal Toxin Lead. **environmental Toxicology**, p. 313–322, 2011.

WAJNER, S. M.; WAGNER, M. DOS S.; FERNANDES, N. S.; MAIA, A. L. O papel dos Hormônios Tireoidianos na Função Testicular. **Revista HCPA**, v. 28, n. 1, p. 41–48, 2008.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase**. 1981.

WOJCIK, D. Case Study : Chronic Lead Toxicity. , v. 31, n. 3, p. 16–20, 2012.

WU, Y.; GU, J.-M.; HUANG, Y.; et al. Dose-Response Relationship between Cumulative Occupational Lead Exposure and the Associated Health Damages: A 20-Year Cohort Study of a Smelter in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 328, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/3/328>>. .

WYSE, A. T.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G.; et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p. 1719–21, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665589>>. .

XU, T.; GAO, X.; LIU, G. The Antagonistic Effect of Selenium on Lead Toxicity Is Related to the Ion Profile in Chicken Liver. **Biological Trace Element Research**, v. 169, n. 2, p. 365–373, 2016.

XUE, H.-Y.; GAO, G.-Z.; LIN, Q.-Y.; JIN, L.-J.; XU, Y.-P. Protective Effects of Aucubin on H₂O₂-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Phytotherapy Research**, , n. April, p. n/a-n/a, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.3562>>. .

YE, H. H.; JEONG, J. U.; BAEK, N. J.; et al. A Case of Lead Poisoning due to a Mixture of Talisman Ash. , p. 2–7, 2013.

YÜCEBILGİÇ G ET ALL. Effects of Lead on Na + -K + ATPase and Ca + 2 ATPase Activities and Lipid Peroxidation in Blood of Workers. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p. 95–97, 2003.

ZHAO, R.; HOLMGREN, A. A Novel Antioxidant Mechanism of Ebselen Involving Ebselen Diselenide, a Substrate of Mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39456–39462, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Magda Helena Soratto Heltich Ferrazza

RG: 1522647

Título da Dissertação: **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
DE ESTRESSE OXIDATIVO, DA FUNÇÃO TIREOIDIANA, RENAL E
HEPÁTICA NA INTOXICAÇÃO POR CHUMBO**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da
Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 09 de março de 2018.



Assinatura do aluno