



UFSM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ENZIMA δ -
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE PULMÃO DE
RATOS *IN VITRO*: INTERAÇÃO COM AGENTES
QUELANTES E ANTIOXIDANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiane Luchese

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ENZIMA δ -
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE PULMÃO DE
RATOS *IN VITRO*: INTERAÇÃO COM AGENTES
QUELANTES E ANTIOXIDANTES**

por

Cristiane Luchese

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a Francielli Weber Santos

Santa Maria, RS, Brasil

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE
DE PULMÃO DE RATO *IN VITRO*: INTERAÇÃO COM AGENTES QUELANTES E
ANTIOXIDANTES**

Elaborada por **Cristiane Luchese** como requisito parcial para a
obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Francielli Weber Santos (Orientadora)

Prof. Dr. Luis Fernando Freire Royes

Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schettinger

Santa Maria, junho de 2007

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE PULMÃO DE RATOS *IN VITRO*: INTERAÇÃO COM AGENTES QUELANTES E ANTIOXIDANTES

AUTORA: CRISTIANE LUCHESE
ORIENTADORA: FRANCIELLI WEBER SANTOS
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 2007

A exposição das populações humanas a uma variedade de metais pesados é um problema de saúde pública. O cádmio é um elemento não essencial e devido ao seu imenso uso em diversas aplicações industriais, é um contaminante ambiental através da comida e da fumaça do cigarro. Este metal tóxico é mais eficientemente absorvido através dos pulmões do que do trato gastrointestinal. Portanto, o uso dos pulmões como um tecido alvo do cádmio é de grande importância porque este metal pesado pode ser absorvido, entrando nos pulmões através da respiração. Uma terapia possível para a intoxicação por metais é remover os metais tóxicos ligados a bioligantes funcionais. O presente estudo foi delineado para avaliar o efeito *in vitro* do cádmio na atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em pulmão de rato. A atividade da δ -ALA-D, um parâmetro toxicológico, tem sido reportada como alvo do cádmio em diferentes tecidos. Foram avaliados também o possível efeito protetor dos agentes quelantes ditiólicos (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS) e o ácido *meso* 2,3- dimercaptosuccínico (DMSA)) ou agentes antioxidantes (ácido ascórbico, N-acetilcisteína (NAC) e o disseleneto de difenila (PhSe)₂) isolados ou em combinação (agentes quelantes x antioxidantes). Além disso, para investigar o possível mecanismo envolvido, nós determinamos o efeito restaurador do cloreto de zinco (ZnCl₂) e do ditiotretol (DTT) na δ -ALA-D. A atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato foi inibida por baixas concentrações de cádmio, e esta inibição ocorreu devido a oxidação dos grupos -SH da enzima, e não por remover os íons zinco da estrutura enzimática. Os agentes quelantes não foram efetivos em proteger a atividade da enzima inibida por cádmio, e apresentaram um efeito inibitório *per se*. O possível mecanismo envolvido nesta inibição foi demonstrado. O DTT restaurou a inibição causada por ambos agentes quelantes, mas o ZnCl₂ restaurou somente o efeito inibitório do DMSA. Isto indica que o DMPS não remove os íons zinco da estrutura da enzima. Este estudo demonstrou também que estes agentes quelantes potencializam a inibição da δ -ALA-D causada por cádmio. Neste sentido, o estudo do possível mecanismo verificou que o DTT restaura a inibição da enzima causada pelo complexo cádmio/DMSA, mas não pelo complexo cádmio/DMPS. Ao contrário do DTT, o ZnCl₂ não restaura a atividade da enzima inibida por ambos complexos. Em relação aos compostos antioxidantes, nós podemos verificar que nenhum antioxidante utilizado neste trabalho foi eficiente em restaurar a atividade da enzima inibida por cádmio. Alguns autores têm demonstrado que a associação de agentes quelantes e antioxidantes é uma boa alternativa no tratamento das intoxicações por metais. Neste sentido, observou-se um efeito combinado de cádmio x DMPS x (PhSe)₂ e cádmio x DMPS x NAC. Porém esse efeito combinado de cádmio x antioxidantes x quelantes não foi observado quando se utilizou o DMSA como

agente quelante. De uma maneira geral, os resultados deste estudo indicam que o cádmio inibiu a atividade da δ -ALA-D do tecido pulmonar; e ainda, o uso de agentes quelantes e antioxidantes, sozinhos ou combinados, não restauraram a atividade da enzima, sendo que em alguns casos, potencializaram a inibição induzida por cádmio. O mecanismo principal envolvido na inibição da enzima foi à oxidação dos grupos sulfidrílicos.

Palavras-chave: Cádmio, δ -ALA-D, Agentes Quelantes, Antioxidantes, Pulmão.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF CADMIUM ON δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE FROM RAT LUNG *IN VITRO*: INTERACTION WITH CHELATING AND ANTIOXIDANT AGENTS

AUTHOR: CRISTIANE LUCHESE
ADVISOR: FRANCIELLI WEBER SANTOS
Date and Place of the defense: Santa Maria, 2007

The exposure of human populations to a variety of heavy metals has been a public health concern. Cadmium is a non-essential elements due to its immense usage in various industrial applications, is an environmental contaminant with food and tobacco smoking. This toxic metal is more efficiently absorbed through the lungs than through the gastrointestinal tract. Therefore, the use of lung as a target tissue of cadmium exposure is of great importance because this heavy metal can be absorbed on suspended particles, entering the lung through the respiration. Thus, a possible therapy for metal intoxication is to remove the toxic metals from the bound functional bioligands. The present study was designed to evaluate the effect of cadmium on δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) activity from rat lung *in vitro*. δ -ALA-D activity, a toxicological parameter, has been reported as a target of cadmium in different tissues. The protective effect of monotherapies with dithiol chelating (*meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and 2,3-dimercaptopropane-1- sulfonic acid (DMPS)) or antioxidant agent (ascorbic acid, diphenyl diselenide, (PhSe)₂, and N-acetylcysteine (NAC)) were also evaluated; as well as, the effect of a combined therapy (dithiol chelating x antioxidant agent) was studied. Moreover, to investigate the possible mechanism involved, we determined the effect of zinc chloride (ZnCl₂) and dithiothreitol (DTT). The rat lung δ -ALA-D activity was inhibited by low concentrations of cadmium, this inhibition occurred due the oxidation of -SH groups of enzyme, and not by displacing zinc from the enzyme structure. The chelating agents were not effective in restoring enzyme activity inhibited by cadmium, and it presented an inhibitory effect *per se*. The possible mechanism involved in this inhibition was demonstrated. DTT restored the inhibition caused by both chelating agents, but ZnCl₂ restored only the inhibitory effect of DMSA. This indicated that DMPS did not remove the zinc ions of the enzyme structure. This study also demonstrated that these chelating agents potentialized the δ -ALA-D inhibition caused by cadmium. In this way, the study of possible mechanism verified that DTT restore the enzyme inhibition caused by cadmium/DMSA complex, but not by cadmium/DMPS complex. In contrast to DTT, ZnCl₂ did not restore the enzyme activity inhibited by both complexes. In relation to antioxidants compounds, we can verify that none antioxidant utilized in this work was efficient in restoring the enzyme activity inhibited by cadmium. Some authors had demonstrated that the association of chelating and antioxidant agents is a good alternative in treatment of metal intoxication. In this way, we observed a combined effect of cadmium x DMPS x (PhSe)₂ and cadmium x DMPS x NAC. However, this combined effect of cadmium x antioxidant x chelating did not observe when we utilized DMSA as chelating agent. In general, the results of this study indicate that cadmium inhibited the pulmonary δ -ALA-D activity; and, the use of chelating and antioxidant agents, alone or combined,

did not restore the enzyme activity, in some cases, potentialized the inhibition induced by cadmium. The principal mechanism involved in enzyme inhibition was the oxidation of –SH groups.

Keywords: Cadmium, δ -ALA-D, Chelating Agents, Antioxidants, Lung.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 - Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase.....	16
FIGURA 2 - Estrutura do ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS).	20
FIGURA 3 - Estrutura ácido <i>meso</i> 2,3- dimercaptosuccínico (DMSA).....	20
FIGURA 4 - Estrutura da N-acetilcisteína (NAC).....	23
FIGURA 5 - Estrutura do disseleneto de difenila ((PhSe) ₂).....	25
FIGURA 6 - Estrutura do ácido ascórbico.....	25

Artigo

FIGURA 1 - Effect of Cd ²⁺ on rat lung δ -ALA-D activity (a). Effects of DTT and ZnCl ₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of Cd ²⁺ (b).....	32
FIGURA 2 – Effect of DMPS on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl ₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of DMPS and Cd ²⁺ (b).....	33
FIGURA 3 - Effect of DMSA on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl ₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of DMSA and Cd ²⁺ (b).....	33
FIGURA 4 - Effect of ascorbic acid on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl ₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of ascorbic acid and Cd ²⁺ (b).....	34
FIGURA 5 - Effect of NAC on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺	34
FIGURA 6 - Effect of (PhSe) ₂ on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl ₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of (PhSe) ₂ and Cd ²⁺ (b).....	35
FIGURA 7 - Effects of DMSA plus NAC (a), DMSA plus ascorbic acid (b) and DMSA plus (PhSe) ₂ (c) on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺	36
FIGURA 8 - Effects of DMPS plus NAC (a), DMPS plus ascorbic acid (b) and DMPS plus (PhSe) ₂ (c) on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd ²⁺	37

LISTA DE ESQUEMAS

Artigo

ESQUEMA 1	37
-----------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

(PhSe)₂ - disseleneto de difenila

δ-ALA-D - delta aminolevulinato desidratase ou porfobilinogênio sintase

ALA - ácido 5'-aminolevulínico ou ácido delta-aminolevulínico

ANOVA - análise de variância

BAL - 2,3-dimercaptopropanol, dimercaprol

DMPS - ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico

DMSA - ácido *meso* 2,3- dimercaptosuccínico

DMSO - dimetilsulfóxido

DL₅₀ - Dose letal para 50 % dos animais

DTNB - 5-5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)

DTT - DL-ditiotreitól

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

IC₅₀ - Concentração que inibe 50 % a atividade da enzima

NAC - N-acetilcisteína

PBG - porfobilinogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Cádmio	14
2.1.1. Ação do Cádmio no Pulmão	15
2.2. Enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D)	16
2.2.1. Histórico e função da δ -ALA-D.....	16
2.2.2. Características estruturais.....	17
2.2.3. Importância toxicológica.....	18
2.3. Agentes Quelantes Sulfidrílicos	18
2.3.1. Aspectos gerais.....	18
2.3.2. DMPS e DMSA.....	20
2.4. Agentes Antioxidantes	22
2.4.1. N-acetilcisteína (NAC).....	22
2.4.2. Selênio.....	23
2.4.2.1. Disseleneto de difenila.....	24
2.4.3. Ácido Ascórbico.....	25
3. OBJETIVOS	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO	27
4.1. Cádmio inibe a δ-aminolevulinato desidratase de pulmão de rato	
<i>in vitro</i> : Interação com agentes quelantes e antioxidantes	28
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	44
7. PERSPECTIVAS	45
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A exposição da população humana a uma variedade de metais tóxicos é um problema de saúde pública (Goyer, 1996). Os metais pesados são alguns dos principais contaminantes encontrados no meio ambiente e possuem amplo emprego industrial, constituindo uma das principais formas de intoxicação ocupacional (Salgado, 1996). Estes metais exercem seus efeitos tóxicos combinando-se a grupos reativos, como os grupos sulfidrilas (-SH), os quais são essenciais para as funções fisiológicas normais. Dentre os metais de maior preocupação estão o chumbo, o mercúrio, o arsênio e o cádmio (Klaassen, 1996).

O cádmio é um metal pesado e um elemento não essencial muito abundante (Fowler, 1991; Goyer, 1996), sendo prejudicial para o meio ambiente e para os seres humanos (Morselt, 1991), uma vez que ele pode se acumular em muitos órgãos (WHO, 1992). O cádmio é um metal tóxico muito utilizado na indústria, é um dos componentes da fumaça do cigarro, e, conseqüentemente, um contaminante potencial para as populações que estão em contato com este metal pesado (WHO, 1992). De todos os metais tóxicos encontrados no ambiente e utilizados industrialmente, o cádmio é de grande interesse clínico, uma vez que as intoxicações por cádmio são difíceis de serem tratadas (Jones e Cherian, 1990).

O pulmão é um órgão que está constantemente em contato com poluentes ambientais, como por exemplo, o cádmio, o que aumenta o risco do desenvolvimento de doenças pulmonares. O cádmio pode ser absorvido através de partículas suspensas, e entra nos pulmões através da respiração. Dentre os efeitos tóxicos causados pelo cádmio nos órgãos, os efeitos no pulmão estão entre os mais prejudiciais. A exposição do pulmão ao cádmio resulta em alterações nas funções celulares devido a respostas imunes humoral e mediada por células em animais (Asvadi e Hayes, 1977; Nath et al., 1984; Hirano et al., 1989, 1990). Além disso, a inalação de cádmio pode causar pneumonites e enfisema pulmonar em humanos (Amanuma e Suzuki, 1987), assim como alterações morfológicas (Fortoul et al., 2005) e tumores pulmonares tanto em humanos quanto em animais (IARC, 1993).

Diversas enzimas podem ter suas atividades reduzidas pelo aumento na concentração de metais tóxicos no organismo. Esses metais podem ligar-se a grupos sulfidrílicos (-SH) e/ou substituir metais essenciais de algumas enzimas

alterando suas atividades catalíticas (Casalino et al., 2000). Desta forma, sistemas enzimáticos essenciais, como a enzima sulfidrílica δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), podem ter suas atividades inibidas pela ação de diversos metais, tais como o mercúrio (Rocha et al. 1995; Emanuelli et al., 1996), o chumbo (Goering, 1993), e o cádmio (Santos et al., 2004, 2005a). A δ -ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade catalítica máxima (Jaffe et al., 2000). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), formando o porfobilinogênio (PBG), em um dos passos iniciais da biossíntese do heme (Gibson et al., 1955). A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme (Sassa et al., 1989; Goering, 1993) e resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, o qual pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993).

A terapia que utiliza agentes quelantes tem sido a base do tratamento médico de intoxicações por metais tóxicos desde a década de 40, sendo os mesmos utilizados clinicamente como antídotos para intoxicações agudas e crônicas (Domingo, 1995). Estes compostos atuam aumentando a excreção destes elementos tóxicos, diminuindo a toxicidade por prevenir a ligação destes em moléculas celulares alvo (Domingo, 1995). O ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS, Dimaval[®]) e o ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA, Succimer[®]) são compostos que apresentam dois grupos -SH vicinais e caracterizam-se por apresentarem maior solubilidade em água (Nadig et al., 1985) e limitada solubilidade lipídica. Conseqüentemente, estes agentes quelantes apresentam menor toxicidade quando comparados com outros análogos estruturais como por exemplo, o 2,3-dimercaptopropanol (BAL, Dimercaprol[®]) (Aposhian, 1983).

Acredita-se que a utilização de antioxidantes, sozinhos ou em associação com agentes quelantes, seria uma alternativa eficaz para o tratamento das intoxicações por cádmio (Pande et al., 2001; Tandon et al., 2003). Neste contexto, estudos em nosso laboratório demonstraram que os agentes quelantes sozinhos ou em associação com o disseleneto de difenila, (PhSe)₂, são capazes de reverter os danos causados pelo cádmio em testículos de camundongos (Santos et al., 2004, 2005a). O (PhSe)₂ é um composto orgânico de selênio que apresenta diversas propriedades farmacológicas descritas por nosso grupo de pesquisa, destacando-se o excelente potencial antioxidante deste composto em alguns modelos

experimentais para a avaliação de estresse oxidativo (Nogueira et al., 2004a; Santos et al., 2005b; Borges et al., 2006; Luchese et al., 2007).

Considerando que a poluição do ar é um dos principais problemas ambientais do mundo e, considerando ainda que o pulmão é um órgão alvo dos poluentes do ar, entre eles os metais tóxicos como o cádmio, o presente trabalho visa estudar os efeitos do cloreto de cádmio (CdCl_2) sobre a atividade da enzima δ -ALA-D em pulmão de rato, bem como o efeito dos agentes antioxidantes e quelantes, sozinhos ou em associação, sobre a atividade da enzima *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cádmio

Os metais pesados são os agentes tóxicos mais conhecidos do homem. O cádmio foi descoberto por volta de 1815 em minérios contendo carbonato e zinco (Salgado, 1996). O cádmio é um dos mais abundantes elementos não essenciais encontrados no ambiente, sendo muito utilizado em aplicações industriais. Além disso, é um dos componentes da fumaça do cigarro, e conseqüentemente pode contaminar as populações que estão em contato com este metal pesado (WHO, 1992). A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos conferiu ao cádmio a 7ª posição do *ranking* das 20 substâncias mais perigosas (Smith, 1997).

A toxicidade do cádmio, tanto em animais experimentais quanto em humanos, é influenciada por um grande número de fatores, tais como a via de administração, a dose, a forma química do metal, a duração da exposição, a idade dos animais experimentais, etc. (Casalino et al., 1997). O cádmio apresenta uma meia vida biológica longa (20-30 anos em humanos) e uma baixa excreção (1-2 µg/dia) (Goering et al., 1995). Este metal tóxico pode se acumular em diversos órgãos como no pulmão, fígado, rim, testículos, cérebro, ossos, sistema sanguíneo, etc. (WHO, 1992).

Muitas evidências indicam que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na indução do dano tecidual pelo cádmio, o que causa estresse oxidativo como resultado do aumento na peroxidação lipídica e diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Koizumi and Li, 1992). Dessa forma, a prevenção e a intervenção terapêutica na intoxicação pelo cádmio podem ser conduzidas de duas maneiras: (1) a utilização de quelantes a fim de remover o cádmio (Goyer et al., 1995; Andersen, 1989); e (2) a eliminação dos radicais livres pela utilização de agentes antioxidantes (Farris, 1991).

Sendo assim, acredita-se que a utilização de antioxidantes, sozinhos ou em associação com os agentes quelantes, seria uma alternativa mais eficaz para o tratamento das intoxicações por cádmio (Pande et al., 2001; Tandon et al., 2003). Entretanto, não há até o momento um consenso com relação ao tratamento mais seguro e eficaz das intoxicações agudas e crônicas por cádmio, o que tem

incentivado a pesquisa de terapias alternativas, em especial de compostos antioxidantes, administrados sozinhos ou associados aos quelantes ditiólicos (DMSA, DMPS) com efeitos benéficos previamente comprovados. Além disso, estudos de nosso grupo têm demonstrado que a associação de agentes quelantes e antioxidantes tem sido uma boa alternativa no tratamento das intoxicações por cádmio em modelos experimentais (Santos et al., 2004, 2005a).

2.1.1. Ação do Cádmio no Pulmão

A população em geral está exposta ao cádmio liberado no ambiente (Friberg et al., 1974; Muskett et al., 1979). Este metal é mais eficientemente absorvido através dos pulmões do que através do trato gastrointestinal (ATSDR, 1999). A inalação é conhecida ser a principal rota da exposição ao cádmio na população em geral (Friberg et al., 1974; Muskett et al., 1979), sendo, portanto, o pulmão o primeiro órgão de deposição do cádmio como consequência desta rota de exposição (Trottier et al., 2002). O cádmio que entra nas vias aéreas pode ser oriundo de processos industriais, escapamentos de automóveis, pigmentos, soldas e na fumaça do cigarro (WHO, 1992; Goyer, 1996). Sendo assim, a fumaça do cigarro é uma importante fonte de exposição ao cádmio, uma vez que este metal tóxico é um contaminante do tabaco (Goyer, 1996). As estimativas indicam que os fumantes absorvem 1-3 µg/dia de cádmio ao fumarem um maço de cigarro por dia (Lewis et al., 1972).

O cádmio também pode entrar nos pulmões através de partículas suspensas após ser absorvido durante a respiração (WHO, 1992). A exposição humana ao cádmio ocorre principalmente pela inalação de baixas doses deste metal (50 µg/m³) (Piscator, 1976). Sendo assim, a exposição ao cádmio pode desenvolver uma variedade de doenças pulmonares, incluindo enfisema, fibrose intersticial, pneumonites, câncer (Amanuma e Suzuki, 1987; IARC, 1993), assim como alterações morfológicas (Fortoul et al., 2005). O exato mecanismo pelo qual o cádmio produz efeitos adversos no tecido pulmonar ainda não está claro, sendo necessários mais estudos para elucidar o mecanismo.

2.2. Enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

2.2.1. Histórico e função da δ -ALA-D

Isolada nos anos 50 (Gibson et al., 1955), a metalo-proteína citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolíase é a enzima que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), com a perda de 2 moléculas de água (Shemin, 1976) (figura 1). Esta reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes), sendo esta via biossintética semelhante em bactérias, vegetais e animais (Rodrigues, 1989).

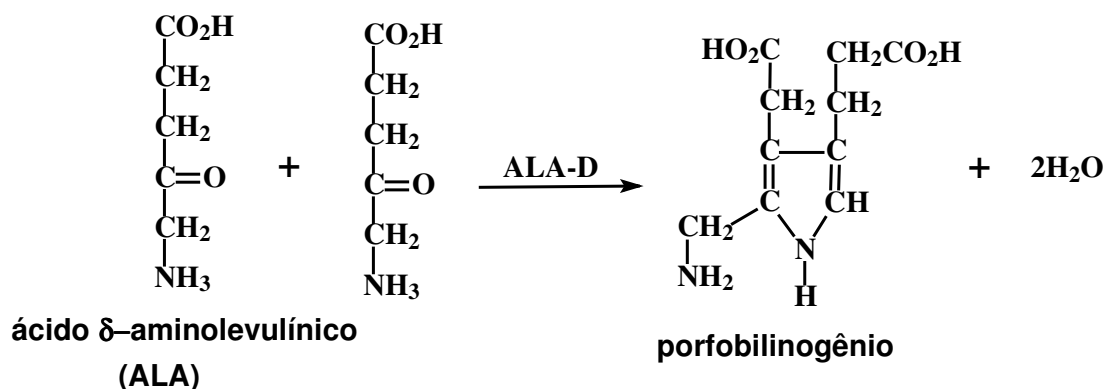


Figura 1: Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase.

Os compostos tetrapirrólicos têm importância metabólica baseada principalmente na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina), por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e do armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente); do transporte de elétrons (citocromos a, b e c); da biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

2.2.2. Características estruturais

A δ -ALA-D é uma enzima de natureza sulfidrídica (Shemin, 1976; Bevan et al., 1980), sendo inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrídicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977), paracloromercúriobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (Barreiro, 1967; Barnard et al., 1977; Tamai et al., 1979) e por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrídicos, como o chumbo, o cobre, o mercúrio e o cádmio (Gibson et al., 1955; Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996; Santos et al., 2004; 2005a).

A maioria das enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico bivalente para estarem ativas, mas, dependendo de sua fonte, requerem metais diferentes para sua ativação. A δ -ALA-D, de animais, leveduras e bactérias, é dependente de zinco (Chen e Neilands, 1973; Finelli et al., 1974), sendo também demonstrado que resíduos de cisteína da proteína estão envolvidos na união deste metal (Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1994). Por outro lado, a enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50 % com a de outras fontes, não requer zinco, mas sim magnésio para ser ativa (Shibata e Ochiai, 1977; Tamai et al., 1979). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal, e que corresponde à região que supostamente liga o zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (Boese et al., 1991; Schaumburg et al., 1991). Evidências sugerem que o sítio ativo da enzima de origem animal seja composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Tsukamoto et al., 1979; Jaffe et al., 1994).

A δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como o EDTA e o 1,10-fenantrolina (Chen e Neilands, 1976; Sommer e Beyersmann, 1984), sendo esta inibição revertida pela adição de zinco (Bevan et al., 1980). Isto mostra que o zinco faz parte da estrutura da enzima e, possivelmente, tenha um papel fundamental no seu mecanismo catalítico. Entretanto, o papel do zinco na atividade da δ -ALA-D não está, ainda, completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na

enzima, ou ambas (Tsukamoto et al., 1979; Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1995).

Após a remoção do zinco pelo EDTA, os grupos –SH da enzima são facilmente oxidados, com concomitante perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, apenas incorporará zinco novamente na presença de um ativador sulfidrílico (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980).

2.2.3. Importância toxicológica

A δ -ALA-D é uma enzima de natureza sulfidrímica que pode ser inibida na presença de metais tóxicos como o mercúrio (Rocha et al., 1993, 1995; Emanuelli et al., 1996), o chumbo (Rodrigues et al., 1989, 1996) e o cádmio (Santos et al., 2004, 2005a). Alguns elementos que possuem alta afinidade por grupos sulfidrílicos, como por exemplo, os compostos orgânicos contendo telúrio e selênio (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001) podem inibir a atividade desta enzima por oxidarem grupos sulfidrílicos. A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (Sassa et al., 1989; Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993). Além disso, o ALA gerado no fígado e medula óssea pode atravessar a barreira hemato-encefálica, apresentando efeitos neurotóxicos (Becker et al., 1971; Cutler et al., 1979).

2.3. Agentes Quelantes Sulfidrílicos

2.3.1. Aspectos gerais

O aumento do uso industrial de metais como o berílio, o cádmio, o cobre, o chumbo, o magnésio e o níquel inevitavelmente resultaram em um ambiente no qual as intoxicações crônicas não são raras. Conseqüentemente, os riscos ocupacionais

e ambientais para a saúde humana originados da exposição ao metal são uma preocupação (Domingo, 1998).

A terapia com agentes quelantes é a forma mais efetiva de tratamento para as intoxicações com metais (Flora e Kumar, 1993). Os compostos sulfidrílicos como o dimercaprol (British Anti-Lewisite, BAL), a D-penicilamina (Klaassen, 1996) e os derivados do dimercaprol como o ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) (Endo e Sakata, 1995; Flora, 1999; Frumkim et al., 2001) e o ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS) (Pingree et al., 2001) são os agentes quelantes mais utilizados na terapêutica. Estes compostos, além de aumentarem a excreção do metal tóxico, também reduzem a toxicidade dos metais por impedir a ligação destes em moléculas celulares alvo (Aposhian et al., 1995; Domingo, 1995). Gilman e colaboradores (1946) propuseram que os metais pesados são tóxicos aos sistemas biológicos por formarem mercaptídeos reversíveis, a partir de grupos -SH de moléculas protéicas, tais como enzimas. Estes autores também postularam uma hipótese para explicar o mecanismo pelo qual os ditióis são capazes de reativar sistemas enzimáticos e exercer benefícios no tratamento de intoxicações com metais pesados. Segundo esta hipótese, o uso de quelantes ditiólicos proporcionaria a formação de mercaptídeos de baixa dissociabilidade, o que reverteria, efetivamente, a ligação dos metais pesados com sistemas protéicos sensíveis a estes (Gilman et al., 1946).

A lipo- ou hidrossolubilidade dos agentes quelantes é característica importante e pode limitar a sua utilização e eficácia. Os compostos lipofílicos, como o BAL, podem facilmente atravessar a membrana celular e atingir os espaços intracelulares (Andersen, 1989), causando redistribuição de diversos metais tóxicos (Hoover e Aposhian, 1983; Cory-Slechta et al., 1987; Aaseth et al., 1995) dos órgãos periféricos para o cérebro. Além disso, este agente quelante é completamente contra-indicado em intoxicações agudas por cloreto de cádmio (Tepperman, 1947). Esta é a principal razão para o declínio do uso do BAL e o aumento do uso de outros quelantes ditiólicos, tais como o DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico) e o DMSA (ácido *meso* 2,3-dimercaptosuccínico), derivados mais hidrossolúveis e possivelmente menos tóxicos deste composto (Andersen, 1989).

2.3.2. DMPS e DMSA

Derivados estruturais do BAL, o DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico) e o DMSA (ácido *meso* 2,3-dimercaptosuccínico) (Figuras 2 e 3, respectivamente), são compostos que apresentam dois grupos sulfidrílicos (-SH) vicinais e caracterizam-se pela maior solubilidade em água (Nadig et al., 1985) e limitada solubilidade lipídica (Aposhian et al., 1983).

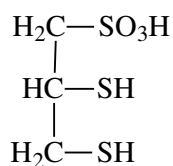


Figura 2- Estrutura do ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS).

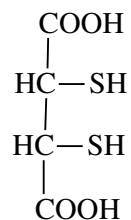


Figura 3- Estrutura ácido *meso* 2,3- dimercaptosuccínico (DMSA).

Estes agentes quelantes sulfidrílicos apresentam-se como sólidos cristalinos e estáveis (Aposhian et al., 1992) e são facilmente administrados por via oral (Aposhian et al., 1996). Além disso, as DL₅₀ destes compostos em camundongos são maiores que DL₅₀ para o BAL (5,22 mmol.kg⁻¹ para o DMPS, 16,5 mmol.kg⁻¹ para o DMSA e 0,73 mmol.kg⁻¹ para o BAL) (Aposhian et al., 1981). Devido a estas

características, estes compostos são considerados menos tóxicos que o BAL (Aposhian et al., 1992).

O DMPS foi usado na antiga URSS desde 1958 e encontra-se disponível, comercialmente na Europa, como DIMAVAL[®]. Além disso, este composto tem sido utilizado na Alemanha para o tratamento de intoxicações por mercúrio (Campbell et al., 1986). O DMPS foi descrito como uma droga efetiva no tratamento de intoxicações por mercúrio (Kostygou, 1958), substituindo o BAL (Toet et al., 1994; Campbell et al., 1986; Cherian et al., 1988), apresentando menor toxicidade local e sistêmica (Hruby e Donner, 1987) e não causando redistribuição de mercúrio para o cérebro de ratos (Buchet e Lauwerys, 1989; Aposhian et al., 1996).

A eficácia do DMSA, Succimer[®], foi originalmente descrita por pesquisadores chineses (Wang et al., 1965). Este composto foi aprovado em 1991 nos EUA pelo FDA (Food and Drug Administration) apenas para o tratamento oral de intoxicações agudas e crônicas por chumbo em crianças com níveis sanguíneos deste metal maiores que 45 µg/dl (U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Além disso, este agente quelante parece ser efetivo em remover chumbo do cérebro (Cory-Slechta, 1988). Portanto, quando comparado a outros quelantes, tais como BAL, EDTA e D-penicilamina, o DMSA é menos tóxico e é efetivo em reduzir a concentração sanguínea e aumentar a excreção urinária de chumbo em crianças (Graziano et al., 1988; 1992; Chisolm, 1990) e animais (Cory-Slechta, 1988; Flora et al., 1995; Gong e Evans, 1997). Outros estudos indicam que o DMSA pode ser mais efetivo que o BAL em proteger da nefrotoxicidade induzida por metil mercúrio (De La Torre et al, 1998). Segundo Aposhian e colaboradores (1992), o DMSA é três vezes menos tóxico que o DMPS.

O DMPS e o DMSA foram utilizados em intoxicações por mercúrio e chumbo e mostraram-se efetivos (Graziano et al., 1988; Aposhian e Aposhian, 1990; Toet et al., 1994). Além disso, alguns autores demonstram que esses agentes quelantes também podem ser usados em modelos experimentais de intoxicações por cádmio (Domingo, 1995; Tandon et al., 2003; Santos et al., 2004, 2005a). Ao contrário, trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que os agentes quelantes ditiólicos potencializam os efeitos tóxicos de alguns metais (Nogueira et al., 2003a; Soares et al., 2003; Nogueira et al., 2004b; Santos et al., 2006). Considerando o descrito

acima, permanece em aberto a questão a respeito de qual seria a droga de escolha, em casos de intoxicação com metais pesados (Muckter et al., 1997).

2.4. Agentes Antioxidantes

Diversos autores têm demonstrado que a toxicidade induzida pelo cádmio está relacionada com a capacidade deste metal em induzir estresse oxidativo (Manca et al., 1991; Pal et al., 1993; Kelley et al., 1999). Uma vez que os antioxidantes possuem uma importante função protegendo as células contra o estresse oxidativo, a utilização destes compostos poderia ser eficaz em prevenir contra intoxicações causadas por este metal pesado.

Neste contexto, muitos compostos com potencial antioxidante têm sido testados na terapia de intoxicações por metais pesados (Shaikh et al., 1999; El-Demerdash et al., 2004; Santos et al., 2004, 2005a,b). Dentre estes compostos, que possuem ação antioxidante, estão a N-acetilcisteína (Moldeus et al., 1986), compostos orgânicos de selênio (Nogueira et al., 2004a) e o ácido ascórbico (Halliwell e Gutteridge, 1989).

2.4.1. N-acetilcisteína (NAC)

A NAC é considerada um importante agente terapêutico e é comumente utilizada na prática clínica (Repine et al., 1997), sendo empregada como agente mucolítico, administrado por inalação, e também como tratamento de intoxicação por acetoaminofeno (Ziment, 1986; Borgström et al., 1986). Além disto, tem sido demonstrado que a NAC possui efeito antimutagênico e anticarcinogênico em animais experimentais (De Flora et al., 1986a; b). Este agente antioxidante possui em sua estrutura grupos tióis (figura 4) e também pode ser utilizada como antioxidante em condições de estresse oxidativo (Moldeus et al., 1986). Vários estudos têm indicado que a N-acetilcisteína também possui atividade quelante para diversos metais pesados (Banner et al., 1986; Shaikh et al., 1999).

A utilização da NAC como agente antioxidante ou quelante, entretanto, requer certos cuidados, já que Ritter et al. (2004) descreveram que o uso da NAC pode ter

algumas limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes, devido à facilidade com que interage com o ferro. De fato, alguns estudos do nosso grupo demonstraram que a terapia com NAC, em animais expostos ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), pode causar danos renais, provavelmente devido à formação de complexos entre a NAC e o HgCl_2 (Brandão et al., 2006).

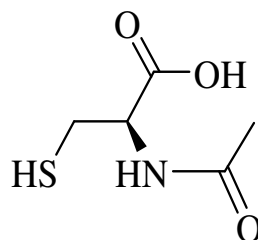


Figura 4- Estrutura da N-acetilcisteína (NAC)

2.4.2. Selênio

Esse elemento químico foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. O selênio é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre. Esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980).

O selênio é um elemento traço essencial, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957, em ratos (Schwartz e Foltz, 1957). Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000).

Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. Para humanos, a

Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 µg, a qual é considerada segura e saudável para adultos.

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante a de antioxidante. Sabe-se que as moléculas contendo selênio, como por exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂, podem ser melhores nucleófilos (e portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001). Já é conhecido que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathione peroxidase (Wingler e Brigelius-Flohé, 1999), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). A atividade redox do selênio tem importância fundamental porque ele faz parte do sítio ativo dessas enzimas.

2.4.2.1. Disseleneto de difenila

A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvo de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (Petragnani et al., 1976; Comasseto, 1983), sendo importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga et al., 1996; 1997).

Nosso grupo de estudo tem demonstrado que o disseleneto de difenila (figura 4) tem propriedades farmacológicas, tais como efeitos antiúlcera (Savegnago et al., 2005), antiinflamatório e antinociceptivo (Nogueira et al., 2003b), hepato-protetor (Borges et al., 2006) e antioxidante em alguns modelos experimentais para a aviação de estresse oxidativo (Nogueira et al., 2004a; Santos et al., 2005b; Borges et al., 2006; Luchese et al., 2007). Adicionalmente, também foi demonstrado que o (PhSe)₂ pode apresentar atividade quelante em animais expostos ao cádmio (Santos et al., 2005a).

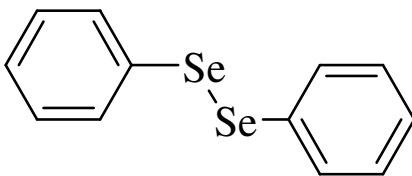


Figura 5 – Estrutura do disseleneto de difenila ((PhSe)₂)

2.4.3. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é considerado um potente antioxidante muito utilizado na clínica. Este antioxidante é um composto de baixo peso molecular (Figura 6) que age como scavenger das espécies reativas de oxigênio, através da transferência rápida de elétrons, inibindo assim a peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1989). Alguns autores demonstraram que a administração de ácido ascórbico reduziu significativamente a peroxidação lipídica de fígado e cérebro, e aumentou os níveis de catalase dos rins de ratos expostos ao chumbo (Patra et al., 2001). Além disso, segundo Goyer e Cherion (1979), o ácido ascórbico pode agir como um quelante de metais tóxicos, com potência similar aos agentes quelantes utilizados, aumentando a excreção dos metais tóxicos do organismo e, conseqüentemente, diminuindo a toxicidade (Dhawan et al., 1988).

Entretanto, a utilização do ácido ascórbico como agente antioxidante ou quelante requer alguns cuidados. Alguns estudos demonstraram que na presença de metais de transição, o ácido ascórbico pode apresentar efeitos pró-oxidantes, que dependem da concentração de metal e de ácido ascórbico (Frei, 1991; Buettner e Jurkiewicz, 1996).

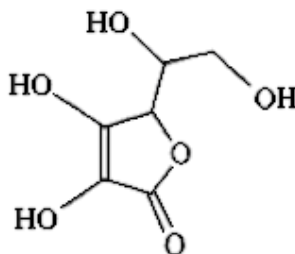


Figura 6 – Estrutura do ácido ascórbico

3. OBJETIVOS

A poluição do ar é um dos maiores problemas ambientais do mundo, e os metais, como o cádmio, são altamente tóxicos e tem aumentado na atmosfera. O cádmio é imensamente usado em indústrias e é um componente da fumaça do cigarro. Este metal pode ser absorvido, entrando nos pulmões através da respiração. Pelo fato do tecido pulmonar ser um órgão alvo dos efeitos tóxicos induzidos pelo cádmio, os objetivos deste trabalho foram: (i) investigar os efeitos tóxicos do cádmio na atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato *in vitro*, uma vez que esta enzima é extremamente sensível à exposição dos metais pesados e é um parâmetro usado em estudos toxicológicos; (ii) estudar o efeito dos agentes quelantes (DMSA e DMPS) em proteger contra os efeitos tóxicos do cádmio; (iii) avaliar o efeito dos agentes antioxidantes (*N*-acetilcisteína, disseleneto de difenila e ácido ascórbico) em proteger contra o efeito tóxico do cádmio; (iv) investigar o efeito da terapia combinada com agentes quelantes ditiólicos e antioxidantes (quelante x antioxidante) em proteger contra o efeito tóxico do cádmio; (v) elucidar o possível mecanismo envolvido na atividade da δ -ALA-D na presença de cádmio, agentes quelantes e antioxidantes pelo uso de $ZnCl_2$ e DTT.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi publicado na Revista *Chemico-Biological Interactions*.

**4.1. Cádmio inibe a δ -aminolevulinato desidratase de pulmão de ratos *in vitro*:
Interação com agentes quelantes e antioxidantes**

**CADMIUM INHIBITS δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE FROM RAT LUNG
IN VITRO: INTERACTION WITH CHELATING AND ANTIOXIDANT AGENTS**



Cadmium inhibits δ -aminolevulinatase from rat lung *in vitro*: Interaction with chelating and antioxidant agents

Cristiane Luchese^a, Gilson Zeni^a, João B.T. Rocha^a,
Cristina W. Nogueira^a, Francielli W. Santos^{a,b,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

^b Centro de Ciências da Saúde de Uruguaiana (UNIPAMPA), Universidade Federal de Santa Maria, Uruguaiana, CEP 97500-009, RS, Brazil

Received 26 September 2006; received in revised form 20 November 2006; accepted 21 November 2006
Available online 24 November 2006

Abstract

The effect of cadmium (Cd^{2+}) on δ -aminolevulinatase (δ -ALA-D) activity from rat lung *in vitro* was investigated. δ -ALA-D activity, a parameter for metal intoxication, has been reported as a target of Cd^{2+} in different tissues. The protective effect of monotherapies with dithiol chelating (*meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid (DMPS)) or antioxidant agents (ascorbic acid, diphenyl diselenide (PhSe)₂, and *N*-acetylcysteine (NAC)) was evaluated. The effect of a combined therapy (dithiol chelating \times antioxidant agent) was also studied. Zinc chloride (ZnCl_2) and dithiothreitol (DTT) were used to investigate the mechanisms involved in cadmium, chelating and antioxidant effects on δ -ALA-D activity. Cadmium inhibited rat lung δ -ALA-D activity at low concentrations. DTT (3 mM), but not ZnCl_2 (100 μM), protected the inhibition of enzyme activity caused by Cd^{2+} . Chelating agents were not effective in restoring the enzyme activity. DMPS and DMSA presented inhibitory effect on enzyme activity. DTT restored the inhibition caused by both chelating agents, but ZnCl_2 restored only the inhibitory effect induced by DMSA. These compounds caused a marked potentiation of δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+} . ZnCl_2 did not restore inhibition of enzyme activity caused by Cd^{2+} plus chelating agents. Conversely, DTT restored the inhibition induced by Cd^{2+} /DMSA, but not by Cd^{2+} /DMPS. Antioxidants were not effective in ameliorating δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+} , whereas ascorbic acid potentiated the enzyme inhibition induced by this metal. A combined effect of $\text{Cd}^{2+} \times \text{DMPS} \times (\text{PhSe})_2$ and $\text{Cd}^{2+} \times \text{DMPS} \times \text{NAC}$ was observed. There was no combined effect of $\text{Cd}^{2+} \times \text{chelator} \times \text{antioxidants}$ when DMSA was used. This study demonstrated that Cd^{2+} inhibited δ -ALA-D activity and chelating and antioxidant agents, alone or combined, did not restore the enzyme activity. In contrast, these compounds potentiated the inhibition induced by Cd^{2+} in rat lung.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cadmium; δ -ALA-D; Chelating agents; Antioxidant; Selenium; Lung

1. Introduction

The exposure of human population to a variety of heavy metals has been a public health concern [1]. Several metals are known to disturb cellular functions by binding to thiol groups of biomolecules. Cadmium (Cd^{2+}) is one of the most abundant non-essential ele-

* Corresponding author at: Centro de Ciências da Saúde de Uruguaiana (UNIPAMPA), Universidade Federal de Santa Maria, 97500-009 Uruguaiana, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3411 5174; fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: francielliweber@yahoo.com.br (F.W. Santos).

ments due to its immense usage in various industrial applications [2], is an environmental contaminant with food and tobacco smoking being the main sources of exposure in the non-occupationally exposed population [3]. Of all the toxic metals found in the environment and used in industry, Cd^{2+} occupies a special place because of the generally intractable nature of cadmium intoxication [4].

Cadmium occupies a unique place among metals because of its diverse toxic effects: its long biological half-life (20–30 years in humans), low rate excretion from the body (1–2 $\mu\text{g}/\text{day}$), and its predominant long-term storage in soft tissues [5]. Cadmium accumulates and proves to be very toxic in many organs, such as kidney, liver, testis, brain, bone, blood system, lung [3]. This toxic metal is more efficiently absorbed through the lungs than through the gastrointestinal tract [6] smoking poses a serious risk. Estimates indicate that smokers absorb 1–3 $\mu\text{g}/\text{day}$ of cadmium if they smoke one pack a day [7], which is approximately equivalent to the total estimated daily intake from dietary sources. Exposure of lung to cadmium can cause pneumonitis and pulmonary emphysema in man [8]. Therefore, the use of lung as a target tissue of cadmium exposure is of great importance because this heavy metal can be absorbed on suspended particles, entering the lung through the respiration.

Consequently, a possible therapy for metal intoxication is to remove the toxic metals from the bound functional bioligands by administering strong thiol-containing chelators [9]. Chelation therapy is the most effective means of treating metal intoxication. Some metal chelators, such as *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid (DMPS), have been shown to be effective for treating the toxicity induced by a number of heavy metals [10]. These compounds are more hydrophilic and less toxic than other metal chelators [11].

Several authors have shown that antioxidant should be one of the important components of an effective treatment of Cd^{2+} poisoning [12]. Furthermore, it is believed that the effects of combined therapy with antioxidants and chelators can yield better therapeutic outcomes than isolated chelation therapy [13]. Previous study of our research group have reported that diphenyl diselenide (PhSe_2) was as effective in restoring oxidative damage induced by cadmium in mice testes as the chelating compounds (DMSA and DMPS) [14,15].

Endogenous metals are essential components of many enzyme systems, for instance, δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) is a metalloenzyme requiring zinc ions for activity [16]. δ -ALA-D catalyses the asymmetric condensation of two molecules of δ -aminolevulinic

acid (δ -ALA) to porphobilinogen in the initial steps of heme biosynthesis [17]. δ -ALA-D is a sulfhydryl-containing enzyme [17,18] and numerous metals such as mercury [19,20], lead [21–23], cadmium [18,24] and other compounds that oxidize sulfhydryl groups modified its activity [25–28]. Therefore, δ -ALA-D is inhibited by substances that compete with zinc and/or oxidize the $-\text{SH}$ groups [29–34] and is linked to situations associated with oxidative stress [35,36].

For the fact that the air pollution is a major problem worldwide, metals, such as cadmium, are highly toxic and have increased in the atmosphere. Cadmium is immensely used in industrial applications and is a component of tobacco smoke, can be absorbed on suspended particles, entering the lung through the respiration. Since lung tissue is a target of the toxic effects induced by cadmium, the goals of this study were to investigate: (i) the toxic effect of Cd^{2+} on δ -ALA-D activity from rat lung *in vitro*, an enzyme extremely sensitive to heavy metals exposure and a parameter used in toxicological studies; (ii) the effect of chelating (DMSA and DMPS) in protecting against the toxic effect of Cd^{2+} ; (iii) the effect of antioxidant agents (*N*-acetylcysteine, diphenyl diselenide and ascorbic acid) in protecting against the toxic effect of Cd^{2+} ; (iv) the effect of combined therapy with dithiol chelating and antioxidant agents (chelator \times antioxidant) in protecting against the toxic effect of Cd^{2+} ; (v) the possible mechanisms involved in δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+} , chelating and antioxidant agents by using ZnCl_2 and DTT.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

δ -Aminolevulinic acid (δ -ALA), cadmium chloride (CdCl_2), *p*-dimethylaminobenzaldehyde, *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid (DMPS), *N*-acetylcysteine (NAC), ascorbic acid, dithiothreitol (DTT), zinc chloride (ZnCl_2) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Diphenyl diselenide (PhSe_2) was synthesized according to Paulmier [37]. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. DMSA and (PhSe_2) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

2.2. Animals

Male adult Wistar rats, weighing 200–300 g, from our own breeding colony were used. The animals were kept on a separate animal room, on a 12 h light/dark cycle, at a

room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food (Guabi, RS, Brazil) and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Medicine Veterinary and Animal Science of the University of Sao Paulo, Brazil.

2.3. δ -ALA-D activity

Lungs were rapidly homogenized in 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 (1/5, w/v) and centrifuged at $2400 \times g$ for 15 min. The activity of rat lung δ -ALA-D was assayed according to the procedure of Sassa [38] with some modifications. The principle of this method is based on the enzyme incubation with an excess of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA). The assay is linear for at least 2.5 h and for up to 2.5 mg of tissue per assay. The K_m for ALA is 4.0×10^{-4} M. The porphobilinogen, which is formed within a fixed time, is mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed is measured photometrically (555 nm) against a blank. Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8 and lung tissue (300 μ l). The incubation was carried out for 180 min at 37 °C.

2.3.1. Effect of Cd^{2+} on δ -ALA-D activity

The effect of Cd^{2+} on rat lung δ -ALA-D activity was determined in the presence of different metal concentrations (0.001–200 μ M). The lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} and the IC_{50} value was determined.

2.3.2. Effect of chelating agents on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+}

The IC_{50} value for Cd^{2+} was utilized to study the protective effect of chelating agents (DMSA and DMPS). The lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}) plus DMSA (1–100 μ M), or Cd^{2+} (IC_{50}) plus DMPS (1–100 μ M).

In another set of experiments, a non-effective Cd^{2+} concentration and the highest non-effective chelating concentration were used to evaluate the possible interaction between Cd^{2+} and chelating agents.

2.3.3. Effect of antioxidant agents on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+}

The IC_{50} value for Cd^{2+} was utilized to study the protective effect of antioxidant agents (NAC, ascorbic acid and (PhSe)₂). The lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}) plus NAC (5–400 μ M), or Cd^{2+} (IC_{50}) plus ascorbic acid

(10–400 μ M), or Cd^{2+} (IC_{50}) plus (PhSe)₂ (0.1, 0.5, 1 μ M).

In another set of experiments, a non-effective Cd^{2+} concentration and the highest non-effective antioxidant concentration were used to test the possible interaction between Cd^{2+} and antioxidant agents.

2.3.4. Effect of chelating plus antioxidant agents on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+}

The combined effect of chelating and antioxidant agents on δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+} was studied. The lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}) and chelating plus antioxidant agents ($Cd^{2+} \times$ chelator \times antioxidant).

In another set of experiments, the IC_{50} value for Cd^{2+} , the highest non-effective antioxidant and chelating concentrations were used to evaluate the possible interaction between $Cd^{2+} \times$ chelating \times antioxidant.

2.3.5. Effect of DTT and $ZnCl_2$ on rat lung δ -ALA activity in the presence of Cd^{2+} , chelating and antioxidant agents

To gain some information about the mechanisms involved in δ -ALA inhibition, the effect of DTT (3 mM) or $ZnCl_2$ (100 μ M) on δ -ALA activity was performed as follow:

- (i) In the presence of Cd^{2+} : lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}).
- (ii) In the presence of chelating agents: lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with DMSA or DMPS (the highest concentration that inhibited δ -ALA activity).
- (iii) In the presence of antioxidant agents: lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with NAC, ascorbic acid or (PhSe)₂ (the highest concentration that inhibited δ -ALA activity).
- (iv) In the presence of Cd^{2+} plus chelating agents: lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}) plus chelating agents (DMSA or DMPS, at the highest concentration that inhibited δ -ALA activity).
- (v) In the presence of Cd^{2+} plus antioxidant agents: lung tissue (300 μ l) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd^{2+} (IC_{50}) plus antioxidant agents (NAC or ascorbic acid or (PhSe)₂, at the highest concentration that inhibited δ -ALA activity).

After the pre-incubation time, each reaction (described above) was started by the addition of substrate (δ -ALA) and DTT or $ZnCl_2$. The incubation was carried out at 37 °C for 180 min.

2.4. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [39] using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.D. Statistical analysis was performed using a one-way and three-way ANOVA followed by the Duncan's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The IC_{50} value was reported as geometric means accompanied by their 95% confidence limits. The IC_{50} value was determined by linear regression from individual experiments using "GraphPad Software" (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effect of Cd^{2+} on rat lung

The inhibition induced by Cd^{2+} in ALA-D activity was concentration-dependent. In fact, 0.1 μM Cd^{2+} inhibited around 12% of the enzyme activity, whereas the most prominent inhibitory effect was observed with 200 μM of this metal (around 93% of δ -ALA-D inhibition) (Fig. 1a). The calculated IC_{50} value was 34.5 μM (95% confidence interval, CI: 19.3–61.7 μM).

DTT (3 mM) was capable to restore the inhibition of δ -ALA-D activity caused by Cd^{2+} (35 μM) to the control levels (around 45% of protection) (Fig. 1b). In contrast, the effect of metal (35 μM) was only partially restored by $ZnCl_2$ (100 μM) (around 28% of protection) (Fig. 1b).

3.2. Effect of chelating agents on δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+}

DMSA and DMPS, at different concentrations (1–100 μM), did not restore the inhibitory effect of Cd^{2+} (35 μM) on δ -ALA-D activity.

DMPS alone had an inhibitory effect on δ -ALA-D activity, at concentrations of 50 and 100 μM (15 and 20% of inhibition, respectively) (Fig. 2a). This chelating agent in combination with Cd^{2+} caused a more pronounced inhibition in δ -ALA-D activity at concentrations of 5, 10, 50 and 100 μM (68, 71, 85 and 91%, respectively) when compared to Cd^{2+} (Fig. 2a). The combination of Cd^{2+} (0.01 μM) with DMPS (10 μM), a non-inhibitory concentration, did not change the enzyme activity (Fig. 2a).

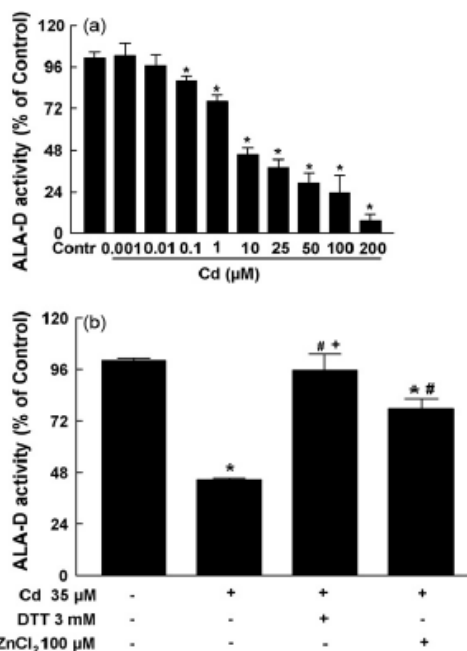


Fig. 1. Effect of Cd^{2+} on rat lung δ -ALA-D activity (a). Effects of DTT and $ZnCl_2$ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+} (b). Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to Cd^{2+} (one-way ANOVA/Duncan). +: Denoted $p < 0.05$ as compared to Cd^{2+} plus $ZnCl_2$ (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

DTT (3 mM) restored to the control levels the inhibition caused by DMPS (100 μM) in enzyme activity (Fig. 2b). Conversely, $ZnCl_2$ (100 μM) did not restore the inhibitory effect of DMPS (100 μM) (Fig. 2b). In addition, DTT (3 mM) and $ZnCl_2$ (100 μM) did not restore the inhibition of the enzyme activity caused by Cd^{2+} (35 μM) plus DMPS (100 μM) (Fig. 2b).

Accordingly, DMSA demonstrated an inhibitory effect at 100 μM (18% of inhibition) (Fig. 3a). Cd^{2+} (35 μM) plus DMSA (50 and 100 μM) demonstrated a higher reduction of enzyme activity when compared to Cd^{2+} (70.4 and 78% of inhibition, respectively) (Fig. 3a). In contrast to DMPS, DMSA (50 μM) plus Cd^{2+} (0.01 μM), which did not have inhibitory effect alone, inhibited the enzyme activity (Fig. 3a).

DTT (3 mM) and $ZnCl_2$ (100 μM) were capable of restoring the inhibition of δ -ALA-D activity caused by DMSA (100 μM) to control levels (Fig. 3b). In addi-

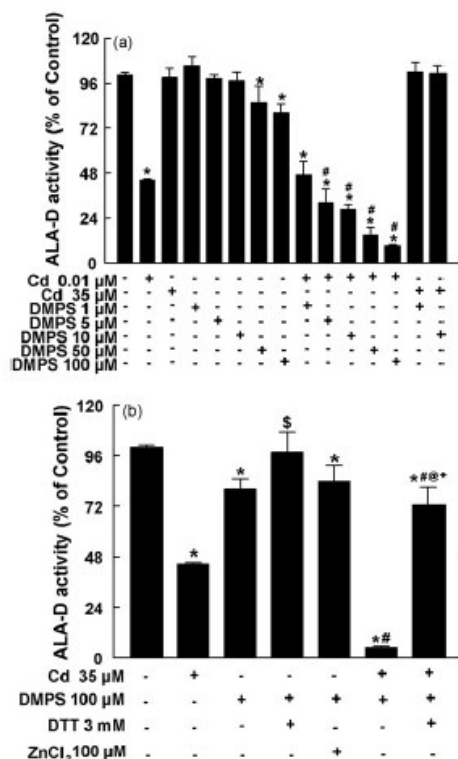


Fig. 2. Effect of DMPMS on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of DMPMS and Cd²⁺ (b). Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ (one-way ANOVA/Duncan). +: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ plus ZnCl₂ (one-way ANOVA/Duncan). @: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ plus DMPMS (one-way ANOVA/Duncan). §: Denoted $p < 0.05$ as compared to DMPMS (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

ton, the inhibitory effect of Cd²⁺ (35 μ M) plus DMSA (100 μ M) was restored by DTT (3 mM) (around 77% of protection), but not by ZnCl₂ (100 μ M) (Fig. 3b).

3.3. Effect of antioxidant agents on δ -ALA-D inhibition induced by Cd²⁺

Ascorbic acid (10–400 μ M), NAC (5–400 μ M) and (PhSe)₂ (0.1, 0.5, 1 μ M) did not restore the inhibitory effect of Cd²⁺ (35 μ M) on δ -ALA-D activity.

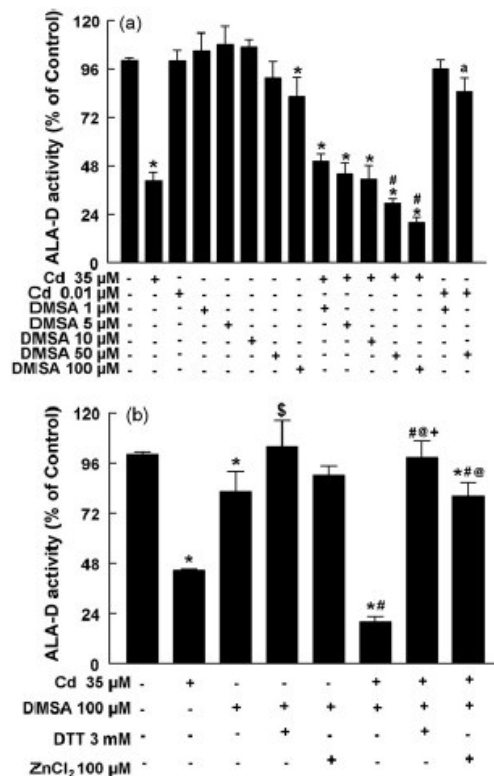


Fig. 3. Effect of DMSA on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of DMSA and Cd²⁺ (b). Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ (one-way ANOVA/Duncan). +: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ plus ZnCl₂ (100 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). @: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ plus DMSA (100 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). §: Denoted $p < 0.05$ as compared to DMSA (100 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

Ascorbic acid had an inhibitory effect on δ -ALA-D at 200 and 400 μ M (14 and 23%, respectively) (Fig. 4a). This antioxidant agent in combination with Cd²⁺ caused a more pronounced inhibition in δ -ALA-D activity when compared to Cd²⁺ (Fig. 4a). Ascorbic acid (100 μ M) plus cadmium (0.01 μ M), which did not have an inhibitory effect alone, caused an inhibition in enzyme activity (Fig. 4a).

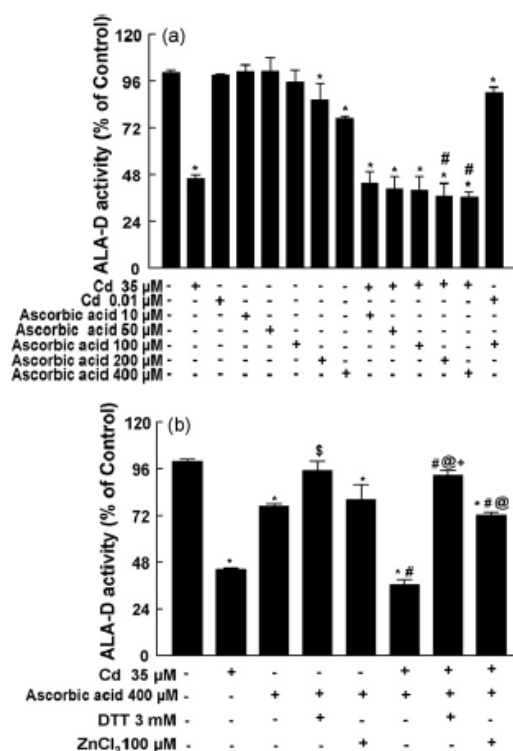


Fig. 4. Effect of ascorbic acid on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+} (a). Effects of DTT and $ZnCl_2$ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of ascorbic acid and Cd^{2+} (b). Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd^{2+} (one-way ANOVA/Duncan). +: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd^{2+} plus $ZnCl_2$ (one-way ANOVA/Duncan). @: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd^{2+} plus ascorbic acid (400 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). \$: Denoted $p < 0.05$ as compared to ascorbic acid (400 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

DTT (3 mM) restored the inhibitory effect of ascorbic acid (400 μ M) in the enzyme activity to the control levels (Fig. 4b). In contrast, the effect of this antioxidant agent (400 μ M) was not restored by $ZnCl_2$ (100 μ M) (Fig. 4b). DTT (3 mM) restored the inhibitory effect caused by Cd^{2+} (35 μ M) plus ascorbic acid (400 μ M) to the control levels (Fig. 4b). In contrast, $ZnCl_2$ (100 μ M) did not restore the enzyme activity caused by Cd^{2+} (35 μ M) plus antioxidant agent (400 μ M) (Fig. 4b).

N-Acetylcysteine did not have an inhibitory effect on δ -ALA-D at concentration tested. This antioxidant did

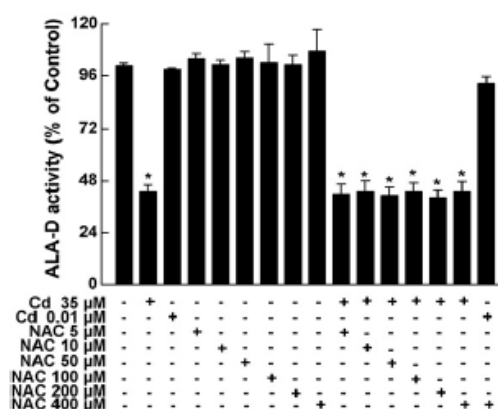


Fig. 5. Effect of NAC on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+} . Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

not restore the inhibition of δ -ALA-D activity caused by Cd^{2+} . NAC (400 μ M) plus Cd^{2+} (0.01 μ M), at concentrations that did not present an effect alone, did not alter the enzyme activity (Fig. 5).

Diphenyl diselenide had an inhibitory effect on δ -ALA-D activity at 0.5 and 1 μ M (around 17% of inhibition) (Fig. 6a). This antioxidant agent in combination with Cd^{2+} (35 μ M) did not change the enzyme activity when compared to Cd^{2+} (Fig. 6a).

DTT (3 mM) partially restored the inhibition in enzyme activity caused by diphenyl diselenide (1 μ M) (around 11% of protection) (Fig. 6b). $ZnCl_2$ (100 μ M) did not restore the enzyme activity (Fig. 6b). DTT (3 mM) and $ZnCl_2$ (100 μ M) partially restored δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+} (35 μ M) plus diphenyl diselenide (1 μ M) (around 39 and 31% of protection, respectively) (Fig. 6b).

3.4. Effect of chelating plus antioxidant agents on δ -ALA-D inhibition induced by Cd^{2+}

Fig. 7a demonstrates the effect of DMSA and NAC association on δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+} . Three-way ANOVA yielded a significant DMSA \times Cd^{2+} interaction ($F_{1,18} = 6.119$; $p < 0.05$). NAC and DMSA combined were not capable of restoring δ -ALA-D inhibition caused by Cd^{2+} in lung.

The effect of the DMSA and ascorbic acid association on δ -ALA-D activity in the presence of Cd^{2+} is

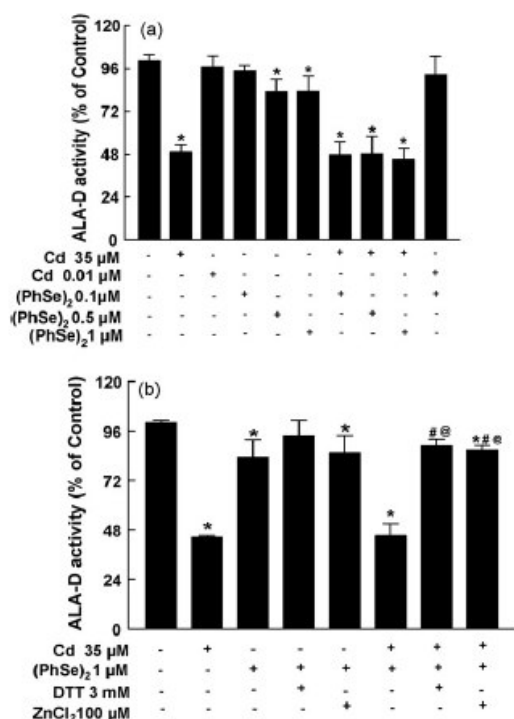


Fig. 6. Effect of (PhSe)₂ on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by Cd²⁺ (a). Effects of DTT and ZnCl₂ on rat lung δ -ALA-D activity in the presence of (PhSe)₂ and Cd²⁺ (b). Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (one-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ (one-way ANOVA/Duncan). @: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ plus (PhSe)₂ (1 μ M) (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

demonstrated in Fig. 7b. Three-way ANOVA yielded a significant DMSA \times Cd²⁺ interaction ($F_{1,17} = 4.874$; $p < 0.05$). Ascorbic acid and DMSA combined were not capable of restoring δ -ALA-D inhibition caused by Cd²⁺.

Fig. 7c presents the effect of DMSA and (PhSe)₂ combination on δ -ALA-D activity in the presence of Cd²⁺. Three-way ANOVA yielded a significant DMSA \times Cd²⁺ interaction ($F_{1,16} = 11.493$; $p < 0.01$). (PhSe)₂ and DMSA combined did not restore the inhibition in δ -ALA-D activity caused by Cd²⁺.

DMSA in combination with antioxidant agents (NAC, ascorbic acid or (PhSe)₂) did not change the enzyme activity.

The effect of the DMPS and NAC association on δ -ALA-D activity in the presence of Cd²⁺ is demonstrated in Fig. 8a. Three-way ANOVA yielded a significant NAC \times DMPS \times Cd²⁺ interaction ($F_{1,30} = 4.766$; $p < 0.05$) in lung. NAC and DMPS combined were not able in restoring the enzyme inhibition caused by Cd²⁺.

Fig. 8b shows the DMPS and ascorbic acid association effect on δ -ALA-D activity in the presence of Cd²⁺. Three-way ANOVA yielded a significant DMPS \times Cd²⁺ interaction ($F_{1,30} = 4.309$; $p < 0.05$). Ascorbic acid and DMPS combined did not restore the inhibition on δ -ALA-D activity caused by Cd²⁺.

Fig. 8c presents the effect of the DMPS and (PhSe)₂ association on δ -ALA-D activity in the presence of Cd²⁺. Three-way ANOVA yielded a significant Cd²⁺ \times DMPS \times (PhSe)₂ interaction ($F_{1,28} = 5.678$; $p < 0.05$) in lung. (PhSe)₂ and DMPS combined did not restore the inhibition in δ -ALA-D activity caused by Cd²⁺.

DMPS in combination with antioxidant agents (NAC, ascorbic acid or (PhSe)₂) did not change the enzyme activity.

4. Discussion

The presented study demonstrated for the first time that δ -ALA-D from lung is inhibited by cadmium. Cadmium is more efficiently absorbed through the lungs than through the gastrointestinal tract [6] smoking poses a serious risk. Cigarette smoke is an important source of cadmium exposure. Estimates indicate that smokers absorb 1–3 μ g/day of cadmium if they smoke one pack a day [7], which is approximately equivalent to the total estimated daily intake from dietary sources.

Cadmium exposure has been involved in a variety of pathological conditions, e.g. neurotoxicity, nephrotoxicity and carcinogenicity. Its competence to alter various cellular processes including metabolism, protein synthesis and cell proliferation has been documented [40]. Its toxicity is related to the production of ROS and lipid peroxidation. Moreover, exposure of lung to cadmium has resulted in alterations in cellular function in addition to affecting both humoral and cell-mediated immune responses in animals [41]. It is well known that inhaled cadmium can cause pneumonitis and pulmonary emphysema in man [8].

The present investigation indicates that low concentrations of cadmium inhibited rat lung δ -ALA-D activity. Therefore it is clearly that lung δ -ALA-D activity is inhibited by cadmium as is δ -ALA-D from other organs [14,15]. Of particular importance, the inhibition of δ -ALA-D can lead to accumulation of ALA [42], which

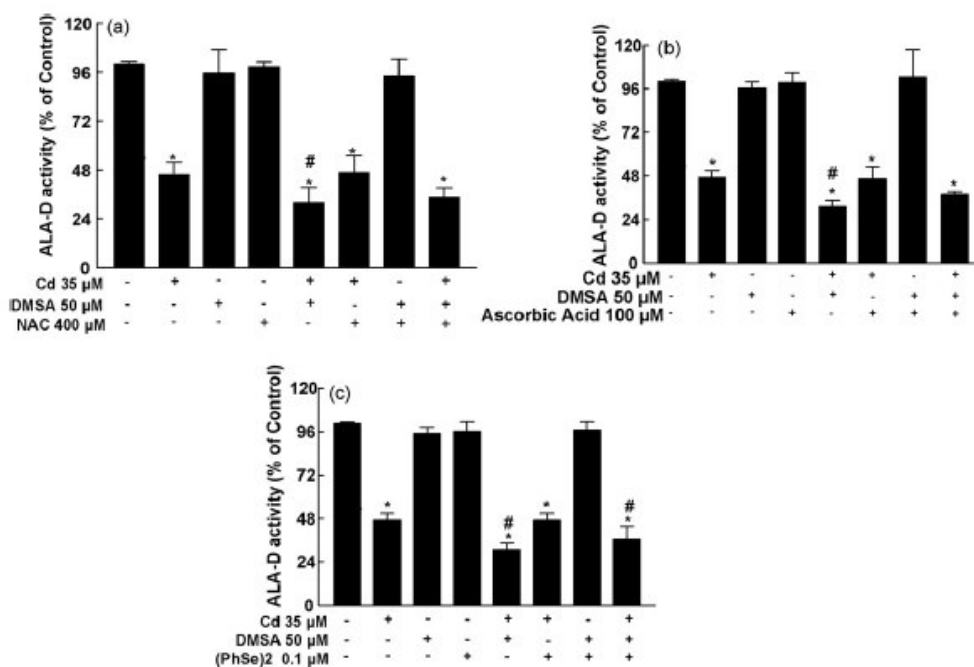


Fig. 7. Effects of DMSA plus NAC (a), DMSA plus ascorbic acid (b) and DMSA plus (PhSe)₂ (c) on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by cadmium. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (three-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ (three-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

may autoxidize to form reactive oxygen species, such as hydroperoxides [43]. Reactive oxygen species are toxic, because they may oxidize numerous biomolecules leading to tissue injury and cell death [44].

Furthermore, mammalian δ -ALA-D is a metalloenzyme that requires Zn²⁺ for maximal catalytic activity and data support the hypothesis of a direct competition between bivalent metals and Zn²⁺ on δ -ALA-D from mammals and bacteria [20,33,34,45]. Thus cadmium could cause a Zn²⁺ displacement leading to δ -ALA-D inhibition. In the current study, ZnCl₂ was not efficient in restoring enzyme activity inhibited by cadmium from rat lung, whereas DTT was. Therefore we can propose the mechanism involved in cadmium effect on δ -ALA-D activity is related to its ability to oxidize -SH groups from enzyme, but not by displacing zinc from the enzyme structure. However, an alternative interpretation for this fact is that the inability of ZnCl₂ to protect may be due to a high affinity of the enzyme for cadmium and protection by DTT may be due to a direct interaction with cadmium, preventing it from interacting with the enzyme.

A possible therapy for metal intoxication is to remove toxic metals from the bound functional bioligands by

administering strong thiol-containing chelators [9]. In addition, several authors have shown that antioxidant should be one of the important components of an effective treatment of cadmium poisoning [24]. In conformity with our earlier observation (PhSe)₂ in combination with DMSA or DMPS were effective in protecting against testicular damage induced by cadmium. However, the concomitant administration of these compounds was not more effective than monotherapy in ameliorating the testicular injury [14,15].

The results of the present investigation clearly indicate that DMSA and DMPS inhibited δ -ALA-D activity. However, the molecular mechanisms underlying DMPS and DMSA effect on δ -ALA-D activity are still not satisfactorily understood. In contrast to BAL, the inhibitory effects of DMSA and DMPS are apparently not related to Zn²⁺ chelation, because Zn²⁺ did not change the inhibitory properties of DMSA or DMPS. The inhibitory effect of DMSA and DMPS on lung δ -ALA-D can be explained by the formation of mixed disulfides between the enzyme and the chelators. Indirect evidences for this mechanism were obtained using DTT as a reducing agent. In fact, DTT acts either by reacting with chelators

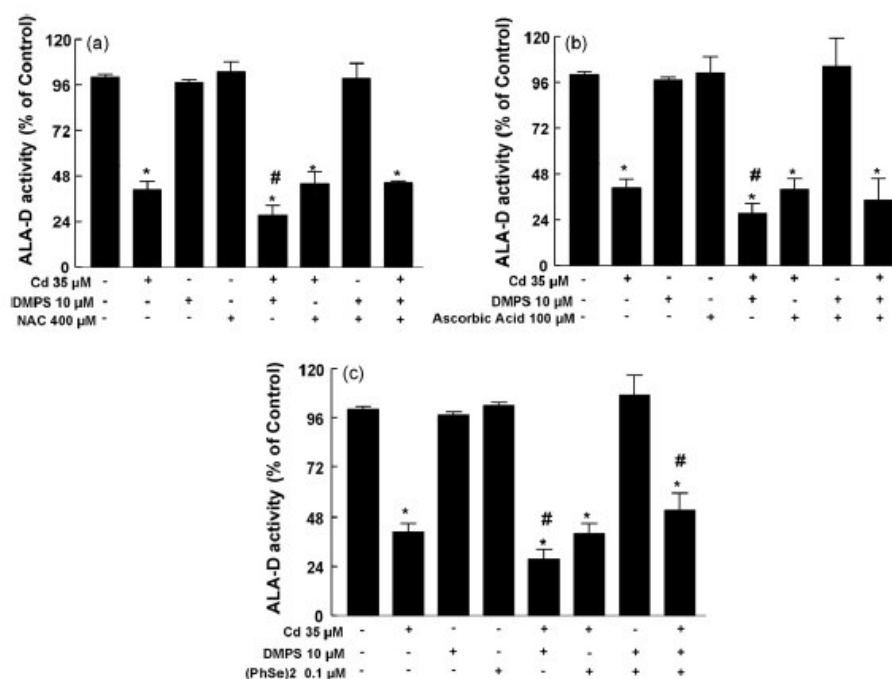


Fig. 8. Effects of DMPS plus NAC (a), DMPS plus ascorbic acid (b) and DMPS plus (PhSe)₂ (c) on rat lung δ -ALA-D inhibition induced by cadmium. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.D. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 12.18 \pm 1.66 (mean \pm S.D.) nmol of porphobilinogen/mg protein/h. *: Denoted $p < 0.05$ as compared to control (three-way ANOVA/Duncan). #: Denoted $p < 0.05$ as compared to 35 μ M Cd²⁺ (three-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

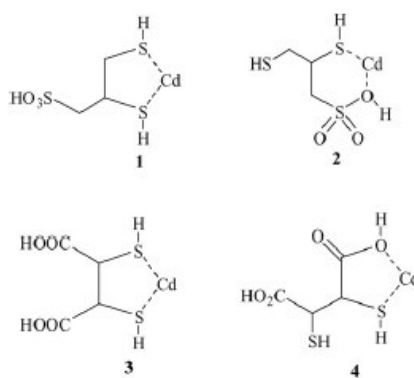
or by reducing the mixed disulfides of the enzyme and chelators.

Our present results indicate that chelating agents (DMPS and DMSA) were not effective to restore δ -ALA-D inhibition caused by cadmium. Moreover, these compounds caused a marked potentiation of δ -ALA-D inhibition induced by cadmium. Accordingly, our group reported that DMPS and DMSA potentiated hepatic δ -ALA-D inhibition induced by mercury, cadmium and lead *in vitro* [23,34] and *ex vivo* [23]. Therefore the oxidation of critical thiols of enzyme could explain the inhibition of δ -ALA-D by the complexes of metals with DMPS or DMSA.

In agreement, previous studies have demonstrated that mercury/thiol complexes possess pro-oxidant activity higher than the isolated components [46].

Since DTT was effective of restoring δ -ALA-D inhibition caused by Cd/DMSA complex but was not effective with Cd/DMPS, we believed that: (i) DMPS could offer at least two chelation possibilities: (a) a five membered ring, Cd complex through two sulfur atoms

donator (Scheme 1, structure 1), (b) a six membered ring, Cd complex with one sulfur and one oxygen biting from sulfonic group (Scheme 1, structure 2); (ii) DMSA could offer only two chelation possibilities: (a) Cd complex with two sulfur atoms donator (Scheme 1, structure 3),



Scheme 1.

(b) Cd complex with one sulfur and one oxygen biting from carboxylic acid group (Scheme 1, structure 4).

Based on these hypotheses we can suggest that DTT is capable of restoring the enzyme inhibition caused by some Cd/chelator (Cd/DMSA) complexes but not by others (Cd/DMPS). Thus, Cd/DMPS complex seems to be more stable than Cd/DMSA.

Similarly to chelating agents, the antioxidant compounds evaluated (ascorbic acid, NAC and (PhSe)₂) were not effective in ameliorating the inhibition of δ -ALA-D activity caused by cadmium, whereas ascorbic acid potentiated the enzyme inhibition induced by metal.

Another interesting observation in the present study was Cd²⁺ × DMPS × (PhSe)₂ and Cd²⁺ × DMPS × NAC interactions, whereas there was not a metal × chelator × antioxidant interaction when DMSA was employed as a chelating agent.

Because *in vitro* observations on chelator/antioxidant–metal interactions provide only a rough guide to the treatment of heavy-metal poisoning, *ex vivo* studies are necessary to determine the clinical efficacy and adverse effects of chelating and antioxidant agents and their interaction with cadmium in lung.

Acknowledgements

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. JBTR, CWN, GZ and FWS are the recipients of CNPq fellowships.

References

- [1] R.A. Goyer, Toxic effects of metals, in: C.D. Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 691–736.
- [2] A.L. Page, M.M. Al-Amamy, A.C. Chang, in: E.C. Foulkes (Ed.), Cadmium: Cadmium in The Environment and Its Entry Into Terrestrial Food Chain Crops, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1986, pp. 33–74.
- [3] W.H.O. Cadmium, Environmental Health Criteria, International Progress in Chemical Safety, WHO, Geneva, 1992, p. 134.
- [4] M.M. Jones, M.G. Cherian, The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication, *Toxicology* 6 (1990) 1–25.
- [5] P.L. Goering, M.P. Waalkes, C.D. Klaassen, Toxicology of cadmium, in: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds.), Toxicology of Metals: Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 115, Springer-Verlag, New York, 1995, pp. 189–213.
- [6] ATSDR. Toxicological profiles: Cadmium, in: J. Taylor, R. DeWoskin, F.K. Ennever (Compilers), Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology, Atlanta, GA, 1999.
- [7] G.P. Lewis, L. Coughlin, W. Jusko, S. Hartz, Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man, *Lancet* 1 (1972) 291–292.
- [8] K. Amanuma, K.T. Suzuki, Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride on phospholipids in alveolar wash fluid, *Toxicology* 44 (1987) 321–328.
- [9] S. Lynn, G.L. Yu, K.Y. Jan, Vicinal-thiol-containing molecules enhance but mono-thiol-containing molecules reduce nickel-induced DNA strand breaks, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160 (1999) 198–205.
- [10] O. Andersen, Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication, *Chem. Rev.* 99 (1989) 2683–2710.
- [11] H.V. Aposhian, R.M. Maiorino, D. Gonzales-Ramirez, M. Zuniga-Charles, Z.F. Xu, K.M. Hurlbut, P. Junco-Munoz, R.C. Dart, M.M. Aposhian, Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents, *Toxicology* 97 (1995) 23–38.
- [12] F.M. El-Demerdash, M.I. Yousef, F.S. Kedwany, H.H. Baghdadi, Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood haematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 1563–1571.
- [13] S.K. Tandon, S. Singh, S. Prasad, K. Khandekar, V.K. Dwivedi, M. Chatterjee, N. Mathur, Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat, *Toxicol. Lett.* 145 (2003) 211–217.
- [14] F.W. Santos, T. Oro, G. Zeni, J.B.T. Rocha, P.C. Nascimento, C.W. Nogueira, Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice, *Toxicol. Lett.* 152 (2004) 255–263.
- [15] F.W. Santos, G. Zeni, J.B.T. Rocha, P.C. Nascimento, M.S. Marques, C.W. Nogueira, Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 1723–1730.
- [16] E.K. Jaffe, The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes, *Acta Crystallogr. D* 56 (2000) 115–128.
- [17] K.D. Gibson, A. Neuberger, J.J. Scott, The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase, *Biochem. J.* 61 (1955) 618–628.
- [18] G.F. Barnard, R. Itoh, L.H. Hohberger, D. Shernin, Mechanism of porphobilinogen synthase: possible role of essential thiol groups, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8965–8974.
- [19] J.B.T. Rocha, A.J. Freitas, M.B. Marques, M.E. Pereira, T. Emanuelli, D.O. Souza, Effect of methylmercury exposure during the second stage of rapid of postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26 (1993) 1077–1083.
- [20] J.B.T. Rocha, M.E. Pereira, T. Emanuelli, R.S. Christofari, D.O. Souza, Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats, *Toxicology* 100 (1995) 27–37.
- [21] A.L.S. Rodrigues, M.L. Bellinaso, T. Dick, Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* Pises, Pimelodidae, Comp. Biochem. Physiol. 94B (1989) 65–69.
- [22] A.L.S. Rodrigues, J.B.T. Rocha, M.E. Pereira, D.O. Souza, Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate, *Environ. Contam. Toxicol.* 57 (1996) 47–53.
- [23] F.W. Santos, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, 2,3-Dimercapto-propanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid increase lead-induced inhibition of

- δ -aminolevulinatase dehydratase in vitro and ex vivo, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 317–323.
- [24] F.W. Santos, G. Zeni, J.B.T. Rocha, S.N. Weis, J.M. Fachinetto, A.M. Favero, C.W. Nogueira, Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues, *Chem. Biol. Interact.* 151 (2005) 159–165.
- [25] T. Emanuelli, J.B.T. Rocha, M.E. Pereira, L.O. Porciuncula, V.M. Morsch, A.F. Martins, D.O. Souza, Effect of mercuric and dimer-caprol treatment on aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice, *Pharmacol. Toxicol.* 79 (1996) 138–143.
- [26] N.B.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, G. Zeni, T. Emanuelli, M.C. Beque, A.L. Braga, Effect of organic selenium on δ -aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149 (1998) 243–253.
- [27] S.J.S. Flora, R. Dubey, G.M. Kannan, R.S. Chauhan, B.P. Pant, D.K. Jaiswal, Meso 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monoisoamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats, *Toxicol. Lett.* 132 (2002) 9–17.
- [28] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119–125.
- [29] V.L.P. Vieira, J.B.T. Rocha, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, S.R. Rodrigues, S.M. Tuerlineks, D. Bohrer, P.C. Nascimento, Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood, *Toxicol. Lett.* 117 (2000) 45–52.
- [30] M. Farina, V. Folmer, L.H. Andrade, G. Zeni, R.C. Bolzan, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase, *Toxicol. Lett.* 119 (2001) 27–37.
- [31] M. Farina, N.B.V. Barbosa, C.W. Nogueira, V. Folmer, G. Zeni, L.H. Andrade, R.C. Bolzan, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of δ -aminolevulinatase dehydratase from rat liver and cucumber leaves, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 623–631.
- [32] R.C. Bolzan, V. Folmer, M. Farina, G. Zeni, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, T. Emanuelli, δ -aminolevulinatase dehydratase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide, *Pharmacol. Toxicol.* 90 (2002) 214–219.
- [33] C.W. Nogueira, F.A. Soares, P.C. Nascimento, D. Muller, J.B.T. Rocha, 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinatase dehydratase, *Toxicology* 184 (2003) 85–95.
- [34] C.W. Nogueira, V.C. Borges, G. Zeni, J.B.T. Rocha, Organochalogen effects on aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro, *Toxicology* 191 (2003) 169–178.
- [35] V. Folmer, J.C.M. Soares, J.B.T. Rocha, Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet, *Int. J. Biochem. Cell. B* 34 (2002) 1279–1285.
- [36] S.K. Tandon, S. Singh, S. Prasad, S. Srivastava, M.K.J. Siddiqui, Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat, *Environ. Res. Sect. A* 90 (2002) 61–66.
- [37] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups, in: C. Paulmier (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1st ed., Pergamon Press, Oxford, England, 1986, pp. 25–51.
- [38] S. Sassa, Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay, *Enzyme* 28 (1982) 133–145.
- [39] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [40] W. Watjen, M. Cox, M. Baigioli, D. Beyerseemann, Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation, *Biometals* 15 (2000) 15–25.
- [41] S. Asvadi, J.A. Hayes, Acute lung injury induced by cadmium aerosol, *Am. J. Pathol.* 90 (1977) 89–96.
- [42] E.J.H. Bechara, M.H.G. Medeiros, H.P. Monteiro, M. Hermes-Lima, B. Pereira, M. Dernasi, C.A. Acosta, D.S.P. Abdalla, J. Onuki, C.A.M. Wendel, P. Di Mascio, A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload, *Química Nova* 16 (1993) 385–392.
- [43] T. Douki, J. Onuki, M.H.G. Medeiros, E.J.H. Bechara, J. Cadet, P. Di Mascio, Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid, *FEBS Lett.* 428 (1998) 93–96.
- [44] B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139–162.
- [45] E.K. Jaffe, The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes, *Acta Cryst. D: Biol. Cryst.* 56 (2000) 115–128.
- [46] D.M. Miller, J.S. Woods, Redox activities of mercurythiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 88 (1993) 23–35.

5. DISCUSSÃO

Os metais tóxicos são os principais contaminantes do meio ambiente, sendo amplamente utilizados em diversos processos industriais (Salgado, 1996). O cádmio é um dos elementos não essenciais mais abundantes, devido a sua grande utilização na indústria (Page et al., 1986). Este metal é mais eficientemente absorvido através dos pulmões do que através do trato gastrintestinal (ATSDR, 1999). A fumaça do cigarro é uma importante fonte de exposição ao cádmio, uma vez que este metal tóxico está presente contaminando as folhas do fumo (WHO, 1992). Estimativas indicam que os fumantes absorvem 1-3 µg/dia de cádmio ao fumarem um maço de cigarro por dia (Lewis et al., 1972).

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a inibição da enzima δ-ALA-D pulmonar causada pelo cádmio. A importância destes achados está no fato de que a inibição da δ-ALA-D pode levar ao acúmulo do seu substrato, o ALA (Emanuelli et al., 2001), o qual pode auto-oxidar, dando origem às espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, são nocivas aos sistemas biológicos, uma vez que podem oxidar biomoléculas importantes, provocando injúria tecidual e morte celular (Yu, 1994). Além disso, a exposição do pulmão ao cádmio pode acarretar no desenvolvimento de uma variedade de doenças pulmonares, incluindo enfisema, fibrose intersticial, pneumonites, câncer (Amanuma e Suzuki, 1987; IARC, 1993), assim como alterações morfológicas (Fortoul et al., 2005).

Uma vez que a atividade da δ-ALA-D é altamente sensível à presença de compostos capazes de oxidar seus grupos sulfidrílicos (Rocha et al., 1995; Rodrigues et al., 1996; Nogueira et al., 2003 a, c), e também é sensível a compostos capazes de remover os íons zinco de sua estrutura (Beber et al., 1998; Emanuelli et al., 1998; Jaffe, 2000), uma maneira de se estudar o mecanismo de inibição enzimática pelo cádmio seria utilizar o DTT, como agente redutor, e o ZnCl₂.

Neste trabalho foi demonstrado que o agente redutor ditiol DTT reverteu a inibição da δ-ALA-D causada por cádmio em pulmão de rato. Ao contrário, o ZnCl₂ não foi eficiente em restaurar a atividade da enzima inibida por este metal tóxico. Sendo assim, os resultados sugerem que o cádmio inibe a δ-ALA-D de pulmão de rato por interagir com os grupos -SH da enzima, e não por remover os íons zinco, os quais são essenciais para a atividade desta. Além disso, pode-se sugerir também

que a incapacidade do $ZnCl_2$ de proteger a inibição pode ser devido à alta afinidade da enzima por cádmio, e a proteção por DTT pode ocorrer devido à direta interação do cádmio com este agente redutor prevenindo assim a interação do metal com a enzima.

As terapias com agentes quelantes sulfidrílicos são o modo mais efetivo de tratar as intoxicações por metais tóxicos, tais como cádmio, removendo estes metais do organismo (Lynn et al., 1999). Entretanto, pode-se inferir que, embora os agentes quelantes sulfidrílicos sejam efetivos em remover os metais tóxicos, eles apresentam alguns efeitos tóxicos *per se*. De fato, trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que os agentes quelantes ditiólicos, tais como o DMPS e o DMSA, apresentaram um efeito inibitório sobre a δ -ALA-D hepática de camundongos (Nogueira et al., 2003a) e sanguínea de humanos (Nogueira et al., 2004b).

Demonstrou-se neste trabalho que o DMSA e o DMPS inibem *per se* a atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato. Como considerado anteriormente, esta inibição da δ -ALA-D poderia ser prejudicial, levando a um aumento das espécies radicais livres que, conseqüentemente, provoca uma injúria tecidual e morte celular.

Entretanto, o mecanismo molecular do efeito do DMPS e DMSA na atividade da δ -ALA-D ainda não está elucidado. O $ZnCl_2$ não reverteu a inibição enzimática causada pelo DMPS, mas foi efetivo em reduzir os efeitos inibitórios do DMSA. O agente redutor DTT reverteu a inibição enzimática causada por ambos agentes quelantes ditiólicos. Desta forma, podemos sugerir que este agente redutor age tanto reagindo com os agentes quelantes quanto reduzindo as pontes dissulfeto da enzima e dos quelantes.

Sendo assim, os resultados sugerem que o DMPS inibe a atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato por interagir com os grupos $-SH$ vicinais da enzima, mas não por remover os íons zinco, os quais são essenciais para a atividade enzimática. Além disso, os resultados obtidos com o DMSA sugerem que o efeito inibitório do deste agente quelante ocorre por interagir com os grupos $-SH$ vicinais da enzima e também por remover os íons zinco da estrutura. As diferenças entre os efeitos dos quelantes observados neste estudo podem estar relacionadas com as propriedades químicas e físicas dos mesmos. Em resumo, a ação do DMSA e do DMPS na δ -ALA-D pulmonar pode ser explicada pela formação de pontes dissulfeto entre a enzima e os agentes quelantes.

Alguns autores têm demonstrado que os agentes quelantes ditiólicos, entre eles o DMPS e o DMSA, são capazes de reverter o dano tecidual causado por cádmio (Santos et al., 2004, 2005a). Ao contrário, outros estudos demonstraram que o DMSA e o DMPS potencializam a inibição da δ -ALA-D hepática induzida por mercúrio, cádmio e chumbo *in vitro* (Nogueira et al., 2003a; Santos et al., 2006) e *ex vivo* (Santos et al., 2006). Nossos resultados indicaram que os agentes quelantes utilizados (DMSA e DMPS) não foram efetivos em restaurar a inibição da δ -ALA-D causada por cádmio, e além disso, potencializaram a inibição da δ -ALA-D induzida por este metal tóxico. Desta forma, os resultados sugerem que a oxidação de tióis da enzima pode explicar a inibição da δ -ALA-D por complexos de metais com DMPS ou DMSA. Neste sentido, estudos prévios têm demonstrado que os complexos mercúrio/tiol possuem atividade pró-oxidante maior que os componentes isolados (Miller and Woods, 1993).

Uma vez que os complexos cádmio/quelantes apresentaram atividade inibitória, procurou-se estudar o mecanismo envolvido no efeito inibitório destes complexos na atividade da δ -ALA-D, utilizando DTT e $ZnCl_2$. O agente redutor DTT foi efetivo em restaurar a inibição da δ -ALA-D causada pelo complexo cádmio/DMSA mas não foi efetivo com o complexo cádmio/DMPS. O $ZnCl_2$ restaurou parcialmente os efeitos inibitórios dos complexos cádmio/quelantes.

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos sugerir que: o DMPS pode oferecer pelo menos duas possibilidades de quelação; e o DMSA pode oferecer somente duas possibilidades de quelação. Baseado nestas hipóteses nós podemos sugerir que o DTT é capaz de restaurar a inibição da enzima causada pelo complexo cádmio/DMSA, mas não pelo complexo cádmio/DMPS, já que este complexo parece ser mais estável do que o complexo cádmio/DMSA.

Diversos autores têm demonstrado que o uso de antioxidantes poderia ser uma boa alternativa no tratamento das intoxicações por cádmio (Santos et al., 2004, 2005a). Sendo assim, os compostos antioxidantes estudados (ácido ascórbico, NAC e $(PhSe)_2$) não foram efetivos em reverter a inibição da atividade da δ -ALA-D causada por cádmio, visto que o ácido ascórbico potencializou a inibição da enzima induzida pelo metal. Além disso, o ácido ascórbico e o $(PhSe)_2$ apresentaram efeito inibitório *per se* na atividade da enzima. Por outro lado, a NAC não produziu

alterações na atividade da enzima *per se*, sugerindo que este composto apresenta uma menor toxicidade quando comparado com o ácido ascórbico e $(\text{PhSe})_2$.

O DTT foi capaz de reverter tanto a inibição enzimática causada por ácido ascórbico e $(\text{PhSe})_2$ *per se*, quanto pelos complexos cádmio/ácido ascórbico e cádmio/ $(\text{PhSe})_2$. Ao contrário do DTT, o ZnCl_2 não reverteu o efeito inibitório causado por ácido ascórbico e $(\text{PhSe})_2$ *per se*, mas reverteu parcialmente o efeito inibitório causado pelos complexos cádmio/ácido ascórbico e cádmio/ $(\text{PhSe})_2$.

Sendo assim, os resultados sugerem que o ácido ascórbico, o $(\text{PhSe})_2$, e os complexos, cádmio/ácido ascórbico e cádmio/ $(\text{PhSe})_2$, inibem a atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato por interagir com os grupos $-\text{SH}$ vicinais da enzima, mas não por remover os íons zinco da estrutura enzimática. As diferenças entre os efeitos dos agentes antioxidantes observados neste estudo podem estar relacionadas com as propriedades químicas e físicas dos mesmos.

Acredita-se que a utilização de antioxidantes sozinhos ou em associação com agentes quelantes, seria uma alternativa mais eficaz para o tratamento das intoxicações por cádmio (Flora, 1999; Pande et al., 2001; Tandon et al., 2003). Neste sentido, estudos prévios de nosso grupo demonstraram que o uso de $(\text{PhSe})_2$, um agente antioxidante, em combinação com DMPS ou DMSA, agentes quelantes ditiólicos, foram eficazes em proteger contra o dano testicular induzido por cádmio (Santos et al., 2004, 2005a). Entretanto, a administração concomitante destes compostos não foi mais eficaz do que as terapias isoladas em melhorar a injúria testicular (Santos et al., 2004, 2005a). Observou-se neste trabalho uma interação entre cádmio x DMPS x $(\text{PhSe})_2$ e cádmio x DMPS x NAC, mas o efeito desta interação não foi capaz de restaurar a inibição da atividade da δ -ALA-D. Ao contrário do que foi verificado com o DMPS, com o DMSA não foram observadas interações entre cádmio x quelante x antioxidante.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir o seguinte:

⇒ O cádmio apresentou um efeito inibitório sobre a atividade da enzima δ -ALA-D de pulmão de rato *in vitro*. Investigando o possível mecanismo de inibição enzimática por este metal, sugerimos que a oxidação dos grupos –SH vicinais presentes na estrutura da δ -ALA-D estariam envolvidos, enquanto a remoção dos íons zinco não estaria envolvida.

⇒ O uso dos agentes quelantes DMPS e DMSA causaram um efeito inibitório *per se* sobre a atividade da enzima. Estudando o possível mecanismo envolvido no efeito inibitório da enzima δ -ALA-D por estes compostos quelantes, podemos sugerir que a oxidação dos grupos –SH da estrutura da enzima estariam envolvidos neste processo. Além disso, a remoção dos íons zinco poderia também estar envolvida no efeito inibitório do DMSA, mas não do DMPS.

⇒ Os complexos cádmio/quelantes apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da δ -ALA-D de pulmão de rato. Além disso, pode-se verificar através dos mecanismos estudados, que o complexo cádmio/DMPS parece ser mais estável que o complexo cádmio/DMSA.

⇒ Os compostos antioxidantes estudados (ácido ascórbico, NAC e $(\text{PhSe})_2$) não foram efetivos em reverter a inibição da atividade da δ -ALA-D causada por cádmio. Além disso, o ácido ascórbico e o $(\text{PhSe})_2$ apresentaram efeito inibitório *per se* na atividade da enzima. Investigando o possível mecanismo envolvido na inibição da atividade da enzima, sugerimos que a oxidação dos grupos –SH estaria envolvida e não a remoção dos íons zinco da estrutura da enzima.

⇒ A administração concomitante de compostos quelantes e antioxidantes não foram eficazes em restaurar a inibição da atividade da δ -ALA-D por cádmio *in vitro*.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

⇒ Realizar estudos *in vivo*, visando elucidar os efeitos tóxicos da fumaça do cigarro em pulmão de ratos lactentes, assim como testar terapias antioxidantes ou quelantes;

⇒ Realizar estudos *in vivo*, com o objetivo de estudar o efeito agudo da exposição da fumaça do cigarro em pulmão de ratos adultos, assim como testar terapias antioxidantes ou quelantes;

⇒ Realizar estudos *in vivo*, com o objetivo de investigar o efeito crônico da exposição da fumaça do cigarro em pulmão de ratos adultos, assim como testar terapias antioxidantes ou quelantes;

⇒ Realizar estudos *in vivo* com o objetivo de verificar o efeito do cádmio administrado através de inalação em pulmão de ratos, assim como testar terapias antioxidantes ou quelantes;

⇒ Realizar estudos *in vitro* com o objetivo de verificar o efeito do cádmio na atividade de outras enzimas antioxidantes do tecido pulmonar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH, J.; JACOBENSEM, D.; ANDERSEN, O.; WICKSTROM, E. Treatment of mercury and lead poisoning with dimercaptosuccinic acid and sodium dimercaptopropanosulfate. **Analyst**, 120, 853-854. 1995.

AMANUMA, K.; SUZUKI, K.T. Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride on phospholipids in alveolar wash fluid. **Toxicology**, 44, 321–328. 1987.

ANDERSEN, O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. **Chem. Rev.**, 99, 2683-2710. 1989.

APOSHIAN, H.V.; TADLOCK, C.H.; MOON; T.E. Protection of mice against lethal effects of sodium arsenite- a quantitative comparison of a number of chelating agents. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 61, 385. 1981.

APOSHIAN, H.V. DMSA and DMPS- Water soluble antidotes for heavy metal poisoning. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 23, 193-215. 1983.

APOSHIAN, H.V.; APOSHIAN, M.M. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of orally effective metal chelating agent. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 30, 279-306. 1990.

APOSHIAN, H.V.; MAIORINO, R.M.; RIVERA, M.; BRUCE, D.C.; DART, R.C.; HURLBUT, K.M.; LEVINE, D.J.; ZHENG, W.; QUINTUS, F.; CARTER, D.; APOSHIAN, M.M. Human studies with the chelating agents DMPS and DMSA. **Clin. Toxicol.**, 30, 505-528. 1992.

APOSHIAN, H.V.; MAIORINO, R.M.; GONZALEZ-RAMIREZ, D.; ZUNIGA-CHARLES, M.; XU, Z.F.; HURLBUT, K.M.; JUNCO-MUNOZ, P.; DART, R.C.; APOSHIAN, M.M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. **Toxicology**, 97, 23-38. 1995.

APOSHIAN, H.V.; APOSHIAN, M.M.; MAIORINO, R.M.; XU, Z. Sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate (DMPS) treatment does not redistribute lead or mercury to the brain of rats. **Toxicology**, 109, 49-55. 1996.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 10, 153-158. 2001.

ASVADI, S.; HAYES, J.A. Acute lung injury induced by cadmium aerosol. **Am. J. Pathol.**, 90, 89–96. 1977.

ATSDR. **Toxicological profiles: Cadmium**. Compiled by J. Taylor, R. DeWoskin, F.K. Ennever, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology, Atlanta, GA, 1999.

BANNER, W.J.R.; KOCH, M.; CAPIN, D.M.; HOPF, S.B.; CHANG, S.; TONG, T.G. Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 83, 142-147. 1986.

BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. Effect of organic selenium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 149, 243-253. 1998.

BARNARD, G. F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L. H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974. 1977.

BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolevulinic acid hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. **Biochim. Biophys. Acta**, 139, 479-486. 1967.

BEBER, F.A.; WOLLMEISTER, J.; BRIGO, M.J.K.; SILVA, M.C.J.; PEREIRA, C.N.; ROCHA, J.B.T. δ -Aminolevulinic acid dehydratase inhibition by ascorbic acid is mediated by an oxidation system existing in the hepatic supernatant. **Int. J. Vit. Nutr. Res.**, 68, 181-188. 1998.

BECHARA, E.J.H.; MEDEIROS, M.H.G.; MONTEIRO, H.P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C.A.; ABDALL, D.S.P.; ONUKI, J.; WENDEL, C.M.A.; MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. Nova**, 16, 385-392. 1993.

BECKER, D.M.; VILJOEN, J.D.; KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolevulinic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, 255, 26-34. 1971.

- BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochim. Biophys. Res. Co.**, v. 173, p. 1143-1149. 1990.
- BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, 255, n. 5, 2030-2035. 1980.
- BOESE, Q.F.; SPANO, A.J.; LI, J.; TIMKO, M.P. δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. **J. Biol. Chem.**, 266, 17060-17066. 1991.
- BORGES, L P, NOGUEIRA, C W, PANATIERI, R B, ROCHA J B T, ZENI, G. Acute liver damage duced by 2-nitropropane rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact.**, 160, 99-107. 2006.
- BORGSTRÖM, L.; KAGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinects of N-acetylcysteine in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 31, 217-222. 1986.
- BRAGA, A.L.; SILVEIRA, C.C.; ZENI, G.; SEVERO, W.A.; STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, pp. 206-207. 1996.
- BRAGA, A.L.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H.; SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reativity of α -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett**, v. 5, pp. 595-596. 1997.
- BRANDÃO, R.; SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. DMPS and N-acetilcisteína induced renal toxicity in mice exposed to mercury. **Biometals**, 19 (4), 389-398. 2006.
- BUCHET, J.P.; LAUWERYYS, R.R. Influence of 2,3 dimercaptopropane-1-sulfonate and dimercaptosuccinic acid on the mobilization of mercury from tissues of rats pretreated with mercuric chloride, phenylmercury acetate or mercury vapors. **Toxicology**, 54, 323-333. 1989.
- BUETTNER, G.R.; JURKIEWIEZ, B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. **Radiat. Res.**, 145, 532-541. 1996.

CAMPBELL, J.R.; CLARKSON, T.W.; OMAR, M.D. The therapeutic use of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in two cases of inorganic mercury poisoning. **J. Am. Med. Assoc.**, 256, 3127-3130. 1986.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 346, 171-179. 1997.

CASALINO, E.; CALZARETTI, G.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Cadmium-dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 383, 288 – 295. 2000.

CHEN, A.; NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063. 1973.

CHEN, A.; NEILANDS, J. B. The delta-aminolevulinic acid dehydratases: molecular and environmental properties. **Struct. Bond.**, Berlin, 29, 123-169. 1976.

CHERIAN, M.G.; MILES, E.F.; CLARKSON, T.W.; COX, C. Estimation of mercury burdens in rats by chelation with dimercaptopropane sulfonate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 245 (8), 479-484. 1988.

CHISOLM, J.J.JR. Evaluation of the potential role of chelation therapy in treatment of low to moderate lead exposures. **Environ. Health Perspect.**, 89, 67-74. 1990.

COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet Chem.**, v. 253, p. 131-181. 1983.

CORY-SLECHTA, D.A.; WEISS, B.; COX, C. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 243, 804-813. 1987.

CORY-SLECHTA, D.A. Mobilization and redistribution of lead over the course of DMSA chelation therapy and long term efficacy. **J.Pharmacol.Exp.Ther.**, 246, 84-91. 1988.

CUTLER, M.G.; MOORE, M.R.; EWART, F.G. Effects of δ -aminolevulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. **Psychopharmacology**, 61, 131-135. 1979.

DE FLORA, S.; ROSSI, G.A.; De FLORA, A. Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine. **Respiration**, 50, 43-49. 1986a.

DE FLORA, S.; ASTENGO, M.; SERRA, D.; BENNICELLI, C. Inhibition of urethan-induced lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine. **Cancer Lett.**, 32, 235-241. 1986b.

DE LA TORRE, A.; BELLES, M.; LLOBET, J.M.; MAYAYO, E.; DOMINGO, J.L. Comparation of the effectiveness of 2,3-dimercaptopropanol and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) as protective agents against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, 63 (1), 1-10. 1998.

DENT, A.J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, 29, 7822-7828. 1990.

DHAWAN, M.; KACHRU, D.N.; TANDON, S.K. Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. **Arch. Toxicol.**, 62, 301-304. 1988.

DOMINGO, J.L. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. **Rep. Toxicol.**, 9, 105-113. 1995.

DOMINGO, J.L. Developmental toxicity of metal chelating agents. **Rep. Toxicol.**, 12 (5), 499-510. 1998.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; KEDWANY, F.S.; BAGHDADI, H.H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood haematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. **Food Chem. Toxicol.**, 42, 1563-1571. 2004.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; PORCIUNCULA, L.O.; MORSCH, V.M.; MARTINS, AF.; SOUZA, D.O. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, 79, 138-143. 1996.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; NASCIMENTO, P.C.; BEBER, F.A.; SOUZA, D.O.G. Delta-aminolevulinatase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in

maintaining cysteineyl residues in a reduced state. **Pharmacol. Toxicol.**, 83, 95-103. 1998.

EMANUELLI, T.; PAGEL, F.W.; ALVES, L.B.; REGNER, A.; SOUZA, D.O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.**, 38, 213-218. 2001.

ENDO, T.; SAKATA, M. Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. **Pharmacol. Toxicol.**, 76, 190-195. 1995.

FARINA, M., FOLMER, V.; BOLZAN, R.; ANDRADE, L.H.; ZENI, G. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.**, 119, 27-37. 2001.

FARRIS, M.W. Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of α -tocopheryl succinate in hepatocytes. **Toxicology**, 69, 63-77. 1991.

FINELLI, V.N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. Delta-aminolevulinic acid dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 60, 1418-1424. 1974.

FLORA, S.J.S.; KUMAR, P. Biochemical and immunotoxicological evaluation of metal chelating drugs in rats. **Drug Invest.**, 5, 269-273. 1993.

FLORA, S.J.S.; MATHUR, S.; MATHUR, R. Effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or 2,3-dimercaptopropane 1-sulfonate on beryllium-induced biochemical alterations and metal concentration in male rats. **Toxicology**, 95, 167-175. 1995.

FLORA, S.J.S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 26, 865-869. 1999.

FORTOUL, T.I.; SALDIVAR, L.O.; ESPEJEL-MAYA, G.; BAZARRO, P.N.; MUSSALI-GALANTE, P.; AVILA-CASADO, M.C.; COLIN-BARENQUE, L.; AVILA-COSTA, M.R. Inhalation of cadmium, lead or its mixture. Effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 329-334. 2005.

FOWLER, B.A. Other toxic effects. In: Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellstrom, T., Nordberg, G.F. (eds). **Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal**. C.R.C. Press, Boca Raton F.L., 1991. pp. 159-204

FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54, 113S-118S. 1991.

FRIBERG, L.; PISCATOR, M.; NORDBERG, G. **Cadmium in the environment**, second ed. CRC Press, Cleveland, OH. 1974.

FRUMKIM, H.; MANNING, C.C.; WILLIAMS, P.L.; SANDERS, A.; TAYLOR, B.B.; PIERCE, M.; ELON, L.; HERTZBERG, V.S. Diagnostic chelation challenge with DMSA: a biomarker of long-term mercury exposure? **Environ. Health Perspect.**, 109, 167-171. 2001.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, 61, 618-628. 1955.

GILMAN, A.; PHILIPS, F.S.; ALLEN, R.P.; KOELLE, E.S. The treatment of acute cadmium intoxication in rabbits with 2,3-dimercaptopropanol (BAL) and other mercaptans. **Chem. Warfare Serv.**, 87, 85-101. 1946.

GOERING, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, 14, 45-60. 1993.

GOERING, P.L.; WAALKES, M.P.; KLAASSEN, C.D. **Toxicology of cadmium**. In: Toxicology of Metals: Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag, New York, 1995. vol. 115 (R.A. Goyer and M.G. Cherian, Eds.), pp. 189-213.

GONG, Z.; EVANS, H.L. Effect of chelation with meso-dimercaptosuccinic acid (DMSA) before and after the appearance of lead-induced neurotoxicity in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 144, 205-214. 1997.

GOYER, R.A.; CHERION, M.G. Ascorbic acid and EDTA treatment of lead toxicity in rats. **Life Sci.**, 24, 433-438. 1979.

GOYER, R.A.; CHERION, M.G.; JONES, M.M.; REIGART, J.R. Role of chelating agents for prevention, intervention and treatment of exposures to toxic metals. **Environ. Health Perspect.**, 103, 1048-1052. 1995.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (ed) Casarett and Doull's. **Toxicology: the basic science of poisons**. McGraw-Hill, New York, 1996. pp. 691-736.

GRAZIANO, J.H.; LOLACONO, N.J.; MEYER, P. Dose-response study of oral 2,3-dimercaptosuccinic acid in children with elevated blood lead concentrations. **J. Pediatr.**, 113, 751-757. 1988.

GRAZIANO, J.H.; LOLACONO, N.J.; MOULTON, T.; MITCHELL, M.E.; SLAVKOVICH, V., ZARATE, C. Controlled study of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid for the management of childhood lead intoxication. **J. Pediatr.**, 120, 133-139. 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, ageing and disease. **Free Radic. in Biol. Med.** Oxford: Clarendon Press, 1989. pp. 1-543.

HIRANO, S.; TSUKAMOTO, N.; KOBAYOSHII, F.; SUZUKI, K.T. Toxicity of cadmium oxide instilled into the rat lung I. Metabolism of cadmium oxide in the lung and its effects on essential elements. **Toxicology**, 55, 15-24. 1989.

HIRANO, S.; TSUKAMOTO, N.; SUZUKI, K.T. Biochemical changes in the rat lung and liver following intratracheal instillation of cadmium oxide. **Toxicol. Lett.**, 50, 97-105. 1990.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 237-271. 1985.

HOOVER, T.D.; APOSHIAN, H.V. BAL increases the arsenic-74 content of rabbit brain. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 70, 160-162. 1983.

HRUBY, K.; DONNER, A. 2,3-Dimercapto-1-propanesulphonate in heavy metal poisoning. **Med. Toxicol.**, 2, 317-323. 1987.

IARC. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: **IARC Monogram Evaluating the Carcinogenic Risk to the Human**, Lyon, France. Vol. 58, pp. 119-237, 1993.

JAFFE, E. K.; VOLIN, M.; MYERS, C. B. 5-Chloro [1,4-¹³C] levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggests an active site containing two Zn(II). **Biochemistry**, 33, 11554-11562. 1994.

JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. **Acta Crystallogr. D.**, 56, 115-128. 2000.

JONES, M.M.; CHERIAN, M.G. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. **Toxicology**, 6, 1-25. 1990.

JORDAN, P. M.; GORE, M. G.; CHAUDHRY, A. G. Subunit modification of 5-aminolevulinatase dehydratase involving cysteine residues. **Biochem. Soc. Trans.**, 4, 762-763. 1976.

KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Eds. Wonsiewicz, M.J. & McCurdy, P. New York: McGraw-Hill, 1996. pp.1649-1671.

KELLEY, C.; SARGENT, D.E.; UNO, J.K., Cadmium therapeutic agents. **Curr. Pharm. Des.**, 5, 229-240. 1999.

KOIZUMI, T.; LI, Z.G. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. **J. Toxicol. Environ. Health**, 37, 25-36. 1992.

KOSTYGOU, N.M. **Pharmakol.Toksikol.**, 21, 64. 1958.

LEWIS, G.P.; COUGHLIN, L.; JUSKO, W; HARTZ, S. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. **Lancet**, 1, 291-292. 1972.

LUCHESE, C.; STANGHERLIN, E.C.; ARDAIS, A.P.; NOGUEIRA, C.W.; SANTOS, F.W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, 230, 189-186. 2007.

LYNN S.; YU, G.L.; JAN, K.Y. Vicinal-thiol-containing molecules enhance but mono-thiol-containing molecules reduce nickel-induced DNA strand breaks. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 160, 198-205. 1999.

MACIEL, E.N.; BOLZAN, R.C.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially effect δ -aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Toxicol.**, 14, 310-319. 2000.

MILLER, D.M.; WOODS, J.S. Redox activities of mercurythiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity, **Chem. Biol. Interac.**, 88, 23-35. 1993.

MANCA, D.; RICARD, A.C., TROTTIER, B., CHEVALIER, G. In vitro and in vivo responses of rat tissues to cadmium induced lipid peroxidation. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 46, 929-936. 1991.

MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I.A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. **Respiration**, 50, 31-42. 1986.

MORSELT, A.F. A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. **Toxicology**, 70, 1-132. 1991.

MUCKTER, H.; LIEBL, B.; REICHL, F.X.; HUNDER, G.; WALTHER, U.; FICHTL, B. Are we ready to replace dimercaprol (BAL) as an arsenic antidote? **Hum. Exp. Toxicol.**, 16(8), 460-465. 1997.

MUSKETT, C.J.; ROBERTS, L.H.; PAGE, B.J. Cadmium and lead pollution from secondary metal refinery operations. **Sci. Total Environ.**, 11, 73-87. 1979.

NADIG, J.; KNUTTI, R.; HANY, A. DMPS treatment in acute sublimate (mercury chloride) poisoning. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, 115, 507-511. 1985.

NATH, R.; PRASAD, R.; PALINAL, V.K.; CHOPRA, R.K. Molecular basis of cadmium toxicity. **Prog. Food Nutr. Sci.**, 8, 109-163. 1984.

NAVARRO-ALARCÓN, M. and LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.**, v. 249, p. 347-371. 2000.

NOGUEIRA, C.W.; SOARES, F.A.; NASCIMENTO, P.C.; MULLER, D.; ROCHA, J.B.T. 2,3-dimercaptopropionate-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium- induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology**, 184, 85-95. 2003a.

NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.**, v. 52, p. 56-63. 2003b.

NOGUEIRA, C.W.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells *in vitro*. **Toxicology**, 191, 169-178. 2003c.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255–6286. 2004a.

NOGUEIRA, C.W.; SANTOS, F.W.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T. 2,3-dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropionate-1-sulfonic acid and *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid inhibit δ -aminolevulinatase from human erythrocytes *in vitro*. **Environ. Res.**, 94, 254-261. 2004b.

PAGE, A.L.; AL-AMAMY, M.M.; CHANG, A.C. In: Foulkes E.C. (Ed.), **Cadmium: cadmium in the environment and its entry into terrestrial food chain crops**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1986, pp 33-74.

PAL, R., NATH, R., GILL, D.K. Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase) in various regions of adult rat brain. **Neurochem. Int.**, 23, 451-458. 1993.

PANDE, M.; MEHTA, A.; PANT, B.P.; FLORA, S.J.S. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 9, 173-184. 2001.

PATRA, R.C.; SWARUP, D.; DWIVEDI, S.K. Antioxidant effects of α -tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. **Toxicology**, 162, 81-88. 2001.

PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates. In: **Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon. 1986.

PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E.; BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, 72, 226-230. 1992.

PETRAGNANI, N.; RODRIGUES, R.; COMASSETO, J.V. **Organomet. Chem.**, p. 114-281. 1976.

PINGREE, S.D.; SIMMONDS, P.L.; WOODS, J.S. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on tissue and urine mercury levels following prolonged methylmercury exposure in rats. **Toxicol. Sci.**, 61, 224-233. 2001.

PISCATOR, M. Health hazards from inhalation of metal fumes. **Environ. Res.**, 11, 268-270. 1976.

REPINE, J.E.; BAST, B.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, 156, 341-357. 1997.

RITTER, C.; ANDRADES, M.E.; REINKE, A.; MENNA-BARRETO, S.; MOREIRA, J.C.F.; DAL-PIZZOL, F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit. Care Med.** 32, 342-349. 2004.

ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 26, 1077-1083. 1993.

ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, 100, 27-37. 1995.

RODRIGUES, A. L.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* Pisces, Pimelodidae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 94B, 65-69. 1989.

RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; SOUZA, D.O. Delta Aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Environ. Contam. Tox.**, 57, 47-53. 1996.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais. *In*: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Ed. Atheneu, São Paulo, 1996.

SANTOS, F.W.; ORO, T.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NASCIMENTO, P.C.; NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.**, 152, 255-263. 2004.

SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NASCIMENTO, P.C.; MARQUES, M.S.; NOGUEIRA, C.W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, 43, 1723–1730. 2005a.

SANTOS, F.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; WEIS, S.N. FACHINETTO, J.M.; FAVERO, A.M.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem. Biol. Interact.**, 151, 159-165. 2005b.

SANTOS, F.W.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid increase lead-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase in vitro and ex vivo, **Toxicol. In Vitro**, 20, 317-323. 2006.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda, V. Paces and V. Kostka (Eds.), Highlights of Modern Biochemistry, VSP, Utrecht, 1, 329-338. 1989.

SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 21, 86–92, 2006.

SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A.A.W.; ECKERSKORN, C. Characterization of plant 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, 45C, 77-84. 1991.

SHAIKH, Z.A.; ZAMAN, K., TANG, W.; VU, T. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by N-acetylcysteine. **Toxicol. Lett.**, 104, 137-142. 1999.

SHEMIN, D. 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 273B, 109-115. 1976.

SHIBATA, H.; OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, 18, 421-429. 1977.

SCHWARTZ, K.; FOLTSZ, P. J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 200-214. 1957.

SMITH, C.J.; LIVINGSTON, A.D.; DOOLITTLE, D.J. An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream tobacco smoke. **Food Chem. Toxicol.**, 35, 1107–1130. 1997.

SOARES, J.C.M.; FOLMER, V.; ROCHA, J.B.T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, 19, 627-632. 2003.

SOMMER, R.; BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, 20, 131-145. 1984.

SPENCER, P.; JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 300, 373-381. 1994.

SPENCER, P.; JORDAN, P. M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 305, 151-158. 1995.

STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 93-110. 1980.

TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASSA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant Cell Physiol.**, 20 (2), 435-444. 1979.

TANDON, S.K.; SINGH, S.; PRASAD, S.; KHANDEKAR, K.; DWIVEDI, V.K.; CHATTERJEE, M.; MATHUR, N. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. **Toxicol. Lett.**, 145, 211-217. 2003.

TEPPERMAN, H.M. The effect of BAL and BAL-glucoside therapy on the excretion and tissue distribution of injected cadmium. **J. Pharmacol.**, 89, 343. 1947.

TIMBRELL, J. A. **Principles of biochemical toxicology**. Second edition. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.

TOET, A.E.; DIJK, A.; SAVELKOUL, T.J.F.; MEULENBELT, J. Mercury kinetics in a case of severe mercuric chloride poisoning treated with dimercapto-1-propane sulphonate (DMPS). **Hum. Exp. Toxicol.**, 13, 11-16. 1994.

TROTTIER, B.; ATHOT, J.; RICARD, A.C.; LAFOND, J. Maternal-fetal distribution of cadmium in the guinea pig following a low dose inhalation exposure. **Toxicol. Lett.**, 129, 189-197. 2002.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta**, 12, 167-78. 1979.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, p. 1393-1396. 1990.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Succimer approved for severe lead poisoning. **FDA Med. Bull.**, 21, 5. 1991.

WANG, S.C.; TING, K.S., WU, C.C. **Clin. Med. J.**, 84, 437. 1965.

WHO. Environmental Health Criteria, Cadmium. 1st ed. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, vol. 134. 1992.

WINGLER, K.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors**, v. 10, p. 245-249. 1999.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, 74,139-162. 1994.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug with an interesting past and a fascinating future. **Respiration**, 50, 26-30. 1986.