

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

**EFEITOS DO CHUMBO SOBRE A ATIVIDADE DA
TIOREDOXINA REDUTASE CITOSÓLICA (TrxR1) E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RINS
DE RATOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Greicy Michelle Marafiga Conterato

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**EFEITOS DO CHUMBO SOBRE A ATIVIDADE DA
TIOREDOXINA REDUTASE CITOSÓLICA (TrxR1) E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RINS DE
RATOS.**

por

Greicy Michelle Marafiga Conterato

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 obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Orientador: Profa. Dra. Tatiana Emanuelli

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**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

**EFEITOS DO CHUMBO SOBRE A ATIVIDADE DA
TIOREDOXINA REDUTASE CITOSÓLICA (TrxR1) E PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RINS DE RATOS.**

elaborada por
Greicy Michelle Marafiga Conterato

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Tatiana Emanuelli, Dra.
(Presidente/Orientador)

Andrea Pereira Regner, Dra. (ULBRA)

Solange Cristina Garcia Pomblum, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 31 de janeiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelos meus objetivos já alcançados e por estar sempre iluminando o meu caminho.

À minha família pelo apoio, e em especial aos meus pais, Cláudio e Catarina, pelo carinho, dedicação, tempo, confiança e incentivo depositados em mim desde o princípio. Agradeço também por todo sacrifício despendido na minha educação moral e intelectual e que foram fundamentais na construção do meu conhecimento e na minha formação.

Ao meu namorado Gaspar, por seu amor, apoio, incentivo e compreensão nas horas em que eu mais precisei.

À minha orientadora Prof^a Tatiana Emanuelli pela oportunidade, pelo esforço dedicado, pela confiança, pela paciência, pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos. A você, minha gratidão e admiração pela pessoa que é e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À minha grande amiga Paula, que está presente na minha vida desde a graduação. Agradeço por sua amizade verdadeira e pela ajuda imprescindível e incansável em todos os momentos e que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Às meninas que contribuíram na execução da parte prática deste trabalho, tanto aquelas que participaram desde o começo, como aquelas que chegaram

depois: Sabrina, Lúdia, Rocheli, Juliana e Patrícia. Obrigada pela amizade e pela ajuda nas horas intermináveis de trabalho no laboratório.

Aos funcionários do Biotério central pelo fornecimento dos animais e demais auxílios prestados.

Aos amigos do NIDAL, inclusive aqueles que já seguiram os seus caminhos, pelo carinho, amizade, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração durante o nosso período de convívio.

Aos professores Andréa Pereira Regner, Solange Cristina Garcia Pomblum e Carlos Fernando de Mello por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação. Agradeço também a Prof^a Solange pelos conhecimentos a mim passados sobre eletroforese, pois mesmo que não tenha sido possível utilizá-los na realização deste estudo, servirão para trabalhos futuros.

À Angélica, secretária do curso, sempre muito atenciosa e prestativa na realização do seu trabalho.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de realizar este curso.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Efeitos do chumbo sobre a atividade da tioredoxina redutase citosólica (TrxR1) e parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratos.

Autora: Greicy Michelle Marafiga Conterato

Orientadora: Tatiana Emanuelli

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de janeiro de 2007

O chumbo é um metal pesado que acumula-se preferencialmente nos rins, onde exerce seus efeitos nefrotóxicos. Muitos estudos sugerem que o estresse oxidativo seja um importante mecanismo molecular para os efeitos tóxicos do chumbo no rim e em outros órgãos. A tioredoxina redutase citosólica (TrxR1) é uma selenoflavoproteína envolvida em muitos processos reguladores dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica ao acetato de chumbo sobre a atividade da TrxR1 renal e sobre outros parâmetros de estresse oxidativo (atividade da δ -aminolevulinato desidratase, glutationa S-transferase, grupos tiólicos não-protéicos, peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes nos rins), bem como sobre os indicadores plasmáticos da função renal (creatinina, ácido úrico e fosfato) em ratos. Na exposição aguda, os ratos receberam uma única injeção intraperitoneal de 25 ou 50 mg/kg de acetato de chumbo e foram mortos 6, 24 ou 48 horas mais tarde. Na exposição crônica, os ratos receberam uma injeção intraperitoneal diária de acetato de chumbo (5 ou 25 mg/kg) durante 30 dias e foram mortos no 31º dia. Em nosso estudo, a exposição aguda a 25 mg/kg de acetato de chumbo aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da TrxR1 (após 6, 24 e 48 h), enquanto que a exposição a 50 mg/kg de acetato de chumbo aumentou a atividade da catalase (CAT) (após 48 h) e inibiu a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (após 6, 24, 48 h) nos rins ($p < 0,05$). A exposição crônica a 5 mg/kg de acetato de chumbo inibiu a δ -ALA-D e aumentou a glutationa S-transferase (GST), níveis de grupos tiólicos não-protéicos (SHNP), CAT, TrxR1 e níveis plasmáticos de ácido úrico ($p < 0,05$), enquanto que a exposição a 25 mg/kg de acetato de chumbo reduziu o peso corporal e a δ -ALA-D, mas aumentou a GST, SHNP e os níveis plasmáticos de ácido de ácido úrico ($p < 0,05$). Não houve alterações nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), na atividade da glutationa peroxidase (GPx) e nos níveis plasmáticos de creatinina e fosfato inorgânico tanto após a exposição aguda como após a exposição crônica. Conclui-se que a exposição ao chumbo causou um aumento significativo na atividade da TrxR1 renal de ratos e esta alteração pode ser um indicador primário da exposição aguda a baixas doses de chumbo. Entretanto, será necessária a realização de mais estudos para elucidar o significado biológico desta indução, bem como o mecanismo envolvido em tal efeito.

Palavras-chave: tioredoxina redutase-1; δ -aminolevulinato desidratase; superóxido dismutase; glutationa peroxidase; catalase

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Effects of lead acetate exposure on renal cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1) activity and on indicators of lead exposure.

Author: Greicy Michelle Marafiga Conterato

Adviser: Tatiana Emanuelli

Date and Place of the Defense: Santa Maria, January 31, 2007

Lead is a heavy metal that accumulates primarily in kidney, where exerts its nephrotoxic effects. Several studies suggest that the oxidative stress is an important molecular mechanism for the toxic effects of lead in kidney and in other organs. Cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1) is a selenoflavoprotein involved in many processes modulating intracellular reactive oxygen species levels. The aims of this study were to evaluate the effects of acute and chronic exposure to lead acetate on renal TrxR1 activity and on other oxidative stress parameters (δ -aminolevulinic acid dehydratase activity, glutathione S-transferase, non-protein thiol groups, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in kidneys), as well as on plasmatic indicators of renal function (creatinine, uric acid and phosphate) in rats. In acute exposure, rats received a single intraperitoneal injection of 25 or 50 mg/kg lead acetate and were killed 6, 24 or 48 h later. In chronic exposure, rats received a daily intraperitoneal injection of lead acetate (5 or 25 mg/kg) during 30 days and were killed at 31st day. In our study, acute exposure to 25 mg/kg lead acetate increased superoxide dismutase (SOD) and TrxR-1 activity (after 6, 24, and 48 h), while exposure to 50 mg/kg lead acetate increased catalase (CAT) activity (after 48h) and inhibited δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity (after 6, 24, and 48 hs) in kidneys ($P < 0.05$). Chronic exposure to 5 mg/kg lead acetate inhibited δ -ALA-D and increased glutathione S-transferase (GST), non protein sulfhydryl groups (NPSH), CAT, TrxR-1, and uric acid plasma levels, while exposure to 25 mg/kg lead acetate reduced body weight and δ -ALA-D, but increased GST, NPSH, and uric acid plasma levels ($P < 0.05$). No changes were observed in thiobarbituric acid reactive substances, glutathione peroxidase, creatinine or inorganic phosphate levels after either acute or chronic exposure. In conclusion, lead exposure caused a marked increase in the TrxR1 activity in the kidney of rats and this change may be an early indicator of acute exposure to low lead doses. However, further studies are needed to clarify the biological meaning of this induction as well as the mechanism involved in such effect.

Keywords: thioredoxin reductase-1; δ -aminolevulinic acid dehydratase; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; catalase.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).... 22
- FIGURA 2** - Esquema das reações envolvidas na remoção de EROs pelas enzimas antioxidantes (Findlay *et al.*, 2005). 23
- FIGURA 3** – Sistema da tioredoxina: a Trx reduzida pela TrxR é um redutor geral de dissulfetos de proteínas (Arnér & Holmgren, 2000). 24
- FIGURA 4** – Resumo das principais funções do sistema da tioredoxina de mamíferos (Nordberg & Arnér, 2001). 27

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comprovante da submissão do manuscrito “ Effect of lead acetate on renal cytosolic thioredoxin reductase activity and indicators of lead poisoning ” à revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.	68
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Ácido δ - aminolevulínico
 δ -ALA-D – δ -Aminolevulinato desidratase
ANOVA – Análise de variância
AP-1 – Proteína ativadora-1
ASK1– Quinase 1 reguladora do sinal da apoptose
b.w. – Peso corporal
CAT – Catalase
DL₅₀ – Dose letal 50
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FAD – Flavina adenina dinucleotídio
G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx – Glutaciona peroxidase
GSH – Glutaciona
GSSG – Glutaciona dissulfeto
GST – Glutaciona S-transferase
ip – Intraperitoneal
MDA – Malondialdeído
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NF- κ B – Fator Nuclear κ B
Nrf2 – Fator 2 relacionado ao NF-E2.
Pb – Chumbo
Prxs – Peroxirredoxinas
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

Sec – Selenocisteína

SH – Grupos sulfidrílicos

SHNP – Grupos tiólicos não-protéicos

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TrxR – Tioredoxina redutase

TrxR1 – Tioredoxina redutase citosólica

TrxR2 – Tioredoxina redutase mitocondrial

TrxR3 – Tioredoxina redutase testicular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ANEXOS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Chumbo	17
2.1.1 Aspecto e forma	17
2.1.2 Ocorrência e uso	17
2.1.3 Toxicocinética	18
2.1.4 Alterações bioquímicas	20
2.1.5 Efeitos nefrotóxicos	21
2.1.6 Estresse oxidativo e chumbo	22
2.2 Sistema da tioredoxina	24
2.2.1 Caracterização da tioredoxina redutase (TrxR) de mamíferos	25
2.2.1.1 Estrutura e sítio ativo	25
2.2.1.2 Funções fisiológicas da tioredoxina redutase citosólica	26
2.2.2 Funções fisiológicas da tioredoxina	27
2.2.3 Efeitos de metais	27
3 RESULTADOS	30

3.1 Manuscrito	31
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
7 ANEXOS.....	..68

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao manuscrito deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O chumbo (Pb) é o metal tóxico presente em maior quantidade na crosta terrestre, sendo de uso industrial bastante difundido (Paoliello & Chasin, 2001). Em decorrência de sua persistência no ambiente, a exposição ao chumbo permanece um sério problema de saúde pública em todo o mundo (Patocka & Cerny, 2003).

O chumbo afeta diversos órgãos e sistemas em humanos, sendo o sistema renal um dos principais alvos (Payton *et al.*, 1994). Este metal acumula-se seletivamente nos rins (Choie & Richt, 1980) e a exposição aguda afeta as células do túbulo proximal causando aminoacidúria, fosfatúria, glicosúria (Goyer, 1990) e diminuição da excreção de ácido úrico (Paoliello & Chasin, 2001). Também foi observada uma correlação inversa entre a depuração de creatinina e os níveis de chumbo sanguíneo em humanos (Staessen *et al.*, 1992). A exposição crônica a este metal pode causar injúria tubular renal e nefrite intersticial, podendo evoluir para uma falência renal crônica (Goyer, 1989).

Alguns dos efeitos tóxicos do chumbo são atribuídos à indução do estresse oxidativo, pois o chumbo prejudica o balanço pró-oxidante/antioxidante dos tecidos, levando ao aparecimento de disfunções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Goyer, 1996). Existem muitos alvos para a ação tóxica do chumbo no organismo. Além de sua competição com metais como o zinco e o cálcio, o chumbo possui grande afinidade por grupos sulfidrílicos e é freqüentemente encontrado nos tecidos e nas células ligado aos grupos sulfidrílicos de proteínas e de moléculas de baixo peso molecular (Campagna *et al.*, 1999). Em decorrência desta afinidade por grupos sulfidrílicos, estudos sugerem que a indução do estresse oxidativo pelo chumbo possa estar relacionada, ao menos em parte, à ação inibitória deste metal sobre a via de biossíntese do heme, o grupo prostético da hemoglobina e dos citocromos. Nesta rota, o chumbo inibe a atividade de enzimas sulfidrílicas como a δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (Rocha *et al.*, 1995), causando o acúmulo do ácido δ -aminolevulínico (ALA). O ALA acumulado pode sofrer autooxidação e induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, provocando danos oxidativos no DNA, peroxidação lipídica e depleção do sistema de defesa antioxidante celular (Gurer & Ercal, 2000). Concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona dissulfeto

(GSSG), além das atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) são os parâmetros mais comumente utilizados para a avaliação do dano oxidativo induzido pelo chumbo em estudos com animais e com humanos (Pande & Flora, 2002).

A tioredoxina redutase (TrxR) é uma selenoflavoproteína que em conjunto com a tioredoxina (Trx) e o NADPH, forma um sistema efetivo para a redução de dissulfetos de proteínas (Holmgren & Björnstedt, 1995). Esse sistema, nomeado sistema da tioredoxina, participa do controle redox de muitos processos celulares como na regulação da apoptose, da imunomodulação e da atividade de fatores de transcrição de um número importante de genes (Nordberg & Arnér, 2001). Além disso, participa como um sistema doador de elétrons na síntese do DNA, durante a reação que converte os ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos (Powis & Montfort, 2001). Atua também na defesa antioxidante e em processos reguladores dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Nordberg & Arnér, 2001).

Três isoformas da enzima tioredoxina redutase já foram isoladas em mamíferos, incluindo a citosólica (TrxR1), a mitocondrial (TrxR2) e a isolada de testículos de ratos, também mitocondrial (TGR ou TrxR3) (Nordberg & Arnér, 2001). A enzima TrxR1 é a isoforma que possui uma ampla especificidade de substratos, pois reduz não só tioredoxinas de diferentes espécies, como também outros compostos antioxidantes, incluindo o deidroascorbato, o ácido lipóico e a ubiquinona (Nordberg & Arnér, 2001).

A ampla especificidade de substratos para a enzima TrxR1 é atribuída à presença de um resíduo de selenocisteína (Sec) no seu sítio ativo, o qual também é essencial para a sua atividade (Nordberg & Arnér, 2001). Esse resíduo possui elevada afinidade por íons e complexos metálicos, o que torna a TrxR1 um alvo potencial para a inibição por drogas e metais (Jung *et al.*, 2004). Entre os principais inibidores encontram-se os chamados “agentes alquilantes” que são classicamente utilizados na terapia anticâncer como os compostos de platina (Witte *et al.*, 2005) e os compostos de ouro utilizados no tratamento da artrite reumatóide (Gromer *et al.*, 1998). Além dos compostos de ouro e de platina, estudos realizados *in vivo* mostraram a inibição da TrxR por compostos de organotelúrio (Engman *et al.*, 2000) e de arsênio (Lin *et al.*, 2001). Por outro lado, dados da literatura mostraram um aumento da atividade da TrxR em células expostas a outros metais conhecidos por

induzir o estresse oxidativo. Jung et al. (2004) demonstraram que a atividade da TrxR aumentou em células hepáticas humanas expostas a metais como o alumínio, cobre, zinco, manganês e cádmio. Posteriormente, Sakurai et al. (2005) relataram que o cádmio promove a super-regulação dos níveis do RNAm da TrxR1 em células do endotélio arterial de bovinos por ativar o fator 2 relacionado ao NF-E2 (Nrf2), que é um fator transcricional responsivo ao estresse.

Existem poucos relatos na literatura que demonstram os efeitos de metais sobre a atividade da TrxR1. Além disso, não foram encontrados estudos avaliando o comportamento da TrxR1 em relação à toxicidade do chumbo. Como o sistema da tioredoxina atua na regulação redox da célula, ele poderia também exercer uma função protetora importante em tecidos que são expostos aos danos oxidativos mediados pelo chumbo (Pb). Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica ao acetato de chumbo sobre a atividade da tioredoxina redutase citosólica (TrxR-1) e sobre parâmetros de estresse oxidativo que são comumente utilizados na avaliação da toxicidade do chumbo, como a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), glutatona S-transferase (GST), grupos tiólicos não-protéicos (SHNP), atividade de enzimas antioxidantes, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em rins de ratos, bem como sobre indicadores plasmáticos da função renal (creatinina, ácido úrico e fosfatos).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Chumbo

2.1.1 Aspecto e forma

O chumbo é um metal branco-acinzentado, brilhante, dúctil e macio. Pertence à família química dos metais do grupo IVA da tabela periódica, juntamente com o carbono, germânio, silício e estanho. É encontrado na natureza tanto no estado livre, como em composição com diversos outros elementos (Paoliello & Chasin, 2001). O íon estável do chumbo é a espécie $2+$, a qual forma o sulfeto iônico PbS ($Pb^{2+}S^{2-}$) que é a base do componente metálico do minério galena do qual é extraído quase todo o chumbo (Baird, 2002). Em ambientes altamente oxidantes, o chumbo pode formar o íon $4+$. Entretanto, enquanto os compostos de chumbo $2+$ são iônicos, a maioria dos compostos tetravalentes são moléculas covalentes, sendo que aqueles formados com o grupo metila ou etila, isto é, tetrametilchumbo $Pb(CH_3)_4$ e tetraetilchumbo $Pb(C_2H_5)_4$, são mais importantes do ponto de vista ambiental e comercial, já que ambos foram empregados no passado como aditivos da gasolina em diversos países (Baird, 2002). Além desses compostos, a interação do chumbo com outros elementos dá origem a compostos tais como sulfato de chumbo, cromato de chumbo, arsenato de chumbo, dióxido de chumbo, brometo de chumbo, litargírio (PbO), zarcão (Pb_3O_4) e alvaiade [$PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$] (Spínola *et al.*, 1980).

2.1.2 Ocorrência e uso

O chumbo é relativamente abundante na crosta terrestre, tendo uma concentração média entre 10 e 20 mg/kg. As maiores fontes naturais de chumbo são as emissões vulcânicas, o intemperismo geoquímico e as névoas aquáticas (WHO, 1995). Estima-se que as taxas de emissão natural do chumbo são da ordem de 19.000 toneladas por ano (WHO, 1995). Entretanto, os processos antropogênicos são os principais responsáveis pela liberação do chumbo no ambiente (ATSDR,

1993), sendo que as atividades de mineração e fundição de chumbo primário (oriundo do minério galena) e secundário (oriundo da recuperação de sucatas ou baterias) constituem importantes fontes emissoras de chumbo (WHO, 1995). Além disso, a combustão da gasolina contendo chumbo é responsável pela presença de uma grande proporção de chumbo no ambiente em países que ainda não proibiram o uso deste metal como antidetonante na gasolina (Baird, 2002).

Em virtude de suas características físicas de ductilidade, maleabilidade e baixo ponto de fusão, o chumbo tem sido usado por populações milenares (Midio & Martins, 2000). O chumbo pode ser consumido na forma de metal, puro ou ligado com outros metais, ou como compostos químicos, principalmente na forma de óxidos (ATSDR, 1993). Atualmente, seu principal uso é na produção de baterias e em alguns tipos de soldas, uma vez que forma importantes ligas com outros metais. Além disso, os sais de chumbo podem aparecer como constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros (ATSDR, 1993). Até recentemente seus sais eram usados na produção de pigmentos para tintas (Midio & Martins, 2000), inclusive naquelas utilizadas para colorir embalagens de alimentos (Baird, 2002). Entretanto, apesar de muitos países restringirem o uso do chumbo em pigmentos e tintas, e concentrações acima de 0,06% (Estados Unidos) e 0,5% (Nova Zelândia) não serem permitidas em pinturas internas (Paoliello & Chasin, 2001), no Brasil ainda não existe uma lei específica que estabeleça limites para o chumbo em pigmentos (Neder, 1999).

2.1.3 Toxicocinética

Existem dois grupos principais de compostos de chumbo e que apresentam diferenças quanto à toxicidade: o chumbo inorgânico e o chumbo orgânico. A intoxicação pelo chumbo inorgânico ocorre predominantemente através da via respiratória e pelo trato gastrointestinal (Sadao, 2002). No organismo humano, o chumbo inorgânico não sofre metabolização, mas é complexado com macromoléculas, sendo diretamente absorvido, distribuído e excretado (Tsalev & Zapriav, 1985). Com relação ao chumbo orgânico, a intoxicação é mais freqüente através do chumbo tetraetila e tetrametila. Por serem muito lipossolúveis, são facilmente absorvidos pela pele, pelo trato gastrointestinal e pelos pulmões (Klaassen, 1991). Ao contrário do chumbo inorgânico, o chumbo orgânico é metabolizado pelo

fígado a chumbo trióxido e chumbo inorgânico, os quais são responsáveis pelos efeitos tóxicos no organismo (Kosnett, 2003).

Atualmente, as intoxicações provocadas pelo chumbo na população humana ocorrem principalmente através da exposição ocupacional, dentro das centenas de profissões que utilizam esse elemento e seus compostos (Paoliello & Chasin, 2001). Exposições não-ocupacionais em adultos estão restritas àquelas que ocorrem através da ingestão de alimentos e bebidas, representando a principal fonte de absorção diária de compostos inorgânicos para a população em geral. Compostos orgânicos de chumbo não são encontrados nos alimentos (Midio & Martins, 2000).

Crianças estão expostas a fontes adicionais de chumbo, como o solo e poeiras. Elas também podem estar expostas ao chumbo durante a gestação, já que o chumbo atravessa facilmente a placenta e passa da mãe para a criança em formação (Baird, 2002). Além disso, as crianças levam continuamente objetos (como lascas de tintas velhas que podem conter chumbo) e dedos à boca, ocasionando um incremento da ingestão de chumbo, o que contribui para a maior absorção e retenção do metal no organismo infantil em relação ao organismo adulto (Midio & Martins, 2000).

A absorção do chumbo no organismo sofre a influência de fatores como a concentração e tempo de exposição ao metal, bem como de fatores relacionados às propriedades físico-químicas como o tamanho da partícula e a solubilidade do composto (Schifer *et al.*, 2005). Além disso, deve-se levar em conta os fatores relacionados à dieta e ao estado nutricional do organismo exposto (Midio & Martins, 2000). Uma ingestão baixa de cálcio (Paoliello & Chasin, 2001), fósforo, ferro e proteínas podem provocar um aumento na absorção de chumbo (WHO, 1995). Por outro lado, a vitamina C reduz a absorção do chumbo, provavelmente por facilitar a absorção do ferro (Midio & Martins, 2000). Fatores relacionados ao indivíduo como a constituição genética, o estado fisiológico e a idade, também influenciam na absorção do chumbo (Klassen, 1991; Paoliello & Chasin, 2001). Diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central, predispõem a uma absorção do chumbo cinco vezes maior nas crianças em relação aos adultos (Lockitch, 1993).

Uma vez absorvido, o chumbo distribui-se no compartimento sangüíneo em duas formas: uma não difusível, ligada aos eritrócitos e outra difusível, no plasma. Apesar de mais de 95% do metal circulante permanecer ligado aos eritrócitos, a

forma difusível (plasmática) é a fração mais ativa do metal. Em função da sua maior disponibilidade, esta fração pode influenciar diretamente a concentração de chumbo nos outros compartimentos e, conseqüentemente, contribuir para a toxicidade do metal nos diferentes órgãos e sistemas (Silva, 1983). A quantidade de chumbo sangüíneo, que geralmente representa uma exposição a curto prazo, eleva-se até atingir um platô, e o excesso penetra nos tecidos moles como o cérebro, o fígado e os rins (Mushak & Crocetti, 1989; Baird, 2002). O tempo de meia-vida para o chumbo no sangue é de 36 dias e nos tecidos moles é de 40 dias (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnett, 2003). Finalmente o chumbo deposita-se nos ossos, onde substitui o cálcio, já que os íons Pb^{2+} e Ca^{2+} são similares em tamanho (Baird, 2002). Em adultos, quase 90% da carga corporal de chumbo está contida no osso onde a meia-vida desse metal é de 20 a 27 anos (Rabinowitz *et al.*, 1976). O chumbo presente no esqueleto é biologicamente inerte, porém em situações que envolvem a desmineralização óssea, como a gravidez e a osteoporose, o chumbo pode ser rapidamente mobilizado levando ao aparecimento dos sintomas tóxicos, mesmo depois de cessada a exposição (Saryan & Zenz, 1994). Todavia, em condições que não envolvem a dissolução dos ossos, a toxicidade do chumbo é proporcional à quantidade presente nos tecidos moles, e não à quantidade que se encontra no sangue ou nos ossos (Baird, 2002). O chumbo é eliminado do organismo pela urina e fezes (excreção biliar), podendo também, ser excretado através do leite materno. A concentração do chumbo secretado pelo leite materno varia entre 10 a 30% da plumbemia (Paoliello & Chasin 2001).

2.1.4 Alterações bioquímicas

O chumbo (Pb^{2+}), assim como o cádmio (Cd^{2+}) e o mercúrio (Hg^{2+}), possuem uma forte afinidade por grupos sulfidrílicos (SH) de aminoácidos, especialmente a cisteína. A interação do chumbo com os grupos sulfidrílicos resulta em depleção da glutatona (Saxena *et al.*, 2005), além da inibição da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo deste tripeptídeo, como a glutatona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutatona-S-transferase (GST) (Sivaprasad *et al.*, 2004). A ligação direta do chumbo com os grupos sulfidrílicos do sítio ativo da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), resulta em um decréscimo na sua atividade e inibição da via de biossíntese do grupo heme da hemoglobina (Rocha *et al.*, 1995).

Além disso, dados disponíveis na literatura indicam que o chumbo é capaz de induzir a síntese de metalotioneínas hepáticas, as quais são proteínas ricas em cisteína cuja função principal no organismo é atuar na homeostase de minerais como o cobre e o zinco (Maitani, Watahiki & Suzuki, 1986; Moffatt & Denizeau, 1997).

Além da afinidade por grupos sulfidrílicos, o chumbo também interfere na função de minerais como o cálcio. Por ser quimicamente semelhante ao cálcio, o chumbo pode substituí-lo no organismo e afetar a neurotransmissão (Silbergeld & Adler, 1978). As alterações observadas incluem mudanças na liberação de neurotransmissores, ativação da proteína quinase C (uma proteína com domínio de ligação para o cálcio) e a inibição da captação de glutamato nos astrócitos (Godwin, 2001). O chumbo também substitui o cálcio nos ossos e a sua liberação e deposição neste tecido segue o metabolismo normal do cálcio no osso.

2.1.5 Efeitos nefrotóxicos

A exposição ambiental e ocupacional ao chumbo tem sido associada a danos na função renal (Payton *et al.*, 1994) e estudos relataram efeitos nefrotóxicos em animais que ingeriram várias doses de chumbo (Vyskocil *et al.*, 1989). A toxicidade renal do chumbo está relacionada ao seu acúmulo seletivo nos rins (Choie & Richter, 1980). A nefrotoxicidade aguda induzida pelo chumbo em humanos tem como características a presença de corpos de inclusão, alterações mitocondriais e citomegalia das células epiteliais do túbulo proximal. Os corpos de inclusão são formados pelos complexos chumbo-proteínas, que são constituídas de ácido aspártico e glutâmico e de pouca cisteína. Em torno de 90% do chumbo depositado no rim de ratos intoxicados foi encontrado como complexos chumbo-proteínas (Goyer & Moore, 1974). As mitocôndrias das células renais sofrem interferências nos processos de oxidação e fosforilação, o que é responsável pela diminuição das funções de reabsorção tubular proximal (Paoliello & Chasin 2001). A disfunção nos túbulos proximais é manifestada como aminoacidúria, glicosúria, fosfatúria e aumento da excreção de sódio (uma síndrome semelhante à síndrome de Fanconi) (ATSDR 1999; Paoliello & Chasin 2001). No caso de nefropatia crônica induzida pelo chumbo, as características observadas incluem fibrose intersticial progressiva, dilatação dos túbulos e atrofia ou hiperplasia das células epiteliais tubulares, pouca ou nenhuma inclusão de corpos nucleares, redução na taxa de filtração glomerular e

uremia, podendo evoluir para uma falência renal crônica (Goyer, 1989; Nolan & Shaikh, 1992; Paoliello & Chasin 2001). Enquanto os efeitos da nefropatia aguda parecem ser reversíveis, os efeitos da nefropatia crônica são irreversíveis. A exposição ao chumbo também pode contribuir para o aparecimento da “gota satúrnica” que é desenvolvida como resultado da hiperuricemia induzida por chumbo devido ao decréscimo da excreção do ácido úrico (ATSDR 2000).

2.1.6 Estresse oxidativo e chumbo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas exogenamente por agentes ambientais ou endogenamente como uma consequência dos processos metabólicos, incluindo a respiração celular (Findlay *et al.*, 2005). A formação de EROs por organismos aeróbicos é conduzida de modo a obter concentrações fisiológicas dessas espécies, as quais são requeridas para a função celular normal, ou quantidades excessivas que levam ao aumento do estresse oxidativo (Nordberg & Arnér, 2001). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante celular, causando danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (Findlay *et al.*, 2005). As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas e derivadas do oxigênio, como por exemplo o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). As moléculas anteriormente citadas e seu mecanismo de formação estão ilustrados na Figura 1.

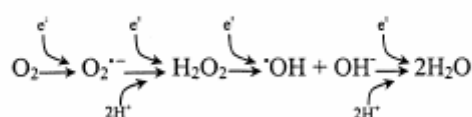


Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).

A homeostase entre a formação e a degradação de EROs no organismo é mantida por moléculas e proteínas antioxidantes que removem as EROs e restauram o balanço redox (Findlay *et al.*, 2005). As principais enzimas antioxidantes na célula incluem a (a) superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (b) catalase (CAT) que reduz o H_2O_2 à água e oxigênio (O_2), (c) glutatona peroxidase (GPx) que catalisa a redução

de hidroperóxidos (H_2O_2) usando a glutationa (GSH) como um redutor e (d) as peroxirredoxinas (Prx) as quais reduzem tanto o H_2O_2 como os hidroperóxidos alquilas em conjunto com a tioredoxina redutase (TrxR), tioredoxina (Trx) e NADPH (Nordberg & Arner, 2001; Findlay et al., 2005) (Figura 2).

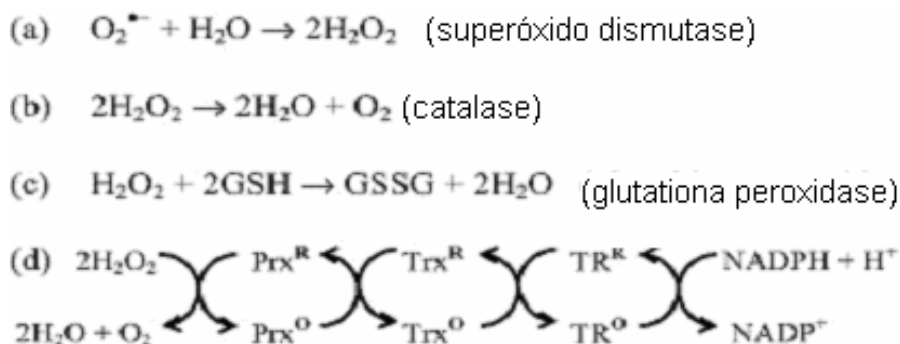


Figura 2 - Esquema das reações envolvidas na remoção de EROs pelas enzimas antioxidantes celulares (Findlay et al., 2005).

A produção de radicais livres e o estresse oxidativo têm sido apontados como causa da injúria tecidual induzida pelo chumbo no fígado, cérebro, rins e em outros órgãos (Patra *et al.*, 2001; Sivaprasad *et al.*, 2002). A participação de radicais livres na intoxicação por chumbo pode ocorrer em diferentes níveis. A inibição da enzima sulfidrílica δ -ALA-D pelo chumbo leva ao acúmulo de seu substrato, o ácido δ -aminolevulínico (ALA) que constitui-se em uma fonte endógena potencial de radicais livres (Hermes-Lima *et al.*, 1991), podendo levar a danos oxidativos no DNA, peroxidação lipídica e depleção do sistema de defesa antioxidante celular (Gurer & Ercal, 2000). Por outro lado, o chumbo (Pb^{2+}) *per se* tem a capacidade de estimular a peroxidação lipídica na presença de ferro (Fe^{2+}) (Adonaylo & Oteiza, 1999). Além disso, a depleção da glutaciona (GSH) e de proteínas sulfidrílicas, bem como as alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, parecem estar envolvidas no dano oxidativo induzido pelo chumbo (Lawton & Donaldson, 1991; Gurer *et al.*, 1998). Jurczuck *et al.* (2006) demonstraram que o decréscimo dos níveis renais e hepáticos de glutaciona (GSH) e dos grupos tiólicos não-protéicos (SHNP) em ratos expostos a 500 mg/L de chumbo na água durante 12 semanas, pode ser um dos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da peroxidação lipídica nestes órgãos. Tandon *et al.* (2002) relataram que a exposição através da água a 2000 ppm de acetato de chumbo durante nove semanas inibiu a atividade da δ -ALA-D,

elevou os níveis de malondialdeído (MDA) (um produto final da lipoperoxidação), e a atividade da catalase no sangue e no cérebro de ratos intoxicados. Flora *et al.* (2003) demonstraram uma redução na atividade da δ -ALA-D e nos níveis de glutathiona (GSH) sangüínea, bem como uma diminuição na atividade da catalase, e um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no fígado e nos rins de ratos que foram expostos a 0,1% de chumbo na água. De maneira semelhante, ratos expostos diariamente a uma injeção subcutânea de 100 mg/kg de acetato de chumbo durante 30 dias apresentaram um aumento na peroxidação lipídica e redução na atividade da superóxido dismutase (SOD) e nos níveis de glutathiona renal e hepática (El-Sokkary *et al.*, 2005).

2.2 Sistema da tioredoxina

O sistema da tioredoxina é formado pela enzima tioredoxina redutase (TrxR), pela proteína tioredoxina (Trx) (principal substrato da TrxR) e NADPH. Neste sistema, a TrxR reduz o dissulfeto do sítio ativo da Trx a ditiol usando o NADPH como doador de elétrons (Figura 3; Arnér & Holmgren, 2000).

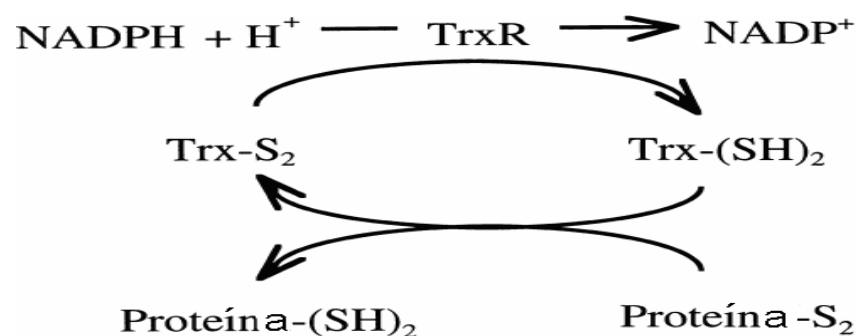


Figura 3 - Sistema da tioredoxina: a Trx reduzida pela TrxR é um redutor geral de dissulfetos de proteínas (Arnér & Holmgren, 2000).

Juntamente com o sistema da glutathiona, este sistema é reconhecido como o principal regulador do ambiente redox intracelular e atua na defesa antioxidante, bem como no controle da regulação redox de diversos processos celulares (Arnér & Holmgren, 2000). Além de atuar na prevenção, intervenção e reparo de danos às proteínas causados pelo estresse oxidativo (Arnér & Holmgren, 2000), o sistema

está envolvido na regulação direta de vários fatores de transcrição, regulação da apoptose e em muitas vias metabólicas, como a síntese do DNA, metabolismo da glicose, metabolismo do selênio, e reciclagem da vitamina C (Nordberg & Arnér, 2001). No entanto, as múltiplas funções celulares desempenhadas pelo sistema da tioredoxina podem estar relacionadas tanto à proteína Trx como diretamente à enzima TrxR, em função desta última poder atuar sobre outros substratos além da Trx.

2.2.1 Caracterização da tioredoxina redutase de mamíferos

2.2.1.1 Estrutura e sítio ativo

As isoenzimas da TrxR são oxidoredutases homodiméricas dependentes de NADPH e contêm um FAD por subunidade que reduz o sítio ativo da Trx oxidada (Holmgren & Björnstedt, 1995). O peso molecular é 55-65 kDa por subunidade, maior portanto, quando comparado com o peso molecular de 35 kDa da TrxR de procariontes, plantas ou leveduras (Holmgren & Björnstedt, 1995; Arnér & Holmgren, 2000). Três isoformas desta enzima já foram isoladas e identificadas em mamíferos, como a isoforma clássica nomeada TrxR citosólica (TrxR1), a mitocondrial (TrxR2) e a terceira (TrxR3/TGR) isolada dos testículos de ratos. As três isoformas são selenoproteínas e contêm um resíduo de selenocisteína (Sec) próximo ao carbono terminal, o qual é essencial para a sua atividade (Nordberg & Arnér, 2001). Estudos demonstraram que a atividade da TrxR é severamente prejudicada em animais (Hill *et al.*, 1997) e em linhagens de células humanas (Marccoci *et al.*, 1997) com deficiência de selênio. Berggren *et al.* (1997) demonstraram que a adição de selênio às células cancerígenas humanas produziu um aumento várias vezes maior na atividade da TrxR, o que não foi observado para outras selenoproteínas como a glutathione peroxidase (GPx). Além disso, a comunicação redox entre Cys-Sec na porção carboxi-terminal e o sítio ativo dissulfeto na porção amino terminal é proposta como sendo essencial para a atividade da TrxR de mamíferos (Zhong & Holmgren, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Funções fisiológicas da tioredoxina redutase citosólica

A TrxR de mamíferos está estritamente relacionada à outras flavoproteínas dissulfeto oxidoredutases, como a glutathiona redutase quanto à estrutura primária, cristalina e nas características gerais do mecanismo catalítico (Nordberg & Arnér, 2001). No entanto, a presença do resíduo de selenocisteína de fácil acesso na porção carboxi-terminal ocorre apenas na TrxR, o que explica muitas das características peculiares desta enzima. Uma característica notável da tioredoxina redutase citosólica (TrxR1) é a ampla especificidade de substratos, podendo reduzir diretamente outras proteínas dissulfetos, compostos dissulfetos de baixo peso molecular e compostos não dissulfetos (Nordberg & Arnér, 2001). Através da redução direta do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos, a TrxR1 poderia atuar como uma via enzimática alternativa para a detoxificação de peróxidos (Nordberg & Arnér, 2001). Proteínas dissulfeto-isomerases (PDI), as quais são proteínas presentes no retículo endoplasmático e que estão envolvidas no dobramento pós-translacional e no processamento de proteínas celulares, possuem domínios dissulfetos semelhantes aos da Trx, que podem ser diretamente reduzidos pela TrxR1 ou pela Trx (Lundström & Holmgren, 1990). Outros substratos para a TrxR1 incluem o polipeptídeo antibacteriano NK-lisina (Andersson *et al.*, 1996), L-cistina, vitamina K e aloxano (Holmgren & Lyckeberg, 1980).

Muitos estudos demonstraram que a atividade antioxidante da TrxR de mamíferos pode estar relacionada também à regeneração direta de compostos antioxidantes pela enzima. A redução do ácido ascórbico e do radical ascorbil livre, do ácido lipóico e da ubiquinona pode ser eficientemente realizada pela TrxR1 (Nordberg & Arnér, 2001). Além disso, TrxR1 também reduz muitos compostos de selênio, tais como selenito (Kumar *et al.*, 1992), selenocistina (Björnstedt *et al.*, 1995) e a selenocisteína (Sec) inserida no sítio ativo da glutathiona peroxidase plasmática (Björnstedt *et al.*, 1994). A TrxR1, na presença ou ausência da Trx, reduz o selenito (SeO_3^{2-}) a seleneto de hidrogênio (HSe^-) para a incorporação cotranslacional do selênio às selenoproteínas. A redução de compostos de selênio para a síntese da própria TrxR1 e para a síntese de outras selenoproteínas, torna a TrxR1 uma enzima chave no metabolismo do selênio no organismo, constituindo-se, portanto, em um elo entre o selênio e os processos antioxidantes celulares (Nordberg & Arnér, 2001).

2.2.2 Funções fisiológicas da tioredoxina

A tioredoxina (Trx) foi primeiramente descrita por Laurent *et al.* (1964) como uma pequena proteína com atividade redox na *Escherichia coli*. Subseqüentemente, as tioredoxinas foram encontradas em diversas espécies procarióticas e eucarióticas. Atualmente, estudos demonstram que as tioredoxinas de mamíferos estão envolvidas em diversas funções celulares. A atividade destas proteínas tem sido encontrada extracelularmente (estimulação do crescimento celular e quimiotaxia), no citoplasma (como um antioxidante e um fator redutor), no núcleo (regulação da atividade de fatores de transcrição) e na mitocôndria (Powis & Montfort, 2001). Como as TrxRs são a única classe de enzimas conhecidas por reduzir a Trx oxidada, acredita-se que sejam essenciais na regulação da atividade do sistema da tioredoxina (Mustacich & Powis, 2000). Um resumo das principais funções do sistema da tioredoxina está ilustrado na Figura 4.

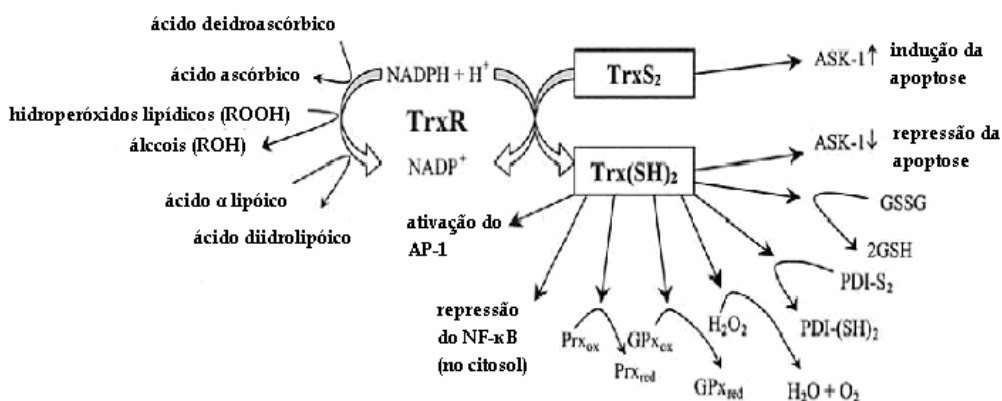


Figura 4 – Resumo das principais funções do sistema da tioredoxina de mamíferos (Nordberg & Arnér, 2001).

2.2.3 Efeitos de metais

O sistema da tioredoxina é o principal sistema envolvido na defesa celular contra o dano oxidativo (Arnér & Holmgren, 2000). Alguns metais como o cádmio, o mercúrio e o arsênio podem induzir o estresse oxidativo e causar lipoperoxidação e alteração na atividade de enzimas antioxidantes, incluindo a glutatona redutase

(GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Casalino *et al.*, 1997; Bando *et al.*, 2005; Pal & Chatterjee, 2006). Estudos demonstraram que a atividade da tioredoxina redutase (TrxR) também pode ser afetada por íons metálicos. A exposição de células hepáticas humanas a diferentes concentrações de alumínio, cobre, zinco, manganês, selenito e cádmio durante 2 a 3 horas induziu a atividade da TrxR. Embora o mecanismo da indução da TrxR não esteja esclarecido para todos os metais já avaliados, Sakurai *et al.* (2005) demonstraram que a indução da atividade da tioredoxina redutase citosólica (TrxR1) de células endoteliais arteriais de bovinos pelo cádmio foi devido à super-regulação do nível de RNAm da TrxR1 já que o cádmio ativa o fator 2 relacionado ao NF-E2 (Nrf2), que é um fator de transcrição responsivo ao estresse. Posteriormente, foi demonstrado que células HeLa com supressão da TrxR1 exibiram maior sensibilidade à doses baixas de cádmio (menores do que 10 μ M) e menor sensibilidade à doses altas, o que sugere que a TrxR1 poderia desempenhar uma importante função na defesa celular contra doses baixas de cádmio. Similarmente, esse estudo também demonstrou que a viabilidade das células com supressão do RNAm da TrxR1 foi maior quando expostas à doses maiores de arsênio e mercúrio inorgânico do que as células controle. Foi sugerido que o resíduo de selenocisteína (Sec) da TrxR1 poderia interagir com cádmio ou mercúrio, comprometendo o selenol da enzima, tornando-a enzimaticamente inativa e sem atividade citoprotetora, o que poderia conseqüentemente, induzir a morte celular quando exposta à doses elevadas desses metais (Nishimoto *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a TrxR comprometida no selênio pode rapidamente induzir a apoptose (Anestal & Arnér, 2003).

Por outro lado, tem sido demonstrado que alguns complexos metálicos, em função de sua eletrofilicidade, inibem a atividade da tioredoxina redutase (TrxR) por interagir diretamente com o resíduo de selenocisteína no sítio ativo. O selenol da TrxR na porção carboxiterminal é facilmente acessível e extraordinariamente reativo, podendo ser derivatizado por compostos eletrofílicos (Nordberg *et al.*, 1998). Compostos de platina comumente utilizados na terapia do câncer, como a cisplatina e oxilplatina são eficientes inibidores da TrxR. Além disso, os compostos de ouro utilizados no tratamento da artrite reumatóide, como a auranofina e o aurotiomalato de sódio são potentes inibidores da tioredoxina citosólica (TrxR1) e mitocondrial (TrxR2), mas não das enzimas glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase

(GPx) (Gromer *et al.*, 1998; Rigobello *et al.*, 2004). Em vista das múltiplas funções desempenhadas pelo sistema da tioredoxina, como na síntese do DNA e processos inflamatórios, bem como na defesa geral contra o estresse oxidativo, a inibição da TrxR foi reconhecida como um mecanismo potencial pelo qual estes compostos poderiam exercer seus efeitos citotóxicos (Witte *et al.*, 2005).

O envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade de metais também pode envolver a oxidação das tioredoxinas. Além de afetar a atividade da enzima TrxR, alguns metais podem também oxidar a proteína Trx e desencadear o processo apoptótico. Hansen *et al.* (2005) demonstraram que metais como o arsênio, o cádmio e o mercúrio promoveram pouca oxidação da glutathiona (GSH), mas oxidaram significativamente tanto a tioredoxina citosólica (Trx1) quanto a mitocondrial (Trx2). A oxidação das tioredoxinas foi responsável pela ativação da proteína quinase-1 reguladora do sinal de apoptose (ASK-1) e subsequente morte celular, o que sugere que a ativação da apoptose pode estar associada a íons metálicos que oxidam a tioredoxina (Trx) e por isso, ativam a ASK-1. A oxidação da Trx também pode estar relacionada à inibição da TrxR por alguns metais como o arsênio (Lin *et al.*, 2000). No entanto, não foram encontrados na literatura, estudos avaliando o efeito do chumbo sobre a atividade da tioredoxina redutase de mamíferos, nem sobre o sistema da tioredoxina como um todo.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito que encontra-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão que será resubmetida à Revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.

3.1 Manuscrito

EFFECT OF LEAD ACETATE ON RENAL CYTOSOLIC THIOREDOXIN REDUCTASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN THE KIDNEY OF RATS.

Manuscrito a ser resubmetido à Revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*

Effect of lead acetate on renal cytosolic thioredoxin reductase activity and oxidative stress parameters in the kidney of rats

Greicy M. M. Conterato¹, Paula R. Augusti¹, Sabrina Somacal², Lídia Einsfeld²,
Rocheli Sobieski², Juliana R.V. Torres² and Tatiana Emanuelli²

¹Post-graduate Program on Biochemical Toxicology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

²Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Alimentary Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Author for correspondence:

Tatiana Emanuelli
Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL)
Department of Alimentary Technology and Science
Center of Rural Sciences
Federal University of Santa Maria
Campus – Camobi, 97105-900
Santa Maria, RS - Brazil
Telephone: +55 55 3220 8547
Fax: +55 55 3220 8353
E-mail: tatiemanuelli@smail.ufsm.br

Running title: Lead acetate and thioredoxin reductase

Abstract It has been suggested that oxidative stress is an important molecular mechanism of toxic effects of lead in the kidney. Thioredoxin reductase-1 is a selenoprotein involved in many cellular redox processes. This study evaluated the effect of acute and chronic exposure (i.p.) to lead acetate on thioredoxin reductase-1 activity and on other oxidative stress parameters in the kidney of rats, as well as on indicators of renal function commonly used to assess lead poisoning. Acute exposure to 25 mg/kg lead acetate increased superoxide dismutase and thioredoxin reductase-1 activity (after 6, 24, and 48 h), while exposure to 50 mg/kg lead acetate increased catalase activity (after 48h) and inhibited δ -aminolevulinic acid dehydratase activity (after 6, 24, and 48 h) in the kidney ($P < 0.05$). Chronic exposure (thirty days) to 5 mg/kg lead acetate inhibited δ -aminolevulinic acid dehydratase and increased glutathione S-transferase, non protein sulfhydryl groups, catalase, thioredoxin reductase-1, and uric acid plasma levels, while exposure to 25 mg/kg lead acetate reduced body weight and δ -aminolevulinic acid dehydratase, but increased glutathione S-transferase, non protein sulfhydryl groups, and uric acid plasma levels ($P < 0.05$). No changes were observed in thiobarbituric acid reactive substances, glutathione peroxidase, creatinine or inorganic phosphate levels after either acute or chronic exposure. Our results suggest that thioredoxin reductase-1 may be an early indicator of acute exposure to low lead doses.

Lead is a pervasive environmental pollutant that is selectively accumulated in the kidneys, where it may cause proximal tubular dysfunction after acute exposure or irreversible nephropathy after chronic exposure [1]. Lead is commonly found in cells attached to thiol-containing molecules and the inhibition of the sulfhydryl-containing enzyme δ -aminolevulinate dehydratase has been shown as an effect of its toxicity. [2]. This inhibition leads to the accumulation of δ -aminolevulinic acid, which undergoes a process of autoxidation generating reactive oxygen species [3]. In line with this, oxidative stress has also been implicated as a contributing factor in lead-associated renal injury [4]. Several antioxidant enzymes and molecules have been used to evaluate lead-induced oxidative damage. Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide concentrations, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase activities are the most commonly used ones [5,6]. Moreover, the expression and activity of cytosolic glutathione S-transferases, which are a family of detoxification enzymes, has been found to be increased in the kidney of rats exposed to lead [7].

Thioredoxin reductase is a selenoprotein that catalyzes the reduction of oxidized thioredoxin, using NADPH as the electron donor [8]. The thioredoxin system (i.e. thioredoxin reductase, thioredoxin, and NADPH) together with the glutathione system are regarded as main regulators of the intracellular redox environment. Among the three mammalian thioredoxin reductases so far isolated, thioredoxin reductase-1 is the only one that has a broad substrate specificity reducing not only different thioredoxins but also other antioxidant compounds, including selenium compounds, dehydroascorbate, lipoic acid, and ubiquinone [8]. Additionally, mammalian

thioredoxin reductases are also NADPH-dependent lipid hydroperoxide and hydrogen peroxide reductases and may serve as an electron donor of human plasma glutathione peroxidase [8]. Since the thioredoxin system functions in redox regulation, it could play an important protective role against lead-mediated damage.

In the present study, we evaluated the effects of acute and chronic exposure to lead acetate on cytosolic thioredoxin reductase activity and on parameters commonly used as indicators of lead-induced oxidative damage (δ -aminolevulinate dehydratase, glutathione S-transferase, non-protein thiol groups, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in the kidney), as well as on plasmatic indicators of renal function (creatinine, uric acid, and phosphate) in rats.

Materials and methods

Animals. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (n° 23081.019156/2005-74). Male Wistar rats from our breeding colony were used for acute (8 weeks-old, 181.3 ± 9.8 g body weight) and chronic exposure (6 weeks-old, 145.0 ± 20.5 g body weight). Animals were housed five to a cage and maintained in an air-conditioned room (22-25°C) under natural lighting conditions, with free access to water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil).

Exposure and sample collection. For acute exposure, the animals received one intraperitoneal (i.p.) injection (1 mL/kg body weight) of vehicle (120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) or lead acetate (25 mg/kg or 50 mg/kg). For chronic exposure, the animals received one daily i.p. injection of vehicle or lead acetate (5 or

25 mg/kg body weight) during thirty days. Lead acetate suspensions were prepared in 120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4.

Six, twenty-four, or forty-eight hours after the lead acetate injection in for acute exposure and twenty-four hours after the last injection for chronic exposure, the rats were anaesthetized by cardiac puncture. Plasma was obtained and stored at -20°C until analyses. Animals were killed by decapitation and the right kidney was homogenized in 3 volumes of 150 mM NaCl. The homogenate was centrifuged at 3000 x g at 4°C for 10 minutes to yield a low-speed supernatant that was used to determine δ -aminolevulinic acid dehydratase, glutathione S-transferase, non-protein thiol groups, thiobarbituric acid reactive substances, and antioxidant enzyme activity. The left kidney was homogenized in 9 volumes of buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3) and prepared as described by Hill et al. [9]. The supernatant obtained was used to determine thioredoxin reductase-1 activity. Succinate dehydrogenase activity was assessed as described by Fischer et al. [10] and no activity was detected in the supernatant fraction, indicating the absence of mitochondria.

d-Aminolevulinic acid dehydratase activity. After incubation at 39°C for 180 minutes the reaction product was determined using Ehrlich's reagent at 555 nm [11].

Glutathione S-transferase. Glutathione S-transferase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as the substrate [12].

Non-protein thiol groups. The low-speed supernatant fraction was mixed with 10% trichloroacetic acid (1:1 v/v), followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (to pH 7.5) with 1 M Tris [13]. Non-protein thiol groups were immediately determined as described by Ellman [14] using a standard curve of cysteine.

Lipid peroxidation. After the addition of 7.2 mM of butylated hydroxytoluene to prevent further oxidation, the supernatant was used for determination of thiobarbituric acid reactive substances [15]. Samples were extracted with *n*-butanol and the reaction product was determined at 535 nm using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

Antioxidant enzymes. Superoxide dismutase activity was determined based on its ability to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome at an alkaline pH [16]. Catalase activity was determined using H₂O₂ as substrate [17]. The pseudo-first order reaction constant (*k*) of the decrease in H₂O₂ absorption at 25°C was determined and specific activity was expressed as *k*/g protein. Glutathione peroxidase activity was determined using glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm [18]. Thioredoxin reductase-1 activity was determined using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and NADPH [19]. The method is based on the reduction of DTNB, which is indicated by an increase in absorbance at 412 nm. Gold (III) chloride trihydrate (500 nM) was used to inhibit thioredoxin reductase activity [20] and determine non-thioredoxin reductase DTNB reduction, which was subtracted from total DTNB reduction in order to obtain thioredoxin reductase activity.

The amount of DTNB reduced was calculated using an absorption coefficient of $13.6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protein quantification. Protein was measured using bovine serum albumin as standard [21].

Plasma creatinine, uric acid, and inorganic phosphate levels. These parameters were determined using routine laboratory kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

Statistical analysis. Data were analyzed using two-way analysis of variance (3 Pb doses x 3 times) for acute exposure and one-way analysis of variance for chronic exposure, followed by Duncan's multiple range test when necessary. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Acute exposure to 25 mg/kg lead acetate did not alter δ -aminolevulinate dehydratase activity, but 50 mg/kg inhibited the activity of this sulfhydryl-containing enzyme after 6, 24, and 48 h ($P < 0.05$; fig. 1a). Acute exposure to lead acetate did not change glutathione S-transferase activity (fig. 1b), the levels of non-protein thiol groups (fig. 1c), thiobarbituric acid reactive substances (data not shown), or glutathione peroxidase activity (fig. 2a). Catalase activity was not changed by 25 mg/kg lead acetate, but increased significantly 48 h after a single injection of 50 mg/kg lead acetate (fig. 2b). Superoxide dismutase and thioredoxin reductase-1 activities were increased after exposure to a single injection of 25 mg/kg lead acetate ($P < 0.05$), but no changes were observed after exposure to 50 mg/kg (fig. 2c).

Plasma levels of uric acid, creatinine, and inorganic phosphate were not changed up to 48 h after acute exposure to lead acetate (25 or 50 mg/kg, data not shown).

Chronic exposure to 25 mg/kg lead acetate decreased the rate of body weight gain from the 16th day of exposure onwards, but no change was observed in the rats exposed to 5 mg/kg lead acetate (fig. 3). A dose-dependent inhibition of renal δ -aminolevulinatase activity and an increase of glutathione S-transferase activity and non protein thiol group levels ($P < 0.05$) were observed in the kidney after chronic exposure to lead acetate (table 1). Chronic exposure to lead acetate had no effect on glutathione peroxidase, superoxide dismutase (table 1), or on the levels of thiobarbituric acid reactive substances in the kidney (data not shown). In contrast, chronic exposure to 5 mg/kg lead acetate increased catalase and thioredoxin reductase-1 activity ($P < 0.05$). These changes were not observed after chronic exposure to 25 mg/kg lead acetate (table 1). Chronic exposure to 5 and 25 mg/kg lead acetate increased uric acid plasma levels ($P < 0.05$; table 1), but did not change inorganic phosphate or creatinine plasma levels (data not shown).

Discussion

In the present study we evaluated changes in the activity of the antioxidant enzyme thioredoxin reductase-1 after lead exposure as compared to changes in other commonly used indicators of lead exposure. We found that renal thioredoxin reductase-1 is a sensitive indicator of lead poisoning as it is affected after exposure to the lowest lead doses evaluated for both the acute and chronic exposure.

We found a simultaneous increase in superoxide dismutase and thioredoxin reductase-1 activities in rats exposed to one dose of 25 mg/kg lead acetate, which may indicate that thioredoxin reductase-1 plays a role in the decomposition of H_2O_2

generated by superoxide dismutase. Thioredoxin reductase is the only class of enzymes known to reduce oxidized thioredoxin [22]. Reduced thioredoxin is involved in the reduction of oxidized peroxirredoxins, which scavenge oxidant species such as H₂O₂ and alkyl peroxides [22]. In addition, we observed increased catalase and thioredoxin reductase-1 activities after chronic exposure to the lowest lead acetate dose. The increase of antioxidant enzyme activities in our study probably occurred as a defense response against lead. However, glutathione peroxidase activity, which is believed to be important for the decomposition of H₂O₂ under low-steady state levels, was not changed in the present study.

Similar to superoxide dismutase activity in the acute exposure and catalase activity in the chronic exposure, thioredoxin reductase-1 activity remained unchanged after exposure to the highest lead acetate doses in our study, indicating a biphasic effect of lead. Possibly, higher lead doses could result in the inactivation of these enzymes, since lead exposure and the resultant oxidative stress have been reported to modify the protein moiety of antioxidant enzymes [23]. In corroboration with our results, Nishimoto et al. [24] showed that silencing the expression of thioredoxin reductase-1 in HeLa cells increased sensitivity to a low cadmium dose and decreased sensitivity to a high cadmium dose. This suggests that TrxR1 might rescue the cells from moderate injury induced by a low dose of cadmium, while it promotes the death of cells severely injured by a high dose of cadmium. Thus, it is possible that thioredoxin reductase-1 could also have a dual role in lead exposure, depending on lead levels.

To our knowledge, this is the first study evaluating the effect of lead exposure on mammalian thioredoxin reductase activity. However, a previous study has revealed that thioredoxin reductase from human hepatic cell lines was induced after 2-3 h

exposure to aluminum, copper, selenite, zinc, or cadmium [25]. Also, Sakurai et al. [26] reported that cadmium up-regulates the thioredoxin reductase-1 mRNA level in bovine arterial endothelial cells by activating NF-E2-related factor 2, a stress-responsive transcriptional factor.

Although the mechanism by which thioredoxin reductase-1 activity is increased after lead exposure is not yet known, there are several reports showing that the upregulation of thioredoxin and thioredoxin reductase has a protective effect against intracellular oxidative stress [25, 27]. It has been suggested that the selenocysteine residue in thioredoxin reductases serves as a cellular redox sensor, because when cells generated reactive oxygen species, selenocysteine in the active site of thioredoxin reductase-1 was oxidized, while its expression was elevated [28].

The increase of non protein thiol group levels and glutathione S-transferase after chronic exposure to lead acetate in the present study is in agreement with previous findings [7]. Glutathione S-transferase conjugates lead to the non protein thiol compound glutathione, which facilitates lead excretion and reduces lead toxicity [29]. Accordingly, decreases of glutathione and non protein thiol groups have been implicated in lipid peroxidation induced by lead in kidney and liver [4]. Therefore, the unchanged levels of thiobarbituric acid reactive substances in our study, may be due to an increase of non protein thiol group levels and/or antioxidant enzyme activities, both of which are effective in scavenging reactive oxygen species and consequently in preventing kidney lipid peroxidation in acute as well as in chronic exposure.

Changes in superoxide dismutase and thioredoxin reductase-1 activities after acute lead exposure (25 mg/kg) were not accompanied by changes in plasma indicators of renal function, suggesting that these antioxidant enzymes could be early indicators of lead exposure. The sulfhydryl-containing enzyme δ -aminolevulinate

dehydratase is considered an important index of subcritical effects of lead due to the high affinity of lead for its **sulfhydryl** groups [1]. Although this enzyme was inhibited in a dose-dependent manner after chronic lead exposure, in acute exposure it was inhibited only after exposure to 50 mg/kg lead acetate, suggesting that antioxidant enzyme activity is a more suitable indicator of acute exposure to low lead doses than δ -aminolevulinate dehydratase activity .

For chronic exposure, uric acid levels were increased in a dose-independent manner, indicating renal dysfunction. Moreover, changes in non protein thiol group levels and δ -aminolevulinate dehydratase, glutathione S-transferase, catalase, and thioredoxin reductase-1 activities were also observed. The reduction of body weight gain observed in animals chronically exposed to 25 mg/kg lead acetate seems not to be involved in the biochemical effects of lead, since all biochemical changes were also observed at the lower lead dose (5 mg/kg).

Our results showed that the response of antioxidant molecules against lead-induced oxidative stress is complex. Lead exposure caused a marked increase in the thioredoxin reductase-1 activity in the kidney of rats and this was the only parameter affected by low lead doses both after acute and chronic exposure. Changes in thioredoxin reductase-1 activity along with those in superoxide dismutase may be an early indicator of acute exposure to low lead doses, since they occurred before changes in other indicators of lead exposure (ALA-D activity and plasma indicators of renal function). However, further studies are needed to clarify the biological significance of this induction as well as the mechanism involved in such effect.

Acknowledgements

We thank to Patrícia Regina Spohr for help in glutathione S-transferase

determination. This work was supported by CNPq (grant 470582/2004-9 to T. Emanuelli). T. Emanuelli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 304257/2004-4). S. Somacal and R. Sobieski were the recipients of PIBIC/CNPq-UFSM fellowship. P.R. Augusti and G.M.M. Conterato are the recipients of CAPES Master degree fellowships.

References

- 1 Al-Saleh IAS. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. *Med Res Rev* 1994;**14**:415-86.
- 2 Rocha , JBT, Rocha, LK, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. 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* 1995;**100**:27-37.
- 3 Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJH. Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochem Biophys Acta* 1991;**1056**:57-63.
- 4 Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Brzóska MM. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology* 2006;**219**:11-21.
- 5 Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, Yannai S. Effects of treatment to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol Toxicol* 1996;**78**:18-22.

- 6 Pande M, Flora SJS. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology* 2002;**177**:187-96.
- 7 Daggett DA, Oberley TD, Nelson SA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* 1998;**128**:191-206.
- 8 Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;**31**:1287-312.
- 9 Hill KE, McCollum GW, Boeglin ME, Burk RF. Thioredoxin reductase is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**234**:293-5.
- 10 Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1985;**153**:23-36.
- 11 Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;**28**:133-45.
- 12 Habig W, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 1981;**77**:398-405.
- 13 Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores E M, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001;**88**:119-25.
- 14 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem* 1959;**82**:70-7.
- 15 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**:351-8.
- 16 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;**244**:6049-55.
- 17 Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**105**:121-6.

- 18 Paglia DE, Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;**70**:158-69.
- 19 Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995;**252**:199-208.
- 20 Omata Y, Folan M, Shaw M, Messer RL, Lockwood PE, Hobbs D et al. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicol in Vitro* 2006;**20**:882-90.
- 21 Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RF. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**:265-75.
- 22 Park YS, Fujiwara N, Koh YH, Miyamoto K, Suzuki K, Honke N et al. Induction of thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells. *Biol Chem* 2002;**383**:683-91.
- 23 Valenzuela A, Leufauconnier J, Chaudiere J, Bourre, J. Effects of lead acetate on cerebral glutathione peroxidase and catalase in the suckling rat. *Neurotoxicology* 1989;**10**:63-70.
- 24 Nishimoto M, Sakaue M, Hara S. Short-interfering RNA-mediated silencing of thioredoxin reductase 1 alters the sensitivity of HeLa cells toward cadmium. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**:543-46.
- 25 Jung H-I, Lim H-W, Kim B-C, Park E-H, Lim C-J. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Yonsei Med J* 2004;**45**:263-72.
- 26 Sakurai A, Nishimoto N, Himeno S, Imura N, Tsujimoto M, Kunimoto M et al. Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in

- vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2. *J Cell Physiol* 2005;**203**:529-37.
- 27 Park YS, Misonou Y, Fujiwara N, Takahashi M, Miyamoto Y, Koh YH et al. Induction of thioredoxin reductase as an adaptative response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**327**:1058-65.
- 28 Sun QA, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield D, Gladyshev V. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* 1999;**274**:24522-30.
- 29 Ballatori N. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* 1994;**27**:271-98.

Figure captions

Fig. 1. Time course of changes in (a) d-aminolevulinatase (ALA-D) activity and (b) glutathione S-transferase (GST) and (c) non-protein thiol groups (NPSH) levels in kidney after acute exposure to lead acetate (0-50 mg/kg). Data are expressed as means \pm SEM (n=6-8). *Different from all other groups ($P < 0.05$). PBG = porphobilinogen. CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

Fig. 2. Time course of changes in antioxidant renal enzymes after acute exposure to lead acetate (0-50 mg/kg): (a) glutathione peroxidase (GPx), (b) catalase (CAT), (c) superoxide dismutase (SOD), (d) thioredoxin reductase-1 (TrxR-1). Data are expressed as means \pm SEM (n=5-8). #Different from all other groups ($P < 0.01$). *Different from other groups at the same time ($P < 0.05$). &Different from all other groups ($P < 0.0001$).

Fig. 3. Effect of chronic exposure to lead acetate on body weight of rats. Data are expressed as means (n=7-8). SEM bars did not appear because they were lower than line markers. The body weight was registered before the daily i.p. injection of saline (control) or lead acetate (5 or 25 mg/kg) during 30 days. *Different from control in the same day ($P < 0.05$).

Table 1

Effect of chronic exposure (30 days) to lead acetate (AcPb) on δ -aminolevulinate dehydratase activity (ALA-D), glutathione S-transferase, non-protein thiol groups levels (NPSH), and antioxidant enzymes activity in kidney, and uric acid plasma levels

	Control	5 mg/kg AcPb	25 mg/kg AcPb
ALA-D (nmol PBG/h/mg protein)	1.31 \pm 0.16 ^a	0.76 \pm 0.07 ^b	0.38 \pm 0.07 ^c
Glutathione S-transferase (nmol CDNB conjugated/min/mg protein)	60.93 \pm 11.67 ^c	116.34 \pm 18.14 ^b	215.78 \pm 22.51 ^a
NPSH (nmol NPSH/mg protein)	17.43 \pm 2.40 ^c	34.36 \pm 2.82 ^b	46.05 \pm 3.03 ^a
Glutathione peroxidase (nmol NADPH/min/mg protein)	21.61 \pm 4.74 ^a	21.42 \pm 1.58 ^a	20.37 \pm 1.93 ^a
Catalase (k/g protein)	117.44 \pm 9.11 ^b	171.05 \pm 10.82 ^a	101.59 \pm 11.29 ^c
Superoxide dismutase (U/mg protein)	7.76 \pm 0.88 ^a	9.10 \pm 0.85 ^a	7.61 \pm 0.97 ^a
Thioredoxin reductase-1 (nmol DTNB/min/mg protein)	5.63 \pm 0.79 ^b	9.88 \pm 1.93 ^a	4.11 \pm 1.37 ^b
Uric acid (mg/dL)	0.46 \pm 0.07 ^b	1.06 \pm 0.148 ^a	0.93 \pm 0.12 ^a

Data are expressed as means \pm SEM (n=7-8).

Values within the same line that have different letters are significantly different (p<0.05).

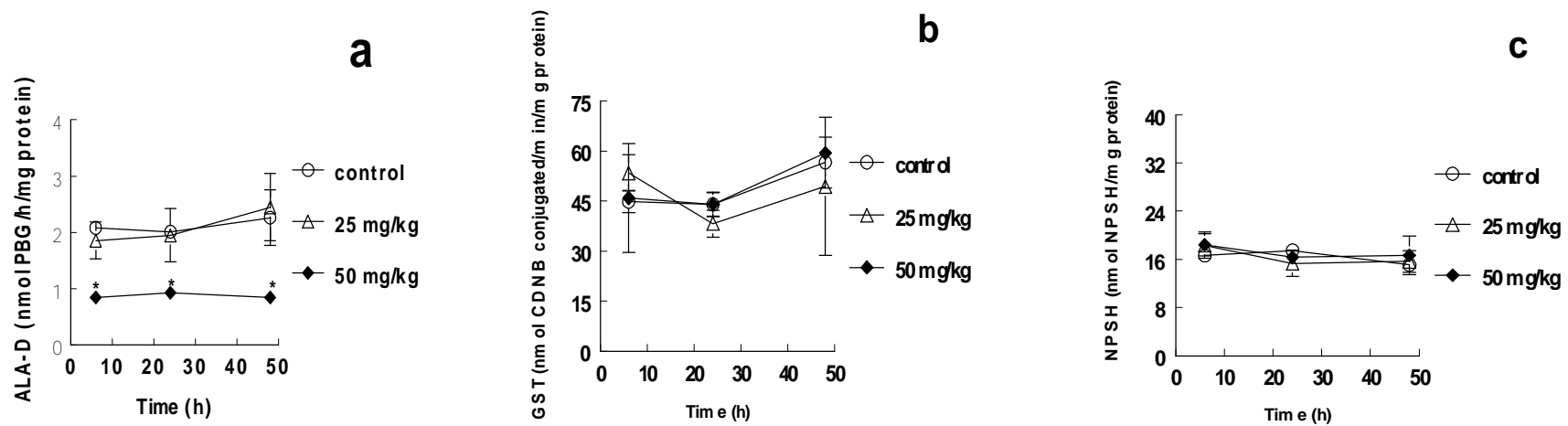


Fig. 1

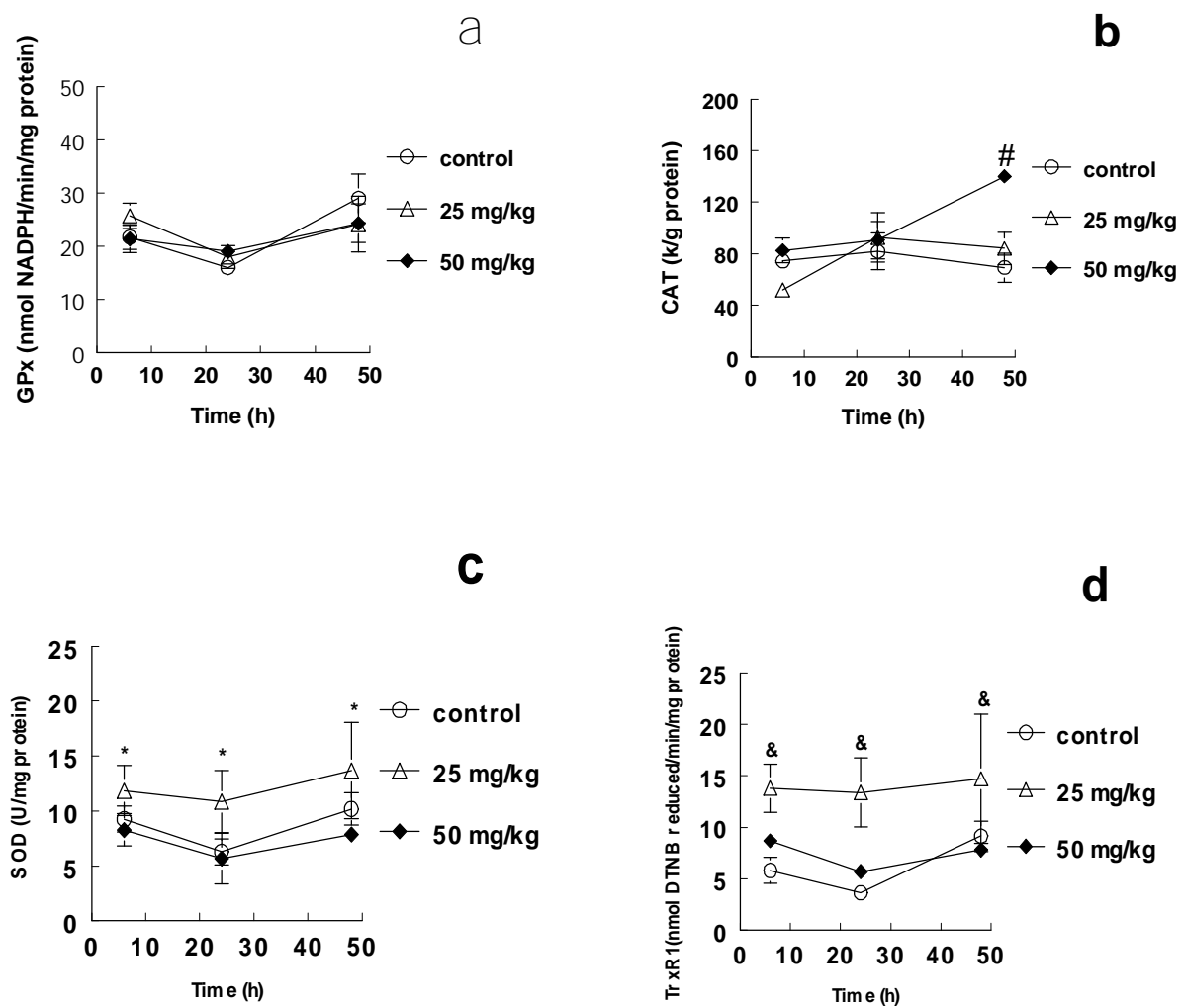


Fig. 2

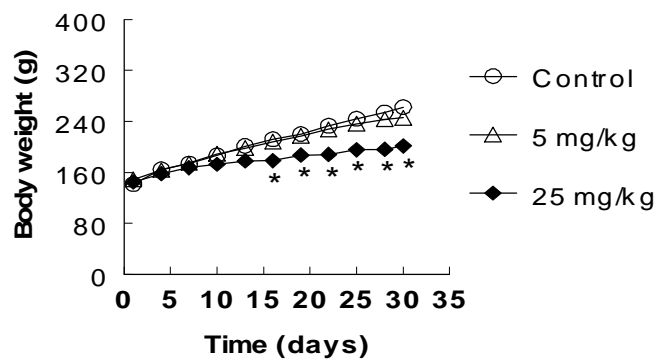


Fig. 3

4 DISCUSSÃO

O chumbo é conhecido por prejudicar o balanço pró-oxidante/antioxidante dos tecidos e evidências experimentais sugerem que o dano celular mediado por radicais livres pode estar envolvido na patologia associada à intoxicação pelo chumbo (Adonaylo & Oteiza, 1999). No presente estudo, foram avaliadas as alterações na atividade da enzima antioxidante tioredoxina redutase citosólica (TrxR1) após a exposição ao chumbo ao mesmo tempo em que foram comparadas com as alterações em outros parâmetros de estresse oxidativo que são comumente utilizados na avaliação da toxicidade do chumbo. Assim, através deste estudo, procurou-se determinar se as alterações na atividade da TrxR1 e demais parâmetros avaliados ocorreram em níveis de exposição fisiologicamente relevantes, já que a DL₅₀ para a injeção intraperitoneal em ratos é 150 mg/kg (Masci & Bongarzone, 1995). Foi encontrado que a TrxR1 renal é um indicador sensível da exposição ao chumbo, pois a sua atividade foi alterada após a exposição às menores doses de chumbo avaliadas neste estudo.

As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) são a primeira linha de defesa celular contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) e tem sido sugerido que o decréscimo de suas atividades contribui para o dano oxidativo nos tecidos (Sivaprasad et al., 2004). Neste estudo, não foram encontradas alterações na atividade da GPx, mas um aumento na atividade da CAT foi observado 48 horas após a exposição aguda a 50 mg/kg de acetato de chumbo e após 30 dias de exposição a 5 mg/kg de acetato de chumbo. Estes resultados estão de acordo com diferentes estudos que relataram um aumento na atividade da CAT nos eritrócitos (Gurer et al., 1998), cérebro, fígado e rim (Pande & Flora, 2002) de ratos expostos ao chumbo.

A SOD desempenha um importante papel na proteção contra os efeitos tóxicos do ânion radical superóxido (O_2^-) por catalisar a sua dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No presente estudo foi encontrado um aumento na atividade da SOD em ratos expostos à dose única de 25 mg/kg de acetato de chumbo, mas não em animais expostos à dose maior (50 mg/kg) ou quando os animais foram expostos cronicamente ao acetato de chumbo. Semelhante a estes resultados, foi

observado um aumento na atividade e expressão protéica de enzimas antioxidantes no rim de ratos após 12 semanas de exposição ao acetato de chumbo para a SOD e a CAT, mas não para a GPx (Farmand et al., 2005). O aumento nas atividades das enzimas antioxidantes neste estudo ocorreu provavelmente como uma resposta de defesa contra a toxicidade do chumbo. Entretanto, a atividade da GPx, a qual é importante na decomposição de baixas concentrações do H_2O_2 (Cohen & Hochstein, 1963), não acompanhou o aumento na atividade da SOD na exposição aguda, sugerindo um possível desequilíbrio no sistema antioxidante/oxidante.

Houve um aumento na atividade da TrxR1 nos ratos expostos às doses menores de acetato de chumbo tanto após a exposição aguda (25 mg/kg) quanto após a exposição crônica (5 mg/kg). O aumento induzido pelo chumbo na atividade da TrxR1 na exposição aguda iniciou antes de completar 6 horas após a injeção e persistiu por mais do que 48 horas após a exposição ao chumbo. Esse aumento ocorreu simultaneamente com o aumento da atividade da SOD na exposição aguda, o que pode indicar um papel para a TrxR1 na decomposição do H_2O_2 gerado pela SOD. A tioredoxina redutase (TrxR) é a única classe de enzimas capaz de reduzir a tioredoxina (Trx) oxidada (Mustacich & Powis, 2000). A Trx reduzida está envolvida na redução das peroxiredoxinas (Prxs), as quais removem espécies oxidantes como o H_2O_2 e os hidroperóxidos alquilas (Mustacich & Powis, 2000).

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da exposição ao chumbo sobre a atividade da TrxR de mamíferos. No entanto, outros estudos recentes relataram que a atividade desta enzima foi afetada por outros metais em cultura de células. A TrxR de linhagens de células hepáticas humanas foi induzida após a exposição de 2 à 3 horas ao alumínio, cobre, selenito, zinco e cádmio (Jung et al., 2004). Sakurai et al. (2005) relataram que o cádmio super-regula os níveis do RNAm da TrxR em células do endotélio arterial de bovinos por ativar o fator 2 relacionado ao NF-E2 (Nfr2), que é um fator transcricional responsivo ao estresse.

Apesar do mecanismo de ativação da TrxR1 pelo chumbo ainda não estar elucidado, existem vários relatos que mostram que a super-regulação da Trx e da TrxR tem um efeito protetor contra o estresse oxidativo intracelular (Park *et al.*, 2005). Jung *et al.* (2004) demonstraram que o peróxido de hidrogênio (5 mM) produziu um aumento significativo na atividade da TrxR em células hepáticas humanas cancerosas (hepatomas) e em células hepáticas normais. A exposição de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) às concentrações baixas de

acroleína (um aldeído α,β -insaturado e um dos produtos da lipoperoxidação) inativou diretamente a TrxR e aumentou o dano oxidativo celular. Entretanto, a inativação inicial das moléculas da TrxR desencadeou um sinal compensatório para a indução da expressão gênica desta enzima (Park *et al.*, 2004). Similarmente, Park *et al.* (2002) também relataram que a exposição de HUVEC a um doador de peróxinitrito (SIN-1) resultou em uma inativação inicial das moléculas de TrxR e conseqüentemente, na indução da expressão gênica da TrxR como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. De acordo com estes relatos, estudos sugerem que o resíduo de selenocisteína nas tioredoxinas redutases (TrxRs) atua como um sensor redox da célula, já que quando as células produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), a selenocisteína do sítio ativo é oxidada, enquanto a expressão destas enzimas é elevada (Sun *et al.*, 1999).

Um mecanismo pelo qual a exposição ao chumbo aumenta a atividade da TrxR1 poderia envolver a participação do cálcio. Estudos sugerem que proteínas que naturalmente ligam cálcio são alvos da ligação com o chumbo, o que contribui para o desenvolvimento dos sintomas associados à intoxicação pelo chumbo (Bouton *et al.* 2001). Rigobello *et al.* (2006) demonstraram que a TrxR1, mas não a TrxR2 foi inibida por concentrações submicromolares de cálcio e esta inibição ocorreu devido às alterações conformacionais na isoforma citosólica induzidas por este metal, o que sugere que o cálcio poderia agir como um regulador fisiológico do sistema da tioredoxina. Esta hipótese foi sustentada por estudos anteriores que também relataram um efeito inibitório do cálcio sobre a atividade da TrxR (Schallreuter *et al.* 1986; 1989; Gitler *et al.*, 2002; Gromer *et al.* 2004). Em função da competição do chumbo com o cálcio no organismo em muitos processos fisiológicos, pode-se sugerir que o chumbo também poderia interferir na inibição fisiológica da atividade da TrxR1 pelo cálcio. No entanto, estudos posteriores deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

Semelhante à atividade da SOD na exposição aguda e à atividade da CAT na exposição crônica, a atividade da TrxR1 permaneceu inalterada após exposição às maiores doses de acetato de chumbo usadas neste estudo, indicando um efeito bifásico do chumbo. Possivelmente, maiores doses de chumbo resultariam na inativação destas enzimas, já que tem sido demonstrado que a exposição ao chumbo e o estresse oxidativo resultante podem modificar o sítio ativo de enzimas antioxidantes (Valenzuela *et al.*, 1989). Nishimoto *et al.* (2006) demonstraram que

células HeLa com supressão da TrxR1 exibiram maior sensibilidade à doses baixas de cádmio (menores do que 10 μM) e menor sensibilidade à doses altas, o que sugere que a TrxR1 poderia desempenhar uma importante função na defesa celular contra o cádmio por dois caminhos: possível recuperação das células contra a injúria moderada induzida por baixas doses de cádmio e indução da morte de células severamente injuriadas por altas doses de cádmio. Assim, uma possível função desempenhada pela TrxR1 na exposição ao chumbo estaria relacionada aos níveis deste metal.

Apesar de estudos demonstrarem que a exposição ao chumbo pode causar a depleção de grupos tiólicos não-protéicos (SHNP) e da glutathiona (GSH) em uma variedade de sistemas biológicos (Tandon *et al.*, 2002; Jurczuck *et al.*, 2006), neste estudo, os níveis renais de SHNP aumentaram de maneira dose-dependente em ratos expostos cronicamente a 5 e 25 mg/kg. Também foi observado um aumento dose-dependente na atividade da glutathiona S-transferase (GST) na exposição crônica. Patra *et al.* (2001) relataram um aumento nos níveis de SHNP no cérebro, mas nenhuma alteração nos níveis de SHNP no fígado e no rim de ratos expostos ao chumbo durante quatro semanas. De acordo com os resultados do presente estudo, Daggett *et al.* (1998) observou um aumento dos níveis renais de glutathiona (GSH) e na expressão e atividade da glutathiona S-transferase (GST) após exposição ao acetato de chumbo. Glutathiona S-transferases (GSTs) são enzimas responsáveis pela conjugação de substratos eletrofílicos e de xenobióticos com a GSH, proporcionando a excreção do conjugado (Listowisky *et al.*, 1988). O chumbo forma um complexo termodinamicamente estável com a GSH (Ballatori, 1994) e a formação deste conjugado é favorecida pelas isoenzimas da GST, facilitando assim, a excreção do chumbo. Por isso, a GST e a GSH desempenham um papel potencial na redução da toxicidade do chumbo.

O aumento na atividade de enzimas antioxidantes e de grupos tiólicos não-protéicos após a exposição a agentes tóxicos é geralmente considerado como uma resposta de defesa e acredita-se que seja desencadeado como resultado do estresse oxidativo (Nordberg & Arnér, 2001; Farmand *et al.*, 2005). Todavia, tanto a exposição aguda como a exposição crônica ao chumbo não alteraram os níveis renais de TBARS neste estudo. De fato, os relatos existentes na literatura sobre as alterações nos níveis de TBARS induzidas pelo chumbo são contraditórios. Os resultados do presente estudo estão de acordo com Patra *et al.* (2001) que

encontraram níveis de TBARS aumentados no fígado e no cérebro, mas não nos rins de ratos após a exposição ao chumbo. Por outro lado, Perottoni et al. (2005) encontraram uma redução nos níveis de TBARS nos rins de ratos intoxicados. Os autores atribuíram este decréscimo à competição do chumbo acumulado no rim com os íons ferro, que são iniciadores da peroxidação lipídica. Jurczuck et al. (2005) encontraram correlações negativas entre as concentrações hepáticas e renais de GSH e/ou SHNP e os níveis de malondialdeído (MDA), sugerindo que o decréscimo das concentrações de GSH e SHNP no fígado e rim de ratos expostos ao chumbo está envolvido nos mecanismos da ação peroxidativa do chumbo nestes órgãos. Por outro lado, Daggett et al. (1998) observaram que os níveis aumentados de GSH e da GST foram bem correlacionados com as alterações histopatológicas no rim induzidas pelo chumbo, mas foram independentes do estresse oxidativo, já que não foram observadas alterações nos níveis de TBARS. A função biológica da GSH está diretamente associada à presença de grupos sulfidrílicos (SH) reduzidos (Jurczuck et al., 2006). A glutatona pode reagir diretamente com radicais livres e com produtos da peroxidação lipídica, bem como atuar como substrato ou co-fator em reações enzimáticas antioxidantes, desempenhando, portanto, seu papel essencial na defesa contra o estresse oxidativo (Tandon et al. 2002). Assim, a ausência de alteração dos níveis renais de TBARS observada neste estudo pode ser devido ao aumento dos níveis de SHNP e/ou na atividade de enzimas antioxidantes, o que pode ter sido efetivo na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente, na prevenção da peroxidação lipídica no rim.

Estudos mostram uma forte associação entre a exposição ao chumbo e efeitos prejudiciais à função renal. A hiperfosfatúria é uma das manifestações decorrentes da exposição aguda à altas doses de chumbo, como uma conseqüência do dano aos túbulos proximais, e as alterações nos níveis de creatinina plasmática e na depuração de creatinina, são usados como indicadores de danos tardios em humanos (ATSDR, 1992). No presente estudo, não houve alterações nos níveis plasmáticos de fosfatos ou creatinina tanto na exposição aguda como na exposição crônica. Por outro lado, um aumento nos níveis plasmáticos de ácido úrico foi observado após a exposição a 5 e 25 mg/kg de acetato de chumbo durante 30 dias, o que sugere danos na função renal. Como na exposição aguda a 25 mg/kg de acetato de chumbo as alterações na atividade da SOD e da TrxR1 não foram

acompanhadas por alterações nestes indicadores plasmáticos, sugere-se que estas enzimas poderiam ser indicadores primários da exposição ao chumbo.

A δ -ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para a sua atividade (Jaffe et al., 1995) e catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido δ -aminolevulínico (ALA) a porfobilinogênio no passo inicial da biossíntese do grupo heme (Gibson et al., 1955). Por ser também uma enzima que contém grupos sulfidrílicos no sítio ativo, metais como o mercúrio e o chumbo e outros compostos que oxidam grupos sulfidrílicos, modificam a sua atividade (Rocha et al., 1995; Goering, 1993; Emanuelli et al., 1996). Em função dessa elevada afinidade do chumbo por grupos sulfidrílicos da δ -ALA-D, a atividade desta enzima é considerada um importante índice dos efeitos subcríticos do chumbo (Al-Saleh, 1994; Simmonds et al., 1995). Neste estudo, a atividade da δ -ALA-D foi inibida na dose de 5 e 25 mg/kg de acetato de chumbo após exposição crônica, mas na exposição aguda a inibição foi observada apenas na maior dose de acetato de chumbo (50 mg/kg), o que sugere que as alterações nas enzimas antioxidantes são mais adequadas do que a atividade da ALA-D para avaliar a exposição aguda à doses baixas de chumbo. A redução no ganho de peso corporal observada nos animais expostos à 25 mg/kg de acetato de chumbo na exposição prolongada parece não estar envolvida nos efeitos bioquímicos do chumbo, já que todas as alterações bioquímicas foram também ou somente observadas nas menores doses de acetato de chumbo (5 mg/kg).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que há uma resposta complexa de moléculas antioxidantes contra o estresse oxidativo induzido pelo chumbo. A exposição ao chumbo causou um aumento pronunciado na atividade da TrxR1 renal de ratos e este foi o único parâmetro afetado por doses baixas de chumbo tanto na exposição aguda como na exposição crônica. As alterações na atividade da TrxR1, acompanhadas pelas alterações na atividade da SOD podem ser um indicador primário da exposição aguda à doses baixas de chumbo. Todavia, será necessária a realização de estudos posteriores para esclarecer o significado biológico desta indução, bem como o mecanismo envolvido neste efeito.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicam que:

→ A exposição ao chumbo não alterou os níveis de TBARS e a atividade da GPx.

→ A exposição prolongada ao chumbo provocou um aumento dose-dependente nos níveis de SHNP e na atividade da GST, inibição dose-dependente na atividade da δ -ALA-D e aumento dose-independente nos níveis plasmáticos de ácido úrico;

→ A exposição aguda à maior dose de acetato de chumbo (50 mg/kg) provocou a inibição da atividade da δ -ALA-D, no entanto não foram observadas alterações nos indicadores da função renal.

→ A exposição ao chumbo exerceu um efeito bifásico na atividade da CAT, SOD e TrxR1, tanto na exposição aguda quanto na exposição crônica: menores doses de chumbo aumentaram suas atividades, enquanto maiores doses não alteraram.

→ A atividade da tioredoxina redutase-1 renal pode ser um indicador sensível da exposição ao chumbo, já que foi afetada nas menores doses de chumbo avaliadas neste estudo tanto na exposição aguda, como na exposição crônica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONAYLO, V. N.; OTEIZA, P.I. **Lead intoxication: Antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain.** *Toxicology*. v. 135, p. 77-85, 1999.

AL-SALEH, I. A. S. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. **Medicinal Research Reviews**. v. 14, p.415-486, 1994.

ANDERSSON, M.; HOLMGREN, A.; SPYROU, G. NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 10116-10120, 1996.

ANESTAL, K.; ARNÉR, E. S. J. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 15966-15972, 2003.

ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**. v. 267, p. 6102-6109, 2000.

ATSDR. **Case studies in environmental medicine: lead toxicity.** U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1992.

ASTDR. **Toxicological profile for lead.** U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1993.

ASTDR. **Toxicological profile for lead.** U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

ASTDR. **Case studies in environmental medicine: lead toxicity.** U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.

BAIRD, C. Metais pesados tóxicos. In: **Química Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Bookman, 2002. p. 403-439.

BALLATORI, N. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. **Advances in Pharmacology**. v. 27, p. 271-298, 1994.

BANDO, I. et al. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 19, n. 3, p. 154-161, 2005.

BERGGREN, M. et al. Cellular thioredoxin reductase activity is regulated by selenium. **Anticancer Research**. v. 17, p. 3377-3380, 1997.

BJÖRNSTEDT M. et al. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, p. 29382-29384, 1994.

BOUTON, C. M. L. S. et al. Microarray analysis of differential gene expression in lead-exposed astrocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 176, p. 34-53, 2001.

CAMPAGNA D. et al. Environmental lead exposure and activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. **Toxicology**. v. 134, p.143-152, 1999.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. **Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.346, n. 2, p. 171-179, 1997.

CHOIE, D. D.; RICHTER, G. W. Effects of lead on the kidney. In: Singhal, R. L., Thomas J. A. **Lead toxicity**. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 1980. p. 187-211.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**. v. 2, p. 1420-1428, 1963.

DAGGETT, D.A. et al. **Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress**. **Toxicology**. v. 128, p. 191-206, 1998.

EL-SOKKARY, G. H.; ABDEL-RAHMAN, G. H.; KAMEL E. S. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. **Toxicology**. v. 213, p. 25-33, 2005.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacology & Toxicology**. v. 79, p. 138-143, 1996.

ENGMAN, L. et al. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anti-cancer Drug Design**. v. 15, p. 323-330, 2000.

FARMAND, F. et al. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. **Environmental Research**. v. 98, p. 33-39, 2005.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 59, p. 374-379, 2005.

FLORA, J. S.; PANDE, M.; MEHTA, A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. **Chemico-biological Interactions**. v. 145, p. 267-280, 2003.

FUJIWARA, N. Roles of N-terminal active cysteines and C-terminal cysteine-selenocysteine in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase. **Journal of Biochemistry**. v. 129, p. 803-812, 2001.

GIBSON, K. D.; NEUREBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemistry Journal**. v. 61, p. 618-629, 1955.

GITLER, C. et al. Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 290, p. 624-628, 2002.

GODWIN, H. A. The biological chemistry of lead. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 5, p. 223-227, 2001.

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

GOYER, R. A.; MOORE, J. F. Lead-induced inclusion bodies: composition and probable role in lead metabolism. **Environmental Health Perspectives**. p.121-127, 1974.

GOYER, R. A. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 46, p. 153-162, 1989.

GOYER, R. A. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. **Environmental Health Perspectives**. v. 86, p. 177-181, 1990.

GOYER, R. A. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. **Environmental Health Perspectives**. v. 104, p. 1050-1054, 1996.

GROMER, S. et al. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 20096-20101, 1998.

GROMER, S.; URIG, S.; BECKER, K. The thioredoxin system-from science to clinic. **Medicinal Research Reviews**. v. 24, p. 40-89, 2004.

GURER, H. et al. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead exposed rats. **Toxicology**. v. 128, p.181-189, 1998.

GURER, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 29, p. 927-945, 2000.

HANSEN, J.M.; ZHANG, H.; JONES, D.P. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 40, p. 138-145, 2006.

HERMES-LIMA, M. et al. Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1056, p.57-63, 1991.

HILL, K.E. et al. Thioredoxin reductase is decreased by selenium deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 234, p. 293-295, 1997.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**. v. 252, p. 199-208, 1995.

HOLMGREN, A.; LYCKEBORG, C. Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 77, p. 5149-5152, 1980.

JAFFE, E. K. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia Coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry**. v. 34, p. 244-251, 1995.

JUNG H-I. et al. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. **Yonsei Medical Journal**. v. 45, n.2, p. 263-272, 2004.

JURCZUCK, M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; BRZÓSKA, M.M. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. **Toxicology**. v. 219, p.11-21, 2005.

KLAASSEN, C.D. Metais pesados e seus antagonistas. In: GILMAN, A. Goodman et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 1061-1065.

KOSNETT, M. J. Intoxicação por metais pesados & quelantes. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 867-870.

KUMAR, S.; BJÖRNSTEDT, M.; HOLMGREN, A. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. **European journal of biochemistry / FEBS**. v. 207, p. 435-439, 1992.

LACHANT, N. A., TOMODA, A., TANAKA, K.R. Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. **Blood**. v. 63, p. 518-524, 1984.

- LAURENT, T.C.; MOORE, E.C.; REICHARD, P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. iv. isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from Escherichia Coli B. **The Journal of biological chemistry**. v. 239, p. 3312-3320, 1964.
- LAWTON, L. J.; DONALDSON, W.E. Lead induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. **Biological Trace Element Research**. v. 28, p.83-97, 1991.
- LISTOWISKY, I. et al. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferases. **Drug Metabolism Reviews**. v. 19, p. 305-318, n. 3-4, 1988.
- LIN, S. et al. Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. **Chemical Research in Toxicology**. v. 14, p. 305-311, 2001.
- LOCKITCH, G. Perspectives on lead toxicity. **Clinical Biochemistry**. v.26, p. 371-381, 1993.
- LUNDSTRÖM, J.; HOLMGREN, A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265, p. 9114-9120, 1990.
- LUTHMAN, M.; HOLMGREN, A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. **Biochemistry**. v. 21, p. 6628-6633, 1982.
- MADEJA, Z. et al. The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. **Biochemical Pharmacology**. v. 69, p. 1765-1772, 2005.
- MAITANI.; T, WATAHIKI, A.; SUZUKI, K. T. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 83, n. 2, p. 211-217, 1986.
- MARCOCCI, L.; FLOHE, L.; PACKER, L. Evidence for a functional relevance of the selenocysteine residue in mammalian thioredoxin reductase. **Biofactors**. v. 6, p. 351-358, 1997.
- MASCI, O.; BONGARZONE, R. Toxicity of lead. In: Castellino, N.; Castellino, P.; Sanolo, N. Eds.). **Inorganic Lead Exposure: Metabolism and Intoxication**. Boca Raton: Lewis, 1995. p.203-213.
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes Tóxicos contaminantes diretos de alimentos. In: **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. cap. 3, p. 61-130.
- MOFFATT, P.; DENIZEAU, F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. **Drug Metabolism Reviews**. v. 29, n. 1-2, p. 261-307, 1997.
- MUSHAK, P.; CROCKETTI, A.F. **Determination of numbers of lead-exposed american children as a function of lead source**: Integrated summary of a report to

the U.S. Congress on childhood lead poisoning. **Environmental Research**. v. 50, p. 211-229, 1989.

MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **The Biochemical Journal**. v. 346, p. 1-8, 2000.

NEDER, A. V. F.; COTTA, T. A. R. G. **Redução dos riscos de exposição ambiental e ocupacional ao chumbo**. Projeto MMA/OPAS. Brasília, 1999.

NISHIMOTO, M.; SAKAUE, M.; HARA, S. Short-interfering RNA-mediated silencing of thioredoxin reductase 1 alters the sensitivity of HeLa cells toward cadmium. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 29, n.3, p. 543-546, 2006.

NOLAN, C. V.; SHAIKH, Z. A. **Lead nephrotoxicity and associated disorder: biochemical mechanisms**. **Toxicology**. v. 73, 127-146, 1992.

NORDBERG J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NORDBERG, J. et al. Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 10835-10842, 1998.

PAL, S.; CHATTERJEE, A. K. Possible beneficial effects of melatonin supplementation on arsenic-induced oxidative stress in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 29, n. 4, p. 423-433, 2006.

PANDE, M.; FLORA, S. J. S. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. **Toxicology**. v. 177, p.187-196, 2002.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. 144 p.

PARK, Y. S. et al. Induction of thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells. **Biological Chemistry**. v. 383, p. 683-691, 2002.

PARK, Y. S. et al. Induction of thioredoxin reductase as an adaptative response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 327, p. 1058-1065, 2004.

PARMIGIANI, M. P. C. V. D.; MIDIO, A. F. Chumbo na alimentação da população infantil. In: **Cadernos de nutrição**. São Paulo, 1995. v. 9, p. 25-34.

PATOCKA, J., CERNY, K. Inorganic lead toxicology. **Acta Medica (Hradec Kralove)**. v. 46, n.2, p.65-72, 2003.

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**. v. 162, p. 81-88, 2001.

PAYTON, M. et al. Low-level lead exposure and renal function in the normative aging study. **American Journal of Epidemiology**. v. 140, p. 821-829, 1994.

PEROTTONI J. et al. Ebselen and diphenil diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinatase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 19, n.2, p. 239-248, 2005.

POWIS, G., MONTFORT, W.R. Properties and biological activities of thioredoxins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**. v. 30, p. 421-455, 2001.

RABINOWITZ, M. B.; WETHERILL, G. W.; KOPPLE, J. D. Kinetic analysis of lead metabolism in health humans. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 58, n.2, p. 260-270, 1976.

RIGOBELLO, M.P. et al. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 98, p. 1634-1641, 2004.

RIGOBELLO, M. P. et al. Differential effect of calcium íons on the cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 343, p. 873-878, 2006.

ROCHA, J.B.T. et al. 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 sucling rats. **Toxicology**. v. 100, p. 27-37, 1995.

SADAO, M. Intoxicação por chumbo. **Revista de Oxidologia**. p.37-42, jan./fev./mar. 2002.

SAKURAI, A. et al. **Transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 expression by cadmium in vascular endothelial cells: role of NF-E2-related factor-2**. **Journal of Cellular Physiology**. v. 203, p. 529-53, 2005.

SARYAN, L. A.; SENZ, C. Lead and its compounds. In: ZENS, C.; DICKERSON, O. B.; HORVATH, E. P. **Occupational Medicine**. Mosby, p. 506-541, 1994.

SAXENA, G.; PATHAK, U.; FLORA, S.J.S. Beneficial role of monoesters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in the mobilization of lead and recovery of tissue oxidative injury in rats. **Toxicology**. v. 214, p. 39-56, 2005.

SCHALLREUTER, K. U. et al. The role of calcium in the regulation of free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of the skin. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 28, p. 227-238, 1986.

SCHALLREUTER, K. U.; PITTELKOW, M. R.; WOOD, J. M. EF-hands calcium binding regulates the thioredoxin reductase/thioredoxin electron transfer in human keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 162, p. 1311-1316, 1989.

SHIFFER, T. dos S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. **Infarma**. v. 17, n. 5-6, p.67-72, 2005.

SILBERGELD, E. K.; ADLER, H. S. Subcellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Brain Research**. v. 148, n.2, p. 451-467, 1978.

SILVA, N. R. **Avaliação da protoporfirina IX eritrocitária como índice da exposição ocupacional ao chumbo**. 1983. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

SIMMONDS, P. L.; LUCKHURST, C. L.; WOODS, J. S. Quantitative evaluation of heme biosynthetic pathway parameters as biomarkers of low-level lead exposure in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 44, p. 351-367, 1995.

SIVAPRASAD, R; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. **Archives of Toxicology**. v. 76, p. 437-441, 2002.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M., VARALAKSHMI, P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 15, p. 18-23, 2004.

SPÍNOLA, A. G.; FERNÍCOLA, N.A. G. G., MENDES, R. 1980. Intoxicação profissional por chumbo. In: **Medicina do Trabalho - Doenças Profissionais**. São Paulo: Sarvier. p. 437-460.

STAESSEN, J.A. et al. Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations in the general population. **The New England Journal of Medicine**. v. 327, p. 151-156, 1992.

SUN, Q. A. et al. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 24522-24530, 1999.

TANDON, S.K. et al. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. **Environmental Research Section A**. v. 90, p. 61-66, 2002.

TSALEV, D. L.; ZAPRIANOV, Z. K. Lead. In: **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**. Florida: CRC Press, 1985. p.137-150.

VALENZUELA, A. et al. Effects of lead acetate on cerebral glutathione peroxidase and catalase in the suckling rat. **Neurotoxicology**. v. 10, p.63-70, 198

9.

VYSKOCIL A. et al. Dose-related proximal tubular dysfunction in male rats chronically exposed to lead. **Journal of Applied Toxicology**. v. 9, p. 395-399, 1989.

WHO. World Health Organization. **Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead**. Geneva: WHO, 1995.

WITTE, A-B. et al. Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 39, p. 696-703, 2005.

ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 18121-18128, 2000.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A – Comprovante de submissão do manuscrito “Effect of lead acetate on renal cytosolic thioredoxin reductase activity and indicators of lead poisoning” à Revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*

De: "Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology" tludvig@health.sdu.dk
Para: etaty@terra.com.br
Data: Mon, 11 Dec 2006 15:06:10 +0100
Assunto: Manuscript Receipt MS 754

From: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology
Manuscript title: Effect of lead acetate on renal cytosolic thioredoxin reductase activity and indicators of lead poisoning
Corresponding Author: Mrs. Emanuelli
Manuscript ID: BCPT6O754

LOGIN INSTRUCTIONS:

Login at: <http://www.manuscriptmanager.com/bcpt/login1.php>
with your email: etaty@terra.com.br and password: tatiana28
(If the link is de-activated paste the URL <http://www.manuscriptmanager.com/bcpt/login1.php> into an internet browser address line.)

Dear Mrs. Emanuelli

Thank you very much for submitting the above manuscript to *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. The manuscript is being evaluated and we will contact you as soon as a decision has been made.

(Acrobat reader 4.0 or a later version needs to be installed on your computer in order to view the downloaded file. If you do not have this application, it can be downloaded free of charge from www.adobe.com/support/downloads/main.html).

The progress of your manuscript can be followed by using your login details provided above. Also a pdf version of your article can be downloaded and checked.

Please inform us by return of email if this version does not correspond with the version that was submitted.

Yours sincerely,
Kim Brøsen MD

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

University of Southern Denmark

Winslowparken 19

DK 5000 Odense

Denmark

+45-3532-7644

fax:+45-3539-5068

tludvig@health.sdu.dk

<http://www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=1742-7835&site=1>