



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

Taíse Fonseca Pedroso

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHUMBO EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS: EFEITO PREVENTIVO DO
ZINCO E DA N-ACETILCISTEÍNA**

Santa Maria, RS
2017

Táise Fonseca Pedroso

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHUMBO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E COMPORTAMENTAIS: EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO E DA N-
ACETILCISTEÍNA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira

Santa Maria, RS, Brasil
2017

Táise Fonseca Pedroso

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHUMBO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E COMPORTAMENTAIS: EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO E DA N-
ACETILCISTEÍNA**

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

Aprovado em 30 de Janeiro de 2017

Maria Ester Pereira, Dr^a. (Presidente/Orientadora) (UFSM)

Ana Lúcia Anversa Segatto, Dr^a. (UFSM)

Margiani de Paula Fortes, Dr^a. (IFRS)

Santa Maria, RS

2017

Dedicatória

... Esta dissertação é dedicada a minha Mãe Dinair, que tanto me apoiou, me incentivou e me deu força para que não desistisse mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A minha mãe Dinair, pela credibilidade, apoio, incentivo e apoio em toda a vida.

As minhas irmãs, Gabi e Greici pela amizade, cumplicidade, apoio, e compreensão pela minha ausência.

A minha orientadora, prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira, por toda paciência e ensinamentos passados, sinto-me muito feliz e orgulhosa de tê-la como orientadora.

Aos colegas de laboratório pela paciência, companheirismo, ensinamentos e ajuda.

Em especial a Cláudia, que além de colega de laboratório tornou-se uma grande amiga. Obrigada por toda paciência, amizade, ajuda, (muitos) ensinamentos e a grande boa vontade por todo esse tempo de lab.

“Azamiga do lab” Lidiane e Jamile, por todas as risadas, momentos de descontração, de estudos e força que demos uma para as outras durante essa jornada.

Aos ex-colegas de laboratório, Vitor, Tiago e Michael, por todo suporte me concedido com toda boa vontade durante esta dissertação.

A minha amiga, Mariana, por toda amizade e cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao lado, no lab e na vida. Sei que posso contar contigo sempre e para tudo mesmo com toda essa distância de agora.

As gurias de Santiago e as amigas da Farmácia, que mesmo um não tão perto me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

Ao Ricardo, meu namorado pelo apoio, dicas de formatação, todos os cafés e a imensa paciência para aguentar minhas loucuras e desesperos.

A banca examinadora, Margiani e Ana Lúcia, por disporem do seu tempo para a avaliação deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

A CAPES pela Bolsa de Pós-Graduação concedida.

Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que de uma forma ou outra me ajudaram no decorrer do meu mestrado.

A todos que, mesmo não estando citado aqui, contribuíram na minha formação profissional e pessoal por toda vida acadêmica, muito obrigada.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CHUMBO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS: EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO E N-ACETILCISTEÍNA

AUTOR: TAÍSE FONSECA PEDROSO
ORIENTADORA: MARIA ESTER PEREIRA

O chumbo (Pb) é um metal tóxico, sem função biológica, o qual pode provocar várias alterações indesejadas no organismo. Animais em desenvolvimento apresentam maior sensibilidade à agressões externas, e a exposição ao Pb poderá provocar danos pronunciados e até mesmo irreversíveis. Alguns trabalhos sugerem que o cloreto zinco ($ZnCl_2$) e a N-acetilcisteína (NAC) possuem ação detoxificante, podendo então, ter um efeito protetor frente a uma intoxicação com Pb. Sendo assim, buscamos investigar o efeito tóxico do acetato de chumbo (AcPb) em parâmetros bioquímicos e comportamentais, quando administrado em animais em desenvolvimento, e a possível ação protetora do $ZnCl_2$ e da NAC sobre esta toxicidade. Para isso ratos Wistar jovens receberam subcutaneamente: salina, $ZnCl_2$ (27 mg/kg), NAC (5 mg/kg) ou $ZnCl_2$ mais NAC do 3º ao 7º; e AcPb (7 mg/kg) ou salina do 8º ao 12º dia de idade. Os animais foram submetidos às tarefas comportamentais: geotactismo negativo, imersão da cauda, teste do becker e campo aberto para avaliação de danos neurológicos e motores. Foram sacrificados aos 33 dias e as amostras biológicas foram guardadas para análises posteriores. Avaliou-se: o peso corporal; a atividade das enzimas porfobilinogênio-sintase (PBG-sintase) em sangue, acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e cerebelo; níveis de hemoglobina (Hb) em sangue total, de ureia e creatinina em soro; níveis de metalotioneínas (MT) em sangue, fígado e cérebro; dosagem de metais em sangue, cérebro e cerebelo. Filhotes expostos ao AcPb apresentaram diminuição da atividade da PBG-sintase de sangue, sem alterações no conteúdo de Hb. O $ZnCl_2$ preveniu parcialmente a inibição PBG-sintase. O AcPb causou diminuição na atividade da AChE de cérebro, enquanto os tratamentos com $ZnCl_2$, NAC e $ZnCl_2$ mais NAC preveniram essa alteração. Além disso, os animais expostos ao AcPb apresentaram acúmulo de Pb em sangue e cérebro; todos os tratamentos preventivos diminuíram os níveis de Pb. Em resumo, os resultados mostram que houve um acúmulo de Pb nos tecidos onde houve inibição das enzimas, que são importantes biomarcadores de toxicidade; acredita-se que a inibição ocorra através da ligação do metal aos grupamentos tióis das enzimas. Quanto aos tratamentos preventivos, o efeito protetor do zinco pode estar ligado a indução de proteínas ligantes de metais. Ainda, sugere-se que a proteção exercida pela NAC está ligada a sua capacidade quelante.

Palavras-chave: Filhotes. Desenvolvimento. Porfobilinogênio-sintase. Acetilcolinesterase. Prevenção.

ABSTRACT

LEAD TOXICITY EVALUATION ON BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL PARAMETERS: PREVENTIVE EFFECT OF ZINC AND N-ACETYLCYSTEINE

AUTHOR: TAÍSE FONSECA PEDROSO
ADVISOR: MARIA ESTER PEREIRA

Lead (Pb) is a toxic metal without biological function, which can cause various undesirable changes in organism. Developing animals are more sensitive to external aggressions, and exposure to Pb may cause pronounced and even irreversible damage. Studies show detoxifying action by zinc chloride (ZnCl₂) and N-acetylcysteine (NAC), suggesting same protective effect against intoxication with Pb. Therefore, we investigated the toxic effect of lead acetate (AcPb) on biochemical and behavioral parameters, in developing animals, and the possible protective effect of ZnCl₂ and NAC. For this young Wistar rats received subcutaneously: saline, ZnCl₂ (27 mg/kg), NAC (5 mg/kg) or more NAC ZnCl₂ from the 3rd to 7th; and AcPb (7 mg/kg) or saline from the 8th to 12th day of age. The animals were subjected to behavioral tasks: negative geotactismo, the tail immersion test beaker and open field to assess neurological damage and motors. They were sacrificed at 33 days and the biological samples were stored for further analysis. We assessed the body weight, the activity of porphobilinogen synthase (PBG synthase) in blood, acetylcholinesterase (AChE) in brain and cerebellum, hemoglobin (Hb) in whole blood, serum urea and creatinine, and blood, cerebrum and cerebellum levels. Pups exposed to AcPb presented a decrease of blood PBG-synthase activity, without changes in Hb content. ZnCl₂ pre-exposure partially prevented the PBG-synthase inhibition. Pb caused a decrease in the activity of brain AChE, while the treatment with ZnCl₂, NAC and ZnCl₂ more NAC prevented this change. In addition, animals exposed to AcPb presented Pb accumulation in blood and brain; all preventive treatments decreased Pb levels. In summary, the results show that there was an accumulation of Pb and inhibition of the activity of two enzymes, which are important biomarkers of toxicity. As preventive treatments, the protector effect of ZnCl₂ may related to its capacity of to induce the biosyntese of metal ligant proteins. As to NAC, it is probable that its protective effect is related to chelating effects.

Keywords: Pups. Development. Porphobilinogen synthase. Acetylcholinesterase. Prevention.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1 - Síntese de porfobilinogênio (PBG) através da condensação de duas moléculas do ácido aminolevulínico (δ -ALA)	20
Figura 2 - Hidrólise da ACh pela AChE no espaço sináptico	22
Figura 3 - Estrutura da NAC	25

2 ARTIGO 1

Figure 1- Latency of negative geotaxis reflex (A) submitted to test from day 3, 7, 9, 11 e 13 of age and latency of access to refuge (s) in the beaker test (B) submitted to test from days 17 to 20 of rats treated as described in Table 2. The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=8).....	52
Figure 2- PBG-synthase activity of rats treated as described in Table 2. The specific activity was expressed as nmol PBG/h/mg protein. The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=5). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups ($p \leq 0.05$)	53
Figure 3- Cerebrum (A) and cerebellum (B) AChE activities of rats treated as described in Table 2. The specific activity was expressed as μ mol ATC hydrolyzed/h/mg protein. The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=5-6). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups ($p \leq 0.05$)	54

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1- Absorção e eliminação do chumbo em adultos e crianças	17
Tabela 2- Índices biológicos de exposição ao Pb	18

2 ARTIGO 1

Table 1- Exposure protocol: the animals were subcutaneously (s.c.) exposed to saline (0.9%), ZnCl ₂ (27 mg/kg), NAC (5 mg/kg), or Zn+NAC (treatment 1), and saline or AcPb (7 mg/kg) (treatment 2)	50
Table 2- Body, cerebrum and cerebellum weights (g) of rats treated (s.c.) with saline (0.9%), ZnCl ₂ (27 mg/kg/day), NAC (1mg/kg/day) or ZnCl ₂ +NAC from 3 rd to 7 th day of age, and with saline or Ac ₂ Pb (7mg/kg/day) from 8 th to 12 th day of age. The animals were sacrificed 21 days after the last AcPb exposure The results are presented as mean ± S.E.M. (n=5-8)	51
Table 3- Crossing and rearing numbers and latency to leave the initial area in the open field task of rats treated as described in Table 1 and submitted to test at day 30. The results are presented as mean ±S.E.M. (n=8)	53
Table 4- Blood hemoglobin levels and serum urea and creatinine levels of rats treated as described in Table 2. The results are presented as mean ± S.E.M. (n=6-8)	55
Table 5- Liver, blood and cerebrum metallothionein levels of rats treated as described in Table 2. The results are presented as mean ± S.E.M. (n=5) and expressed in µg of SH/g of tissue	55
Table 6- Lead and zinc levels of rats treated as described in Table 2. The results are presented as mean ± S.E.M. (n=3-4). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among the groups at least p<0.05	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterase
AcPb: acetato de chumbo
ALA: ácido delta aminolevulínico
ANOVA: análise de variância
APA: Associação Pediátrica Americana
ATC: acetylthiocholine iodide (acetiltiocolina)
b.w.: body weight (peso corporal)
CDC: Centros de Controle de Doenças
DNA: ácido desoxirribonucléico
DTNB: 5-dithiobisnitrobenzoic acid (ácido 5-ditiobisnitrobenzóico)
EO: estresse oxidativo
ERS: espécies reativas
GSH: glutationa reduzida
Hb: hemoglobina
MT: metalotioneína
n: número de repetições
NAC: N-acetilcisteína
p: nível de significância
Pb: chumbo
PBG: porfobilinogênio
PBG-sintase: porfobilinogênio-sintase
pH: potencial hidrogeniônico
rpm: rotações por minuto
s.c.: subcutânea; subcutaneamente
S.E.M.: standard error of mean (erro padrão da média)
Sal: salina
SH: grupos sulfidrílicos
SNC: sistema nervoso central
Zn: Zinco
ZnCl₂: cloreto de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CHUMBO.....	14
1.1.1	EXPOSIÇÃO, ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO	16
1.1.2	EFEITOS TÓXICOS	17
1.2	PORFOBILINOGENO-SINTASE (PBG-SINTASE).....	20
1.3	ACETILCOLINESTERASE (ACHE)	21
1.4	ANIMAIS EM DESENVOLVIMENTO.....	22
1.5	ZINCO (ZN)	23
1.6	N-ACETILCISTEÍNA (NAC).....	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MANUSCRITO	28
4	CONCLUSÕES	57
5	REFERÊNCIAS.....	59

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada na seguinte forma: primeiramente encontra-se a introdução e os objetivos. Os métodos, os resultados e a discussão são apresentados na forma de manuscrito, o qual se encontra no item manuscrito com o título: Effects of zinc and N-acetylcysteine in damage caused by lead exposure in young rats. O item conclusão encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se somente as citações que aparecem no item introdução.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal divalente pertencente ao grupo 14 da tabela periódica, o qual possui número atômico 82, peso molecular 207,21 e ponto de fusão 327,5°C, sendo sólido à temperatura ambiente. Este metal é encontrado naturalmente na superfície terrestre, devido à erosão e à atividade vulcânica, na forma de compostos minerais como: sulfeto de chumbo, arsenato de chumbo, dióxido de chumbo, chumbo-tetraetila, chumbo tetrametila, litargirio, zarcão, alvaiade, dentre outros (CORDEIRO e LIMA FILHO, 1995; BERRAHA et al., 2007).

Apesar do Pb ser emitido por fontes naturais, o lançamento deste metal no ambiente teve um grande aumento após o processo de industrialização e ampliação da mineração. Este metal passou a ser muito utilizado em diversos processos como na fabricação de baterias, folhas de chumbo, cerâmicas (ATSDR, 2007), tintas e chumbadas de pesca (GODWIN, 2001; PANDE e FLORA, 2002), além de ser adicionado à gasolina como antidetonante; atualmente esta prática é proibida na maioria dos países. O Brasil foi um dos pioneiros a banir a adição de Pb na gasolina em 1989 (PONTES, 2002). Ainda, estudos relatam a presença de metais tóxicos, incluindo o Pb, em chás (LI et al., 2013; NAGARAJAN et al., 2014) e cosméticos como batom, sombra, hena e cremes (BOCCA et al., 2014), que geram grande preocupação quanto a utilização destes produtos.

Devido a ampla utilização, o Pb tornou-se um contaminante ambiental preocupante, visto que encontra-se incorporado ubiquamente nos solos, alimentos, poeira, ar e água (AL-SALEH, 1994; CORY-SLECHTA et al., 1995). Nriagu e Pacyma (1988) estimaram que 330.000 toneladas de Pb por ano foram diretamente despejados na atmosfera até a década de 80. Deste modo, a concentração média de Pb estimada no solo é de 10 a 20 mg/kg (SCHVARTSMAN, 1985; WHO, 1995); na atmosfera cerca de 0,0005 µg/m³ de ar (SCHVARTSMAN, 1985) e em águas superficiais em torno de 0,02 µg/L (WHO, 1995).

Sabendo-se que a contaminação ambiental pelo Pb ocorre principalmente em função do seu emprego industrial e na mineração (PAOLIELLO e CHASIN, 2001), alguns incidentes se destacam no Brasil:

Em 1993, no município de Santo Amaro da Purificação (Reconcavo Baiano), as instalações da empresa Plumbum Mineração e Metalurgia Ltda foram abandonadas,

deixando em suas propriedades e áreas adjacentes cerca de 490 mil toneladas de resíduos, contendo principalmente Pb e cádmio (Cd). Estes resíduos contaminaram boa parte da população da região, assim como o solo, os sedimentos e os organismos do estuário do rio Saubaté (ANJOS e SÁNCHEZ, 2001; CARVALHO et al., 2003). Antes mesmo do abandono da metalúrgica, um estudo em 1980 verificou que crianças que moravam próximas das chaminés da companhia (até 900 m) possuíam níveis sanguíneos de Pb e Cd acima dos limites permitido. Em 1998, outro estudo com crianças nascidas após o fechamento da metalúrgica, constatou que os resíduos deixados ainda eram uma fonte de intoxicação, visto que a grande maioria das crianças possuíam níveis de Pb no sangue acima de 10 µg/dL (valor estipulado pelos Centros de Controles de Doenças) (PAOLIELLO e CAPITANI, 2007).

Outro incidente ocorreu na região do Vale do Ribeira (entre os estados do Paraná e São Paulo), que por 50 anos foi palco da mineração e metalurgia comandadas pela Plumbum do Brasil Ltda, gerando a contaminação do ar, dos rios, do solo e da população da região. A empresa fechou as portas em 1995, deixando grande quantidade de rejeitos contaminados (CUNHA, 2006). Apesar de não haver dados sobre os níveis sanguíneos de Pb nas crianças da região durante o funcionamento da Plumbum, um estudo realizado entre os anos de 1999 e 2000 com crianças habitantes de regiões próximas da refinaria ou das áreas de mineração demonstrou que 59% das crianças possuíam níveis sanguíneos de Pb >10 µg/dL e 12,8% apresentavam níveis sanguíneos de Pb > 20 µg/dL, confirmando a contaminação residual mesmo após cessar o funcionamento da empresa (PAOLIELLO et al., 2002).

Recentemente, o incidente ocorrido no município de Mariana – MG, onde uma barragem de rejeitos da produção de minério de ferro rompeu, lançou cerca de 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos em forma de lama, ocasionando a devastação da região e contaminando o Rio Doce, principal recurso hídrico do estado de MG. O Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Baixo Guandu – ES, em laudos preliminares, confirmou a presença de metais como Pb, mercúrio, arsênio e ferro nas águas do Rio Doce (COSTANTI, 2016).

Tendo em vista que o Pb, metal tóxico, ainda é muito utilizado na indústria, principalmente no processo de fabricação e reciclagem das baterias de veículos automotores (PAOLIELLO e CAPITANI, 2007), é de grande importância entender o modo como este metal age nos organismos, assim como, é importante buscar por

tratamentos que possam minimizar os efeitos danosos do Pb nos organismos intoxicados.

1.1.1 EXPOSIÇÃO, ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO

A exposição ao Pb ocorre através da inalação de fumaça e poeira, da ingestão de alimentos e/ou água contaminados, assim como, por via dérmica. Sendo que as principais vias de absorção são o trato gastrointestinal e o sistema respiratório (GODWIN, 2001; PANDE e FLORA, 2002).

O Pb é facilmente absorvido por via inalatória; porém, a deposição, retenção e absorção de partículas de chumbo no trato respiratório depende de fatores como: tamanho da partícula inalada, densidade, forma química, solubilidade, ritmo respiratório e duração da exposição. Quanto à absorção gástrica, esta varia mediante a idade do indivíduo que é exposto ao metal. Adultos absorvem cerca de 10%, enquanto crianças absorvem até 40% do Pb ingerido (KLAASSEN, 1996). Além disso, jejum e dietas com baixo cálcio (Ca) e zinco (Zn), bem como a deficiência de ferro (Fe), podem aumentar a absorção intestinal de Pb, fatores frequentes em crianças (LOCEY et al., 1998). A absorção cutânea do Pb geralmente está relacionada as exposições ocupacionais, compostos orgânicos de Pb são facilmente absorvidos, uma vez que são lipossolúveis, enquanto a absorção de compostos inorgânicos e o chumbo metálico são pouco absorvidos pela pele (TSALEV e ZAPRIANOV, 1985).

Após a absorção, o Pb não é distribuído de forma homogênea no organismo. Inicialmente vai para o sangue e tecidos moles, com meia-vida de aproximadamente 37 e 40 dias, respectivamente (KLAASSEN, 1996; ASTDR, 2007). Posteriormente acumula-se nos ossos, tendo uma meia-vida de aproximadamente 30 anos (ASTDR, 2007), servindo este tecido como compartimento de armazenamento de Pb (KLAASSEN, 1996). Há relatos de que 90 a 95% do Pb presente no corpo está depositado no tecido ósseo (SMITH et al., 1996).

O Pb é excretado por várias rotas, principalmente pelas vias renal e gastrintestinal; porém, o Pb pode ser eliminado em pequenas quantidades pelo suor, saliva, unhas e cabelo e pode ser encontrado no leite materno (GULSON et al., 1998). A quantidade excretada pelo organismo é afetada pela idade e características da exposição. A comparação dos dados sobre a cinética do Pb em adultos e crianças mostra que, aparentemente, estas últimas parecem ter uma taxa total de

excreção menor. Crianças com até dois anos de idade retêm 34% da quantidade total de Pb absorvido, enquanto que esta retenção é de apenas 1% nos adultos (IPCS, 1995), como também pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1- Absorção e eliminação do chumbo em adultos e crianças

Parâmetro	Crianças	Adultos
Chumbo consumido na dieta ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).	10,76	3,63
Fração absorvida.	0,55	0,15
Chumbo absorvido da dieta ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).	5,92	0,54
Chumbo absorvido pelo ar ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).	0,20	0,21
<i>Total absorvido ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).</i>	<i>6,12</i>	<i>0,75</i>
Chumbo eliminado via urinária ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).	1,00	0,47
Chumbo eliminado pelas fezes ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).	1,56	0,24
<i>Total eliminado ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).</i>	<i>2,56</i>	<i>0,71</i>
Chumbo Eliminado/ Absorvido.	0,42	0,92
<i>Fração consumida retida.</i>	<i>0,33</i>	<i>0,01</i>

Fonte - US EPA; Ziegler et al.; Rabinowitz et al. apud WHO (1995, p.113).

1.1.2 EFEITOS TÓXICOS

O Pb, além de não possuir função biológica, é potencialmente perigoso para a saúde humana, pois induz uma gama de disfunções fisiológicas e bioquímicas (GURER E ERCAL, 2000), tendo como exemplos principais alterações hematológicas, neurológicas e renais (BERRAHA et al., 2007; CASADO et al., 2007; DEWANJEE et al., 2013). Sendo assim, a delimitação dos limites de tolerância biológica (LTB) é muito importante. A tabela 2 demonstra os níveis tolerados e o LTB no Brasil, regulamentados pela Portaria nº12, de 06/06/83, apresentada pela Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho (Larini, 1993).

A exposição ao Pb pode afetar tanto crianças como adultos; porém, há maior preocupação com as crianças, pois estas apresentam sintomas de intoxicação mesmo quando possuem níveis sanguíneos significativamente mais baixos do que os adultos, devido a imaturidade e fragilidade do organismo. Além disso, quando expostas cronicamente, crianças tendem a desenvolver problemas neurológicos e de desenvolvimento permanentes, enquanto que em adultos, muitos sintomas apresentados são revertidos após o término da exposição (FLORA et al., 2012).

Tabela 2- Índices biológicos de exposição ao Pb

<i>IBE</i>	<i>Valor Normal</i>	<i>LTB</i>
Chumbo no sangue	Até 40 µg/dL	60 µg/dL
Chumbo na urina	Até 65 µg/L	150 µg/L
Ácido delta amino-levulínico desidratase	30-60 U/L	10 U/L
Protoporfirina zinco	Até 75 µg/dL	200 µg/dL
Protoporfirina livres	Até 60µg/dL	300 µg/dL
Ácido delta amino-levulínico na urina	Até 4,5 mg/L	15 mg/L
Coproporfirina urinária	Até 150 µg/L	200 µg/L

***IBE:** Índices biológicos de exposição

***LTB:** Limite de tolerância biológica

Fonte: Larini, 1993

O Pb, mesmo em níveis de exposição relativamente baixos, pode causar alterações nos glóbulos vermelhos e em enzimas do sangue, além de atraso no desenvolvimento físico e mental em bebês e crianças; déficits de atenção, de audição e da habilidade de aprendizagem são consequência deste tipo de exposição. Em adultos, baixos níveis de Pb já são suficientes para causar aumento na pressão arterial em alguns indivíduos. Deste modo, os Centros de Controle de Doenças (CDC) e a Associação Pediátrica Americana (APA) consideram os níveis sanguíneos ≥ 10 µg/dL excessivos para lactentes, crianças e mulheres em idade fértil. Quanto à exposição ocupacional, em ambientes profissionais, níveis de exposição são regulados de modo que os níveis de Pb no sangue não sejam superiores a 60 µg/dL (PATRICK, 2006).

O Pb prejudica a síntese do heme, parte essencial de proteínas transportadoras de oxigênio (hemoglobina) e íons (citocromo) (TIMBRELL, 1991), por interferir em diversas etapas da biossíntese, sendo que, nesta rota a porfobilinogênio-sintase (PBG-sintase) é a enzima mais sensível à inibição pelo Pb (GOERING, 1993). A diminuição na síntese do grupamento heme e,

conseqüentemente, a diminuição na formação da hemoglobina, são consequência dos efeitos do Pb no sistema hematopoiético, sendo que concentrações sanguíneas de Pb acima de 40 µg/dL acarretam anemia em crianças (IPCS, 1995).

Tanto crianças como adultos apresentam irritabilidade, dor de cabeça, diminuição de concentração, perda de memória e comprometimento cognitivo como primeiros sintomas de toxicidade induzida pelo Pb. Com o aumento da exposição, sintomas comportamentais de impulsividade, incapacidade de seguir sequências ou direções, diminuição da atividade lúdica, diminuição do QI, e déficit de atenção são observados em crianças com níveis sanguíneos de Pb de 10-35 µg/dL; em adultos o sintoma neurológico mais comum é a neuropatia periférica, geralmente envolvendo grupos musculares extensores. Estudos mostram que a exposição ao Pb afeta enzimas e neurotransmissores dopaminérgicos, colinérgicos e glutamatérgicos no cérebro (PATRICK, 2006). Trabalhos demonstram, por exemplo, que o Pb altera a atividade da enzima colinérgica acetilcolinesterase (AChE) de cérebro de roedores, prejudicando assim o sistema neuronal, o que pode acarretar em alterações comportamentais (ALFANO et al., 1983; LIU et al., 2013).

Níveis sanguíneos entre 80-100 µg/dL são associados a efeitos renais (BUSTAMANTE e MACIAS-KONSTANTOPOULOS, 2016). A nefropatia tem sido bem reportada em trabalhadores expostos ao Pb e manifesta-se através de dano tubular proximal, esclerose glomerular e fibrose intersticial. A insuficiência renal é acompanhada por dor abdominal, defeitos cognitivos, neuropatia periférica, artralgias, anemia com pontilhado basófilo, uma "linha de chumbo" na junção dos dentes e gengivas e altos níveis de Pb no sangue (PATRICK, 2006).

Quanto aos mecanismos bioquímicos e moleculares da ação tóxica do Pb, ainda há muito a ser elucidado. No entanto, a literatura relata que, por ser um metal divalente, o Pb possui afinidade por grupamentos sulfidríla (SH), radical amino ($\text{NH}_2 \cdot$), radical hidroxila ($\text{OH} \cdot$) e também pelo ácido fosfórico (H_3PO_3). Assim, o metal pode complexar-se com enzimas e outras moléculas biológicas, interferindo na estrutura e deste modo na atividade e função destas (PAOLIELLO e CHASIN, 2001). Além disso, o Pb pode substituir íons metálicos como o Zn^{2+} , o Ca^{+2} , o Na^+ e o Mg^{+2} , isto causa prejuízo ao metabolismo e ainda altera vários outros processos como a adesão celular, a sinalização celular, apoptose, e a liberação de neurotransmissores das vesículas (FLORA et al., 2008). Ainda, é proposto que um aumento de espécies

reativas de oxigênio (EROS) e indução do estresse oxidativo (EO) estejam envolvidos na toxicidade induzida pelo Pb (BERRAHA et al., 2007).

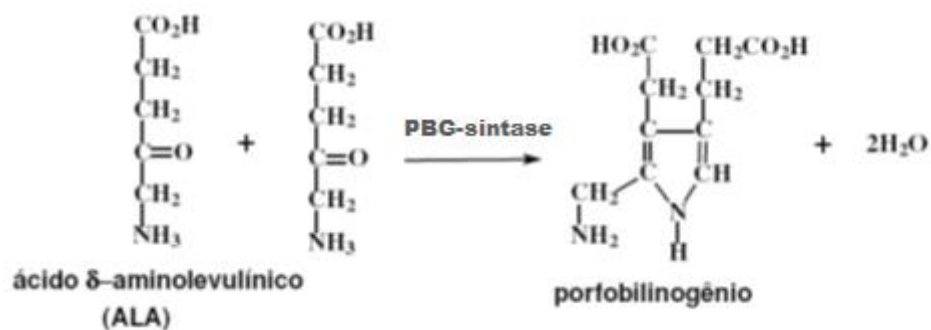
1.2 PORFOBILINOGENO-SINTASE (PBG-SINTASE)

A PBG-sintase é uma enzima citosólica, expressa em muitos tecidos e encontrada em maiores níveis na medula óssea, no fígado, rins e nos eritrócitos (DESSYPRIS, 1998). Esta enzima faz parte da via de biossíntese de compostos tetrapirrólicos (SHEMIN, 1976), que são grupamentos prostéticos de proteínas, as quais desempenham funções como transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c) e biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) (TIMBRELL, 1991).

Esta enzima, portanto, está envolvida na biossíntese do heme, a qual ocorre parcialmente na mitocôndria e no citosol, e catalisa a formação do porfobilinogênio (PBG) através da condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta aminolevulínico (ALA), com a perda de duas moléculas de água (Figura 1) (SHEMIN, 1976).

A PBG-sintase é um exemplo de enzima que possui grupamentos -SH em seu sítio ativo (TSUKAMOTO et al., 1980), os quais estão envolvidos na coordenação essencial do cofator desta enzima, o íon Zn (JAFTE, 1995; GODWIN, 2001). Este íon pode ser removido por metais divalentes como Hg e Pb, os quais ligam-se aos -SH da enzima, fazendo com que esta perca sua atividade catalítica (MARKHAM et al. 1993; SARAIVA et al. 2012).

Figura 1 - Síntese de porfobilinogênio através da condensação de duas moléculas do ácido aminolevulínico (ALA)



Fonte: Adaptada de Shemin, 1976

Por ser uma enzima sulfidrídica, a PBG-sintase é utilizada como biomarcador da exposição a metais divalentes. A inibição da atividade da PBG-sintase em humanos é bastante utilizada como índice de exposição ao Pb (GOERING, 1993). De fato, estudos tem demonstrado que animais jovens (ROCHA et al., 1995; PEIXOTO et al., 2004) e adultos (PEROTTONI et al., 2005), quando expostos a este metal apresentam inibição da atividade da PBG-sintase. A inibição dessa enzima pode levar ao acúmulo do ALA, o qual causa neurotoxicidade (PEREIRA et al., 1992; BECHARA, 1996) além de diminuir a síntese do grupamento heme (SHEMIN, 1976, KLAASSEN, 1996). Deste modo, a PGB-sintase torna-se um importante marcador de efeitos tóxicos (ROCHA et al., 1995; FRANSCISCATO et al., 2011).

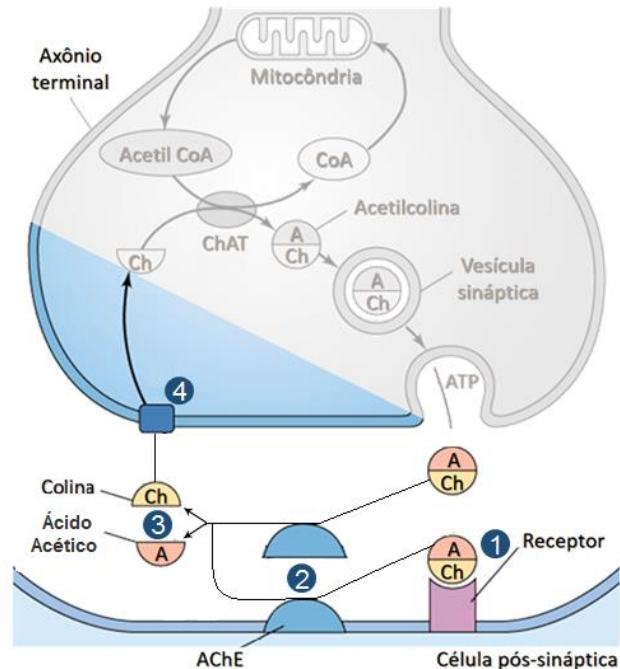
1.3 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A enzima AChE é uma enzima sulfidrídica encontrada principalmente no sistema nervoso central (SNC), junções neuromusculares e no sistema hematopoiético de vertebrados (ANDERSON e KEY, 1999). A AChE desempenha um papel importante no SNC, coordenando a transmissão do impulso nervoso (SOREQ e SEIDMAN, 2001) através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético (Figura 2), controlando a atividade sináptica no sistema colinérgico (BLOKLAND et al., 1995; TAYLOR, 1996). Isto é importantíssimo uma vez que este sistema está envolvido na função cognitiva relacionada à atenção, memória e emoção (ROMÁN e KALARIA, 2006). Devido a isso, alterações na atividade desta enzima são de extrema preocupação.

Sabe-se que o sistema nervoso é um alvo importante na intoxicação por Pb, e que o cérebro em desenvolvimento é mais sensível a toxicidade induzida pelo Pb (BASHA et al., 2012). Foi demonstrado que a exposição ao Pb altera a atividade da AChE de cerebelo de animais adultos (REDDY et al., 2007; LIU et al., 2013) e em jovens (ALFANO et al., 1983; REDDY et al., 2003).

Dois possíveis mecanismos pelo qual este metal atuaria no sistema colinérgico seriam: a afinidade do Pb pelos grupos sulfidrídicos (SH) da AChE, onde a ligação destes ocasiona na inibição da enzima (REDDY et al., 2007) e mimetização e ligação deste metal a canais iônicos e proteínas dependentes de Ca^{2+} (BASHA et al., 2013), prejudicando a transmissão sináptica.

Figura 2. Hidrólise da ACh pela AChE no espaço sináptico



Ligação ao receptor (1) e transmissão do impulso nervoso; hidrólise da ACh pela AChE (2) com formação dos produtos: ácido acético e a colina (3). **Fonte:** Adaptada de CNS fórum (https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/dementia_cholinergic).

1.4 ANIMAIS EM DESENVOLVIMENTO

Animais em desenvolvimento são mais sensíveis a insultos externos e devido a esta vulnerabilidade do organismo, estes podem causar consequências irreversíveis (NIES e SPIELBERG, 1996). A maior sensibilidade de animais jovens pode ser atribuída ao acelerado crescimento e desenvolvimento do cérebro e de outros órgãos que ocorre nos primeiros dias de vida pós-natal. GOTTLIEB et al. (1977) propõem que roedores apresentam 3 fases de desenvolvimento, as quais estão compreendidas entre o dia do nascimento e o final do período de desmame.

- 1ª fase: 0 a 6 dias de idade
- 2ª fase: 8 a 12 dias de idade
- 3ª fase: 17 a 23 dias de idade

Estes períodos são caracterizados por um aumento progressivo da divisão celular, expressão gênica, proteínas e mielina (GOTTLIEB et al., 1977). Segundo

Semple et al. (2013), as fases de desenvolvimento cerebral de roedores assemelham-se com as de humanos. Deste modo, ressaltam algumas características de cada fase; durante a 1ª fase há o desenvolvimento do sistema imunológico e estabelecimento da barreira hematoencefálica; na 2ª fase há um pico crescimento cérebral e de gliogênese, aumento da densidade axonal e dendrítica e consolidação do sistema imunológico; e na 3ª fase o cérebro atinge 90-95% do peso adulto, há um pico na densidade sináptica e na taxa de mielinização, além de mudanças nos neurotransmissores e receptores. Portanto, agressões tais como: manejo, privação nutricional e exposição a praguicidas e metais, impostas aos animais durante estas fases de desenvolvimento rápido, mesmo que em níveis baixos, podem causar danos pronunciados (SMART e DOBBING, 1971).

Crianças expostas a baixos níveis de Pb nos períodos pré e pós-natal, apresentam sintomas de irritação, hiperatividade e desatenção, enquanto níveis maiores podem causar atraso no crescimento, perda de audição, diminuição da memória de curto prazo, déficit de aprendizagem e até mesmo morte (CLEVELANDI et al., 2008). Do mesmo modo, trabalhos tem demonstrado que ratos jovens são também mais sensíveis à exposição a metais tóxicos, tendo como consequência alterações bioquímicas e comportamentais (BRADY et al., 1975; ALFANO et al., 1983; ROCHA et al., 1993; PEIXOTO et al., 2003; FRANCISCATO et al., 2009).

1.5 ZINCO (Zn)

O Zn é um metal divalente que pertence à família 12 da tabela periódica. Este metal essencial é o segundo elemento traço de maior prevalência no organismo, o qual está envolvido em diversas funções vitais (FANG et al., 2002; STEHBENS, 2003). O Zn é fundamental no crescimento e desenvolvimento, pois desempenha papel importante na proliferação e diferenciação celular (STEBENS, 2003; SANDSTEAD e AU, 2007). Também participa da estabilização de membranas biológicas, da expressão gênica, da sinalização intracelular, reprodução e apoptose, além de ser cofator e elemento estrutural de uma série de proteínas (STEBENS, 2003; SANDSTEAD e AU, 2007; SHAH, 2011). Ainda, o Zn é um indutor da síntese de glutathiona (GSH), um importante agente antioxidante e protetor celular de danos oxidativos (LANGE et al., 2002), de proteínas ligantes de metais (RONEY e COLMAN, 2004) e metalotioneínas (MT), as quais estão envolvidas na quelação e

detoxificação de metais (PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO et al., 2007 OLIVEIRA et al., 2015).

O Zn é absorvido principalmente no intestino delgado e sua homeostase é feita através de proteínas transportadoras de membrana e MT (CHIMIENTI et al., 2003; MARET, 2005); sua excreção ocorre majoritariamente através das fezes. A deficiência deste metal pode resultar em alterações na maturação sexual, crescimento e funções imuno e neurológicas de animais e humanos. Todavia, o excesso de Zn pode gerar citotoxicidade (CHOI e KOH, 1998). Devido a grande participação do Zn em diversas funções vitais, é imprescindível a manutenção de seus níveis normais.

Segundo Tarohda et al. (2004), a concentração cerebral de Zn nos primeiros dias de vida pós-natal é baixa e aumenta gradativamente até a idade adulta, quando mantém-se em níveis constante. Um adulto de aproximadamente 70 kg possui cerca de 2 a 3 g de Zn distribuído no organismo e excreta de 12 a 15 mg por dia. No plasma a concentração deste metal é de aproximadamente 15 μM , sendo transportado pela albumina; já nos órgãos encontra-se ligado a MT e sua concentração é variável. O cérebro contém de 100 a 150 μM , sendo o órgão com maior concentração de Zn (MATHIE et al., 2006).

Estudos demostram resultados promissores no emprego preventivo do Zn frente a diversos agentes, como álcool (ZHOU et al., 2005; INEU et al., 2013), organofosforados (GOEL et al., 2005; FRANCO et al., 2009), lítio (CHADHA et al., 2008) e cádmio (BRZÓSKA et al., 2001). Trabalhos demonstram que o cloreto de zinco (ZnCl_2), administrado de forma preventiva, protege dos efeitos tóxicos do cloreto de mercúrio (HgCl_2), provavelmente através da indução da síntese de moléculas e proteínas antioxidantes e aumento dos níveis de proteínas ligantes de metal e MT, capazes de quelar e carrear metais até sua excreção (PEIXOTO et al., 2007; FRANCISCATO et al., 2009, 2011; MORAES-SILVA et al., 2012; FAVERO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014, 2015)

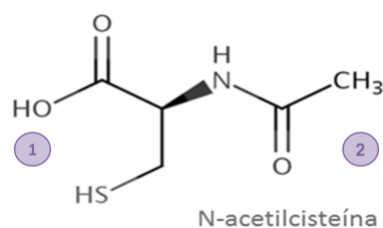
1.6 N-ACETILCISTEÍNA (NAC)

A NAC (Figura 3) é empregada na clínica como antídoto para o envenenamento por paracetamol e tratamento de várias patologias como doenças respiratórias, nefropatia e distúrbios cerebrais (SAMUNI et al., 2013); nestes casos o

emprego da NAC deve-se a sua ação antioxidante (CHEN et al., 2012). Além disso, alguns trabalhos pesquisam o papel da NAC frente à intoxicação por metais, como mercúrio, cádmio e Pb devido a suas propriedades quelantes e antioxidantes (BLANUSA et al., 2005; CHEN et al., 2012; SAMUNI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

A NAC, molécula derivada do aminoácido cisteína, é de fácil absorção, devido a sua capacidade de atravessar as membranas celulares (CHEN et al., 2012; BERK et al., 2013; SAMUNI et al., 2013). Os grupamentos sulfídricos e hidroxila desta molécula são conhecidos por servirem como sítios de quelação para íons metálicos divalentes, enquanto o grupo acetil, tem ação antioxidante (CHEN et al., 2012; SAMUNI et al., 2013).

Figura 3- Estrutura da NAC



Demonstrando grupamentos: sulfídrico (1) e acetil (2). Fonte: Adaptado de DrugBank (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB06151>).

Após a entrada da NAC na célula, a mesma reduz diretamente as EROS. Além disso, a NAC pode ser hidrolisada liberando cisteína, um precursor da glutathiona (GSH). A GSH é um importante antioxidante endógeno que protege as células das EROS (MEISTER, 1995; ERCAL et al., 1996b), as quais encontram-se elevadas em casos de intoxicação por metais, como o Pb (FLORA et al., 2002; DEWANJEE et al., 2013). De fato, o tratamento com NAC em intoxicações por Pb tem resultados promissores. Ercal et al. (1996a; 1996b) demonstraram que a NAC atenua o estresse oxidativo induzido pelo Pb. Outros estudos relatam que a NAC tem potencial quelante para o Pb, visto que aumenta a excreção do metal (BANNER et al., 1986; OTTENWALDER e SIMON, 1987).

Chen et al. (2012) mostraram a capacidade de ligação NAC-Pb em solução, com a possível formação de 4 complexos: [Pb-NAC], [Pb-NAC-Pb-H₂O], [NAC-Pb-

NAC-Pb], [Pb-NAC-Pb-NAC-Pb], sendo o primeiro o de maior percentagem (76,5%); além disso, CARDIANO et al. (2016) também relatam sobre a interação entre a NAC e íons metálicos (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+}), sendo o Pb o segundo na ordem de capacidade de sequestro.

Atualmente o tratamento para intoxicações por metais é feito através de agentes quelantes, os quais se ligam e removem o metal do corpo. Devido à inespecificidade destes quelantes, pode ocorrer a quelação e, até mesmo, a depleção de metais essenciais. Neste ponto, a NAC pode apresentar vantagens. Hjortso et al. (1990) relatam que pacientes saudáveis tratados com NAC por via oral não apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos ou aumento na excreção de Ca, Mg, Fe, Zn e Cu.

Tendo em vista a utilização da NAC em tratamentos de diferentes doenças e na intoxicação por metais, estudos que procuram entender melhor sua ação e mecanismo são de grande importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos bioquímicos e comportamentais da exposição de ratos em desenvolvimento ao acetato de chumbo (AcPb), bem como o efeito preventivo do tratamento com ZnCl₂ e/ou NAC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar:

- O peso corporal, como parâmetro de desenvolvimento corporal;
- O desempenho em testes de movimento reflexo, nocicepção, locomoção, equilíbrio e capacidade exploratória, como parâmetros de desenvolvimento comportamental;
- A atividade da enzima PBG-sintase em sangue, como marcador de exposição;
- Os níveis de Hb como marcador de hematotoxicidade;
- A atividade da enzima AChE em cérebro e cerebelo como marcador de neurotoxicidade;
- Os níveis séricos de ureia e creatinina, como parâmetro de nefrotoxicidade;
- Os níveis de MT em sangue, fígado e cérebro como parâmetro de indução de proteção;
- O conteúdo de Pb e Zn em sangue e cérebro, como indicativo de absorção, distribuição e deposição destes metais;
- O possível efeito preventivo do zinco e/ou da NAC sobre alterações causadas pelo AcPb nos itens anteriormente citados.

3 MANUSCRITO

Effects of zinc and N-acetylcysteine in damage caused by lead exposure in young rats

O manuscrito está submetido ao periódico *Biological Trace Element Research* e encontra-se em fase de revisão.

As tabelas e figuras estão organizadas de forma a facilitar a leitura e entendimento a partir das legendas, não corresponde à forma que foi submetida (normas do periódico).

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

December 29, 2016

To:
Editor Biological Trace Elements Research

We are sending our manuscript: **Effects of zinc and N-acetylcysteine in damage caused by lead exposure in young rats**, which we would like to submit for publication in this highly regarded periodic. It is an original paper and has not been submitted to another periodic.

All other authors have read the manuscript and have agreed to submit it in its current form for consideration for publication in the Biological Trace Elements Research.

Authors:

Taise F. Pedroso: taise_pedroso@hotmail.com

Mariana M. Fonseca: marimesquitta@gmail.com

Lidiane M. Costa: lidi_m_costa@hotmail.com

Cláudia S. Oliveira: claudia.bioquimica@yahoo.com.br

Vitor A. Oliveira: vitor_biomedicina@hotmail.com

Maria E. Pereira: pereirame@yahoo.com.br

Sincerely yours,

Dr. Maria Ester Pereira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular CCNE UFSM
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900 Santa Maria Brazil
email: pereirame@yahoo.com.br

Dear Dr. Pereira:

I have received reviews of your manuscript, "Effects of zinc and N-acetylcysteine in damage caused by lead exposure in young rats", which you submitted to Biological Trace Element Research.

Based on the advice received, your manuscript could be accepted for publication should you be prepared to incorporate minor revisions. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which are attached, and submit a list of responses to the comments. Your list of responses should be uploaded as a file in addition to your revised manuscript.

In order to submit your revised manuscript electronically, please access the following web site:

<http://bter.edmgr.com/>

Your username is: MPereira-357

Your password is: available at this link:

http://bter.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Maria+Ester+Pereira&lastname=CNPq&email_address=pereirame@yahoo.com.br

Click "Author Login" to submit your revision.

I look forward to receiving your revised manuscript.

Sincerely yours,

Forrest Harold Nielsen, Ph.D.

Co-Editor-in-Chief

Biological Trace Element Research

Effects of zinc and N-acetylcysteine in damage caused by lead exposure in young rats

Táise F. Pedroso², Cláudia S. Oliveira², Mariana M. Fonseca², Vitor A. Oliveira²,
Maria E. Pereira^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas; Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica; Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author:

Maria Ester Pereira

Address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 55 3220 8799

E-mail address: pereirame@yahoo.com.br

Abstract:

This study investigated the toxicity of rats exposed to lead acetate (AcPb) during the second phase of brain development (8-12 days post-natal) in hematological and cerebral parameters. Moreover, the preventive effect of zinc chloride (ZnCl₂) and N-acetylcysteine (NAC) was investigated. Pups were injected subcutaneously with saline (0.9% NaCl solution), ZnCl₂ (27 mg/kg/day), NAC (5 mg/kg/day) or ZnCl₂ plus NAC for five days (3rd-7th post-natal days), and with saline (0.9% NaCl solution) or AcPb (7 mg/kg/day) in the five subsequent days (8th-12th post-natal days). Animals were sacrificed 21 days after the last AcPb exposure. Pups exposed to AcPb presented inhibition of blood porphobilinogen-synthase (PBG-synthase) activity without changes in hemoglobin content. ZnCl₂ pre-exposure partially prevented PBG-synthase inhibition. Regarding neurotoxicity biomarkers, animals exposed to AcPb presented a decrease in cerebrum acetylcholinesterase (AChE) activity and an increase in Pb accumulation in blood and cerebrum. These changes were prevented by pre-treatment with ZnCl₂, NAC, and ZnCl₂ plus NAC. AcPb exposure caused no alteration in behavioral tasks. In short, results show that AcPb inhibited the activity of two important enzymatic biomarkers up to 21 days after the end of the exposure. Moreover, ZnCl₂ and NAC prevented the alterations induced by AcPb.

Key words: Lead; NAC; Zinc; Pups; PBG-synthase; AChE; Hematological; Cerebral

1 Introduction

2 Lead (Pb) is naturally found in the lithosphere and is typically released by
3 erosion and volcanic activity [1]. Pb is a ubiquitous environmental contaminant due to
4 its wide utilization in batteries, lead foil, ceramic, lead-based paint, and fishing sinkers
5 [2]. This metal can be released by gasoline containing lead compounds [3-4].
6 Population exposure occurs due to the intake of contaminated food and water as well
7 as the inhalation of polluted air. Recent studies have shown that heavy metals, such
8 as Pb, are found as contaminants in teas [5] and herbal preparations [6].
9 Furthermore, Kasperczyk et al. [7] demonstrated that employees who worked with Pb
10 presented approximately 45 µg/dL of Pb in their blood.

11 Pb is a critical environmental pollutant and induces a wide range of
12 physiological and biochemical dysfunctions [8]. Among such dysfunctions, Pb is
13 known to cause neurological, hematological, immunological, renal and hepatic
14 alterations [1, 9-10]. Additionally, Pb may cross the blood-brain barrier and
15 accumulate in the brain [11], causing alterations in the function of cerebral enzymes,
16 cognitive ability and behavioral changes [12] in both human and experimental
17 animals [13]. However, the biochemical and molecular mechanisms of Pb toxicity are
18 not well elucidated despite numerous studies.

19 Pb exposure inhibits several enzymes involved in hemoglobin (Hb)
20 biosynthesis such as porphobilinogen synthase (PBG-synthase) [14], which is an
21 important biomarker of Pb exposure [15]. This enzyme has sulfhydryl (-SH) groups
22 that present high affinity to bivalent metals [16-19]. The PBG-synthase catalyzes the
23 formation of porphobilinogen (PBG), which is a precursor of heme group [20-22].
24 Another enzyme that also is used as a biomarker of intoxication, mainly to
25 organophosphates, is acetylcholinesterase (AChE). This enzyme plays an important
26 role in the central nervous systems (CNS) by controlling synaptic transmission
27 through the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) [23], ending the
28 nerve impulses in the cholinergic synapses. AChE has -SH groups in its structure,
29 which are a Pb target [24-26].

30 Organisms in development are extremely vulnerable to extern insults [16, 27].
31 In rodents, brain development is divided into three main stages: 0-6, 8-12, 17-23
32 days old [28-29]. The second phase (8-12 days old) seems to be more susceptible to

33 toxic agents, which may be due to accelerated myelin protein, deoxyribonucleic acid
34 (DNA), and ribonucleic acid (RNA) synthesis [28].

35 Cases of poisoning by toxic metals, including Pb, have been treated with
36 chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2,3-
37 dimercaptopropanol (BAL) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). These
38 chelators bind to metals and decrease their toxicity [30]. However, due to their low
39 specificity they can bind to essential metals thus causing a homeostasis disturbance
40 [31]. Therefore, studies have sought alternatives for treating Pb poisoning.

41 Zinc (Zn) and N-acetylcysteine (NAC) have protective functions against toxic
42 agents. They have direct (NAC) [32] and indirect (Zn) [33-34] action in the chelation
43 of metals, in addition to being important in the antioxidant system [33, 35]. Zinc,
44 which is an essential metal, is involved in the induction of glutathione [36], metal-
45 binding proteins and metallothionein (MT) biosynthesis [34, 37-38]. Moreover, studies
46 of our research group have shown the important preventive effect of Zn against
47 mercury toxicity in rats [27,33,38-40]. Regarding NAC, it is a low molecular weight
48 thiol-containing molecule that has the role of a free-radical scavenger, in addition to
49 being a glutathione precursor [38]. Recently, Sisombath and Jalilehvand [42]
50 demonstrated that NAC molecules form a complex with the Pb(II) ion. Moreover, NAC
51 has the ability to sequester metal cations such as Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} [43].

52 Since rats in early stages of development have high susceptibility to external
53 aggression that can harm their development, this study aimed to investigate the
54 toxicity of Pb in rats exposed during the second phase (8-12 days postnatal) of brain
55 development in hematological, cerebral and behavioral parameters. Furthermore, this
56 work investigated the possible Zn and/or NAC preventive effects on alterations
57 induced by Pb, since Zn and NAC properties would help in the protection of the toxic
58 effects caused by Pb.

59

60 **Material and Methods**

61

62 **Chemicals**

63 Zinc ($ZnCl_2$), lead (AcPb), N-acetylcysteine (NAC), sodium chloride (NaCl),
64 dibasic (K_2HPO_4) and monobasic (KH_2PO_4) potassium phosphate, dibasic sodium
65 phosphate (Na_2HPO_4), sucrose, ortho-phosphoric acid, absolute ethanol, nitric acid
66 (HNO_3), chloridric acid (HCl) were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil);

67 acetylthiocholine iodide (ATC), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Tris [Tris
68 (hydroxymethyl-d3) amino-d2-methane], Coomassie brilliant blue G and bovine
69 serum albumin were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). P-
70 Dimethylaminobenzaldehyde was obtained from Riedel (Seelze, Han, Germany). The
71 commercial kits for biochemical dosages were obtained from Labtest Diagnóstica
72 S.A. (Lagoa Santa/ MG/ Brazil)

73

74 **Animals**

75 Pregnant Wistar rats obtained from the General Animal House of the Federal
76 University of Santa Maria were transferred to our breeding colony and maintained at
77 a 12 h light/dark cycle and controlled temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$. All animals had free
78 access to food (Guabi, RS, Brazil) and tap water. One day after birth, the number of
79 pups of each litter was reduced to 8, and pups were kept with the dam until weaning.
80 The total number of eight litters was used in the experimental procedure. Procedures
81 involving animals were carried out in strict accordance with the guidelines of the
82 Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal
83 University of Santa Maria, Brazil (Process number-5320270415). All efforts were
84 made to minimize the number of animals used and their suffering.

85

86 **Exposures**

87 The pups from each litter were randomly distributed into eight groups. The
88 animals were subcutaneously (s.c.) exposed to 0.9% NaCl (saline solution), NAC (5
89 mg/kg), ZnCl_2 (27 mg/kg) or ZnCl_2 plus NAC for five consecutive days and to saline or
90 AcPb (7 mg/kg) for another five consecutive days. The compounds (Zn, Pb and NAC)
91 were dissolved in saline solution at a volume of 10 mL/kg body weight. The animals
92 were weighed daily in order to adjust the dose. Each litter contained one rat for each
93 treatment. Pup rats were submitted to protocol of exposure from the 3rd to the 12th
94 postnatal day of their life as described in Table 1. Twenty-one days after the last
95 dose of Pb, animals were weighed and subsequently anesthetized with isoflurane
96 inhalation and euthanized by decapitation.

97

98 **Behavioral tests**

99 Eight litters were submitted to negative geotaxis task, beaker test, tail
100 immersion and open field task. Each litter contributed only with one experimental *n* in
101 each treatment.

102

103 *Negative geotaxis task*

104 On postnatal days 3, 5, 7, 9, 11 and 13, the animals were submitted to
105 negative geotaxis reflex test that was carried out on a 30 cm long and 20 cm wide
106 platform with an inclination of 30°. Pups were placed with the head down. The
107 maximum latency for the reflex of negative geotaxis was 60 s for each session. Each
108 trial consisted of the mean latency of five consecutive sessions. The trials were made
109 before solution administration. Latency decrease of negative geotaxis reflex was
110 considered as the improvement of the motor reflex response [44].

111

112 *Tail immersion test*

113 On postnatal days 13, 20 and 27, nociception was assessed in the tail
114 immersion test as described in Franciscato et al [27], with some changes. Rats were
115 wrapped in a towel and 3.5 cm of tail was immersed in water bath (48±1 °C). The
116 time needed for the animal to deflect the tail was used as latency immersion. A cut-off
117 time of 10 s was used to avoid tail tissue damage.

118

119 *Beaker test*

120 The animals were submitted to the beaker test on postnatal days 17 to 20
121 (sessions 1 to 4) with an interval of 24 h between sessions as described in Peixoto et
122 al [45]. In this task, the capability of the rats to balance and move along the rim of a 2
123 L polypropylene beaker was observed. This beaker, which was 19.5 cm high and 14
124 cm in diameter, had an outward-curving top edge. The apparatus was placed on a
125 workbench 1 m from the room floor. A dark refuge box, which had the inner
126 dimensions 9.5 cm X 5.5 cm X 3.5 cm high and an 5 cm X 5.5 cm entrance platform,
127 was clamped in order that the platform could rest on the spout of the beaker. Each rat
128 was placed on the rim of the beaker facing the refuge at the furthest distance from it.
129 Time points to reach the refuge, fall or jump off the rim were recorded. A cut off time
130 of 90 s was used for each session [46]. Results are presented as mean of latency to
131 access to refuge.

132

133 *Open field task*

134 Open field task was carried out as described in Peixoto et al [45], with some
135 changes. The animals were submitted to open field at 30 days of age. The
136 exploratory behavior was investigated in a rectangular open field, 57 cm of length X
137 45 cm of width X 43 cm of high wall, and was situated on the room floor. Each rat
138 was placed in the lower left corner with its face to the wall, in a way that the animal
139 could not to see the observer. During a period of 5 min, the following behaviors were
140 recorded: latency to leave the initial area, crossing (number of areas entered) and
141 rearing (incidence of head-lifting on the hind legs either against a vertical surface or
142 unsupported). The behavior of exiting the initial area and crossing was considered
143 when the animal placed the four paws inside another area.

144

145 **Biochemistry assays**

146

147 *PBG-synthase activity*

148

149 Blood samples (collected with anticoagulant) were transferred to a recipient
150 with distilled water, at 1:4 (v/v) proportions, and under constant agitation in ice bath
151 for 10 min for full hemolysis. The technique was performed according with Sassa [47]
152 by measuring the rate of product formation (porphobilinogen, PBG), as previously
153 described by Peixoto et al [39]. The incubation medium contained 2.2 mM δ -ALA and
154 76 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). After adding 200 μ L of hemolyzed
155 blood, the incubation was initiated and carried out for 120 min at 39 °C. The reaction
156 was stopped by the addition of 10% trichloroacetic acid (TCA) containing 0.05 M
157 HgCl_2 and the PBG formation was measured with Ehrlich`s reagent using the molar
158 absorption coefficient of 6.1×10^4 for Ehrlich-PBG salt. The specific enzymatic activity
159 was expressed as nmol PBG formed/h/mg protein.

160

161 *AChE Activity*

162 Cerebrum and cerebellum were homogenized (1:10, w/v) in 10 mM Tris-HCl
163 buffer, pH 7.2 with 160 mM sucrose. The homogenate was centrifuged for 10 min at
164 1,000 g and the supernatant were frozen at -20 °C until analysis. AChE activity was
165 determined by the method of Ellman et al [48] modified as described by Pereira et al
166 [49]. The mixture assay contained 1.04 mM DTNB, 24 mM potassium phosphate

167 buffer pH 7.2 and 25 μ L of enzymatic material. It was pre-incubated for 2 min at 30 $^{\circ}$ C
168 and the reaction was started with the addition of 0.83 mM ATC. The product from the
169 reaction of thiocholine with DTNB was determined at 412 nm every 30 s for 2 min
170 with a molar absorption coefficient of 1.36×10^4 . The specific activity was expressed
171 as μ mol ATC hydrolyzed/h/mg protein.

172

173 *Hb content*

174 For Hb level determination, 10 μ L of blood (collected with anticoagulant and
175 diluted 1:20 v/v in deionized water) was added to a medium containing 200 mM
176 phosphate buffer, 120 mM potassium ferricyanide, 150 mM potassium cyanide and
177 surfactant (Triton X-100) for 5 min at room temperature. The Hb content was
178 determined spectrophotometrically at 540 nm. The levels were expressed as g/dL.

179

180 *Urea*

181 Serum was separated from the total blood after centrifugation at 1,050 g for 10
182 min. The incubation at 37 $^{\circ}$ C for 5 min was started by adding 10 μ L of serum sample
183 to a medium containing 19.34 mM phosphate buffer, pH 6.9, 58.84 mM sodium
184 salicylate, 3.17 mM sodium nitroprusside, and urease (≥ 12.63 UK/L) using a Labtest
185 commercial kit. The reaction was stopped by adding oxidant solution (final
186 concentrations: 0.07 M NaOH and 3.01 mM sodium hypochlorite) and the mixture
187 was incubated for 5 min in order to achieve color development. Urea levels were
188 determined at 600 nm and expressed as mg/dL.

189

190 *Creatinine*

191 Serum was separated from the total blood after centrifugation at 1,050 g for 10
192 min. Creatinine level estimation was carried out by measuring the quantity of product
193 formed, creatinine picrate, and by using creatinine as standard using a Labtest
194 commercial kit. The reaction was carried out in a medium containing 20.2 mM picric
195 acid and 145.4 mM NaOH at 37 $^{\circ}$ C with 50 μ L of serum. Creatinine levels were
196 determined at 510 nm and expressed as mg/dL.

197

198 *Determination of MT levels*

199 For MT assays, blood (collected with anticoagulant) was diluted, and liver and
200 cerebrum tissues were homogenized in 4 volumes of cold 20 mM Tris-HCl buffer, pH

201 8.6 containing 0.5 mM PMSF as antiproteolytic agent and 0.01% β -mercaptoethanol
202 as a reducing agent. The homogenate was then centrifuged at 16,000 g at 4°C for 30
203 min in order to obtain a supernatant containing metallothioneins. Aliquots of 1 mL of
204 supernatant were added with 1.05 mL of cold (-20°C) absolute ethanol and 80 μ L of
205 chloroform; the samples were then centrifuged at 6,000 g for 10 min. The collected
206 supernatant was combined with three volumes of cold ethanol (-20°C), maintained at
207 -20°C for 1 h and centrifuged at 6,000 \times g for 10 min. The metallothionein-containing
208 pellets were then rinsed with 87% ethanol and 1% chloroform and centrifuged at
209 6,000 g for 10 min. The pellet was resuspended in 150 μ L 0.25M NaCl and
210 subsequently 150 μ L 1N HCl containing 4 mM EDTA was added to the sample. MT
211 content was assayed as described in Peixoto et al [39] using the colorimetric method
212 with Ellman's reagent at 412 nm [48]. Metallothionein concentration was estimated
213 utilizing cysteine as a reference standard and expressed as the μ g of SH/g of tissue.

214

215 *Protein determination*

216 Protein levels were determined by method of Bradford [50] using bovine serum
217 albumin as standard.

218

219 **Determination of Zn and Pb levels**

220 Metal levels were determined by inductively coupled plasma atomic emission
221 spectrometry (ICPE-9000; Shimadzu Scientific Instruments). The samples of wet
222 tissue were placed in vials and frozen at -20 °C until analysis. Samples were digested
223 as previously described by Ineu et al [51]. After digestion, samples were diluted with
224 deionized water and the metals determined by ICPE-9000. The analytical standard of
225 the metals (Merck®) was used to make the curve. The detection limit was considered
226 0.0025 ppm, which was the minimum measurable quantity for this method.

227

228 **Statistical analysis**

229 Results were analyzed by one (biochemistry assays and metal levels) or two-
230 way ANOVA (behavioral tasks) followed by Duncan's multiple range test when
231 necessary. Effects were considered significant when $p \leq 0.05$.

232

233 **Results**

234

235 Weight

236

237 Body, Cerebrum and Cerebellum weight

238 The body, cerebrum and cerebellum weight were not altered by the treatments
239 (Table 2).

240

241 Behavioral tests

242

243 Negative geotaxis task

244 The negative geotaxis responses are shown in Fig. 1A. All groups presented
245 the negative geotaxis reflex. Two-way ANOVA (8 treatments X 6 sessions) showed a
246 significant effect of session [$F(5,280)=301.43$; $p<0.001$], since all groups presented
247 better performance throughout the sessions. The treatments did not interfere in the
248 appearance of this reflex.

249

250 Tail immersion test

251 The tail immersion test latency was not altered by treatments (data not
252 shown).

253

254 Beaker test

255 Latency to access the refuge is shown in Fig. 1B. Two-way ANOVA (8
256 treatments x 4 sessions) revealed a significant effect of the session on latency to
257 access to refuge [$F(3, 168)=112.19$; $p<0.001$], since all groups presented a better
258 performance throughout the sessions. The treatments did not alter the performance
259 of the animals.

260

261 Open field task

262 The performance of rats in the open field task was not altered by treatments
263 (Table 3).

264

265 Biochemistry assays

266

267 PBG-synthase activity

268 PBG-synthase activity is shown in Fig. 2. Pups exposed to AcPb exhibited a
269 significant decrease in enzyme activity [$F(7, 32)=6.512$; $p<0.001$]. Zinc alone partially
270 prevented the inhibitory effect of Pb, but NAC and Zn+NAC association did not
271 prevent the AcPb inhibitory effect on enzyme activity.

272

273 *AChE Activity*

274 The cerebrum and cerebellum AChE activity are presented in Fig. 3 A and B,
275 respectively. Pups showed a significant decrease in cerebrum AChE activity [$F(7,$
276 $40)=4.005$; $p<0.02$] as a result of Pb exposure. All preventive treatments (Zn, NAC,
277 and Zn+NAC association) protected the Pb inhibitory effect.

278

279 *Hb content and Urea and Creatinine levels*

280 These parameters were not altered by treatments (Table 4).

281

282 *MT levels*

283 Blood, cerebrum and liver MT levels were not altered by treatments (Table 5).

284

285 *Cerebrum and blood metal levels*

286 Lead and Zn levels are presented in Table 6. Pups exposed to AcPb
287 presented Pb accumulation in the blood [$F(7, 24)=7.211$; $p<0.001$] and cerebrum
288 [$F(7, 16)=80.213$; $p<0.001$]. The preventive treatments protected this Pb
289 accumulation in both tissues. Zinc levels were similar between the treatment groups.

290

291 **Discussion**

292 This work investigated the sensitivity of young rats to AcPb exposure in
293 biochemical and behavioral parameters as well as the protective effects of $ZnCl_2$ and
294 NAC. In this study, Pb exposure caused inhibition of blood PBG-synthase activity and
295 cerebrum AChE activity. Zinc partially prevented the inhibition of blood PBG-synthase
296 activity and all pre-treatments (Zn, NAC and Zn plusNAC) prevented the cerebrum
297 AChE activity decrease. Indeed, Pb exposure caused accumulation of this metal in
298 the blood and cerebrum, and Zn, NAC as well as their combination prevented such
299 accumulation.

300 The enzyme PBG-synthase is an important biomarker of toxic effects induced
301 by divalent metals [16, 40], mainly because of its -SH groups, which have high affinity
302 to heavy metals [52]. Studies have shown that Pb decreases PBG-synthase activity.
303 It is likely that Pb binds to the enzyme -SH groups thus interfering in the interaction of
304 the substrate with the active site [17, 53]. In our work, Pb intoxication decreased
305 about 60% of blood PBG-synthase activity. This result is in agreement with other
306 studies that reported inhibition of this blood enzyme of rodents due to Pb exposure
307 [54-55], when investigated immediately after exposure. Additionally, this inhibition
308 persists even several days after exposure, which confirms that the PBG-synthase
309 activity measurement is a good marker of blood Pb exposure.

310 It is known that PBG-synthase is responsible for the second step of heme
311 biosynthesis and consequently influences Hb synthesis [14]. However, considering
312 that only 20% of the PBG-synthase activity is necessary for heme synthesis [56], the
313 blood enzyme inhibition verified here was not enough to alter Hb levels.

314 Our study also shows a decrease in cerebrum AChE activity. Studies have
315 shown that the central nervous system is a target of Pb [57]. This metal may cause
316 dysfunction in the cholinergic system [24-25, 58], which would be related to
317 behavioral manifestations [2, 59]. In fact, one possible mechanism of Pb neurotoxicity
318 is the inhibition of AChE attributed to high Pb affinity for -SH groups [26]. Lead may
319 bind to AChE and cause the enzyme inhibition followed by the accumulation of ACh
320 in the synaptic cleft [59].

321 In this work, we assessed the motor function necessary for the animal to
322 respond to the negative geotactic reflex [44], muscular strength and cerebellar
323 function necessary to balance in the rim and access to refuge in beaker test [45], the
324 locomotor and exploratory activity in the open field task [45], and pain sensitivity in
325 tail immersion test [27], in which the hyperalgesia response is generally attributed to
326 central mechanisms [60]. Animals treated with Pb showed no alterations in behavioral
327 activities in the tests performed. In the studies by Phyu and Tangpong [2] and Liu et
328 al [25], mice treated with drinking water with 1 g Pb/L for 2 months and 0.5 g Pb/L for
329 3 months, respectively, presented AChE inhibition and an impairment in water maze
330 swimming test [2] and open field test [25] performance.

331 Animals treated with Pb presented blood and cerebrum Pb accumulation. This
332 occurred in parallel to blood PBG-synthase and cerebrum AChE activity inhibition,
333 respectively, as commented above. After absorption, Pb is distributed and

334 accumulates in several tissues of the body, most notably in the bones, which is called
335 storage compartment [21]. In humans, the half-life of Pb in the blood is approximately
336 30 days, although the total body Pb is, in great percentage, accumulated in the bone,
337 with a half-life of decades [61]. In our study, analyses were performed 21 days after
338 the last Pb administration, and the metal may have been moved to the bone and
339 partly excreted in the feces and urine. Therefore, despite blood and cerebrum levels
340 being 1.7 and 6 times higher than the control group, Pb levels are low when
341 considered the high dose injected.

342 Zinc prevented partially PBG-synthase inhibition. Zinc, NAC and the
343 association (Zn+NAC) prevented the decrease in the AChE activity and promoted a
344 decrease in Pb levels in the blood and cerebrum. Studies have related that the
345 supplementation with Zn decreases gastrointestinal absorption and distribution of Pb
346 [34, 62, 63]. Moreover, Zn is known as an important inductor of metal-bind proteins,
347 such as metallothionein, which has chelating properties [37,38]. This property may
348 explain the protective effects of Zn on Pb intoxication; however, the Zn groups did not
349 present high MT content. Regarding NAC, Nehru and Kanwar, [64] demonstrated that
350 this may be a GSH precursor molecule, since NAC exposure restored GSH cerebrum
351 levels depleted by Pb exposure. Moreover, NAC protective effect may be due to
352 Pb(II) ion complex with the NAC molecule as suggested by Sisombath and
353 Jalilehvand [42] and Cardiano et al. [43].

354

355 **Conclusion**

356 Results showed that AcPb exposure during the second phase of brain
357 development alters biochemical parameters even long time after exposure. Moreover,
358 the potential preventive action of Zn and NAC suggests that these compounds may
359 serve as a promising alternative treatment for Pb poisoning. However, further
360 investigations are necessary to better understand the mechanism by which Pb
361 causes its toxic effects as well as to understand the preventive effects of Zn and
362 NAC.

363

364 **Acknowledgements:**

365 The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento
366 Científico e Tecnológico (CNPq 311082/2014-9) and Coordenação de
367 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

368 **Conflict of Interest:**

369 The authors declare that they have no conflict of interest.

370 **Compliance with Ethical Standards:**

371 The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and
372 Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil
373 (Process number-5320270415).

374

375 **References**

- 376 1. Berraha AA, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S (2007) Antioxidant enzymes
377 activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C R Biol* 330:581-588
- 378 2. Phyu MP, Tangpong J (2013) Protective effect of *Thunbergia laurifolia* (Linn.) on
379 lead induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment in mice.
380 *BioMed Res Int* doi: 10.1155/2013/186098
- 381 3. Godwin HA (2001) The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol* 5:223-
382 227
- 383 4. Pande M, Flora SJS (2002) Lead induced oxidative damage and its response to
384 combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology* 177:187-
385 196
- 386 5. Li X, Zhang Z, Li P, Zhang Q, Zhang W, Ding X (2013) Determination for major
387 chemical contaminants in tea (*Camellia sinensis*) matrices: A review. *Food Res Int*
388 53:649-658
- 389 6. Nagarajan S, Sivaji K, Krishnaswamy S, Pemiah B, Rajan KS, Krishnan UM,
390 Sethuraman S (2014) Safety and toxicity issues associated with lead-based
391 traditional herbo-metallic preparations. *J Ethnopharmacol* 151:1-11
- 392 7. Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Romuk E, Rykaczewska-
393 Czerwinska M, Pawlas N, Birkner E (2016) Effect of N-acetylcysteine administration
394 on homocysteine level, oxidative damage to proteins, and levels of iron (Fe) and Fe-
395 related proteins in lead-exposed workers. *Toxicol Ind Health* 32:1607-1618
- 396 8. Gurer H, Ercal N (2000) Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead-
397 poisoning? *Free Radic Biol Med* 29:927-945
- 398 9. Casado MF, Cecchini AL, Simão ANC, Oliveira RD, Cecchini R (2007) Free
399 radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead
400 acetate as evaluated by chemiluminescence. *Food Chem Toxicol* 45:945-952
- 401 10. Dewanjee S, Sahu R, Karmakar S, Gangopadhyay M (2013) Toxic effects of lead
402 exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of
403 edible jute (*Corchorus litorius*) leaves. *Food Chem Toxicol* 55:78-91
- 404 11. Richetti SK, Rosemberg D B, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan
405 CD (2011) Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is
406 altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32:116-122
- 407 12. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Rotimi SO, Abama E, Okediran BS, Dosumu OA,
408 Onunkwor BO (2007) Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate

- 409 indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta,
410 Nigeria. *Environ Toxicol Pharmacol* 24:183-188
- 411 13. Cory-Slechta DA, Pokora MJ, Widzowski DV (1992) Postnatal lead exposure
412 induces super sensitivity to the stimulus properties of a D2-D3 agonist. *Brain Res*
413 598:162-172
- 414 14. Wang Q, Zhao H, Chen J, Hao Q, Gu K, Zhu Y, Zhou Y, Ye L (2010) δ -
415 Aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary δ -aminolevulinic acid concentration
416 and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure. *Int J Hyg*
417 *Environ Health* 213:52-58
- 418 15. Patrick L (2006) Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure,
419 evaluation and treatment. *Altern Med Rev* 11:2-22
- 420 16. Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO (1995) Effect of
421 treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid
422 postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain,
423 liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100:27-37
- 424 17. Peixoto NC, Roza T, Pereira ME (2004) Sensitivity of δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of
425 rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicol In*
426 *Vitro* 18:805-809
- 427 18. Perottoni J, Meotti FC, Folmer V, Pivetta L, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT
428 (2005) Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead
429 acetate on delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:239-
430 248
- 431 19. Scheuhammer AM (1987) Erythrocyte d-aminolevulinic acid dehydratase in birds.
432 I. The effects of lead and other metals in vitro. *Toxicology* 45:155-163
- 433 20. Shemin D (1976) 5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and
434 mechanism. *Phil Trans R Soc Lond B* 273:109-115
- 435 21. Klaassen CD (1996) Heavy metals and heavy-metals antagonists. In: Hardman
436 JG, Gilman AG, Limbird LE (Eds) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of*
437 *Therapeutics*, 9th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1649-1671
- 438 22. Goyer RA (1996) Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (Ed) *Casarett & Doull's*
439 *Toxicology: the basic science of poisons*, 5th edn. McGraw-Hill, New York, pp 691-
440 736
- 441 23. Blokland A (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?
442 *Brain Res Rev* 21:285-300

- 443 24. Alfano DP, Petit TL, Leboutillier JC (1983) Development and plasticity of the
444 hippocampal-cholinergic system in normal and early lead exposed rats. *Brain Res*
445 312:117-124
- 446 25. Liu C, Zheng G, Ming Q, Sun J, Cheng C (2013) Protective effect of puerarin on
447 lead-induced mouse cognitive impairment via altering activities of
448 acetylcholinesterase, monoamine oxidase and nitric oxide synthase. *Environ Toxicol*
449 *Pharmacol* 35:502-510
- 450 26. Reddy GR, Devi BC, Chetty CS (2007) Developmental lead neurotoxicity:
451 alterations in brain cholinergic system. *Neurotoxicology* 28:402-407
- 452 27. Franciscato C, Goulart FR, Lovatto NM, Duarte FA, Flores EMM, Dressler VL,
453 Peixoto NC, Pereira ME (2009) ZnCl₂ exposure protects against behavioral and
454 acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂ *Int J Dev Neurosci* 27:459-468
- 455 28. Gottlieb A, Keydar I, Epstein HT (1977) Rodent brain growth stages: an analytical
456 review. *Biol Neonate* 32:166-176
- 457 29. Winick M, Noble A (1965) Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during
458 prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev Biol* 12:451-466
- 459 30. Domingo, JL (1998) Developmental toxicity of metal chelating agents. *Reprod*
460 *Toxicol* 12:499-510
- 461 31. Cantilena LRJr, Klaassen CD (1982) The effect of chelating agents on the
462 excretion of endogenous metals. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:344-350
- 463 32. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989) The antioxidant action of N-
464 acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and
465 hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6:593-597
- 466 33. Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Moraes-Silva L, Siqueira LF, Pereira ME
467 (2014) Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect
468 of ZnCl₂. *J Trace Elem Med Biol* 28:240-246
- 469 34. Roney N, Colman J (2004). Interaction profile for lead, manganese, zinc, and
470 copper. *Environ Toxicol Pharmacol* 18:231-234
- 471 35. Chen W, Ercal N, Huynh T, Volkov A, Chusuei CC (2012) Characterizing N-
472 acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) binding for lead poisoning
473 treatment. *J Colloid Interface Sci* 371:144-149
- 474 36. Lange A, Ausseil O, Segner H (2002). Alterations of tissue glutathione levels and
475 metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to
476 cadmium and zinc. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131:231-243

- 477 37. Eaton DL, Stacey NH, Wong KL, Klaassen CD (1980). Dose-response effects of
478 various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and
479 cytochrome P-450. *Toxicol Appl Pharmacol* 55:393-402
- 480 38. Peixoto NC, Serafim MA, Flores EMM, Bebiano MJ, Pereira ME (2007)
481 Metallothionein, zinc and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and
482 subsequently to mercury. *Life Sci* 81:1264-1271
- 483 39. Peixoto NC, Roza T, Flores EM, Pereira ME (2003) Effects of zinc and cadmium
484 on HgCl₂-δ-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol Lett*
485 146:17-25
- 486 40. Franciscato C, Moraes-Silva L, Duarte FA, Oliveira CS, Ineu RP, Flores EM,
487 Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME (2011) Delayed biochemical changes induced
488 by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*
489 74:480-486
- 490 41. Ercal N, Treeratphan P, Lutz P, Hammond TC, Matthews, RH (1996) N-
491 acetylcysteine protects chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced
492 oxidative stress. *Toxicology* 108:57-64
- 493 42. Sisombath NS, Jalilehvand F (2015) Similarities between N-Acetylcysteine and
494 Glutathione in Binding to Lead(II) Ions. *Chem Res Toxicol* 28:2313-2324
- 495 43. Cardiano P, Foti C, Giuffre O (2016) On the interaction of N-acetylcysteine with
496 Pb²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ and Hg²⁺. *J Mol Liq* 223:360-367.
- 497 44. Da-Silva VA, Malheiros LR, Bueno FMR (1990) Effects of toluene exposure
498 during gestation on neurobehavioral development of rats and hamster. *Braz J Med*
499 *Biol Res* 23:533-537
- 500 45. Peixoto NC, Roza T, Morsch VM, Pereira ME (2007) Behavioral alterations
501 induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure. *Int J Dev Neurosci*
502 25:39-46
- 503 46. Smart JL, Dobbing J (1971) Vulnerability of developing brain. II. Effects of early
504 nutritional deprivation on reflex ontogeny and developmental of behavior in the rat.
505 *Brain Res* 28:85-95
- 506 47. Sassa S (1982) Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28:133-
507 145
- 508 48. Ellman GL, Courtney KD, Andress JRV, Featherstone RM (1961) A new and
509 rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*
510 7:88-95

- 511 49. Pereira ME, Adams AIH, Silva NS (2004) 2,5-Hexanedione inhibits rat brain
512 acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol Lett* 146:269-274
- 513 50. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram
514 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*
515 72:248-254
- 516 51. Ineu RP, Oliveira CS, Oliveira VA, Moraes-Silva L, Luz SCA, Pereira ME (2013)
517 Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in
518 rats. *Food Chem Toxicol* 58:522-529
- 519 52. Rooney JP (2007) The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting
520 ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234:145-156
- 521 53. Goering PL (1993) Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity.
522 *Neurotoxicology* 14:45-60
- 523 54. Nakagawa K, Asami M, Kuriyama K (1980) Inhibition of release of lysosomal
524 enzymes in young rat brain by lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 56:86-92
- 525 55. Rendón-Ramírez A, Cerbón-Solórzano J, Maldonado-Veja M, Quintanar-Escorza
526 MA, Calderón-Salinas JV (2007) Vitamin-E reduces the oxidative damage on δ -
527 aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol In*
528 *Vitro* 21:1121-1126
- 529 56. Petrucci RA, Leonardi A, Battistuzzi G (1982) The genetic polymorphism of delta-
530 ALAD in Italy. *Hum Genet* 60:289-290
- 531 57. Basha MR, Wei W, Brydie M, Razmiafshari M, Zawia NH (2003) Lead-induced
532 developmental perturbations in hippocampal Sp1 DNA-binding are prevented by zinc
533 supplementation: *in vivo* evidence for Pb and Zn competition. *Int J Dev Neurosc* 21:1-
534 12
- 535 58. Abdel Moneim AE (2012) Flax seed oil as a neuroprotective agent on lead
536 acetate-induced monoaminergic alterations and neurotoxicity in rats. *Biol Trace*
537 *Elem Res* 148:363-370
- 538 59. Reddy GR, Basha MDR, Devi CB, Suresh A, Baker JL, Shafeek A, Heinz J,
539 Chetty CS (2003) Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum
540 and hippocampus of developing rat. *Int J Dev Neurosc* 21:347-352
- 541 60. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H, Puig MM (1989) The hyperalgesic
542 effect of naloxone is attenuated in streptozotocin-diabetic mice. *Psychopharmacology*
543 97:169-174

- 544 61. ASTDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological
545 Profile for Lead. U.S. Department Of Health And Human Services. August, 2007
- 546 62. Peraza MA, Ayalo-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT (1998). Effects of
547 micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect* 106:203-216
- 548 63. Fowler BA (1998). Roles of Lead-Binding Proteins in Mediating Lead
549 bioavailability. *Environ Health Perspect* 106:1585-1587
- 550 64. Nehru B, Kanwar SS (2007). Modulation by N-acetylcysteine of lead-induced
551 alterations in rat brain: Reduced glutathione levels and morphology. *Toxicol Mech*
552 *Method* 17:289-293.
- 553

Table 1 Exposure protocol: the animals were subcutaneously (s.c.) exposed to saline (0.9%), ZnCl₂ (27 mg/kg), NAC (5 mg/kg), or Zn+NAC (treatment 1), and saline or AcPb (7 mg/kg) (treatment 2)

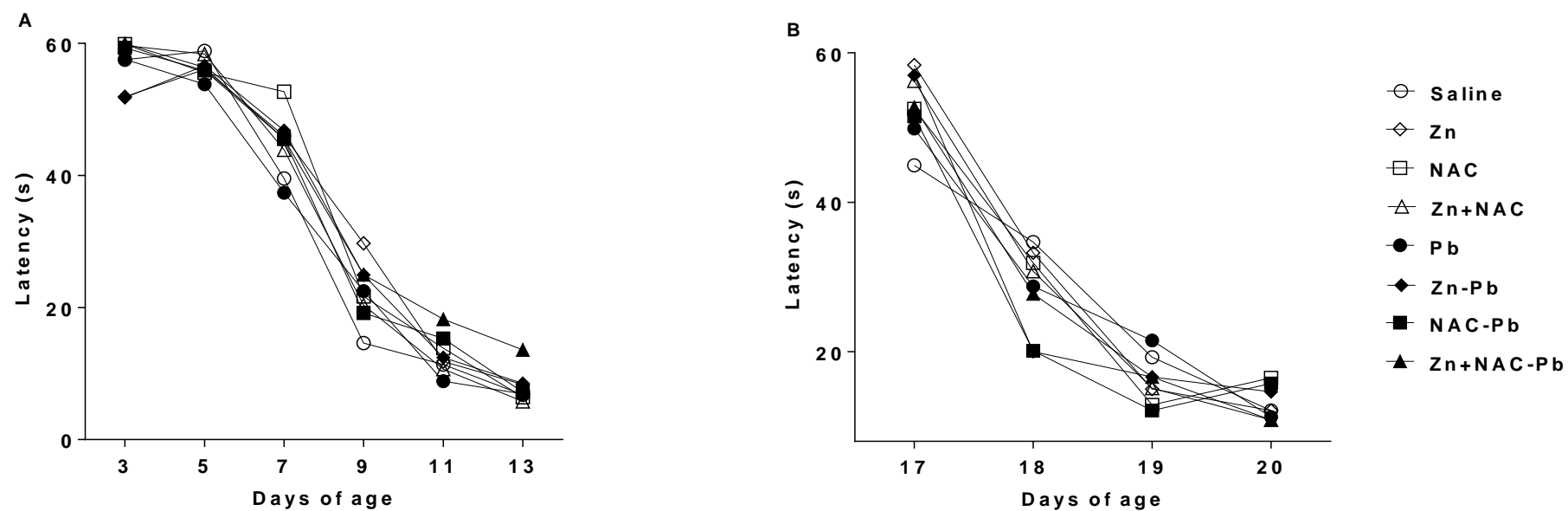
Groups	Treatment 1 (3 rd to 7 th days old)	Treatment 2 (8 th to 12 th days old)
Saline	Saline + Saline	Saline
Zn	ZnCl ₂ + Saline	Saline
NAC	NAC + Saline	Saline
Zn+NAC	ZnCl ₂ + NAC	Saline
Pb	Saline + Saline	AcPb
Zn-Pb	ZnCl ₂ + Saline	AcPb
NAC-Pb	NAC + Saline	AcPb
Zn+NAC-Pb	ZnCl ₂ + NAC	AcPb

Table 2 Body, cerebrum and cerebellum weights (g) of rats treated (s.c.) with saline, ZnCl₂ (27 mg/kg/day), NAC (1mg/kg/day) or ZnCl₂+NAC from 3rd to 7th day of age, and with saline or AcPb (7mg/kg/day) from 8th to 12th day of age. The animals were sacrificed 21 days after the last Ac₂Pb exposure.

Groups	Body weight				Cerebrum	Cerebellum
	Day 3	Day 8	Day 13	Day 33	Day 33	Day 33
Saline	8.5±0.2	16.0±0.8	25.6±1.7	97.5±2.8	0.94 ±0.03	0.24±0.01
Zn	8.4±0.2	16.4±1.0	23.6±1.6	89.9±3.8	0.94±0.03	0.24±0.01
NAC	8.4±0.3	15.6±0.9	25.2±1.6	98.3±5.0	0.98±0.04	0.25±0.01
Zn+NAC	8.5±0.3	15.8±0.5	24.4±1.0	97.4±2.9	0.91±0.03	0.25±0.02
Pb	8.5±0.3	15.3±0.7	24.4±0.9	88.4±3.3	0.89±0.03	0.25±0.01
Zn-Pb	8.8±0.4	16.0±0.8	24.6±1.2	92.8±2.3	0.92±0.03	0.25±0.01
NAC-Pb	8.6±0.3	16.0±0.9	23.4±0.7	90.0±5.8	0.90±0.02	0.24±0.01
Zn+NAC-Pb	8.8±0.3	15.6±0.9	24.4±1.4	89.1±4.2	0.91±0.03	0.25±0.01

The results are presented as mean ± S.E.M. (n=5-8)

Fig. 1 Latency of negative geotaxis reflex (A) submitted to test from day 3, 7, 9, 11 e 13 of age and latency of access to refuge in the beaker test (B) submitted to test from day 17 to 20 of rats treated as described in Table 2.



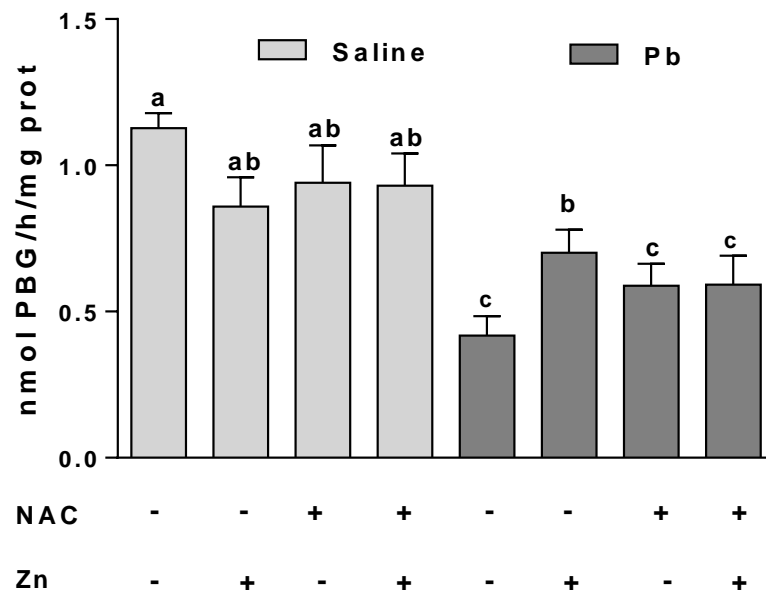
The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=8)

Table 3 Crossing and rearing numbers and latency to leave the initial area in the open field task of rats treated as described in Table 2 and submitted to test at day 30

Groups	Crossings	Rearings	Latency (s)
Saline	52.1±4.5	24.7±4.4	11.9±4.2
Zn	55.9±4.5	30.8±1.1	11.3±2.7
NAC	66.6±4.9	36.9±4.3	9.0±1.9
Zn+NAC	55.5±4.5	37.4±4.6	17.0±4.7
Pb	53.4±10.4	24.9±2.8	13.8±3.2
Zn-Pb	47.0±3.8	27.5±3.6	19.5±7.1
NAC-Pb	61.0±9.3	31.8±6.0	12.9±4.3
Zn+NAC-Pb	44.8±7.5	23.5±6.3	8.7±2.3

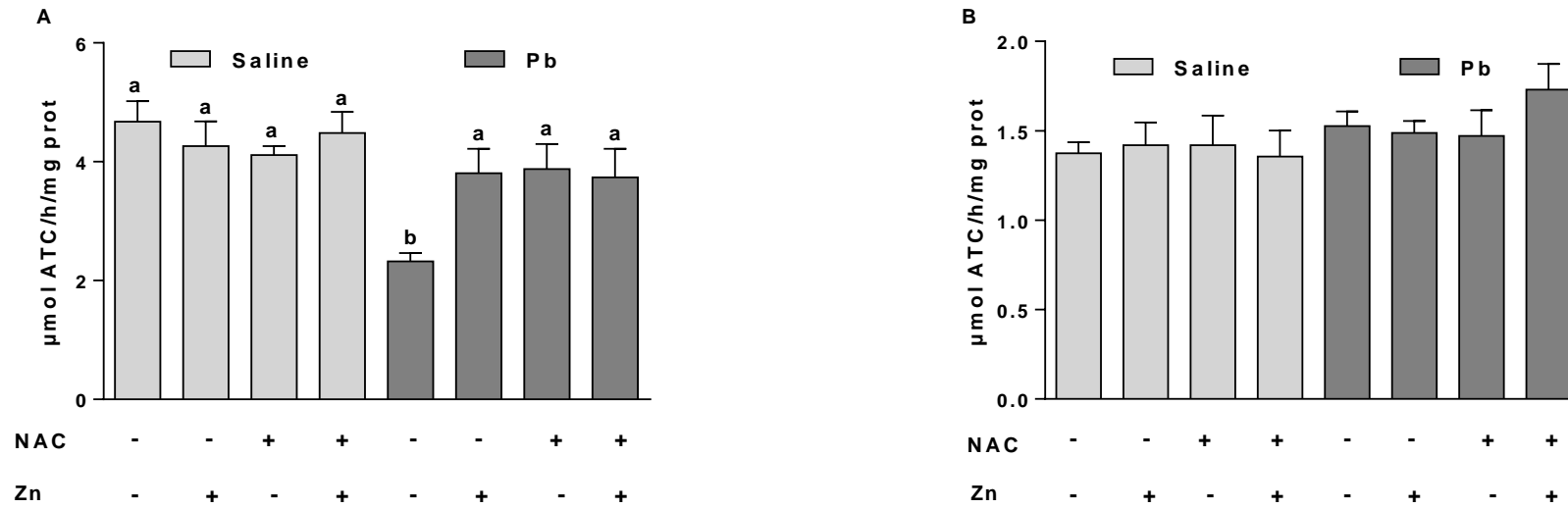
The results are presented as mean ±S.E.M. (n=8)

Fig. 2 Blood PBG-synthase activity of rats treated as described in Table 2. The specific activity is expressed as nmol PBG/h/mg protein.



The results are presented as mean ± S.E.M. (n=5). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups at least $p \leq 0.05$

Fig. 3 Cerebrum (A) and cerebellum (B) AChE activities of rats treated as described in Table 2. The specific activity is expressed as $\mu\text{mol ATC hydrolyzed/h/mg protein}$.



The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=5-6). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups at least $p \leq 0.05$

Table 4 Blood hemoglobin levels and serum urea and creatinine levels of rats treated as described in Table 2

Groups	Hemoglobin (g/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Saline	8.7±1.2	37.8±1.2	0.8±0.2
Zn	9.0±0.7	39.2±3.5	0.7±0.2
NAC	8.4±1.1	37.4±2.7	0.8±0.1
Zn+NAC	10.5±0.4	35.5±3.0	0.5±0.2
Pb	8.6±0.9	37.7±2.2	0.8±0.2
Zn-Pb	9.4±0.8	38.6±3.4	0.6±0.2
NAC-Pb	10.7±0.6	35.1±2.5	0.5±0.1
Zn+NAC-Pb	9.2±0.3	35.9±3.9	0.4±0.1

The results are presented as mean ± S.E.M. (n=6-8)

Table 5 Liver, blood and cerebrum metallothionein levels of rats treated as described in Table 2

Groups	Liver	Blood	Cerebrum
Saline	44.9±11.8	75.5±11.2	130.6±8.5
Zn	47.8±15.2	66.1±3.9	133.2±11.8
NAC	43.5±5.1	85.0±4.7	130.9±14.8
Zn+NAC	33.2±6.6	76.9±9.1	123.2±17.5
Pb	51.0±10.4	85.6±7.7	144.4±23.6
Zn-Pb	33.6±5.6	71.8±4.9	145.4±20.6
NAC-Pb	43.6±7.2	66.6±5.3	141.2±18.9
Zn+NAC-Pb	51.0±6.3	69.0±9.0	134.8±23.5

The results are presented as mean ± S.E.M. (n=5) and expressed in µg of SH/g of tissue

Table 6 Lead and zinc levels of rats treated as described in Table 2

	Lead levels		Zinc levels	
	Blood ($\mu\text{g/mL}$)	Cerebrum ($\mu\text{g/g}$)	Blood ($\mu\text{g/mL}$)	Cerebrum ($\mu\text{g/g}$)
Saline	0.076 \pm 0.006 ^{ac}	0.036 \pm 0.010 ^a	4.77 \pm 0.30	15.00 \pm 0.51
Zn	0.084 \pm 0.005 ^a	0.028 \pm 0.016 ^{ab}	5.50 \pm 0.31	16.50 \pm 1.80
NAC	0.086 \pm 0.010 ^a	0.016 \pm 0.006 ^{abc}	5.58 \pm 0.54	17.96 \pm 1.28
Zn+NAC	0.065 \pm 0.005 ^{ac}	0.004 \pm 0.004 ^{bc}	4.65 \pm 0.33	20.54 \pm 2.13
Pb	0.129 \pm 0.012 ^b	0.220 \pm 0.012 ^d	6.07 \pm 0.53	17.46 \pm 1.83
Zn-Pb	0.055 \pm 0.011 ^c	<0.001 ^c	4.44 \pm 0.45	15.60 \pm 1.80
NAC-Pb	0.083 \pm 0.005 ^a	<0.001 ^c	5.52 \pm 0.23	16.75 \pm 3.46
Zn+NAC-Pb	0.068 \pm 0.009 ^{ac}	<0.001 ^c	3.45 \pm 0.78	13.96 \pm 1.05

The results are presented as mean \pm S.E.M. (n=3-4). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among the groups at least $p < 0.05$

4 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

A exposição de ratos em desenvolvimento ao AcPb:

- Não alterou o desenvolvimento corporal.
- Não alterou o desenvolvimento comportamental.
- Inibiu a atividade da AChE, marcador de neurotoxicidade, apenas em cérebro, sem alteração da atividade em cerebelo. A atividade normal da enzima em cerebelo pode estar ligada ao desempenho comportamental normal dos animais expostos ao Pb, visto que este tecido está envolvido na coordenação motora e função cognitiva.
- Inibiu a atividade da PBG-sintase sanguínea, marcador de exposição, porém, não foi suficiente para causar alteração na síntese de Hb, visto que a síntese mantém-se normal com até 80% de inibição da enzima.
- Aumentou os níveis de Pb em sangue e cérebro, tecidos onde houve inibição da atividade de importantes enzimas marcadoras de toxicidade (PBG-sintase e AChE), demonstrando que este metal foi absorvido e distribuído nos tecidos.
- Não alterou os níveis de ureia e creatinina, parâmetros de nefrotoxicidade. Sabe-se que alterações nestes parâmetros podem ocorrer em indivíduos expostos a altos níveis de Pb ou em exposições crônicas ao metal. Neste trabalho, apesar da sensibilidade dos animais jovens, a exposição deu-se por um pequeno período (5 dias).
- Não alterou os níveis sanguíneos, hepáticos e cerebrais de MT. Deste modo, acredita-se que o mecanismo de proteção não está envolvido no aumento da síntese desta molécula. Outras moléculas detoxificantes podem estar envolvidas no mecanismo de proteção.
- A pré-exposição ao ZnCl₂ e/ou NAC:
 - O tratamento com ZnCl₂ amenizou a inibição da atividade da PBG-sintase sanguínea, e todos os tratamentos preventivos (ZnCl₂, NAC e ZnCl₂+NAC) protegeram a inibição da enzima AChE cerebral e o acúmulo de Pb em

sangue e cérebro. Quanto a proteção exercida pela NAC, acredita-se que está ligada a ação quelante da própria molécula.

Os resultados mostram alguns efeitos protetores dos compostos utilizados, porém, mais estudos envolvendo ligação dos compostos e investigação de indução de moléculas e proteínas detoxificantes são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na ação do Zn e da NAC.

5 REFERÊNCIAS

ALFANO, D.P.; PETIT, T.L.; LEBOUTILLIER, J.C. Development and plasticity of the hippocampal-cholinergic system in normal and early lead exposed rats. **Brain Research**. v. 312, p. 117-124, 1983.

ANDERSON R.B.; KEY B. Role of acetylcholinesterase in the development of axon tracts within the embryonic vertebrate brain. **Interntional Journal of Developmental Neuroscience**. v. 17 p. 787-793, 1999.

ANJOS, J.A.S.A.; SANCHEZ, L.E. Plano de Gestão ambiental para sítios contaminados com resíduos industriais: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação/BA. **Bahia Análise & Dados**. v. 10, p. 306-309, 2001.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Lead**. U.S. Department Of Health And Human Services. August, 2007

BANNER, W.JR. Experimental chelation therapy in chromium, lead, and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. **Toxicology Applied Pharmacology**. v. 83, p. 142-147, 1986.

BASHA, C.D. et al. Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain: reversal effect of calcium co-administration. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 30, p. 343-350, 2012.

BASHA, M.R. et al. Lead-induced developmental perturbations in hippocampal sp1 DNA-binding are prevented by zinc supplementation: in vivo evidence for pb and zn competition. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 21, p. 1-12, 2003.

BECHARA, E.J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal of medical and biological research**. v. 29, p. 841-851, 1996.

BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 34, p. 167-177, 2013.

BERRAHA, A.A. et al. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. **Comptes Rendus Biologies**. v. 330, p. 581-588, 2007.

BLANUSA, M. et al. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 2271-2794, 2005.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory Brain. **Brain Research Reviews**. v. 21, p. 285-300, 1995.

BOCCA, B. et al. Toxic metals contained in cosmetics: A status report. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 68, p. 447-467, 2014.

BRADY, K.; HERRERA, Y.; ZENICK, H. Influence of parental lead exposure on subsequent learning ability of offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 3, p. 561-565, 1975.

BRZÓSKA, M.M. et al. The effect of zinc supply on cadmium-induced changes in the tibia of rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 729-737, 2001.

BUSTAMANTE, N.D.; MACIAS-KONSTANTOPOULOS, W.L. Retained lumbar bullet: a case report of chronic lead toxicity and review of the literature. **The Journal of Emergency Medicine**. v. 51, p. 45-49, 2016.

CARDIANO, P.; FOTI, C.; GIUFFRÉ, O. On the interaction of N-acetylcysteine with Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} . **Journal of Molecular Liquids**. v. 223, p. 360-367, 2016.

CARVALHO, F.M. et al. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 13, p. 19-24, 2003.

CASADO, M.F. et al. Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p. 945-952, 2007.

CHADHA, V.D.; BHALLA, P.; DHAWAN, D.K. Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. **Liver International**. v. 28, p. 558-565, 2008.

CHEN, W. et al. Characterizing N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) binding for lead poisoning treatment. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 371, p. 144-149, 2012.

CHIMIANTI, F. et al. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Current Drug Targets**. v. 4, p. 323-338, 2003.

CHOI, D.W.; KOH, J.Y. Zinc and brain injury. **Annual Review of Neuroscience**. v. 21, p. 347-375, 1998.

CLEVELAND, L.M. et al. Lead hazards for pregnant women and children: Part 1: immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. **American Journal of Nursing**. v. 108, p. 40-49, 2008.

CORDEIRO, R.; LIMA-FILHO, E. C. A inadequação dos valores dos limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 11, p. 177-186, 1995.

CORY-SLECHTA, D.A.; POKORA, M.J.; WIDZOWSKI, D.V. Postnatal lead exposure induces super sensitivity to the stimulus properties of a D2-D3 agonist. **Brain Research**. v. 598, p. 162-172, 1992.

COSTANTI, M. Laudo comprova alta concentração de metais pesados em lama de barragens. Disponível em: <<http://noticias.r7.com/minas-gerais/laudo-comprova-alta>>

concentracao-de-metais-pesados-em-lama-de-barragens-13112015>. Acesso em 25 out. 2016.

CUNHA, F.G. et al. Diagnóstico ambiental e de saúde humana: contaminação por chumbo em Adrianópolis, no estado do Paraná, Brasil. In: SILVA, C.R. Et al. **Geologia Médica no Brasil**. Rio de Janeiro: CPRM – Serviço Geológico do Brasil, 2006.

DESSYPRIS, E. N. Erythropoiesis. In: LEE, G. R. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. **Baltimore: Williams and Wilkins**, 1998. vol 1, chapter. 9, p. 169-192.

DEWANJEE, S. et al. Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorusolitorius*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**. v. 55, p. 78-91, 2013.

ERCAL, N. et al. In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL16 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or Nacetylcysteine. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 21, p. 157-161, 1996a.

ERCAL, N. et al. N-actylcysteine protects chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. **Toxicology**. v. 108, p. 57-64, 1996b.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**. v. 18, p. 872-879, 2002.

FAVERO, A.M. et al. Lactating and nonlactating rats differ to renal toxicity induced by mercuric chloride: the preventive effect of zinc chloride. **Cell Biochemistry and Function**. v. 32 p. 420-428, 2014.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 5 p. 47-58, 2012.

FLORA, S.J.S. Nutritional components modify metal absorption, toxic response and chelation therapy. **Journal of nutrition e environmental medicine**. v. 12, p. 53-67, 2002.

FLORA, S.J.S.; MITTAL, M.; MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **Indian Journal of Medical Research**. v.128, p.501-523, 2008.

FRANCISCATO, C. et al. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, p. 480-486. 2011.

FRANCISCATO, C. et al. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 27, p. 459-468, 2009.

FRANCO, J.L. et al. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicology Letters**. v. 187, p.137-143, 2009.

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

GOEL, A.; DANI, V.; DHAWAN, D.K. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. **Chemico-Biological Interactions**. v. 156, p. 131-140, 2005.

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

GOTTLIEB, A.; KEYDAR, I.; EPSTEIN, H.T. Rodent brain growth stages: an analytical review. **Biology of the Neonate**. v. 32, p. 166-176, 1977.

GULSON, B.L. et al. Relationships of lead in breast milk to lead in blood, urine and diet of infant and mother. **Environmental Health Perspectives**. v. 106, p. 667-674, 1998.

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

HJORTSO, E.; FOMSGAARD, J.S.; FOGH-ANDERSEN, N. Does N-acetylcysteine increase the excretion of trace metals (calcium, magnesium, iron, zinc and copper) when given orally? **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 39, p. 29-31, 1990.

INEU, R.P. et al. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 58, p. 522-529, 2013.

IPCS, 1995 (International Programme On Chemical Safety). **Environmental health criteria 165 for inorganic lead**. Geneva, 1995. 165p.

JAFFE, E.K. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 27, p. 169-179, 1995.

KLAASSEN, C. D. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In HARDMAN, J. G.; GIMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 66, p. 1649-1671.

LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 131, p. 231-243, 2002.

LARINI, L. **Toxicologia**, Editora Manole, Segunda Edição, 1993.

LI, X. et al. Determination for major chemical contaminants in tea (*Camellia sinensis*) matrices: A review. **Food Research International**. v. 53, p. 649-658, 2013.

LIU, C. et al. Protective effect of puerarin on lead-induced mouse cognitive impairment via altering activities of acetyl cholinesterase, monoamine oxidase and nitric oxide synthase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 35, p. 502-510, 2013.

LOCEY, B. J., FÜRST, A. & RADDING, S. B. In WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic, 1998. 2v. 614: 230-233: Lead

MARET, W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 19, p. 7-12, 2005.

MARKHAM, G.D. et al. Spatial proximity and sequence localization of the reactive sulfhydryls of porphobilinogen synthase. **Protein Science**. v. 2, p. 71-79, 1993.

MATHIE, A.; SUTTON, G.L.; CLARK, C.E.; VEALE, E.L. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. **Pharmacology Ther**. v. 111, p. 567-583, 2006.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods Enzymology**. v. 251, p. 3-7, 1995.

MORAES-SILVA, L. et al. Protecting Against Alterations Induced by Mercury Chloride in Newborn Rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 26, p. 354-359, 2012.

NAGARAJAN, S. et al. Safety and toxicity issues associated with lead-based traditional herbo-metallic preparations. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 151, p. 1-11, 2014.

NIES, A.S.; SPIELBERG, S.P. 1996. Principles of Therapeutics. In: Hardman JG; Gilman AG; Limbird LE (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 3, p. 34-63.

NRIAGU, J.; PACYMA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. **Nature**. v. 333 p. 134-139, 1988.

OLIVEIRA, V.A. et al. Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect of ZnCl₂. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 28, p. 240-246, 2014.

OLIVEIRA, V.A. et al. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 32, p. 183-188, 2015.

OTTENWALDER, H.; SIMON, P. Differential effect of N-acetylcysteine on excretion of the metals Hg, Cd, Pb, and Au. **Archives Toxicology**. v. 60, p. 401-402, 1987.

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. 87-196, 2002.

PAOLIELLO, M.M.B. et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environmental Research**. v. 88, p. 120-128, 2002.

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

PAOLIELLO, M.M.B.; DE CAPITANI, E.M. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmental Research**. v. 103, p. 288-297, 2007.

PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation and treatment. **Alternative Medicine Review** v. 11 p. 2-22, 2006.

PEIXOTO, N. C.; ROZA, T.; PEREIRA, M. E. Sensitivity of d-ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue. **Toxicology In Vitro**. v. 18, p. 805-809, 2004.

PEIXOTO, N.C. et al. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicology Letters**. v. 146, p. 17-25, 2003.

PEIXOTO, N.C. et al. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Life Science**. v. 81, p. 1264-1271, 2007

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**. v. 72, p. 226-230, 1992.

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

PHYU, M.P.; TANGPONG, J. Protective effect of Thunbergialaurifolia (Linn.) on lead induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment in mice. **BioMed Research International**. 2013. doi: 10.1155/2013/186098

PONTES, L. O combustível automotivo no Brasil. **Com Ciência**, 2002.

REDDY G.R.; Devi, B.C.; Chetty, C.S. Developmental lead neurotoxicity: alterations in brain cholinergic system. **Neurotoxicology**. v. 28, p. 402-407, 2007.

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

ROCHA, J.B.T. et al. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aluminolevulinatase

dehydratase of suckling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 26, p. 1077-1083, 1993.

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 d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**. v. 100, p. 27-37, 1995.

ROMÁN, G.C.; KALARIA, R.N., Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. **Neurobiology of Aging**. v. 27, p.1769-1785, 2006.

Roney, N.; Colman, J. Interaction profile for lead, manganese, zinc, and copper. **Environmental Toxicology Pharmacology** v. 18, p. 231-234, 2004.

SAMUNI Y., GOLDSTEIN S., DEAN O.M., BERK M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1830 p. 4117-4129, 2013.

SANDSTEAD, H.H; AU, W. Zinc. In: Nordberg, G.F.; Fower, B.A.; Nordberg, M.; Friberg, L.T. (eds). **Handbook on the Toxicology of Metals**, Academic Press, USA, 925-47, 2007.

Santo Amaro da Purificação - BA. In: Bahia Análise & Dados, Salvador/BA, v.10 n. 4 p.306-309, mar. 2001. Disponível em:<http://jangello.unifacs.br/downloads/Projeto_Purifica.pdf>. Acesso em: 09 de novembro de 2016.

SARAIVA, R. A. et al. Molecular Docking Studies of Disubstituted Diaryl Diselenides as Mammalian δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Enzyme Inhibitors. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 75, p. 1012-1022, 2012.

SCHVARTSMAN, Samuel. **Intoxicações Agudas**. 3ª.Ed. São Paulo: Sarvier, p.241-248, 1985.

SHAH, D. Magnitude of zinc deficiency and efficacy of zinc. **Indian Journal Pediatrics**. v. 78, p. 1140-1141, 2011.

SHEMIN, D. 5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 273, p. 109-115, 1976.

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and developmental of behavior in the rat. **Brain Research**. v. 28, p. 85-95, 1971.

SMITH, R.D.; OSTERLOH, J.D.; FLEGAL, A.R. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. **Environmental Health perspectives**. 1996, 104(1) 60-66

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 2, p. 294-302, 2001.

STEBBENS, W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 75, p. 265-276, 2003.

TAROHDA, T.; YAMAMOTO, M.; AMANO, R. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 380, p. 240-246, 2004.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds.), **Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill Companies, 1996. Chapter 8, 161-176.

TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology**. 2th ed. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.

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

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver d-aminolevulinic acid dehydratase. **International Journal of Biochemistry**. v. 12, p. 751-756, 1980.

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

ZHOU, Z. et al. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. **American Journal of Pathology**. v. 166, p. 1681-1690, 2005.

SEMPLE, B.D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**. v. 106–107 p. 1–16, 2013.