

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO  
ALEGRE**

**ESTRESSE OXIDATIVO CEREBRAL E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA INALAÇÃO DE ROFA  
(*RESIDUAL OIL FLY ASH*)**

**ANA CLÁUDIA TEDESCO ZANCHI**

Porto Alegre

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ESTRESSE OXIDATIVO CEREBRAL E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA INALAÇÃO DE *RESIDUAL OIL*  
*FLY ASH***

**ANA CLÁUDIA TEDESCO ZANCHI**

Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, ênfase em farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ramos Rhoden

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva

Porto Alegre

2006

## AGRADECIMENTOS

**À Deus**, por ter me iluminado durante essa caminhada;

À **Profa. Dra. Cláudia Ramos Rhoden**, pela sensibilidade, dedicação, integridade, amizade e, sobretudo, por ter acreditado em mim como pessoa e pesquisadora;

À **Profa. Dra. Helena Barros**, por ter aguçado e motivado a minha curiosidade científica, pela paciência em transmitir os conhecimentos sobre o comportamento de animais de laboratório, dedicação, disponibilidade, apoio e carinho durante esta caminhada;

À **Prof. Dra. Rosane Gómez**, por ser uma grande amiga e conselheira nas horas difíceis;

Ao **Prof.Dr.Paulo Hilário Saldiva**, pelo auxílio para iniciar este estudo e por nos ajudar a desenhar a parte experimental e gentilmente nos fornecer e enviar o ROFA;

Minha mãe, **Marinice Maria Tedesco Zanchi**, pelo amor incondicional, pelas palavras certas nas horas difíceis, pelo exemplo de força, de superação, por não ter permitido que eu desistisse;

Ao meu pai, **Cláudio José Zanchi** (*in memorian*), que demonstrou coragem e ternura durante toda a doença zelando por mim enquanto eu estudava ao seu lado no Hospital e pelo seu orgulho ao saber que eu tinha passado na prova do mestrado;

Minha irmã, **Marta Beatriz Tedesco Zanchi**, por termos cumprido a promessa de seguirmos em frente juntas;

Meu amor, **João Luiz Guedes**, companheiro, cúmplice e amigo que soube compreender as minhas ausências;

À **Camila Caggiane Tedesco**, minha prima, pelo bom humor e amizade;

À **”sogrona” querida do coração Oliva Maier da Fonseca**, ao **”sograsto” querido José Carlos de Oliveira**, à **cunhada e amiga Márcia Rita da Fonseca de Oliveira**, à **afilhada Bruna de Oliveira** e ao **futuro cunhado “sortudo” Téo** por ter encontrado a minha cunhada, o meu agradecimento pelos momentos maravilhosos dos almoços de domingo, as conversas longas e divertidas, as risadas, pelo carinho, o apoio e a palavra amiga nas horas difíceis e a certeza de ter **uma grande família**;

À **Elaine Freitas Silveira**, que além de médica, é uma pessoa muito especial que me ensinou a lutar contra os revéses da vida e a me conhecer melhor;

Aos colegas de mestrado, **Carlos Eurico Pereira da Luz**, **Thiago Gomes Heck**, **Fernanda Praia** e **Viviane Toniazio** pela amizade e companheirismo;

**Aos queridos bolsistas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição atmosférica, Luís Felipe Ingrassia Campesato, Lucas Toniolo da Silva, Camila Orkanowski de Oliveira, Juliana Klieman Chagas, Maria Fernanda H. Carneiro, Roberto Marques Daminai e Marcelo Rafael Petry** meu agradecimento pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pela disponibilidade em ajudar sempre que fosse necessário e por me mostrar que a vida é alegre e gostosa de se viver;

À **Maria Letícia Maya**, pela amizade e conselhos;

Ao **Alexandre Maslinkiewicz** pela ajuda e amizade;

Ao **Mário Serapião** pelos ensinamentos sobre os animais de laboratório e amizade;

Às secretárias do pós **Fatima Regina da Silva, Ivonice Oliveira dos Santos e Patricia Twardowski.**, pela paciência e dedicação com que me atenderam durante estes dois anos;

Às amigas da limpeza, **Nilda de Oliveira Pereira, Delci Regina de Oliveira e Jaqueline Adms Amaral** pelo carinho e apoio nas horas difíceis;

À **Eleonora Liberato Petzhold** da Biblioteca da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, sempre sorridente e otimista de que ela conseguiria aquele artigo difícil de se encontrar;

À **Dona Yvone Pereira Rodrigues** da Biblioteca da Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre pelas palavras amigas nos momentos difíceis e pelo carinho.

**Muito obrigada a todos que participaram desta jornada!**

“É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito; e vivem nesta penumbra cinzenta sem conhecer a vitória nem a derrota.”

(Franklin Roosevelt)

“É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que ela pode vencer, nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que ela comporta.”

(Marquês do Pombal)

## RESUMO

Estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição humana aos metais da transição está associada às doenças neurodegenerativas. A exposição ocupacional aos solventes e aos metais como ferro, manganês, cobre, chumbo ou zinco tem sido associada com a doença de Parkinson e a exposição ao alumínio parece ter relação com a doença de Alzheimer. Conseqüentemente, os danos oxidativos podem estar relacionados às ações neurotóxicas destes metais. O nosso objetivo é estudar o estresse oxidativo no cérebro e as alterações comportamentais de ratos expostos ao *residual oil fly ash* (ROFA) por 30 dias. Ratos Wistar foram expostos ou não ao ROFA por instilação intranasal e tratados ou não com a n-acetilcisteína (NAC) (150 mg/Kg) i.p. por 30 dias. Após o primeiro, oitavo e trigésimo dias, os animais foram testados no campo aberto. Os ratos foram sacrificados, o cérebro foi dissecado e o estriado e o cerebelo retirados. As estruturas foram homogenizadas e testadas para determinar o estresse oxidativo (EO). A experiência foi feita no verão e no inverno. O grupo ROFA no inverno apresentou uma concentração mais elevada do malondialdeído (MDA) independente dos tratamentos em comparação ao verão ( $p=0.001$ ). Por outro lado, no verão, o grupo ROFA apresentou a concentração de MDA mais elevada e a NAC protegeu o estriado do EO. A respeito do cerebelo, não houve alteração na concentração de MDA tanto no verão como no inverno ( $p=0.120$  para o verão;  $p=0.252$  para o inverno). Em relação ao comportamento dos animais no campo aberto, avaliou-se a motricidade (andar periférico, levantar, explorar) e a emocionalidade (andar central, *grooming* e número de bolos fecais). Os animais do grupo ROFA e ROFANAC apresentaram uma diminuição maior da motricidade no inverno em comparação ao verão. Observou-se, no decorrer do tempo, uma diminuição gradual destes comportamentos, o que demonstrou a habituação dos animais ao teste do

campo aberto. A emocionalidade dos grupos ROFA e ROFANAC diminuiu por que tanto no inverno como no verão os animais fizeram menos *grooming* e andaram menos no centro do campo. Portanto, nosso estudo demonstrou que o ROFA causou EO no estriado sendo este protegido pela NAC. Entretanto, a NAC não protegeu das alterações comportamentais. Assim, a inalação do ROFA está associada ao EO, mas esta não influencia diretamente nas alterações comportamentais apresentadas pelos animais.

## ABSTRACT

**Background:** Epidemiological studies have demonstrated that exposure to transition metals is associated with neurodegenerative disorders. Occupational exposure to solvents and metals as iron, manganese, copper, lead or zinc are associated with Parkinson's disease while aluminium associated with Alzheimer's disease. Therefore, oxidant damage may be related to the neurotoxic actions of these metals.

**Objectives:** To study oxidative stress in brain and behavioral alterations in rats exposed to ROFA for 30 days.

**Methods:** Wistar rats, male, 45 day of life, were exposed or not to ROFA by intranasal instillation and were treated with n-acetylcysteine (NAC) (150 mg/Kg) or not i.p. for 30 days. In 1, 8, 30 days animals were tested in open-field. Rats were sacrificed and brain was separated in striatum and cerebellum. The structures were homogenized and tested for oxidative stress (OS). The experiment were done in summer and winter.

**Results:** ROFA group in summer presented higher malondyaldeyde concentration (OS) as compared with winter ( $p=0.001$ ). In summer, ROFA group had higher MDA and NAC protect striatum from OS. In winter all values of MDA were higher in striatum and there were not significative differences among groups. Regarding cerebellum, anything was observed ( $p=0.120$  for summer;  $p=0.252$  for winter). Rats demonstrated in open-field more movement (higher frequency of rearings and exploration) in summer than in winter during time of the experiment.

**Conclusions:** In conclusion, our study demonstrated that ROFA inhalation was associated with OS at the striatum level, but this alteration did not impact, directly, behavioral changes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática das reações de oxi-redução; a,b: reações de Fenton	22
Figura 2: Representação esquemática das reações de redução do oxigênio à água	26
Figura 3: Representação esquemática das etapas da lipoperoxidação de membranas celulares	30
Figura 4: Representação esquemática da reação de dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase CuZn	34
Figura 5: Representação esquemática da reação de dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase Mn	34
Figura 6: Representação esquemática da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio	35
Figura 7: Representação esquemática da reação de redução da glutathiona pela glutathiona peroxidase	37
Figura 8: Representação esquemática das reações entre a n-acetilcisteína e as espécies reativas de oxigênio	38
Figura 9: Representação esquemática da regeneração do ascorbil ou semihidroascorbato	39
Figura 10: Representação esquemática da reação entre o $\alpha$ -tocoferol e o lipoperóxido produzindo um composto não reativo, LO <sub>2</sub> H (1); reação entre o lipoperóxido e o $\alpha$ -Toc <sup>•</sup> produzindo uma substância não reativa, $\alpha$ -TocOOL (2)	40
Figura 11: Concentrador de partículas – Universidade de Harvard, Boston, EUA. Fotografia cedida pela professora Cláudia Rhoden	41
Figura 12: Aspecto geral das câmaras de exposição localizadas no jardim da Faculdade de Medicina da USP. Fotografia cedida pelo professor Paulo H.N. Saldiva	43
Figura 13: Fotografia do método de instilação intratraqueal (cedida pela professora Cláudia Rhoden)	44
Figura 14: Fotografia do método de instilação intranasal (cedida pela professora Cláudia Rhoden)	45

Figura 15: Fotografia do campo aberto (cedida pela professora Cláudia Rhoden) 47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>1.1 Material Particulado</b>	13
<b>2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO</b>	26
<b>2.1 Toxicidade do oxigênio</b>	26
<b>2.2 Tipos de Espécies Reativas de Oxigênio</b>	27
2.2.1 Radical ânion superóxido	27
2.2.2 Radical hidroperoxil	28
2.2.3 Radical hidroxil	28
2.2.4 Peróxido de hidrogênio	28
2.2.5 Oxigênio singlet	29
<b>2.3 Reatividade das Espécies Reativas de Oxigênio</b>	29
<b>3 DEFESAS ANTIOXIDANTES</b>	33
<b>3.1 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS</b>	33
3.1.1 Superóxido dismutase	33
3.1.1.1 Superóxido dismutase CuZn	33
3.1.1.2 Superóxido dismutase Mn	34
3.1.2 Catalases	35
3.1.3 Glutathiona	35
3.1.3.1 Glutathiona reduzida	36
3.1.3.2 Glutathiona redutase	36
3.1.3.3 Glutathion peroxidase	37
<b>4 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS</b>	38
<b>5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO DO AR</b>	41
<b>6 OBJETIVOS</b>	46
<b>6.1 Objetivos específicos</b>	46
<b>ANEXO 1</b>	47
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	49
<b>PAPER</b>	56-84
<b>8 CONCLUSÃO</b>	85

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MATERIAL PARTICULADO

No final do século XX, vários episódios foram reconhecidos como marco para o início dos estudos sobre poluição e saúde humana. O primeiro evento ocorreu de 1 a 5 de dezembro de 1930 no *Vale Meuse*, na Bélgica. As condições atmosféricas estáveis e a poluição proveniente de Liege, na Bélgica, contribuíram para o acúmulo de poluentes como dióxido de enxofre, ácido sulfúrico e gás fluoreto. Nos últimos dias deste evento, mais de 60 pessoas morreram, o que correspondeu a uma taxa de mortalidade 10 vezes maior do que a normal nesta região. Outro caso ocorreu em Donora, sudeste da Pensilvânia, Estados Unidos. Em 1948, de 27 a 30 de outubro houve um acúmulo de poluentes na atmosfera nesta região devido a um episódio de inversão térmica, o que resultou em 20 mortes. A taxa de mortalidade em Donora e na região de Webster Hollow, após o pico de poluição atmosférica foi seis vezes maior do que a normal (BELL *et al.*, 2004; BELL *et al.*, 2001). Entretanto, o episódio mais importante ocorreu em 1952 na cidade de Londres, na Inglaterra. Na época, uma massa estacionária de ar de alta pressão pairou sobre a cidade persistindo por cinco dias. As emissões de partículas eram provenientes do aumento da queima doméstica de carvão devido às temperaturas baixíssimas do inverno, das indústrias e da combustão de diesel pelos veículos automotores. Além disto, as concentrações de dióxido de enxofre e de fumaça aumentaram, porque não ocorria a dispersão do ar atmosférico. Assim, como a camada de ar junto à superfície terrestre não se renovava, os poluentes ficaram concentrados e formaram uma nuvem negra sobre a cidade (HUNT *et al.*, 2003). Este evento resultou em 12.000 mortes entre dezembro de 1952 e fevereiro de 1953. Apesar desta situação catastrófica, este acontecimento impulsionou as pesquisas nesta área.

Atualmente, em várias partes do mundo ainda existem poluentes em excesso no ar atmosférico. Ezzati *et al.* (2002) estimaram em 800.000 e 1.600.000 mortes anuais devido à exposição ao meio externo e ao interno respectivamente, como, por exemplo, ao ar livre em um distrito industrial e no interior dos edifícios no centro de uma metrópole. Portanto, o estudo dos efeitos da poluição sobre a saúde servirá de alerta para que as autoridades tomem providências com o objetivo de prevenir a emissão de um grande número de partículas no ar.

Entre as formas de prevenção destacam-se: o rodízio das placas dos carros nas metrópoles a fim de diminuir as emissões provenientes dos veículos automotores e a colocação de filtros nas chaminés de refinarias, siderúrgicas, pólos petroquímicos, indústrias e fábricas. O Estado pode, além disto, criar leis mais rígidas em favor do meio ambiente. As penas como multas e prisão deveriam ser aplicadas de forma exemplar, e os responsáveis pelos desastres ecológicos teriam a obrigação de recuperar a área atingida.

A poluição atmosférica faz parte do nosso cotidiano nas grandes cidades sendo formada por uma mistura de sólidos, líquidos ou gases suspensos no ar. Especificamente, o material particulado é uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos que podem variar em proporção e composição diariamente. Individualmente, estas partículas são invisíveis, mas, coletivamente, podem aparecer como nuvens ou “massa” escura que fica suspensa no ar por longo período de tempo, sendo movimentada pelos ventos. O tamanho das partículas é variado e as mesmas são classificadas conforme o diâmetro aerodinâmico em grossas, partículas com diâmetro entre 10 e 2,5 micra; finas, diâmetro entre 2,5 e 0,1 micra; e ultrafinas, diâmetro menor do que 0,1 micron. Estas duas últimas possuem um grande poder de penetração após serem inaladas pelo ser humano e são responsáveis pelas ações tóxicas provocadas através da exposição à poluição do ar (Environmental Protect Agency, 2006; KAISER *et al.*, 2000; SCHWELA *et al.*, 2000).

As fontes destes poluentes são variáveis e subdividem-se em: diretas - as partículas são liberadas pelos veículos automotores, fábricas, queima de madeira, entre outras; e indiretas - as partículas são geradas pela reação de gases formados a partir da queima de combustíveis fósseis com a luz solar e o vapor de água (Environmental Protect Agency, 2006). Os componentes do material particulado podem incluir nitratos, sulfatos, compostos orgânicos, material biológico (endotoxinas) e uma variedade de metais (GURGUEIRA *et al.*, 2002).

A importância de misturas complexas tem sido reconhecida com base em um amplo estudo epidemiológico que examina a relação entre os níveis de partículas no ar e morte, nos Estados Unidos (Health Effects Institute, 2006). Este estudo demonstrou que a exposição aguda ou crônica ao material particulado contribuiu para o aumento de admissões hospitalares e de morbimortalidade de doenças cardiopulmonares, especialmente em pacientes de faixas etárias extremas e com doenças respiratórias crônicas pré-existentes, tais como asma e bronquite (KAISER, *et al.*, 2000; SCHWELA, *et al.*, 2000). Em 2004, Samet e colaboradores demonstraram que o material particulado também está associado ao baixo peso dos neonatos nascidos de mães expostas durante a fase gestacional.

No panorama nacional, existem estudos que se referem à associação entre a mortalidade de crianças e idosos e a exposição aos poluentes (SALDIVA, *et al.*, 1995, SALDIVA, *et al.*, 1994), aos problemas respiratórios em crianças e a poluição do ar (SOBRAL, 1989), ao aumento das admissões hospitalares de crianças e de adolescentes expostos à poluição do ar (BRAGA, *et al.*, 2001) e ao aumento da mortalidade intrauterina em fetos de mães expostas à poluição (PEREIRA, *et al.*, 1998).

Estes acontecimentos coincidem com o aprimoramento da tecnologia vinculada a métodos de colheita, de determinação e de caracterização do material particulado em amostras urbanas (SIOTAS, *et al.*, 1995), possibilitando o desenvolvimento de estudos experimentais,

tanto em animais como em cultura de células para a detecção de sítios alvo, bem como a compreensão dos mecanismos de toxicidade destas partículas.

Estudos que utilizam diferentes modelos experimentais têm demonstrado que o dano tecidual causado por estas partículas não ocorre somente no coração e no pulmão. A exposição ao material particulado na fase gestacional de camundongos fêmeas pode estar associada ao aumento dos efeitos deletérios no ácido desóxi-ribonucléico nos seus fetos (RELIENE *et al.*, 2005). Por sua vez, a exposição crônica de camundongos fêmeas por quatro meses às partículas pode estar associada também à alteração na fertilidade feminina (MOHALLEM *et al.*, 2005).

Existem estudos na literatura que relacionam o local de coleta do material particulado, a composição química, o diâmetro aerodinâmico das partículas, as estações do ano e os efeitos sobre a saúde humana (BECKER *et al.*, (2005); BALLESTER *et al.*, 1997; Companhia de saneamento ambiental do estado de São Paulo, 2006; MIZOUE *et al.*, 2004; SIOTAS *et al.*, 2005; STEERENBERG *et al.*, 2004).

Quanto à composição química, pesquisadores concluíram que o material particulado apresenta concentrações diferentes de metais de transição que variam de acordo com o local da coleta do material. Wellenius e colaboradores (2002) obtiveram o *residual oil fly ash* (resíduos da combustão de combustíveis fósseis) composto por partículas ricas em enxofre, sílica, ferro, cálcio, alumínio, níquel e vanádio coletados na área de Boston (EUA); Medeiros e colaboradores (2004), *residual oil fly ash* composto na sua maior parte por manganês ( $1977 \pm 14 \mu\text{g/g}$  do pó das partículas) em relação aos outros metais de transição como bromo, cério, cobalto, cromo, ferro, lantânio, rubídio, estrôncio, vanádio, zinco coletados em uma siderúrgica no estado de São Paulo (Brasil) e Lambert e colaboradores (2002), *residual oil fly ash* rico em vanádio, ferro e níquel que foi coletado na área de Birmingham (EUA). Além das fontes de emissão, a composição do material particulado depende dos ventos, massas de ar,

chuvas, episódios de inversão térmica e das estações do ano. As condições meteorológicas do inverno favorecem a formação de material particulado possivelmente por que há o aumento na condensação de vapores orgânicos e a diminuição da renovação do ar atmosférico. Este fato está relacionado com o fenômeno da inversão térmica que se caracteriza pela presença de uma camada de ar quente que se sobrepõe a uma camada de ar frio, impedindo o movimento ascendente do ar fazendo com que os poluentes se mantenham próximos à superfície. Este fenômeno é mais freqüente no inverno, período em que as camadas de inversão são mais baixas principalmente durante a noite. Em um ambiente com uma grande circulação de veículos automotores e número de indústrias, este fenômeno pode levar às altas concentrações de poluentes ocasionando o aumento nos problemas de saúde da população como os respiratórios (Companhia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo, 2006). Siotas e colaboradores (2005) demonstraram que a composição do MP pode, em parte, contribuir para a variação sazonal dos efeitos sobre a saúde humana. Eles demonstraram que as partículas ultrafinas ( $<0,1$  micra), em maior quantidade na atmosfera no inverno, são capazes de induzir reações inflamatórias maiores nos pulmões por unidade de massa de material particulado devido ao seu número elevado e à área maior da superfície de contato, o que facilita a deposição nos tecidos. Estudo experimental em animais sensibilizados com ovoalbumina demonstrou um aumento de IgG e IgE quando os camundongos eram expostos ao MP no inverno em comparação com o verão e a primavera (STEERENBERG *et al.*, 2004). Também, Mizoue e colaboradores (2004), que estudaram a síndrome do “edifício doente” no inverno e na primavera, demonstraram que existe o risco 1,6 maior de aumentar a produção de muco pelo sistema respiratório e de pele seca devido à sujidade do ar nos escritórios. Entretanto, ainda não existem estudos que demonstrem a existência de uma associação entre o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, psiquiátricas e a exposição ao material particulado. Tem sido mostrado, na literatura, que a exposição aos metais de transição como o

ferro, o cobre e o alumínio que compõem o material particulado, provavelmente está associada à fisiopatogenia da doença de Parkinson e do mal de Alzheimer (BARNHAM *et al.*, 2004; HALLIWELL *et al.*, 1992). O homem, geralmente, se expõe a estes metais durante a sua jornada de trabalho em locais insalubres como minas, siderúrgicas, metalurgias, indústria de tintas e termoelétricas (SEIDLER *et al.*, 1996). Esta exposição no seu dia a dia pode se constituir em um problema de saúde pública. Estudo epidemiológico realizado na região metropolitana de Detroit (EUA) concluiu que se o indivíduo se expusesse por mais de 20 anos ao cobre e ao ferro, haveria um risco de 3,69 vezes maior de desenvolver a doença de Parkinson. Se a exposição fosse ao ferro e ao chumbo, este risco seria 2,64 mais elevado de desenvolver a doença de Parkinson (GORELL *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2002). Em relação ao mal de Alzheimer, a exposição ao alumínio é um fator de risco para a doença. Estudo epidemiológico ecológico realizado na Noruega em municípios agrupados de acordo com a concentração de alumínio na água demonstrou que até 0,05 mg/ml, entre 0,05 e 0,20 mg/ml e acima de 0,20 mg/ml deste elemento o risco para a demência era equivalente a 1; 1,15 e 1,32 para os homens e, 1; 1,19 e 1,42 para as mulheres respectivamente (FLATEN *et al.*, 1990 apud FLATEN, 2001; FLATEN *et al.*, 1986 apud FLATEN, 2001; VOGT *et al.*, 1986 apud FLATEN, 2001). Estes resultados mostraram que existia uma relação dose-resposta, isto é, quanto maior fosse a concentração de alumínio na água, maior seria o risco para a demência em homens e mulheres. Forbes *et al* citado por Flaten (2001) estudaram a relação entre a função cognitiva e as concentrações de alumínio na água. Eles concluíram que indivíduos expostos a altas concentrações de alumínio (acima de 0,88 mg/ml) e baixas de fluoretos (abaixo de 0,88 mg/ml) teriam um risco 2,72 vezes maior de apresentar demência em comparação aos indivíduos expostos à condição inversa (FORBES *et al.*, 1992 apud FLATEN, 2001; FORBES *et al.*, 1994 apud FLATEN, 2001; FORBES *et al.*, 1995 apud FLATEN, 2001). Mckhann *et al* citado por Flaten (2001) analisaram, em 1984, uma coorte de

3.777 de homens e mulheres idosos e diagnosticaram o mal de Alzheimer através do método do Instituto Nacional de Desordens Neurológicas, de Comunicação, Derrame e Mal de Alzheimer. Os pesquisadores ajustaram o risco relativo para o mal de Alzheimer para idade, sexo, local onde os pacientes fixaram residência e o consumo de vinho e concluíram que as pessoas expostas à água com concentrações maiores que 0,10 mg/ml de alumínio apresentaram um risco 2,74 vezes maior para a doença (MCKHANN *et al.*, 1984 apud FLATEN, 2001). Já Kilburn *et al.* (1998) estudaram se a reciclagem de alumínio no sudeste dos EUA estava relacionada às alterações neurocomportamentais e às doenças pulmonares. Ele demonstrou que dos trabalhadores expostos ao alumínio, 19,5% apresentaram depressão ( $p=0,035$ ) e 41,5%, bronquite crônica ( $p=0,005$ ). A prevalência da depressão nos trabalhadores expostos foi maior do que nos controles (3,9%) (KILBURN *et al.*, 1998). Portanto, existe uma relação entre os metais de transição e a fisiopatogenia das doenças neurodegenerativas, no caso, a doença de Parkinson e o mal de Alzheimer.

Dentre os mecanismos que buscam explicar a toxicidade do material particulado cabem ressaltar os dois mais investigados:

a) Ação direta: as partículas podem atingir diferentes tecidos exercendo a sua atividade tóxica. Esta ação corrobora a idéia de que as partículas finas e, especialmente, as ultrafinas podem ter uma distribuição sistêmica danificando as células alvo localizadas a uma distância razoável do seu sítio de absorção (pulmão).

b) Ação indireta: Stringer e Kobzik (1998) sugeriram que a toxicidade destas partículas poderia estar relacionada ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio em células alvo. Estudo experimental realizado por Gurgueira e colaboradores (2002), confirmou esta hipótese, determinando que a exposição de ratos por 5 h a um concentrado de partículas causava um aumento do estresse oxidativo no pulmão e no coração destes animais. Dois anos mais tarde, Rhoden e colaboradores (2004) demonstraram que o estresse oxidativo

é um mediador importante da resposta inflamatória pulmonar induzida pela exposição ao material particulado. Assim, a interação do material particulado inalado com os macrófagos pulmonares induz a formação de espécies ativas de oxigênio que podem modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estas espécies afetam o sistema cardiovascular causando um aumento do tônus simpático e, conseqüentemente, um aumento na frequência cardíaca (GODLESKI *et al.*, 2000; LOVETT *et al.*, 2002).

O encéfalo é mais sensível às espécies reativas de oxigênio que os outros órgãos como coração, pulmões e fígado (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998). Em primeiro lugar, o encéfalo é composto, na sua maior parte, por lipídeos. Assim, as espécies reativas de oxigênio provocarão a reação em cascata de lipoperoxidação a partir dos lipídeos de membrana e causarão, conseqüentemente, alterações na sua estrutura e permeabilidade, a perda da seletividade na troca iônica, o acúmulo de lipoperóxidos no meio intracelular, a liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos (malondialdeído), culminando na morte celular por apoptose (FERREIRA *et al.*, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998). Segundo, as enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase são encontradas em pouca quantidade e a glutathione peroxidase, em maior concentração no cérebro. A catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, que fazem parte da primeira linha de defesa antioxidante do organismo, atuam como detoxificadoras do agente antes que ele cause lesão. Já a segunda linha de defesa tem a função de reparar o dano ocorrido, sendo constituída pelo ascorbato (vitamina C). Como a catalase está em baixa concentração no cérebro, esta degradará uma menor quantidade de peróxido de hidrogênio, um dos produtos da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Este peróxido de hidrogênio em excesso reagirá com os metais de transição e resultará no radical hidroxil, o mais tóxico entre todas as espécies reativas de oxigênio. Este radical possui uma alta afinidade por cada molécula encontrada nas células

vivas. O hidroxil pode causar a quebra das ligas duplas do ácido desóxi-ribonucléico, alterações químicas na deóxiribose, nas bases púricas e pirimídicas, nos lipídeos de membrana (lipoperoxidação) e a oxidação de proteínas. Todos estes eventos causarão problemas na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, na liberação do cálcio intracelular, na indução de proteases e a lipoperoxidação levando à morte celular apoptótica (GERLACH *et al.*, 1994). O radical hidroxil leva à produção de aldeídos citotóxicos via lipoperoxidação como o malondialdeído. Além disso, a lipoperoxidação causará a perda gradual da fluidez da membrana plasmática, o que aumenta a sua permeabilidade aos íons cálcio. Se este processo for adiante, a membrana perderá a sua integridade e as enzimas e os receptores serão desativados (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985). Já a baixa concentração de superóxidodismutase leva a uma maior quantidade do radical ânion superóxido (FERREIRA *et al.*, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998). Como não há uma quantidade suficiente de superóxidodismutase para catalisar a reação de dismutação entre o ânion superóxido e um próton a fim de produzir peróxido de hidrogênio, sobrarão um excesso desta espécie reativa de oxigênio. Assim, o ânion superóxido em excesso desencadeará a reação de lipoperoxidação. Por sua vez, a glutathione peroxidase catalisará a reação da redução da glutathione em dissulfeto de glutathione com o objetivo de oxidar o peróxido de hidrogênio à água. Desta maneira, a glutathione peroxidase se encarregará de retirar o excesso de peróxido de hidrogênio evitando a produção do radical hidroxil e, conseqüentemente, a iniciação da lipoperoxidação (BHARATH *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998). O ascorbato faz parte da segunda linha de defesa antioxidante contra as espécies reativas de oxigênio. Os neurônios e as células da glia possuem um sistema de transporte ativo para o ascorbato. Este composto somente será um antioxidante na ausência dos metais de transição. Todavia, se o mesmo estiver na presença de  $Fe^{+2}$  ou de  $Cu^{+1}$  poderá formar um complexo que levará à produção de espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso central. Desta forma,

se a ferritina liberar o ferro e a ceruplasmina, o cobre no encéfalo, estes serão agentes oxidantes tóxicos e provocarão danos no tecido neuronal através da produção de espécies reativas de oxigênio pela sua reação com o ascorbato (HALLIWELL, 1992). Terceiro, várias áreas nobres do cérebro como a *substância nigra pars compacta* e o globo pálido são ricas em ferro. Este metal de transição está ligado na sua forma oxidada à ferritina. Esta proteína de armazenamento impede que ocorra a redução do  $\text{Fe}^{+3}$  ao  $\text{Fe}^{+2}$ . Assim, o  $\text{Fe}^{+2}$  não reagirá com o peróxido de hidrogênio e não produzirá o radical hidroxil. O ferro ainda exerce funções essenciais no cérebro especialmente na aprendizagem e na memória. Sugere-se que o ferro se faz necessário para que certos neurotransmissores se liguem corretamente aos seus respectivos receptores. Logo, uma concentração alta de ferro é necessária, principalmente durante o desenvolvimento do organismo humano. Entretanto, a presença deste pode causar danos às células neuronais, via reação de Fenton, provocando a morte celular (figura 1) (HALLIWELL, 1992).

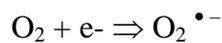


Figura 1: Representação esquemática das reações de oxi-redução; a, b: reações de Fenton (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Pesquisadores já demonstraram que existe uma relação entre o alto conteúdo de ferro no sistema nervoso central, o estresse oxidativo e a fisiopatogenia das doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e mal de Alzheimer.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta*. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos, pigmentados pela neuromelanina, na *substantia nigra pars compacta* e a deficiência de dopamina no estriado são as bases da doença de Parkinson. As causas da degeneração destes neurônios não foram totalmente elucidadas. Sugere-se que a degeneração neuronal esteja associada aos processos tóxicos envolvendo as espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil. A hipótese do estresse oxidativo refere-se a um desequilíbrio entre oxidantes celulares, em maior concentração, e os antioxidantes, em menor concentração. O estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio pode acarretar na lipoperoxidação gerando lipoperóxidos que se acumularão na célula levando-a a morte celular por apoptose. Além disso, nas células nervosas dopaminérgicas, o peróxido de hidrogênio é gerado a partir da degradação da dopamina pela monoaminoxidase B e, não enzimaticamente, pela auto-oxidação deste neurotransmissor *in vivo* (GÖTZ *et al.*, 2004). Os pacientes portadores da doença de Parkinson possuem uma concentração alta de ferro na *substantia nigra pars compacta* e no globo pálido. Por isso,  $Fe^{+2}$  ou de  $Cu^{+1}$  reagem com o excesso de peróxido de hidrogênio produzindo o radical hidroxil (reação de Fenton) (figura 1) (AMEIJEIRAS *et al.*, 2004). Como os pacientes perdem os neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* e há uma diminuição da dopamina no estriado, eles apresentam sintomas como bradicinesia, tremores, dificuldades para iniciar os movimentos e problemas de equilíbrio (CARLSON, 2002).

O mal de Alzheimer é caracterizado patologicamente pela presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis de proteína beta-amilóide (SIMONIANI *et al.*, 1996). A maior fonte da proteína beta-amilóide no cérebro de pacientes com mal de Alzheimer provêm dos depósitos em forma de placas senis. No encéfalo se encontram proteínas como a citocromo P450, as não heme para o ferro, a tirosina e a triptofano hidroxilases que contêm ferro. As

regiões cerebrais que têm alto conteúdo de ferro são a *substantia nigra pars compacta*, o núcleo caudado, o putâmen e o globo pálido. No cérebro saudável o ferro é armazenado pela ferritina, o que previne o dano oxidativo. Entretanto, a presença dos metais de transição como o ferro, o zinco e o cobre nas placas senis podem ser importantes para a patologia da doença. Assim, o ferro no estado redox ativo ( $\text{Fe}^{+2}$ ) está aumentado nos emaranhados neurofibrilares e nas placas senis. Sabe-se que o ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) catalisa a formação do radical hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio, proveniente do metabolismo celular, (figura 1) e pode ser a causa do aumento de estresse oxidativo observado no encéfalo dos pacientes com mal de Alzheimer. Mais do que isto, muitos compostos que se acumulam nas placas beta-amilóide e nos emaranhados neurofibrilares podem estar envolvidos no estresse oxidativo (MILTON, 2001). Por exemplo, o alumínio estabiliza o  $\text{Fe}^{+2}$  impedindo a sua oxidação a  $\text{Fe}^{+3}$  e a sua ligação à ferritina, aumentando a concentração do ferro redox ativo. O excesso deste metal catalisará a reação de Fenton (YANG *et al.*, 1999). Como vimos anteriormente, o radical hidroxil, produto desta reação, desencadeia uma série de processos que resultam em produtos tóxicos para as células e causam a morte celular por apoptose. Logo, as atividades pró-oxidantes da proteína beta-amilóide e a capacidade do  $\text{Fe}^{+2}$  e do  $\text{Cu}^{+1}$  de aumentá-las podem ser importantes. Os pré-requisitos para que as espécies reativas de oxigênio geradas pelas proteínas beta-amilóide exerçam uma função no processo de neurodegeneração são: a produção das espécies reativas de oxigênio mais estáveis e a captação das proteínas beta-amilóide pelas células. Logo, sugere-se que a proteína beta-amilóide necessita entrar ou se ligar nas células para produzir as espécies reativas de oxigênio, a partir do seu conteúdo de ferro redox ativo via reação de Fenton, e causar a morte celular. Portanto, o estresse oxidativo pode ser uma manifestação precoce do mal de Alzheimer (BONDY *et al.*, 1993, BENZI *et al.*, 1995, MILTON, 2004; PERRY *et al.*, 2002). Estes estudos demonstraram que o estresse oxidativo relacionado ao ferro e ao cobre pode ser um dos fatores causadores dos sintomas do

mal de Alzheimer (perda da memória, da cognição e as dificuldades para realizar tarefas simples do dia a dia).

## 2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.1 TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

Embora os organismos aeróbios necessitem do oxigênio do ar para sobreviver, esta substância pode causar danos. Os sinais de toxicidade dependem da espécie, da idade, do estado fisiológico e da dieta. Ratos recém nascidos sobrevivem por mais tempo respirando oxigênio 100% em comparação aos adultos, os quais desenvolvem sofrimento respiratório. Já os humanos adultos ao respirarem oxigênio 100% por várias horas poderão desenvolver dano alveolar e fibrose pulmonar. As altas pressões de oxigênio podem causar toxicidade aguda no SNC dos seres humanos, sendo capazes de provocar convulsões, o que pode acontecer com mergulhadores ou pacientes colocados em câmaras hiperbáricas (BONDY *et al.*, 1993; CAMPBELL *et al.*, 2001; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998; JUNQUEIRA *et al.*, 2004; WILLIAM *et al.*, 1991).

No organismo humano, o oxigênio é utilizado na respiração celular. Esta molécula via citocromo oxidase é reduzida à água através da cadeia respiratória (na mitocôndria), com o intuito de produzir ATP. No entanto, os 5% restantes de oxigênio sofrem reações de redução incompleta (figura 2) gerando as EROS (quadro 1), as quais são extremamente reativas e instáveis.

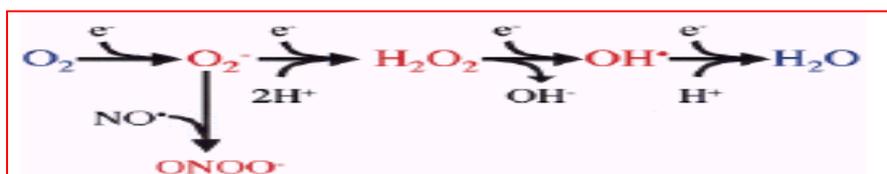


Figura 2. Representação esquemática das reações de redução incompletas do oxigênio à H<sub>2</sub>O (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Tabela 1. Exemplos de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Espécies reativas de oxigênio	
Superóxido $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrogênio $H_2O_2$
Hidroxil $^{\bullet} OH$	Ácido hipocloroso $HOCl_4$
Peroxil $RO_2^{\bullet}$	Ozônio $O_3$
Alcoxil $RO^{\bullet}$	Oxigênio singlet $O^1$
Hidroperoxil $HO_2^{\bullet}$	Peroxinitrito $ONOO^{\bullet}$
	Óxido nítrico $NO$

## 2.2 TIPOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

### 2.2.1 Radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )

O radical ânion superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos causada por processos inflamatórios. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária em sistemas geradores de  $O_2^{\bullet -}$  (FERREIRA *et al.*, 1997).

### 2.2.2 Radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^\bullet$ )

Representa a forma protonada do radical ânion superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxil é mais reativo do que o ânion superóxido por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA *et al.*, 1997).

### 2.2.3 Radical hidroxil ( $^\bullet\text{OH}$ )

É considerada a espécie mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do  $^\bullet\text{OH}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxil for produzido próximo ao ácido desóxi-ribonucléico e neste estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações nas bases púricas e pirimidícas, levando à inativação ou a mutação do ácido desóxi-ribonucléico. Além disso, este radical pode inativar várias proteínas (enzimas ou constituintes da membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e, iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (figura 3) (FERREIRA *et al.*, 1997; MILTON *et al.*, 2004; PERRY *et al.*, 2002).

### 2.2.4 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

O peróxido de hidrogênio não é uma espécie radical por não possuir elétrons desemparelhados na última camada. É uma molécula que passa para o meio intracelular

facilmente através da difusão passiva e participa da reação que produz o radical hidroxil (figura 1) (FERREIRA *et al.*, 1997).

### **2.2.5 Oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ )**

É a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O  $^1\text{O}_2$  tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (FERREIRA *et al.*, 1997).

## **2.3 Reatividade das espécies reativas de oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio reagem com lipídios, proteínas e ácido desóxiribonucléico podendo provocar danos nas membranas celulares, mutações e acúmulo de produtos de degradação promovendo a morte celular. Estas reações ocorrem em diferentes órgãos do organismo como o coração, fígado, pulmões, rins, encéfalo entre outros (BONDY, LEBEL, 1993; CAMPBELL *et al.*, 2001; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1985; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998; JUNQUEIRA, *et al.*, 2004; WILLIAM, *et al.*, 1991). Na figura 3 é demonstrada a representação esquemática do processo de lipoperoxidação.

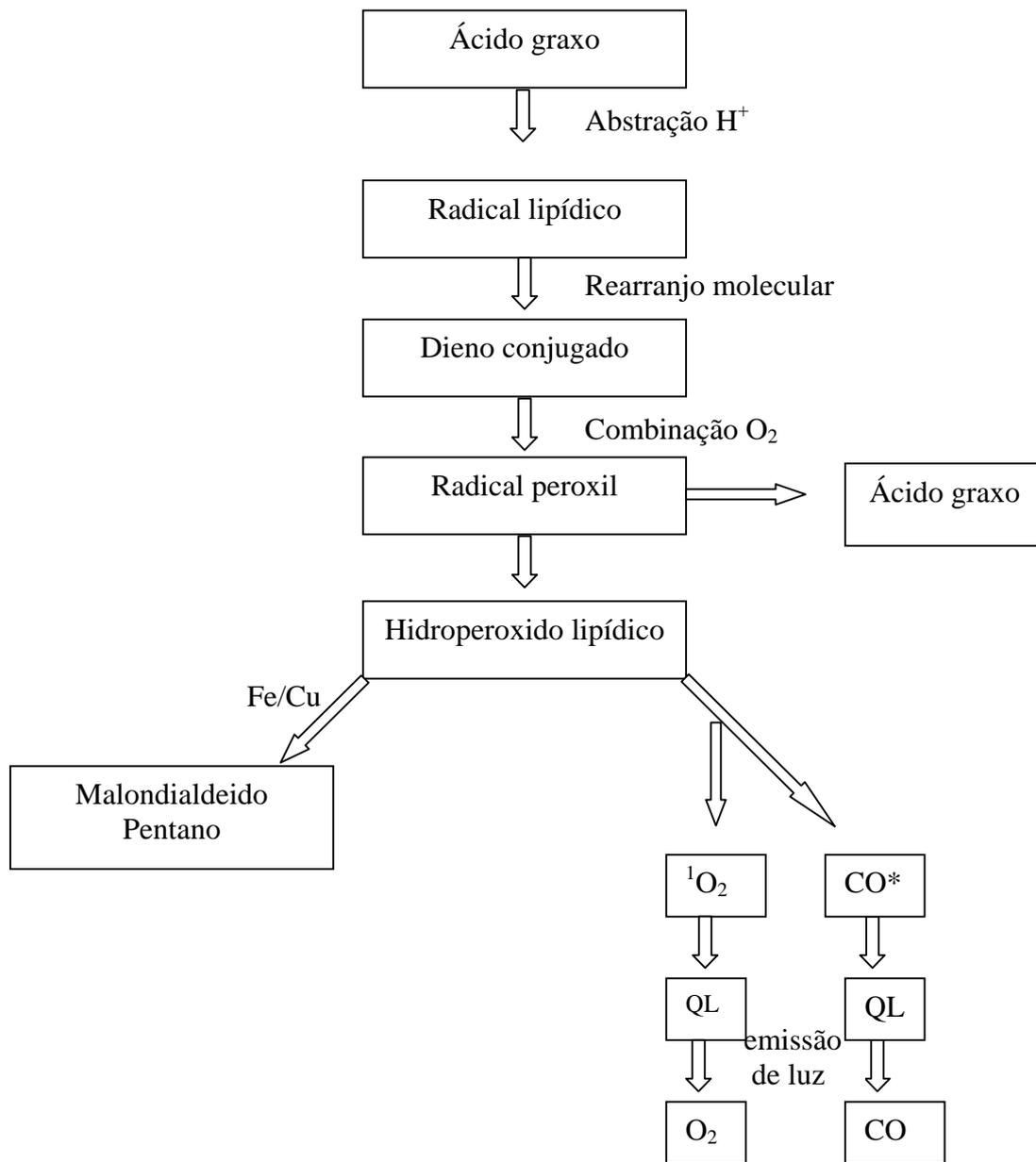


Figura 3: Representação esquemática das etapas da lipoperoxidação de membranas celulares  $^1\text{O}_2$  = oxigênio *singlet* e  $\text{CO}^*$  = carbonila excitada (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

A reação em cascata da lipoperoxidação se divide em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, ocorre o ataque das espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil, aos ácidos graxos poliinsaturados retirando o átomo de hidrogênio de um metileno (-CH<sub>2</sub>-). A retirada deste átomo resulta na espécie -CH<sup>•</sup>- que apresenta um elétron desemparelhado na última camada. Este radical se estabiliza através do rearranjo molecular de um dieno conjugado. Já na segunda etapa, a propagação, os dienos conjugados reagem com o oxigênio resultando no radical peroxil. Por sua vez, este radical reage com os lipídeos de membrana formando os lipoperóxidos e assim, sucessivamente, até a fase da terminação. Na terminação, o peroxil se combina com um átomo de hidrogênio, o que resulta no hidroperóxido lipídico. Este composto se degrada em maldondialdeído e gás pentano na presença dos íons ferro e cobre. Além disto, o hidroperóxido lipídico libera o oxigênio *singlet* e as carbonilas excitadas emitem *quanta* de luz visível a fim de retornar ao seu estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

Alguns produtos resultantes da reação de lipoperoxidação podem ser usados na mensuração do estresse oxidativo através de técnicas laboratoriais. As principais técnicas utilizadas são os testes das substâncias oxidantes reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que determina a concentração de malondialdeído, o gás pentano exalado e a quimiluminescência. O TBARS é a reação entre o ácido tiobarbitúrico (solução a 0,67%) e o malondialdeído que, na presença de sais de ferro, produz um complexo de coloração rósea cuja absorbância é lida a 535 nm no espectrofotômetro. Outro produto, o gás pentano contido no ar exalado pelos humanos e animais é passado através de uma superfície adsorvente a baixa temperatura. Este gás é liberado do material adsorvente e mensurado através da cromatografia gasosa (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998). Já a quimiluminescência quantifica o *quanta* de luz visível emitido pelo oxigênio *singlet* e pelas carbonilas excitadas

quando retornam ao seu estado fundamental (COHEN, 1992; BELLÓ-KLEIN, 1993; NUNES *et al.*, 1995).

### **3 DEFESAS ANTIOXIDANTES**

Para a adaptação a meios ricos em oxigênio, os seres aeróbios desenvolveram uma série de mecanismos biológicos destinados ao controle das espécies reativas de oxigênio geradas durante o seu metabolismo. Dentre eles podemos citar os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

#### **3.1 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS**

##### **3.1.1 Superóxido Dismutase**

Existem dois tipos de superóxidodismutase: a superóxidodismutase CuZn e a superóxidodismutase Mn. As atividades relativas das superóxidos dismutases dependem do tecido e da espécie onde são encontradas.

###### **3.1.1.1 Superóxidodismutase CuZn**

Em células animais, grande parte da superóxidodismutase CuZn localiza-se no citosol, mas parece estar presente também nos lisossomas, núcleo e no espaço entre e fora das membranas mitocondriais. Peroxissomas também contém superóxidodismutase CuZn. A enzima contém dois sítios ativos, cada qual com um íon cobre e um íon zinco. A superóxidodismutase CuZn catalisa a reação de dismutação do radical ânion superóxido. Os íons cobre na superóxidodismutase CuZn parecem funcionar na reação de dismutação através da alternância entre a oxidação e a redução no sítio ativo da enzima. O íon zinco não tem

função no ciclo catalítico, mas auxilia na estabilização da enzima (figura 4) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998; REITER, 1985).



Figura 4: Representação esquemática da reação de dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

### 3.1.1.2 Superóxidodismutase Mn

A superóxidodismutase Mn caracteriza-se por apresentar no seu sítio ativo o íon  $\text{Mn}^{+3}$  quando em repouso. Apesar desta diferença a superóxidodismutase Mn catalisa a mesma reação que a superóxidodismutase CuZn. A superóxidodismutase Mn é também mais lábil a desnaturação pelo calor ou produtos químicos como detergentes do que a superóxidodismutase CuZn. Em células animais se localiza nas mitocôndrias.



Figura 5: Representação esquemática da reação de dismutação do radical ânion superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Uma variável importante para a superóxidodismutase Mn é o número de mitocôndrias presentes em cada tipo de tecido (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998; REITER, 1985).

### 3.1.2 Catalases

A enzima possui quatro subunidades protéicas com um grupo heme férrico ligado ao seu sítio ativo. Como demonstrado anteriormente, a dismutação do radical ânion superóxido  $O_2^{\bullet -}$  gera peróxido de hidrogênio, uma espécie também produzida por outras oxidases *in vivo* como a xantina, D-amino e a urato oxidases. O peróxido de hidrogênio é removido pela catalase. Esta enzima catalisa diretamente a decomposição do peróxido de hidrogênio em água (figura 6).

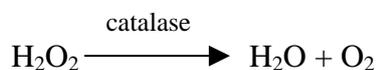


Figura 6: Representação esquemática da reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase em água e oxigênio (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Nos animais a catalase é encontrada na maior parte dos órgãos, mas está, principalmente, concentrada no fígado. O cérebro, o coração e o músculo esquelético apresentam uma baixa concentração de catalase (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998; REITER, 1985).

### 3.1.3. Glutathione

A glutathione está presente em altas concentrações no cérebro. Após a oxidação do agente oxidante, a reciclagem desta substância é necessária. Para tal, várias enzimas atuam em ciclo.

### 3.1.3.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio extracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol, presente na cisteína. A glutathiona reduzida pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio e luz ultravioleta. Além disso, diminui a susceptibilidade à lesão renal decorrente de isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório de cisteína; participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação dos produtos de lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese do ácido desóxi-ribonucléico, de proteínas e algumas prostaglandinas (FERREIRA *et al.*, 1997; REITER, 1985).

### 3.1.3.2 Glutathiona redutase

Após a exposição da glutathiona reduzida ao agente oxidante, ocorre a sua oxidação a dissulfeto de glutathiona (GSSG) (figura 7). A recuperação da glutathiona reduzida é feita pela enzima glutathiona redutase, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de glutathiona redutase é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A glutathiona redutase é uma flavoproteína dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, há prejuízo da função da glutathiona redutase (FERREIRA *et al.*, 1997).

### 3.1.3.3 Glutathione peroxidase

A glutathione peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão da glutathione a dissulfeto de glutathione (figura 7).



Figura 7: Representação esquemática da reação de redução da glutathione pela glutathione peroxidase (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Embora a glutathione peroxidase tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (FERREIRA *et al.*, 1997).

#### 4 DEFESAS NÃO ENZIMÁTICAS

Existe uma gama de substâncias antioxidantes que protegem o organismo contra os radicais livres. As mais importantes são a n-acetilcisteína (NAC) (substância sintetizada em laboratório), o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), os carotenóides e os flavonóides provenientes da dieta.

A n-acetilcisteína é um composto tiol inicialmente utilizado como agente mucolítico. Atualmente, é também utilizada como droga para o tratamento de doenças associadas com a diminuição dos níveis de glutathione, tais como: infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (VIHA), doenças cardíacas e câncer. Apesar do seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado, a n-acetilcisteína pode exercer o papel de antioxidante, pois se admite que esta substância atue através do aumento nos níveis de cisteína, a qual age como precursor da glutathione (MENON, *et al.*, 2003). Assim, a n-acetilcisteína reage com o radical ânion superóxido (1), com o peróxido de hidrogênio (2) e com o radical hidroxil (3) (figura 8).

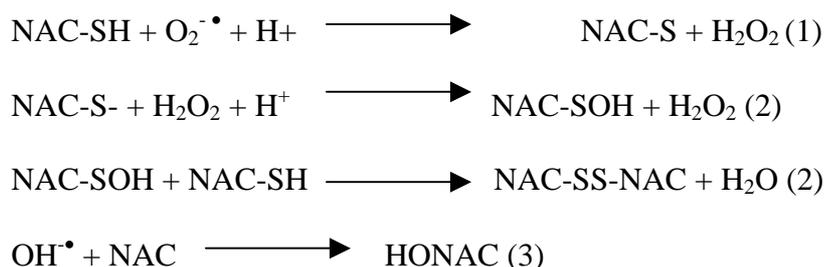


Figura 8: Representação esquemática das reações entre a n-acetilcisteína e as espécies reativas de oxigênio (MENON *et al.*, 2003).

Segundo Pocernich *et al.* (2000), Fontaine *et al.* (2000) e Christien *et al.* (2001) o sistema de transporte de aminoácidos pode carrear a cisteína (metabólito da NAC) através da

barreira hematoencefálica aumentando os níveis intracelulares de glutathione. Logo, a n-acetilcisteína seria um precursor indireto da glutathione. Por sua vez, Bender *et al.* (2000) e Thompson *et al.* (1996) sugeriram que a cisteína proveniente da n-acetilcisteína seria transportada para o meio intracelular através de um sistema de transporte sódio dependente ( $\text{Na}^{+1}$ ) específico para o glutamato e a cistina.

Outro antioxidante importante, o ascorbato, o qual pode ser encontrado nas frutas cítricas, possui a propriedade de agir como agente redutor. Assim, o ascorbato doa um elétron e produz o radical ascorbil ou semihidroascorbato (SDA) que pode sofrer oxidação e formar o dihidroascorbato (DHA). A pouca atividade do ascorbil é a essência da propriedade antioxidante do ascorbato: uma espécie reativa de oxigênio interage com o ascorbato e uma substância muito menos reativa é formada. O ascorbil perde um próton regenerando o ascorbato (figura 9) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

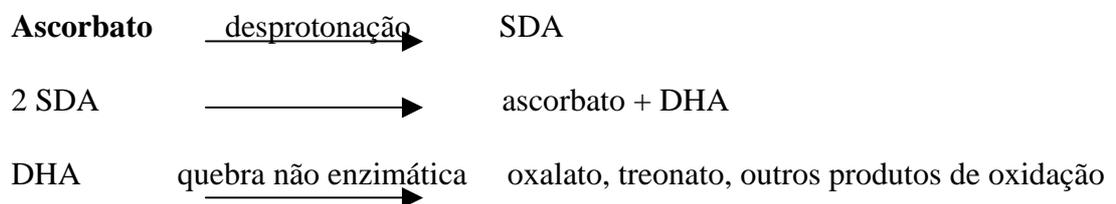


Figura 9: Representação esquemática da regeneração do ascorbil ou SDA (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Já o  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E ( $\alpha$ -ToCH) reage com os lipoperoxídeos ( $\text{LO}_2^{\bullet}$ ) resultantes da lipoperoxidação muito mais rápido do que estes radicais possam reagir com as cadeias de ácidos graxos adjacentes ou com as proteínas de membrana (Figura 10) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

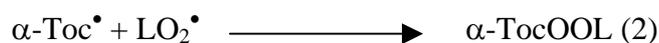


Figura 10: Representação esquemática da reação entre o  $\alpha$ -tocoferol e o lipoperóxido produzindo um composto não reativo,  $\text{LO}_2\text{H}$  (1); Reação entre o lipoperóxido e o radical  $\alpha\text{-Toc}^\bullet$  produzindo a substância não reativa,  $\alpha\text{-TocOOL}$ , (2) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

O radical  $\alpha\text{-Toc}^\bullet$  formado a partir da perda do hidrogênio do  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha\text{-TocH}$ ) reage novamente com o lipoperóxido e forma um produto não reativo. O  $\alpha$ -tocoferol é encontrado em óleos vegetais, margarina e grãos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Outras substâncias provenientes da dieta além da vitamina E são os carotenóides. Os carotenóides são pigmentos coloridos encontrados no tomate, cenoura, moranga e mamão. Estas substâncias, sob condições fisiológicas, reagem com os lipoperóxidos formando produtos inofensivos ao organismo. Os carotenóides quando estão em altas concentrações no sangue estão associados com a diminuição da incidência de certos tipos de câncer como o de pulmão (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1998).

Além disso, outros compostos que formam pigmento coloridos são os flavonóides. Estas substâncias são encontradas no vinho tinto, no suco de uva, no chocolate e no chá verde (LUZ *et al.*, 2004; LEIKERT *et al.*, 2002). Os flavonóides reagem com o óxido nítrico (NO) e com o peróxinitrito (produzido a partir da reação entre o ânion superóxido e óxido nítrico) evitando a lipoperoxidação (RIEMERSMA *et al.*, 2001).

## 5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO DO AR

Existem vários modelos para o estudo da exposição à poluição do ar. Modelos *in vitro* como as culturas de células e *in vivo* como a exposição ao concentrado de partículas, a exposição ao ar livre, a exposição em câmaras e a instilação intratraqueal e intranasal são os mais importantes.

Becker *et al* (2005), por exemplo, utilizaram a cultura de células. O processo é simples: expõem-se as culturas de células normais do epitélio brônquico humano e dos macrófagos alveolares à mesma quantidade de partículas grossas (diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 10 micra) e de ultrafinas (diâmetro aerodinâmico menor que 0,1 micron) coletadas em Chapel Hill, Carolina de Norte, EUA (BECKER *et al.*, 2005). Este método *in vitro* é simples, entretanto, não demonstra o que ocorreria se um organismo vivo completo fosse exposto à poluição.

A partir da necessidade de se expor seres vivos aos poluentes, a Universidade de Harvard, EUA desenvolveu um concentrador de partículas oriundas da atmosfera da cidade de Boston como demonstrado na figura abaixo (figura 11).

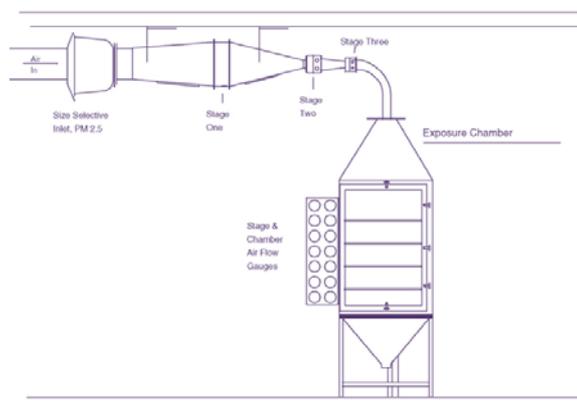


Figura 11: Concentrador de partículas – Universidade de Harvard, Boston, EUA.

Fotografia cedida pela professora Cláudia Rhoden.

Os ratos são colocados nas prateleiras e inalam um concentrado de partículas (diâmetro aerodinâmico entre 0,5 e 2,5 micra) por 5 h. O concentrado de partículas permanece em suspensão sem alterações físicas ou químicas no interior do aparelho para exposições via inalação ou coleta de filtros para análise da composição do material particulado. No entanto, o concentrado de partículas não mimetiza a exposição ao ar livre. Além disto, o custo do equipamento é muito elevado, o que impossibilitaria experimentos deste porte no Brasil (GURGUEIRA *et al.*, 2002; RHODEN *et al.*, 2004).

Outra forma de expor os animais à poluição seria ao ar livre. Garcidueñas-Calderón *et al.* (2002) expuseram cães ao ar livre na cidade do México, altas taxas de poluição, e na cidade de Taxcala, mesmo país, mas com reduzido índices de poluição atmosférica, sendo esta utilizada como controle por um tempo determinado. A principal vantagem é a reprodução de forma fidedigna da exposição dos animais ao ar atmosférico poluído. As duas cidades devem ter altitude, latitude e condições climáticas semelhantes. O clima deve ser levado em consideração porque altera a composição do material particulado de uma região para outra. Entretanto, necessita-se de espaço para colocar os canis nas duas cidades, pessoas para cuidar dos animais, um número pequeno de cães que sejam da mesma raça, idade e que tenham as mesmas condições de alimentação e higiene, o que encarece o experimento.

Mohallem *et al.* (2005) expuseram ratos ao ar atmosférico em câmaras especificamente confeccionadas para o objetivo proposto. Estas câmaras consistem em estruturas cilíndricas com 1,5 m de diâmetro e 2,5 m de largura e são cobertas com material plástico (figura 12). No interior destas câmaras foram construídas prateleiras, onde as gaiolas com os animais de laboratório são colocadas (MOHALLEM *et al.*, 2005).



Figura 12: Aspecto geral das câmaras de exposição localizadas no jardim da Faculdade de Medicina da USP. Fotografia cedida pelo professor Paulo H. Saldiva.

A entrada e a distribuição do ar no interior das câmaras ocorrem na base do cilindro. O ar entra na câmara pela tubulação e sai através do topo. Há um sistema de controle da pressão barométrica nas câmaras para que esta não seja maior que a pressão atmosférica. Ao final da tubulação existem filtros instalados dentro de caixas hermeticamente fechadas. O primeiro filtro é para as partículas pequenas e o segundo, para as substâncias químicas. Estes reduzem drasticamente a entrada de material particulado e de gases no interior da câmara sendo considerada livre de poluentes (limpa). Por outro lado, câmaras desprovidas do sistema de filtros permitem que o ar poluído circule livremente. As vantagens deste método são: a mimetização fidedigna da exposição real dos ratos ou camundongos ao ar atmosférico e a utilização de um número maior de animais por experimento. Entretanto, o custo elevado para a instalação das câmaras torna o método não amplamente disponível (MOHALLEM *et al.*, 2005).

Como uma alternativa aos métodos de exposição ao material particulado através do concentrador de partículas e das câmaras existem os métodos de instilação intratraqueal e

intranasal. O método de instilação intratraqueal (figura 13) nada mais é que a introdução de uma cânula fina na traquéia do animal anestesiado e a injeção de uma suspensão de partículas, cuja concentração é conhecida, no interior da luz da traquéia dos mesmos (ANTONINI *et al.*, 2002).

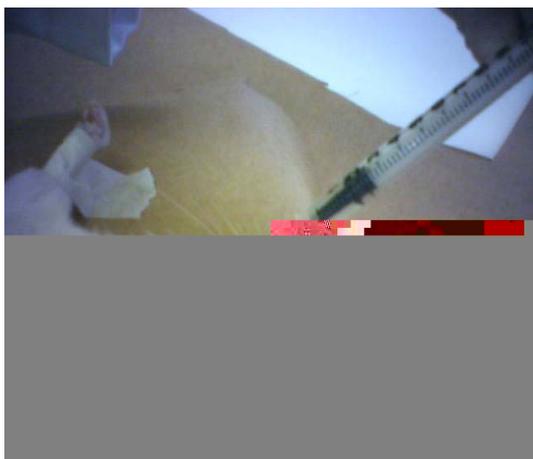


Figura 13: Fotografia do método de instilação intratraqueal (cedida pela professora Cláudia Rhoden).

Já o método de instilação intranasal (figura 14) utilizado neste trabalho é a instilação de um volume (10  $\mu$ l) de uma suspensão de partículas, cuja concentração é previamente conhecida com o auxílio de uma pipeta automática na narina do rato. A instilação provoca o reflexo de apnéia seguido por uma inspiração profunda o que propulsiona o líquido para o interior dos pulmões (MEDEIROS *et al.*, 2004) e para o sistema nervoso central através da via do bulbo olfatório.



Figura 14: Fotografia do método de instilação intranasal (cedida pela professora Cláudia Rhoden).

As vantagens das duas técnicas são a sua fácil execução e o baixo custo. Entretanto, podem haver perdas da suspensão ao fazer a instilação quando o pesquisador não está treinado, o que resultaria em uma concentração menor de poluentes que a preconizada para o experimento em questão. Além disso, os dois métodos não são como a exposição ao ar livre, pois a concentração de partículas é conhecida e todo o volume de suspensão, a princípio, é aspirado pelo animal. Contudo, apesar das desvantagens, o método de instilação nasal foi o escolhido porque, ao aspirar a suspensão, parte destas partículas penetra no sistema nervoso central via bulbo olfatório e o restante é direcionado para o pulmão. Não foi utilizada a instilação intratraqueal, pois não era do nosso interesse que o material particulado fosse somente para os pulmões. Portanto, ao se escolher o modelo experimental para estudar os efeitos da poluição, deve-se levar em consideração o objetivo do trabalho, a infraestrutura laboratorial, o tempo do experimento, o treinamento das pessoas envolvidas e o custo.

## 6 OBJETIVO GERAL

Estudar se a exposição crônica ao ROFA (*residual oil fly ash*), através do modelo de instilação nasal, produz alterações comportamentais em ratos e se as mesmas são mediadas por mecanismos dependentes de substâncias oxidantes.

### 6.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar as alterações comportamentais de ratos expostos ou não ao *residual oil fly ash* por 1, 8 e 30 dias no teste do campo aberto;
- b) Avaliar se o tratamento crônico com a n-acetilcisteína protege os animais das alterações comportamentais induzidas pela exposição ao *residual oil fly ash*;
- c) Avaliar a lipoperoxidação no estriado e cerebelo dos ratos expostos ao *residual oil fly ash* por 30 dias;
- d) Avaliar se o tratamento crônico com a n-acetilcisteína protege do estresse oxidativo induzido pelo *residual oil fly ash*;
- e) Avaliar a influência das estações do ano (inverno e verão) sobre as respostas comportamentais induzidas pelo *residual oil fly ash*.

## ANEXO 1

### Análise comportamental

#### Campo Aberto

O campo aberto (figura 15) consiste em uma arena branca, circular com 45 cm de raio, circundada por uma parede também branca de 36 cm de altura. O piso é dividido por linhas pretas circulares, formando um círculo central de 9 cm de raio e, outro concêntrico de 26 cm de raio. É ainda dividido em 16 unidades por linhas pretas radiais que partem de um círculo central (MASUR *et al.*, 1970). A iluminação do aparelho é feita com três lâmpadas vermelhas de 40 W, situadas acima da arena e não é utilizado som de fundo. O rato foi colocado no centro da arena, observado por cinco minutos e seu comportamento foi filmado e gravado em fita VHS. Após cada teste, o aparelho foi lavado com solução hidroalcoólica a 50% com o intuito de eliminar o odor do animal testado anteriormente. Assim, o pesquisador, que estava cego para os tratamentos, assistiu as fitas e, com o auxílio do programa Behav (limite de confiança de 95%), analisou os comportamentos de cada rato.



Figura 15: Fotografia do campo aberto  
(cedida pela professora Cláudia Rhoden)

O objetivo deste teste é avaliar a emocionalidade (andar central, número de *groomings* e de bolos fecais) e a motricidade (andar periférico, levantar e explorar) (MASUR *et al.*, 1970).

Neste teste, simula-se a situação na qual o animal está no campo e à mercê do seu predador, como o gavião. Por exemplo, o comportamento natural do rato é de se proteger ou fugir da ameaça. Entretanto, quando se administra um ansiolítico aos animais, eles apresentarão alterações comportamentais como andar pouco na periferia, andar mais ao centro da arena (ambulação - número de quadrados invadidos com as quatro patas); a diminuição no número de bolos fecais, o que demonstra que o animal não está ansioso; a diminuição na frequência do *grooming* (movimentos de auto-limpeza, sistemáticos, dirigidos à cabeça e ao corpo com as patas dianteiras a fim de coçar ou limpar os pêlos e patas), o que demonstra o baixo nível de estresse do animal; a diminuição na frequência do levantar (número de vezes que o rato fica em pé com as patas traseiras no chão), o que demonstra que ele não sente necessidade de se localizar espacialmente no ambiente, e a diminuição na exploração, o que demonstra a tranquilidade do animal ao ser colocado no campo aberto.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEIJEIRAS, A H., MÉNDEZ-ALVARÉZ, E., SANCHEZ-IGLESIAS, S., SANMARTIN-SUÁREZ, C., SOTO-OTERO, R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochemistry International**, v.45, p.103-116, 2004.

ANTONINI, J.M. *et al.* Residual oil fly ash increases the susceptibility to infection and severe damages the lungs after pulmonary challenge with a bacterial pathogen. **Toxicological Sciences**, v.70, p.110-119, 2002.

BALLESTER, F., CORELLA, D., PÉREZ-HOYOS, S., SÁEZ, M., HERVÁS, A. Mortality as a function of temperature. A study in Valencia, Spain, 1991-1993. **International Journal of Epidemiology**, v.26, n.3, p.551-561, 1997.

BARNHAM, K.J., MASTERS, C.L., BUSH, A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.3, p.205-214, 2004.

BECKER, S., DAILEY, L.A., SOUKUP, J.M., GRAMBOW, S.C., DEVLIN, R.B., HUANG, Y. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n.8, p.1032-1038, 2005.

BELL, M.L., DAVIS, D.L. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.3, p.389-394, 2001.

BELL, M.L., DAVIS, D.L., FLETCHER, T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of *Influenza* and pollution. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.1 p.6-8, 2004.

BELLÓ-KLEIN, A. **Contratura cardíaca induzida pelo peróxido de hidrogênio**. Porto Alegre:UFRGS, 1993. Tese de doutorado, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993.

BENDER, A.S., REICHEL, W., NORENBURG, M.D. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**. v.37, p.269-276, 2000.

BENZI, G., MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiology of Aging**, v.16, n.4, p.661-674, 1995.

BHARATH, S., HSU, M., DEEPINDER, K., RAJAGOPALAN, S., ANDERSEN, J.K. Glutathione, iron and Parkinson's disease. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.1037-1048, 2002.

BONDY, S. C.; LEBEL, C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Biology and Medicine**, v.14, p.633-642, 1993.

BRAGA, A L., SALDIVA, P.H., PEREIRA, L.A, MENEZES,J.J., CONCEIÇÃO,G.M., LIN,C.A, ZABONETTI ,A. SCHWARTZ,J., DOCKERY, D.W. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. **Pediatr Pulmonol**, v.31, p.106-113, 2001.

CAMPBELL, A. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. **Brain Research Bulletin**, v.55, p.125-132, 2001.

CHRISTIEN, S., SCHAPER, LYKKESFELDT, J., SIEGENTHALER, C., BIFRARE, Y., BANIC, S., LEIB, S. L., TÄUBER, M.G. Oxidative stress in brain during experimental bacterial meningitis: differential effects of  $\alpha$ -phenyl-tert-butyl nitron and n-acetylcysteine treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.6, p.754-762, 2001.

COHEN, P.J. Allopurinol administrated prior to hepatic ischemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 39, p.1090-1093, 1992.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo. **O que é inversão térmica?** Disponível em <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar\\_geral.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_geral.asp)> Acesso em: 30 jun. 2006.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol. Scand.**, v. 492, p.153-167, 1980.

Environmental Protect Agency. **Air**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>> Acesso em 1 jul.2006.

EZZATI, M., LOPEZ, A.R., HOORN, S.V., MURRAY, C.J.L., COMPARATIVE RISK ASSESSMENT COLLABORATING GROUP. Select major risk factors and global and regional burden of disease. **The Lancet**, v.360, p.147-1360, 2002.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLATEN, T.P. **An investigation of the chemical composition of Norwegian drinking water and its possible relationships with the epidemiology of some diseases**. Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, 1986 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n. 22, p.187-199, 2001.

FLATEN, T.P. Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia (including Alzheimer's disease), Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. **TD0.0009b9b06**.

FONTAINE, M.A. *et al.* Effect of exogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: insights into Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v.75, n.4, p.1709-1715, 2000.

FORBES, W.F., AGWANI, N. Geochemical risk factors for mental functioning based on the Ontario Longitudinal Study of Aging (LSA) III. The effects of different aluminium-containing compounds. **Canadian Journal of Aging**, v. 13, p. 488-498, 1994 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n. 22, p.187-199, 2001.

FORBES, W.F., HAYWARD, L.M., AGWANI, N. Geographical risk factors for mental functioning based on the Ontario Longitudinal Study of Aging (LSA) I. Results from a preliminary investigation. **Canadian Journal of Aging**, v. 11, p. 269-280, 1992 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n. 22, p.187-199, 2001.

FORBES, W.F., MCAINEY, C.A., HAYWARD, L.M., AGWANI, N. Geochemical risk factors for mental functioning based on the Ontario Longitudinal Study of Aging (LSA) II. The role of pH. **Canadian Journal of Aging**, v. 13, p. 249-267, 1994 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.22, p.187-199, 2001.

FURASTÉ, P.A. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico: elaboração e formatação. Explicitação das Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas.** 14.ed. Porto Alegre: Gráfica e Editora Brasul, 2006.

GARCIDUEÑAS-CALDERÓN, L., AZZARELLI, B., ACUNA, H., GARCIA, R., GAMBLING, N.O., MONROY, S., TIZANPANTZIA, M.R., CARSON, J.L., VILLAREAL-CALDERÍN, A., REWCASTLE, B. Air pollution and brain damage. **Toxicology Pathology**, v.30, n.3, p.373-389, 2002.

GERLACH, M., BEN-SHACHAR, D., RIEDERERE, P., YODIM, M.B.H. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? **Journal of Neurochemistry**, v.63, n.3, p.793-807, 1994.

GODLESKI, J.J., VERRIER, R.L., KOUTRAKIS, P., CATALANO, P., COULL, B., REINISCH, U., LOVETT, E.G., LAWRENCE, J., MURTHY, G.G., WOLFSON, J.M., CLARKE, R.W., NEARING, B.D., KILLINGSWORTH, C. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. **Res.Rep.- Health Effects Inst.**, v.91, p.5-88, 2000.

GORELL, J.M., PETERSON, E.L., RYBICKI, B.A., JOHNSON, C.C. Multiple risk factors for Parkinson's disease. **Journal of Neurological Sciences**, v.217, p.169-174, 2004.

GÖTZ, M.E., DOUBLE, K., GERLACH, M., YODIM, M.B.H., RIEDERERE, P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1012, p.193-208, 2004.

GURGUEIRA, S.A., LAWRENCE, J., COULL, B., MURTHY, K., GONZÁLEZ-FLECHA, B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.8, p.749-755, 2002.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. London: Oxford University Express, 1998.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., Oxygen radicals and the nervous system. **TINS**, p.22-26, 1985.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.59, p.1609-1623, 1992.

Health Effects Institut. **Time series analysis of air pollution and mortality: a statistical review**. Disponível em:<<http://www.healtheffects.org/Pubs/Dominici-SAS.pdf>> Acesso em: 1 ago. 2006.

HUNT, A., ABRAHAM J.L., JUDSON, B., BERRY, C.L. Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. **Environmental Health Perspectives**., v.111, n.9, p.1209-1214, 2003.

JUNQUEIRA, V.B.C. et al. Aging and oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 5-16, 2004.

KAISER J. Evidence mounts that tiny particles can kill. **Science**, v. 289, p.22-23, 2000.

KILBURN, K. Neurobehavioral impairment and symptoms associated with aluminum remelting. **Archives of Environmental Health**, v.53, n.5, p.329-335, 1998.

LAI, B.C.L., MARION, S.A. TESCHKE, K., TSUI, J.K.C. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v.8, p.297-309, 2002.

LAMBERT, A.L., DONG, W., SELGRADE, M.K., GILMOUR, M.I. Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.165, p.84-93, 2000.

LEIKERT, J.F., RÄTHEL, T.R., WOHLFART, P., CHEYNIER, V., VOLLMAR, A.M., DIRSCH, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. **Circulation**, v.24, p.1614-1616, 2002.

LOVETT, E.G., VERRIER, R.L., COULL, B., MURTHY, G.G.K., CATALANO, P. WOLFSON, J.M., FERGUSON, S., KOUTRAKIS, P., REINISCH, U., GODLESKI, J.J. Effects of concentrated ambient particle matter composition in the conscious dog: II. Heart rate variability. **J.Appl.Physiol, S.e**.

LUZ, P.L., COIMBRA, S.R. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1275-1295, 2004.

MCKHANN, G., DRACHMAN, D. FOLSTEIN, M., KATZMAN, R., PRICE, D., STADLAN, F.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. **Neurology**, v.34, p.939-944, 1984 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.22, p.187-199, 2001.

MASUR, J. - A técnica do "open-field" como medida da reatividade "emocional" de ratos. **Rev. Psicol. Normal e Patol.**, v. 3-4,p.195-220, 1970.

MEDEIROS, N. JR.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA P.H. *et al.* Acute Pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. **Environmental Research**, v.95, p.62-70, 2004.

MENON, S., BUETTNER, G.R., OBERLEY, L.W. N-acetylcysteine (NAC). **Free Radicals Biology and Medicine**, v.77, p.222, 2003.

MILTON, N.G.N. Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v.21, p.82-100, 2004.

MIZOUE, T., ANDERSSON, K., REIJULA, K., FEDELI, C. Seasonal variation in perceived indoor environment and nonspecific symptoms in a temperate climate. **Journal of Occupational Health**, v.46, p.303-309, 2004.

MOHALLEM, S.V., LOBO, D.J.A., PESQUERO, C.R., ASSUNÇÃO, J.V., de ANDRE, P.A., SALDIVA, P.H., DOLHNIKOFF, M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. **Environmental Research**, v.98, n.2, p.196-202, 2005.

NEVES, C.M.M. **Lipoperoxidação no encéfalo de rato submetido a isquemia global transitória**. Porto Alegre:UFRGS, 1997. Tese de mestrado, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

NUNES, R.J., KUMAR, T., CHANCE, B., BRASS, C.A. Chemiluminescent measurement of increase free radical formation after ischemia-reperfusion. **Dig.Dis.Sci.**, v.40, n.5, p.1045-1053, 1995.

PEREIRA, L.A., LOOMIS, D., CONCEIÇÃO, G.M., BRAGA, A.L., ARCAS, R.M., KISHI, H.S., SINGER, J.M., BOHM, G.M., SALDIVA, P.H. **Association between air pollution and intrauterine mortality** in São Paulo, Brazil, v.106, p. 325-329, 1998.

PERRY, G., LAWRENCE, M.S., ATWOOD, C.S., CASTELLANI, R.J., CASH, A.D., ROTTKAMP, C.A., SMITH, M.A. The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders. Therapeutic implications. **CNS Drugs**, v.16, n.5, p.339-352, 2002.

POCERNICH, C.B., LA FONTAINE, M., BUTTERFIELD, D.A. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. **Neurochemistry International**, v.36, p.185-191, 2000.

REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **The FASEB Journal**, v.9, p.526-533, 1985.

RELIENE, R., HLAVACOVA, A., MAHADEVAN, B., BAIRD, W.M., SCHIESTL, R.H. Diesel exhaust particles cause increased levels of DNA deletions after transplacental exposure in mice. **Mutation Research**, v.571, p.245-252, 2005.

RHODEN, C.*et al.* N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. **Toxicological Sciences**, v.79, n.2, p.296-303, 2004.

RIEMERSMA, R.A., RICE-EVANS, C.A., TYRRELL, R.M., CLIFFORD, M.N., LEAN, M.E.J. Tea flavonoids and cardiovascular health. **Q.J. Med.**, v.94, p.277-282, 2001.

SALDIVA, P.H., LICHTENFELS, A.J., PAIVA, P.S., BARONE, I.A., MARTINS, M.A., MASSAD, E. PEREIRA, J.C., XAVIER, V.P., SINGER, J.M., BOHM, G.M. Association between air pollution due to respiratory diseases in children in: São Paulo, Brazil: a preliminary report. **Environmental Research**, v. 65, p.218-225, 1994.

SALDIVA, P.H., POPE, C.A., SCHWARZ, J., DOCKERY, D.W., LICHTENFELS, A.J., SALGE, J.M., BARONE, I., BOHM, G.M. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. **Archives Environmental Health**, v.50, p.159-163, 1995.

SAMET, J.M., DEMARINI, D.M., MALLING, H.V. Do airborne particles induce heritable mutations? **Science**, v.304, p.971-972, 2004.

SEIDLER, HELLENBRAND, W., ROBBA, B.P., VIEREGGE, P., NISCHAN, P., JOERG, J., OERTEL, W.H., SCHNEIDER, E. Possible environmental, occupational and other etiologic factors for Parkinson's disease. **Neurology**, v.46, p.1275-1284, 1996.

SCHWELA, D. Air pollution and health in urban areas. **Reviews on Environmental Health**, v.15, p.13-42, 2000.

SIMONIAN, N.A.; COYLE, J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annu. Rev. Pharmacology Toxicol**, v. 36, p. 83-106, 1996.

SIOUTAS, C., KOUTRAKIS, P., BURTON, R.M. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. **Environmental Health Perspectives**, v.103, p.172-177, 1995.

SOBRAL, H.R. Air pollution and respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil. **Sci.Sci.Med**, v.29, n.8, p.959-964, 1989.

STEERENBERG, P.A., WITHAGEN, C.E.T., van DALEN, W.J., DORMANS, J.A.M.A., CASSEE, F.R., HEISTERKAMP, S.H., van LOVEREN, H. Adjuvant activity of ambient particulate matter of different sites, sizes, and seasons in a respirator allergy mouse model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.200, p.186-200, 2004.

STRINGER, B., KOBZIK, L. Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress. **J.Toxicol.Environ. Health**, v.55, p.31-44, 1998.

THOMPSON, K.J., SHOHAM, S., CONNOR, J.R. Iron and neurodegenerative disorders. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.2, p.155-164, 2001.

VOGT, T. Water quality and health: Study of a possible relation between aluminium in drinking water and dementia. **Sosiale og Okonomiske Studier**, n.61, 1986 apud FLATEN, P.T. in Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.22, p.187-199, 2001.

WELLENIUS, G.A., SALDIVA, P.H. *et al.* Eletrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. **Toxicological Sciences**, v.66, p.327-335, 2002.

WILLIAM, A. Oxidative stress status: an introduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, p.173, 1991.

YANG, E.Y., GUO-ROSS, S.X., MBONDY, S.C. The stabilization of ferrous iron by a toxic  $\beta$ -amyloid fragment and by an aluminium salt. **Brain Research**, v.839, p.221-226, 1999.

## **Brain Oxidative Stress and Behavioral Changes Induced by Residual Oil Fly-Ash (ROFA) Inhalation**

Ana Claudia Zanchi<sup>a</sup>, Carina Duarte Venturini <sup>b</sup> Paulo H. N. Saldiva<sup>c</sup>, Helena Maria Tannhauser Barros<sup>a</sup>, Mitiko Saiki <sup>d</sup>, Claudia Ramos Rhoden<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pos-Graduation Course in Medical Sciences and Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratory of Experimental Air Pollution. Medical School – University of São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brazil.

<sup>d</sup>. Institute of Nuclear Energy Research, São Paulo, Brazil.

### **Correspondence:**

Claudia Ramos Rhoden.

Rua: Jaraguá, 370/302, Bela Vista. Porto Alegre – RS. CEP: 90450-140. Brazil

Phone: 55-51-32248822 ramal 112

Fax:55-51-32248822 ramal 129

e-mail: [crhoden@fffcmpa.edu.br](mailto:crhoden@fffcmpa.edu.br)

Page proofs should be sent to Claudia Ramos Rhoden

### **Running title**

Brain oxidative stress and behavioral changes induced by Residual Oil Fly-Ash (ROFA) Inhalation

## **Article descriptor**

Toxicology

**Key words:** Oxidative stress, particulate air pollution, behavioral changes, reactive oxygen species, ROFA, central nervous system.

## **Abbreviations**

PM particulate matter

ROFA residual oil fly ash

NAC n-acetylcysteine

OS oxidative stress

TBARS thiobarbituric acid reaction substances

VCR video cassette recorder

MDA malondyaldeyde

## **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brazil. A.C. Zanchi is supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, and DrC.R. Rhoden, Dr. H.M.T. Barros and Dr. P.H.N. Saldiva are supported by - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. The authors declare they have no conflict of interest.

## **Outline**

Abstract

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion and conclusions

References

Tables

Figure legends

Figures

## **Abstract**

**Background:** Epidemiological studies have demonstrated that exposure to transition metals is associated with neurodegenerative disorders. Occupational exposure to metals as iron, manganese and copper is associated with Parkinson's disease while aluminium with Alzheimer's, suggesting that oxidant damage may be related to neurotoxic actions of these metals.

**Objectives:** To study the oxidative stress (OS) in brain areas and motor, emotional and learning behaviors of rats exposed to residual oil fly ash (ROFA) for 30 days.

**Methods:** Male Wistar rats, 45 days of life, were exposed or not to ROFA by intranasal instillation for 30 days and were treated or not with n-acetylcysteine (NAC) (150 mg/Kg) i.p. The animals were tested in the open-field 1,8 and 30 days after exposition. Rats were sacrificed and the striatum, cerebellum were isolated. These structures were homogenized and tested for OS. The experiment was done in the summer and in winter.

**Results:** In the summer ROFA induced an increase in malondyaldeyde concentration (OS) in striatum, but not in winter ( $p=0.001$ ). NAC protected the striatum from an increased of OS. In winter the OS in striatum was higher indepentendly of the study group and there were no significant differences among experimental groups. Regarding the cerebellum, no differences were detected in both seasons. In the open-field test, animals presented higher frequency of rearing and exploration during the summer when compared with winter.

**Conclusions:** Our study demonstrated that ROFA inhalation was associated with OS at the striatum level, although this alteration is not associated directly with behavioral disturbances.

## Introduction

Air pollution contains a combination of gases (ozone, carbon dioxide, carbon monoxide, volatile organic compounds), liquids and solids (aerosols) components. Aerosols (PM) in general is classified in 3 categories: coarse fraction – aerodynamic diameter between 10 and 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) that penetrates and is deposited in the tracheobronchial tree; fine particles - aerodynamic diameter between 2.5 and 0.1  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) that can reach the small airways and alveoli; and ultra fine particles- aerodynamic diameter  $< 0.1 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{0.1}$ ) that demonstrate very high deposition in human alveoli and may pass directly into the circulatory system and disseminate systemically (Nemmar et al., 2001; Oberdorster et al., 2002). Fine particles are mostly produced by anthropogenic sources, as they frequently result from an incomplete oxidation of carbonaceous materials. Residual oil fly ash (ROFA) is a type of fine PM, rich in transition metals with a diameter less than 2.5  $\mu\text{m}$  (Ghio et al., 2001, Medeiros et al., 2004). ROFA has been particularly useful as a surrogate for ambient air PM in studies testing the hypothesis that metals mediate the biologic effects of air pollution particles.

The concentrations of gaseous or particulate matter to which people are exposed may be different during summer and in the winter when the thermal inversion phenomenon is often seen (Guo et al, 1999, Maitre et al., 2002, Singh et al., 2006) exacerbating the health effects of pollutants. Several epidemiological studies have linked PM exposure to numerous adverse health effects on the respiratory, cardiovascular and reproductive systems which include increased hospital admissions (Braga et al. 1999; Zanobetti et al. 2000; Anderson et al. 2001; Farhat et al. 2005), increase of emergency room visits (Farhat et al 2005), increase of respiratory symptoms (Jalaludin et al. 2004) and exacerbation of chronic respiratory (Schwartz 1993; Luttinger et al. 2003) and cardiovascular diseases (Peters et al. 2004; Dockery 2001), decreased lung function and premature mortality (Saldiva et al. 1995; Pereira

et al. 1998; Samet et al. 2000). Groups at special risk are children under 5 years of age, patients with cardiovascular and chronic respiratory diseases, the elder population and pregnant women (Ezzati et al., 2002).

However, the effects of air pollution on the central nervous system are not so well documented and the literature shows controversial results. According to Otto et al. (1992), human exposure to the complex mixture of volatile organic compounds has been related to an impairment of cognitive function and irritant effects on eyes, nose and throat. On the other side, Fiedler et al (2005) demonstrated that an a single exposure to a complex mixture of volatile organic compounds more ozone and their products of oxidation at the upon typical indoor concentration range, did not cause significant acute changes in neurobehavioral performance or lung function in healthy women (Fiedler et al 2005).

These controversial data regarding human air pollution exposure and neurobehavioral alterations might be better represented by some animal studies (Rodríguez et al., 2005) that demonstrated significant behavioral changes, such as a sleep-wake disruption induced by ozone exposure (Rodríguez et al., 2005). The behavioral changes were associated to a disruption in serotonergic and cholinergic neurotransmission with a significant negative impact in paradoxal sleep (Rodriguez et al. 2005; Gonzalez et al. 2003).

Alzheimer's, Parkinson's diseases and multiple sclerosis are among the most common neurodegenerative disorders in the aging population. Some potential risk factors for these diseases include geographic factors, hereditary, viral and toxicological exposures (Emard et al, 1995). Occupational exposure to solvents and metals such as iron, manganese, copper, lead or zinc are associated with an increased risk for Parkinson's (Seidler et al., 1996; McDonnel et al., 2003; Park et al., 2004) while aluminum is associated with Alzheimer's. (Emard et al., 1995; Polizzi et al.,2002). Oxidant-mediated damage and the triggering of oxidant-sensitive transcription factors may be related to the neurotoxic actions of these metals. However,

definitive association between air pollution exposure and neurodegenerative diseases is not documented yet.

The aim of this study was to investigate whether prolonged exposure to ROFA promotes behavioral changes and whether they are associated to oxidant mechanisms in the striatum and the cerebellum of rats. The secondary purpose is to determine whether these responses are modulated by seasonal trends (summer or winter).

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Wistar male rats, 45 days of age from the Animal Facility of Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre were used. The animals were kept in plastic cages (47 cm x 34 cm x 18 cm) under controlled humidity (75-85%), temperature ( $220 \pm 20$ C), non-reversed light cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) and were fed with a conventional laboratory diet (Supra-lab, Alisul Alimentos S.A, Brazil) and water *ad libitum*.

### **Animal care**

The authors assure that the study was conducted in accordance with national and institutional guidelines for animal welfare. All animals used in the research were treated humanely, with due consideration to the alleviation of distress and discomfort. This protocol was approved by the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas Ethical Committee for Research (CPA 084/03).

### **Drugs**

The solution of 150 mg/ml N-acetylcysteine (NAC) (GALENA, Spain) was prepared in saline (pH 7.2-7.4) and administrated intraperitoneally 1 ml/Kg (body weight). Suspension of residual oil fly ash (Universidade de São Paulo, Brazil) 20 $\mu$ g ROFA/10 $\mu$ l was prepared in saline and administrated by intranasal instillation (Medeiros et al., 2004).

### **Characterization of particles**

ROFA consisted of particles retained in the electrostatic precipitator installed in one of the chimneys of a large steel plant localized in São Paulo city, Brazil. The element composition of ROFA suspension particles was determined by neutron activation analysis. Basically the procedure involved short irradiations of 5 min for the determination of Cl

meaning chlorine; K, potassium; Mn, manganese; Na, sodium and Sr, strontium using a pneumatic transfer system facility under a thermal neutron of  $1.4 \times 10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Longer irradiations of 16 h under a thermal neutron flux of about  $10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$  were performed for determinations of As meaning arsenic; Ba, barium; Ca, calcium; Ce, cerium; Cr, chromium; Co, cobalt; K, potassium; La, lanthanum; Mn, manganese; Na, sodium; Rb, rubidium; Sb, antimony; Sc, scandium; Th, thorium; V, vanadium and Zn, zinc. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure detector Model GX2020 coupled to Model 1510 (Perkin Elmer Ortec, Oak Ridge TN, USA) integrated signal processor, both from Canberra Corporate Headquarters (Meriden CT, USA). Counting times from 200 to 50,000 s were used, depending on the half-lives or activities of radioisotopes considered. The radioisotopes measured were identified according to their half-lives and  $\gamma$ -ray energies. The concentrations of the elements were calculated using a comparative method. Measurements of the diameters of the particles (largest diameter) were made using an integrating eyepiece with polarized light microscopy. Each line in the eyepiece represented a 10  $\mu\text{m}$  length at a magnification of 1000 x. About 230 events for each particle were measured (Medeiros et al, 2004).

Particles of ROFA presented  $44.6 \pm 0.1\%$  of iron; bromine,  $1.482 \pm 19 \mu\text{g g}^{-1}$ ; cesium,  $16.3 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ; cobalt,  $9.90 \pm 0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ ; chromium,  $107.7 \pm 1.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ; lanthanum,  $10.3 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ ; manganese,  $3,884 \pm 24 \mu\text{g g}^{-1}$ ; rubidium,  $719.7 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ ; antimony,  $2.27 \pm 0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ ; arsenic,  $154.4 \pm 0.8 \mu\text{g g}^{-1}$ ; vanadium,  $35 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ ; zinc,  $491.9 \pm 3.1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Almost all particles had a diameter of less than 10  $\mu\text{m}$ ; the means and standard deviations were  $1.7 \pm 2.56 \mu\text{m}$  for carbon;  $1.2 \pm 2.24 \mu\text{m}$  for transition metals particles. About 78% of carbon particles and 98% of transition metals particles had a diameter less than 2.5  $\mu\text{m}$  (Medeiros et al, 2004).

## **Tissue preparation**

Tissue samples of the brain structures were defrosted and homogenized in 9 volumes of KPi buffer (KCl 1.15%) at 0-40C. The suspensions were centrifuged at 600 g for 10 min at 0-40C to remove nuclei and cell debris. The pellets were discarded and the supernatants were used as homogenates (Neves et al., 1997).

## **Determination of TBARS – Lipid Peroxidation**

The determination of oxidative stress (OS) was performed using the reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) method. Homogenates were precipitated with 10 % TCA, centrifuged, and incubated with thiobarbituric acid (Sigma, Chem. Co.) for 15 minutes at 1000C. TBARS were extracted using butanol (1:1). After centrifugation, the absorbance of the butanol layer was measured at 535nm (Buege and Aust, 1978). The concentration of TBARS formed was expressed in nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein, which is a marker of oxidative stress (Neves et al., 1997; Buege and Aust, 1978). Protein concentration in homogenates was measured through the Bradford Protein Assay (Schleicher and Wieland, 1978) using bovine serum albumin as standard at 595 nm. Measurements were carried out in a Perkin Elmer Lambda 40 spectrophotometer.

## **Behavioral test**

### **Open field**

The open field used was a 90 cm diameter circular arena surrounded by walls 36cm high. The area was divided into 8 central and 16 peripheral squares and was illuminated from above with two red lamps. All behavioral experiments were performed between 2:00 p.m. and 5:00 p.m. and recorded on a video cassette recorder. Each individual animal was observed for 5 minutes (Masur, 1970). The animal was introduced in the central area of the open field and

the motor behavior was analyzed by counting the number of the peripheral square crossings and the number of vertical rearings (Barros, 2001). Exploration was estimated by adding the number of peripheral and central square crossings and the number of vertical rearings. For the emotionality evaluation the number of central square crossings were analyzed and mainly its percentage in respect to overall locomotion (Karl et al, 2003; Masur, 1970; Bindra, 1968), the frequency of groomings (Karl et al, 2003; Masur, 1970; Bindra, 1968) and the number of fecal bolus (Karl et al, 2003; Masur, 1970; Bindra, 1968). Behavioral habituation was the paradigm for examination of nonassociative learning and memory processes, because it is possible to verify if the animal behaves as if recalling the prior exposure, by showing decreased exploration in subsequent sessions. (Leussis and Bolivar, 2006). The video cassette recordings were analyzed with the aid of dedicated software (Kevin Willioma, KD Ware Computer, Boston, MA, modified by Thomas Vatne) by a blind for treatments trained observer.

### **Experimental Procedures**

The experimental protocol was performed both during summer and wintertime. For each season, rats were divided into four treatment groups (6 rats/group): Group 1: 10 µl saline intranasal instillation (i.n.) and 1ml/Kg saline i.p; Group 2: 20µg ROFA i.n. (Medeiros et al., 2004) and 1ml/Kg saline i.p.; Group 3: 10 µl saline i.n and 150 mg/kg NAC i.p (Zhang et al., 2003; Nehru, et al., 2004); Group 4: 20µg ROFA saline i.n and 150 mg/Kg NAC i.p, All treatments were administered once a day for 1 month. Test suspension of ROFA and saline solutions were delivered by delivering the test solution in one of the nostrils of the awake animal. This instillation provokes a reflex of apnea followed by a deep inspiration that propels the liquid into the lungs (Medeiros et al, 2004).

At days 1, 8 and 30 of treatment the animals were submitted to the Open-Field Test, 24 h after the last administration. After the session of the open field test, rats were decapitated to remove the brain areas. The striatum and the cerebellum were dissected and washed in cold saline solution and quickly frozen in nitrogen liquid for further oxidative stress evaluation.

### **Statistical analysis**

Two Way ANOVA was used to compare MDA concentration in brain structures for treatment and winter/summer. Three Way ANOVA was used for behavioral paradigms to concomitantly compare the influence of ROFA and NAC treatments, on the 3 days of observation, during the two seasons. *Post hoc* Multiple comparison between groups were done with the Student Newman Keuls Test. All statistical analyses were performed using Sigma-Stat 2.0 Software (Jandel Corporation, 1992-1995). The level of significance was set as 5%.

## Results

The magnitude of OS varied with season. Higher levels of MDA were observed during winter independently on the treatment group, as compared to summer inhalation groups ( $p=0.016$ ; Figure 1). When we analyzed MDA levels in the experiment done in summertime an increase in OS was observed after ROFA instillation and this effect was prevented by NAC treatment ( $p=0.008$ ; Figure 1). No statistically significant interaction was detected between treatment and season ( $p=0.706$ ). Regarding the cerebellum, no changes were detected in OS evaluation considering treatments and seasons ( $p=0.484$ ; Figure 2). Between seasons, there was a significant difference in MDA concentration ( $p=0.005$ )

To determine if prolonged ROFA inhalation induced motor behavioral alterations, we evaluated horizontal locomotion of rats in the open field considering the frequency of walking in the periphery, rearing and exploration. Specifically, we observed that walking in the periphery was decreased in rats submitted to ROFA inhalation and that NAC treatment did not prevent such alteration ( $p=0.006$ ; Tables 1 and 2). There was no difference between seasons for the frequency of peripheral locomotion ( $p=0.618$ ) (Tables 1 and 2).

ROFA also promoted a decrease of rearing ( $p=0.001$ ) and general exploration ( $p=0.001$ ) in all days of behavioral observations in both seasons, and NAC treatment also did not prevent these changes in rearing and exploration. Regarding rearing ( $p=0.001$ ) and exploration ( $p=0.001$ ), we detected more intensive decrease of both behaviors in wintertime than in summertime (Tables 1 and 2).

To determine if ROFA inhalation for a prolonged time induced learning and memory changes, we compared the evaluations of the motor, periphery locomotion and exploration, and rearing behaviors of rats submitted to the open field test in the 3 different days of observation. As demonstrated in Table 1, in both seasons there was a decrease in the frequency of peripheral walking ( $p=0.001$ ), rearing ( $p=0.001$ ) and exploration ( $p=0.001$ ) of

rats on 8th and 30th days of observation in all experimental groups. Animals exhibited a reduction of central walking in the course of the experiment, which suggest habituation to the Open Field (Table 3). Habituation is classically defined as the waning of a response, elicited by a repeated exposure to a novel stimulus not accompanied by any biological consequence. One of the most common forms of habituation seen in rodents is a decrease in exploratory behavior in response to continued or repeated exposure to a novel environment (Leussius and Bolivar, 2006) For rearing and exploration there was an interaction between the season and the days of observation ( $p=0.001$ ;  $p=0.011$ , respectively). In the summer a decrease in behaviors was already seen in the 8 th day in comparison to the first experience in the open field, while in the winter such behavior in occurred on the 30 th day of observation. No significant interaction was seen between treatments and the days of observation. Behavioral analyses in the time course showed that rats presented a decrease of grooming in both seasons.

Emotionality of rats was tested by analyzing the frequencies and percentages of the rats walking in the center of the open-field, the number of groomings and the number of fecal bolus (Karl et al, 2003; Masur, 1970; Bindra et al, 1968). Overall, after 30 days of treatment, rats that inhaled ROFA presented decreased frequency of central walking which was not prevented by NAC pre treatment ( $p=0.002$ ; Tables 2 and 3), with no difference in the frequency of central walking between winter and summer ( $p=0.400$ ; Tables 2 and 3). When the percentage of central walking (a way to separate the influence of the motor interference on affect behavior of the animals) was considered, no differences between the groups was detected demonstrating that pollution might not influence emotionality of rats, which was confirmed with the results of the frequency of grooming that also did not detect any differences between the treatments groups ( $p=0.820$ ; Tables 2 and 3). In the meantime, rats exposed during winter presented more grooming as compared to those exposed during

summer. ( $p=0.001$ ; Tables 2 and 3). The other parameter used to test emotionality was the number of fecal boluses while in the open field, an novel environment and, again, no differences were found considering groups of treatment ( $p=0.362$ ); seasons ( $p=0.363$ ) and time the course ( $p=0.068$ ), as demonstrated in tables 2 and 3.

## **Discussion and conclusions**

There is an important gap in the literature regarding the association between exposure to air pollution and central nervous system disorders. The relevance of information on the effects of pollutants on nervous system is important in the context of the possible role exerted by air pollutants in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. There is also a lack of studies investigating central effects of PM and experimental animal studies may be of use to provide information on the effects of air pollutants on central nervous system, avoiding some of the confounding parameters usually present in clinical investigations.

This is the first study in the literature demonstrated that prolonged inhalation of a fine particles product of pollution- ROFA - increases OS in the striatum in rats and that NAC treatment reverses this effect. In many studies (Rhoden et al, 2004; Gonzalez-Flecha, 2004) NAC has been shown to exert an antioxidant effect in lungs (Ghio et al, 2001), heart (Rhoden et al, 2005), and in the brain (Fukami et al, 2005). Also for the first time behavioral effects of ROFA were associated to motor aspects. In the same experiments, no emotional, learning or memory alterations were detected.

More specifically, we showed that ROFA inhalation for 30 days increased lipid peroxidation in the striatum. This finding is in agreement with other authors, who demonstrated that pulmonary and cardiac effects of PM exposure may be mediated by mechanisms dependent on oxidants (Gurgueira et al., 2002; Gonzalez-Flecha, 2004, Rhoden et al., 2005). Probably, the OS promoted by ROFA is dependent on its high concentration of iron (44.6%), although only 0.035% of this metal is able to cross blood brain barrier (Beard et al., 2005). This hypothesis is based on the evidences in the literature that free iron acts as a Fenton reaction catalytic, facilitating the conversion of superoxide anion and hydrogen peroxide to hydroxyl radical, initiating the lipid peroxidation cascade (Stohs et al, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1998). Reinforcing this point of view is the observation that NAC

protected striatum of rats from OS induced by ROFA. Protective effects of NAC against hydroxyl radical produced by the protein oxidation in synaptosomal membranes of the brain of rats were reported when animals were treated with iron and hydrogen peroxide (Pocernich et al, 2000). It is known that NAC, the acetylated variant of amino acid L-cysteine, is an excellent source of sulphhydryl groups, and it is converted in the body into metabolites is capable of stimulating glutathione synthesis, promoting detoxification and acting directly as free radical scavengers. A disturbance of glutathione homeostasis may lead to or be a result of OS (Schulz et al., 2000).

The absence of an increased lipid peroxidation in cerebellum of rats exposed to ROFA could be justified by the fact that this structure is 2-fold less susceptible to oxidative damage in comparison with the striatum, as seen after chemical intoxication of rats (Shila et al., 2005). Interestingly, the same authors demonstrated a decrease in total SOD activity in striatum as compared to other brain regions. Moreover, striatum is highly enriched with non-heme iron, which is involved in the production of free radicals (Hill and Switzer, 1984).

The hypothesis that PM inhalation could be able to promote behavioral changes is supported by some studies, which have demonstrated that environmental and occupational conditions are important etiologic factors for neurodegenerative diseases (Seidler et al., 1996; Lai et al., 2002; Park et al., 2004). In the current study, rats exposed to ROFA exhibited decreased motricity and decreased of emotionality. These behavioral changes induced by ROFA could be associated with its composition, specifically, high iron concentration. Sobotka et al (1996) showed that excessive dietary iron decreases activity, reflex startle and conditioned avoidance response performances in rats, which were related to the high level of whole-brain non-heme iron content. In addition it has been also demonstrated that administration of iron salts into the brain of animals can induce neuronal death after lipid peroxidation and hydroxyl radical generation (Haliwell, 1992). The loss of dopaminergic

neurons in the substantia *nigra* causes a decrease of dopamine in the striatum and, consequently, slower movements, as well as, impairment of the motor activity (Halliwell, 1992).

Surprisingly, NAC did not block the behavioral changes induced by ROFA, observation that is in disagreement with the demonstration of a protective effect of NAC on rats behavioral effects and striatum neurotoxicity by methamphetamine (Fukami et al, 2004). We do not have a definite answer to justify such finding. Some hypothesis could be considered, such as - a) higher dose of NAC is necessary to prevent the behavioral impairment induced by ROFA, b) ROFA induces behavioral changes by mechanisms independent of OS, c) the loss of dopaminergic neurons, underlying the behavioral effects, could be associated with autoxidation of dopamine by increase in caspase-3 activity instead of OS mediated by iron (Pedrosa and Soares-silva, 2002). The lack of some measurements such as - non-heme iron, NAC, dopamine cerebral concentrations and histological evaluation of apoptosis, are some limitations of the current study and future studies in this field should consider the analysis of these parameters.

In conclusion, our study demonstrated that prolonged ROFA inhalation by rats induces behavioral changes and OS at the striatum level, but that such alterations do not alter the behavioral parameters measured in our experiment. Our findings support the concept that particles with high metal content may induce deleterious lesions to central nervous system, probably due to oxidative stress.

## References

Anderson HR, Bremner SA, Atkinson RW, Harrison RM, Walters S. Particulate matter and daily mortality and hospital admissions in the west midlands conurbation of the United Kingdom: associations with fine and coarse particles, black smoke and sulphate. 2001. *Occup. Environ. Med.* 58(8):504-510.

Antoniak BA, Hubbard R, Lawson L, Britton, A. 2003. Occupational exposure to solvents and metals and Parkinson's disease. *Neurology* 61:716-717.

Barros HMT. Modelos para estudo da locomoção e exploração em roedores. Manuscript of a chapter for the book "Princípios e técnicas em experimentação animal." edited by Rhoden E, Rhoden CR. 2006. In press.

Beard JL, Wiesinger JA, Li N, Connor JR. Brain iron uptake in hypotransferrinemic mice: influence of systemic iron status. 2005. *Journal of Neuroscience Research* 79:254-261.

Braga AL, Saldiva PHN, Pereira LA, Menezes J.J, Conceição GM, Lin C.A, Zbonetti A Schwartz J, Dockery DW. 2001. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol.* 31:106-113.

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52:302-309.

Dockery DW, Pope Acd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BGJ, Speizer FE. 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *New Engl. J. Med* 329:1753-1759.

Emard JF, Thouez, J, Gauvreau. 1995. Neurodegenerative diseases and risk factors: a literature review. *Soc. Sci. Med.* 40(6):847-858.

Ezzati, M, Lopez AR, Hoorn, SV, Murray CJL, Comparative Risk Assessment Collaborating Group. 2002. Select major risk factors and global and regional burden of disease. *The Lancet* 360:147-1360.

Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceição GM, Lin CA, Braga AL, Wath MP, Saldiva PHN. 2005. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 38(2): 227-235.

Fiedler N, Laumbach R, Kelly-McNeil K, Fan Z, Zhang J, Ottenweller J, Ohman-Strickland P, Kipen H. Health effects of a mixture of indoor air volatile organics, their ozone oxidation products, and stress. 2005. *Environmental Health Perspectives* 113(11):1542-1548.

Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okamura N, Shimizu E, Iyo M. 2004. Effect of antioxidant n-acetyl-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Research* 1016:90-95.

Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. 2001. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am. J. Respirat. Crit. Care Med.* 162:981-988.

- Gonzalez-Flecha B. Oxidants mechanisms in response to ambient air particles. 2004. *Molecular Aspects of Medicine* 25:169-182.
- Guo YL, Sung FC, Huang SL, Ko YC, Lai JS, Su HJ, Shaw CK, Lin RS, Dockery DW. 1999. Climate, traffic-related air pollutants, and asthma prevalence in middle-school children in Taiwan. *Environm.Health Perspect.* 107(12):1001-1006.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. 1998. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. London:Oxford University Express.
- Hill JM, Switzer RC. 1984. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 11(3):595-603.
- Jalaludin BB, O'Toole BI, Leeder SR. Acute effects of urban air pollution on respiratory symptoms, asthma medication use and doctor visits for asthma in a cohort of Australian children. 2004. *Environ.Res.* 95(1):32-42.
- Lai BCL, Marion, SA, Teschke, K, Tsui, JKC. 2002. Occupational and environmental risk factor for Alzheimer's disease. *Parkinsonism & Related Disorder*, 8:297-309.
- Leussius MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology and genetics. 2006. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006. In press.
- Luttinger D, Wilson L. A study of air pollutants and acute asthma exacerbations in urban areas: status report. 2003. *Environ.Pollut.* 123(3):399-402.
- Maitre A, Soulat JM, Masclat P, Stoklov M, Marques M, de Gaudemaris R. 2002. Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. *Scand.J.Work Environ.Health* 28(6):402-410.
- Masur J. 1970. A técnica do "open-field" como medida da reatividade "emocional" de ratos. *Rev. Psicol. Normal e Patol.* 3-4:195-220.
- McDonnel L, Maginis C, Lewis S, Pickering N, Medeiros NJ, Rivero DHRF, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, Capelozzi VL, Saldiva PHN, Antonangelo L. 2004. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research* 95:62-70.
- Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nernery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. 2001. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 164(9):1665-1668.
- Nerhu B; Kanear SS. 2004.. N-acetylcysteine exposure on lead induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. *Biol Trace Elem Res* 101(3): 257-264.
- Neves CMM. 1997. Lipoperoxidação no encéfalo de rato submetido a isquemia global transitória. Msc Dissertation. Porto Alegre, BRA:Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Krevling W, Cox C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J.Toxicol. Environ. Health A.* 65(20):1531-1543.

Otto DA, Hudnell K, House DE, Molhave, L, Counts W. Exposure of humans to a volatile organic mixture, I, behavioral assessment. 1992. *Archive of Environmental Health* 47(1):23-28.

Park J, Yoo C, Sim CS, Kim HK, Kim JW, Jeon BS, Bang Oh-Y, Lee W, Yi Y, Jung K, Chung S, Kim Y. 2005. Occupations and Parkinson's disease: A multi-center case-control study in South Korea. *Neurotoxicology* 26:99-105.

Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Bohm GM, Saldiva PHN. 1998.. Association between air pollution and intrauterine mortality. *São Paulo: Brazil* 106: 325-329, 1998.

Peters A, von Klot S, Heier M, Trentinaglia I, Hormann A, Wichmann HE, Lowel H, Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Study Group. 2004. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N.Engl.J.Med.* 351(17):1721-1730.

Pocernich, CB, La Fontaine M, Butterfield DA. 2000. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochemistry International* 36: 185-191.

Pollizi S, Pira E, Ferrara M, Bugiani M, Papaleo A, Albera R, Palmi S. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. 2002. *Neurotoxicology* 23(6):761-774.

Rhoden CR, Lawrence J, Godleski J, González-Flecha B. 2004. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicological Sci.*79(2):296-303.

Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, Gonzalez-Flecha B. PM induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. 2005. *Biochem.Biophys.Acta* 1725(3):305-313.

Rodriguez AA, González-Piña R. 2005. Ozone-induced paradoxal sleep decrease is related to diminished acetylcholine levels in the medial preoptic area in rats. *Chemico-Biological Interactions* 151:151-158.

Saldiva, PHN, Pope CA, Shwarz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM. 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Archives Environmental Health.*50:159-163.

Samet JM, Demarini DM, Malling HV. 2004. Do airborne particles induce heritable mutations? *Science.*304:971-972.

Schulz JB, Lindenau J, Sevfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. 2002. *Eur.J.Biochem.* 267(16):4904-4911.

Schwartz J, Slater D, Larson TV, Pierson WE, Koeing JK. 1993. Particulate air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle. *Am.Rev.Respirat.Dis.* 147:826-831.

Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E. 1996. Possible environmental, occupational and other etiologic factors for Parkinson's disease: A case control study in Germany. *Neurology* 46:1275-1284.

Singh M, Phuleria HC, Bowers K, Siotas C. 2006. Seasonal and spatial trends in particle number concentrations and size distributions at children's health study sites in Southern California. *J.Expo.Sci.EnvIRON.Epidemiol.*16(1):3-18.

Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. 2005. Brain regional responses in antioxidant system to  $\alpha$ -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 210:25-36.

Sobotka TJ, Whittaker P, Sobotka JM, Brodie RE, Quander DY, Robl M, Bryant M, Barton CN. 1996. Neurobehavioral dysfunctions associated with dietary iron overload. *Physiol. Behav.* 59(2):213-129.

Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18(2):321-336.

Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. 2000. *Environm. Health Perspect.* 108(11):1071-1077.

Zhang Q, Zhang G, Meng F, Tian H. 2003. Biphasic activation of apoptosis signal-regulating kinase 1-stress-activated protein kinase 1-c-jun N-terminal protein kinase pathway is selectively mediated by  $Ca^{+2}$  permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors involving oxidative stress following brain ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience* 337:51-55.

Figure 1: Striatum, oxidative stress of rat that inhaled ROFA and treated or not with NAC in winter or summer. Values represent the mean of 6 rats in summer and 10 rats in winter independent determinations  $\pm$  SEM. ANOVA two ways followed by Student Newman Keuls: \*\*p=0.001 as compared to winter groups; \*p=0.008 as compared to other groups in summer.

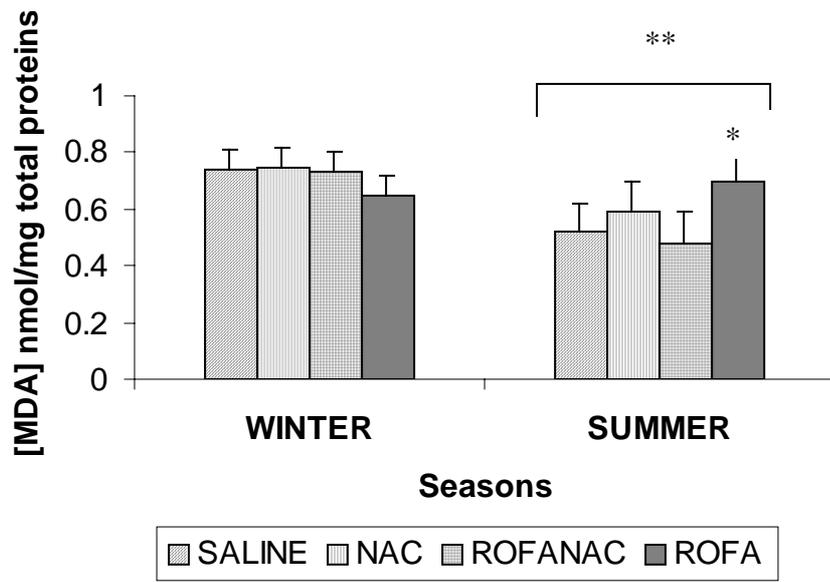


Figure 2: Cerebellum, oxidative stress of rats that inhaled ROFA and treated or not with NAC in winter and summer. Values represent the mean of 6 rats in summer and 10 rats in winter independent determinations  $\pm$  SEM. ANOVA two ways followed by Student Newman Keuls:  $p=0.252$  as compared to other groups in winter;  $p=0.120$  as compared to other groups in summer;  $**p=0.001$  compared to the groups in winter.

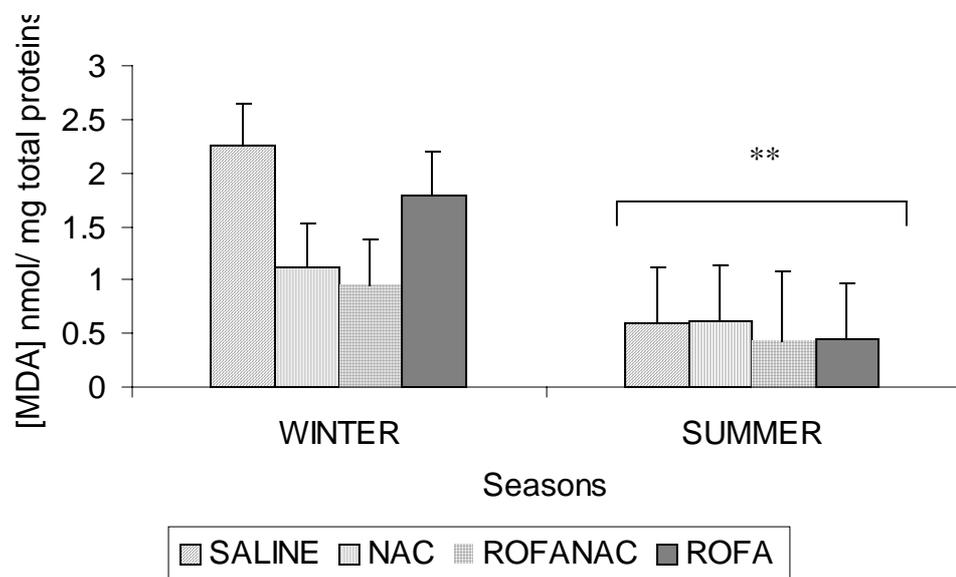


Table 1: Motricity evaluation of rats that inhaled ROFA and treated or not with NAC in winter or summer.

Behavior	Treatments study groups	n	peripheral walking	rearing	exploration
<b>WINTER</b>					
Day 1	SALINE	10	144.30±6.69	30.50±2.20	193.80±7.54
	ROFA	10	<b>136.80±6.81</b>	<b>26.20±3.03</b>	<b>177.90±6.60</b>
	NAC	10	132.60±9.81	28.70±2.30 #	178.00±12.39
	ROFANAC	10	<b>126.70±8.25</b>	<b>23.70±2.20</b>	<b>161.70±8.95</b>
Day 8	SALINE	10	103.10±8.46	21.10±2.20	138.20±11.02
	ROFA	10	<b>94.60±10.33</b>	<b>18.80±2.22</b>	<b>124.20±12.63</b>
	NAC	10	100.20±8.27	17.90±2.70 #	129.90±12.14
	ROFANAC	10	<b>88.50±7.56</b>	<b>14.60±2.25</b>	<b>113.40±9.90</b>
Day 30	SALINE	10	78.10±11.56	16.70±129.90+	
	ROFA	10	<b>56.20±11.35</b>		
	NAC	10	69.40±10.13		
	ROFANAC	10	<b>43.70±7.06</b>		

Table 2: Summary of F values of the three-way anovas for the frequency of behavioral paradigms of rats

Behavior (frequency)	Treatment (3; 168)	Days of behavioral observation (2; 168)	Seasons (1; 168)	Interaction days x seasons (2; 168)	Interaction treatment x seasons (3; 168)
Periphery walking	<b>4.278:</b> SALINE>ROFANAC p=0.006	<b>77.744:</b> 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup> ; 1 <sup>th</sup> >30 <sup>th</sup>	0.249	1.801	0.988
Rearing	<b>6.858:</b> SALINE>ROFANAC; SALINE>NAC; ROFA>ROFANAC; ROFA>NAC	<b>46.144:</b> 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup> ; 1 <sup>th</sup> >30 <sup>th</sup>	<b>951.234:</b> S>W	<b>23.108:</b> W: 1 <sup>th</sup> >30 <sup>th</sup> S: 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup>	<b>4.312:</b> W:SALINE>ROFANAC; SALINE>NAC; SALINE>ROFA; ROFA>ROFANAC; ROFA>NAC; NAC>ROFANAC S: SALINE>ROFANAC; SALINE>NAC; SALINE>ROFA; ROFA>ROFANAC; ROFA>NAC; NAC>ROFANAC
Exploration	<b>7.234:</b> SALINE>ROFANAC; ROFA>ROFANAC; NAC>ROFANAC	<b>67.801:</b> 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup> ; 1 <sup>th</sup> >30 <sup>th</sup>	<b>215.316:</b> S>W	<b>4.164:</b> W: 1 <sup>th</sup> >30 <sup>th</sup> S:1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup>	2.343
Central walking	<b>5.313;</b> SALINE>ROFANAC	<b>4.099:</b> 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup>	0.400	0.388	1.527
Grooming	0.308	<b>17.6:</b> 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup>	<b>16.345:</b> W>S	<b>9.264:</b> W: 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup> S: 1 <sup>th</sup> >8 <sup>th</sup>	1.252
Number of fecal bolus	1.074	2.732	0.833	1.301 p=0.275	1.732

exposed to ROFA and treated or not with NAC for 30 days and observed in the open field on days 1, 8 and 30 of treatment DURING THE SUMMER (S) AND IN THE WINTER (W). Two different experiments were conducted in the winter (W) and in the summer (S). ROFA is residual oil fly ash n.i.; ROFANAC is residual oil fly ash n.i. and n-acetylcysteine i.p. (NAC); NAC is n-acetylcysteine n.i. and saline i.p.

Table 3: Rats emotionality behavior in the Open-Field Test.

Behavior	n	Treatment Groups	central walking	% central walking	fecal bolus	grooming
<b>WINTER</b>						
Day 1	10	SALINE	19±2.4	11.5±2.37	5.5±0.7	2±0.4
	10	ROFA	<b>14.9±2.2</b>	13.78±1.97	4.7±0.9	1.2±0.3
	10	NAC	16.7±2.6	9.53±1.43	2.7±1.1	1.3±0.3
	10	ROFANAC	<b>11.3±2.1</b>	8.73±1.52	4±0.8	2.4±0.4
Day 8	10	SALINE	11.8±3.3	10.33±1.60	6.3±0.63	3.3±0.6
	10	ROFA	<b>10.8±2.2</b> *	7.27±2.52	5±0.9	2.5±0.6 *
	10	NAC	14±3.41	11.1±3.07	5.4±0.7	3.5±0.7
	10	ROFANAC	<b>10.3±2.5</b>	12.82±3.56	4.6±0.9	3.3±0.7
Day 30	10	SALINE	10.3±1.4	12.28±1.4	4.8±0.6	0.8±0.3
	10	ROFA	<b>8.2±2.4</b>	8.54±1.17	4.9±0.8	1.1±0.5
	10	NAC	10.9±2.2	15.95±2.67	3.6±0.8	1±0.5
	10	ROFANAC	<b>9.6±3.7</b>	16.45±3.28	6.4±0.7	0.6±0.2
<b>SUMMER</b>						
Day 1	6	SALINE	18.7±1.9	11.73±1.2	4.3±1	1±0.4
	6	ROFA	<b>18.2±2.8</b>	11.57±1.5	4.2±0.9	2.8±0.5
	6	NAC	14±3.8	10.8±2.56	4.3±0.7	1.2±0.4
	6	ROFANAC	<b>10.2±2.3</b>	6.5±1.61	5±0.9	1.8±0.7
Day 8	6	SALINE	18.5±5.1			
	6	ROFA	<b>13±5.6</b> *			
	6	NAC				
	6	ROFANAC	<b>5.8±6</b>	530.7	47431	TD0003 Tc(1+)TjET517.599.8 48.36

Results were expressed in Mean ± SEM. **Bold** represents difference among treatment groups, }\* represents difference among days, *Italics* represents difference between seasons, represents interaction between days and seasons.

## 8 CONCLUSÕES

- a) Os ratos expostos ao *residual oil fly ash* apresentaram diminuição na motricidade e na emocionalidade nos dias 1, 8 e 30 do tratamento.
- b) O tratamento com a n-acetilcisteína não protegeu os ratos das alterações comportamentais induzidas pelo *residual oil fly ash* nos dias 1,8 e 30 do tratamento.
- c) Exposição dos ratos ao *residual oil fly ash* por 30 dias causou aumento da lipoperoxidação no estriado. Este efeito não foi observado no cerebelo.
- d) O tratamento crônico com a n-acetilcisteína protegeu os ratos do estresse oxidativo no estriado induzido pela inalação de *residual oil fly ash* por 30 dias.
- e) As estações do ano (inverno e verão) não influenciaram as alterações comportamentais induzidas pelo *residual oil fly ash*.

Nosso estudo demonstra que a inalação de *residual oil fly ash* em ratos por 30 dias está associada com o aumento do estresse oxidativo no estriado. Entretanto, o estresse oxidativo parece não modular diretamente as alterações comportamentais.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)