

ADEMIR FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS DA INTOXICAÇÃO  
EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO  
EM RATOS ADULTOS**

Belém  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ADEMIR FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS DA INTOXICAÇÃO  
EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO  
EM RATOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências  
Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Socorro dos Santos Aguiar.

**Data de Aprovação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal – Orientador  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Socorro dos Santos Aguiar – Co-Orientadora  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

---

Prof. Dr. Ismaelino Mauro Magno – Examinador  
Universidade Paranaense – UNIPAR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Edna Cristina Santos Franco – Examinador  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

*Ao meu amado Deus pela vida, saúde, força, determinação, superação e fé para viver a vida.*

*Aos meus pais, Wilma e Ademir, às minhas irmãs, Keila e Karla por sempre acreditarem na realização deste sonho.*

*Aos meus sobrinhos, Kauã e Vinícios pelos seus lindos sorrisos que alegam meu viver.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, não somente por ter aceito minha orientação em um momento difícil, quando tive que trocar de orientador a pedido da Pós-graduação, mas ainda pela oportunidade concedida, pelo suporte incondicional, pelas requisições de qualidades científicas ao trabalho e pela paciência demonstrada durante a minha caminhada acadêmica com o mesmo.

À minha “ex-orientadora”, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lílian Rosana Faro, pela orientação competente, pelas críticas ao trabalho, as quais sempre foram pertinentes, e pela força que sempre me deu afim de eu levar ao termo esse projeto: muito obrigado.

À minha Co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Socorro Aguiar, por ter aberto as portas do Laboratório de Psicobiologia da UFPA para que eu pudesse desenvolver a maior parte deste trabalho, pela amizade que construímos e firmamos durante esta empreitada, por ter me incentivado a concluir essa dissertação mesmo com todas as dificuldades e desafios que tive de enfrentar, por todo o suporte dado durante a execução desse projeto pioneiro em nosso Estado e por ter contribuído na minha formação acadêmica, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Cristowam Diniz, por ter me permitido utilizar alguns dos seus equipamentos e o *software* Any Maze Stoelting para análise de alguns testes comportamentais.

Ao Prof. Dr. William Lee Berdel Martin, pelas horas de consultoria estatística despendidas para me ajudar na análise dos dados.

Ao professores, Rômulo Feio, José Inácio Carvalho, Rafael Lima e Edna Franco por todas as críticas e contribuições realizadas.

Ao Técnico do Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Geociências da UFPA, Natalino Valente, por ter contribuído na preparação da solução de citrato de alumínio.

À Andrea Campos e Márcia Freitas, pela amizade, companheirismo e contribuições para a realização desse projeto.

À Daisy Elane, pela grande ajuda na elaboração e formatação dos gráficos no programa *Prisma GraphPad*, por todo apoio e amizade durante o curso deste projeto.

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Psicobiologia, Douglas, Ketrynne, Odemir, Anna Patrycia, Jesiane e Rosemiro, pelo apoio, amizade e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos Colegas do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental da UFPA, Marcelo, Luana, Elder, Andrea e Patricy que me auxiliaram no criostato e nas imunoistoquímicas.

Aos Bioteristas, Amarildo Melo e Osvaldo Vicente que dentro do possível sempre atenderam as minhas solicitações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) que concedeu a minha bolsa de mestrado.

Aos Diretores científicos da FAPESPA, Professores Sanclayton Moreira e Lourivaldo da Silva Santos e a Coordenadora de Bolsa, Sandra Perdigão, que sempre atenderam as minhas solicitações na medida do possível durante a execução deste projeto.

*O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.  
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranqüilas.  
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.  
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás  
comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.  
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com  
óleo, o meu cálice transborda.  
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e  
habitarei na casa do SENHOR por longos dias.*

**Salmo 23**

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O ALUMÍNIO.....	15
1.2 BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO.....	16
1.3 TOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO.....	18
1.4 TOXICOCINÉTICA DO ALUMÍNIO.....	20
1.5 TOXICODINÂMICA DO ALUMÍNIO.....	24
1.6 PROCESSOS NEUROBIOLÓGICOS DE MEMÓRIA.....	26
<b>1.6.1 Considerações gerais</b> .....	26
<b>1.6.2 Tipos de Memória</b> .....	29
1.7 ALUMINOSES E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES SOBRE OS PROCESSOS DE MEMÓRIA.....	30
1.8 UTILIZAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS ACERCA DOS EFEITOS DO ALUMÍNIO.....	32
1.9 HIPÓTESE EXPERIMENTAL.....	35
1.10 OBJETIVOS.....	36
1.10.1 <b>Geral</b> .....	36
1.10.2 <b>Específicos</b> .....	36
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	37
2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO.....	37
2.3 PROCEDIMENTOS DE INTOXICAÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
2.4 TESTE PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES BÁSICAS DE ATIVIDADES LOCOMOTORAS E EXPLORATÓRIAS APÓS O PROTOCOLO DE INTOXICAÇÃO.....	40
<b>2.4.1 Campo Aberto</b> .....	40
2.4.1.1 Fundamento.....	40
2.4.1.2 Equipamento.....	41
2.4.1.3 Procedimento.....	42
2.5 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO	



DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA.....	43
<b>2.5.1 Labirinto em T elevado.....</b>	<b>43</b>
2.5.1.1 Fundamento.....	43
2.5.1.2 Descrição do aparato.....	46
2.5.1.3 Procedimento.....	47
2.6 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	47
2.7 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	49
<b>2.7.1 Estudos Imunoistoquímicos.....</b>	<b>49</b>
2.8 ANÁLISE QUALITATIVA.....	50
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
3.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO SOBRE AS ATIVIDADES LOCOMOTORAS E EXPLORATÓRIAS NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	52
3.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO NO TESTE DE MEMÓRIA NO LABIRINTO EM T ELEVADO.....	54
<b>3.2.1 Análise das diferenças entre os grupos em cada tentativa de esquiva....</b>	<b>54</b>
3.2.1.1 Linha de Base.....	54
3.2.1.2 Esquiva 1.....	55
3.2.1.3 Esquiva 2.....	56
3.2.1.4 Esquiva 3 (Teste de Memória).....	56
<b>3.2.2 Análise comparativa entre todas as tentativas de esquiva de cada grupo</b>	<b>57</b>
3.2.2.1 Grupo 1 (controle).....	57
3.2.2.2 Grupo 2.....	58
3.2.2.3 Grupo 3.....	59
3.2.2.4 Grupo 4.....	59
<b>3.2.3 Análise das latências de fuga dos grupos em cada tentativa do LTE.....</b>	<b>60</b>
3.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO HIPOCAMPO APÓS INTOXICAÇÃO POR CITRATO DE ALUMÍNIO EM RATOS.....	61
<b>3.3.1 Preservação Neuronal.....</b>	<b>61</b>
<b>3.3.2 Ativação Astrocitária.....</b>	<b>64</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS.....	66
4.2 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS.....	67
4.3 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA HIPOCAMPAL.....	70
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## RESUMO

Evidências experimentais sugerem que o alumínio é um agente neurotóxico com ações deletérias sobre os processos cognitivos. No entanto, poucos estudos investigaram de forma sistemática os efeitos comportamentais e neuropatológicos da intoxicação experimental com alumínio. Neste estudo, investigamos os efeitos neurocomportamentais da contaminação experimental com citrato de alumínio sobre os processos mnemônicos de ratos Wistar adultos. Utilizou-se 29 ratos Wistar machos de 230-250 g, divididos em 1 grupo controle (G1) e 3 grupos experimentais (G2, G3 e G4) com os tempos de sobrevivência de 8, 17 e 31 dias, respectivamente. A dose usada de citrato de alumínio foi de 320 mg/kg. O neurotóxico foi administrado por via intragástrica, durante 4 dias. Os animais foram submetidos a os testes comportamentais do campo aberto e do Labirinto em T elevado (LTE). Os animais foram perfundidos com solução salina a 0.9% e paraformaldeído. Realizou-se imunistoquímica para a avaliação da perda neuronal (anti-neuN) e ativação de astrócitos (anti-GFAP) em secções coronais contendo as regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Verificou-se um aumento da atividade locomotora no teste do campo aberto para o grupo G2 em comparação ao grupo controle e aos demais grupos ( $P < 0.05$ ). No LTE, a latência de esquiva, nas quatro tentativas, apresentou uma diferença estatística altamente significativa para todos os grupos ( $P < 0.01$ ). O tempo de permanência dos animais no braço fechado desde a linha de base até a esquiva 2 aumentou significativamente e já na esquiva 3 (teste de memória) realizada 72 horas após a esquiva 2 diminuiu bruscamente em todos os grupos, com exceção do grupo controle, caracterizando um déficit no aprendizado. Não houve diferenças significativas nas fugas 1 e 2. Os dados da imunistoquímica revelaram intensa perda neuronal e diminuição progressiva na ativação astrocítica nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo no cérebro dos animais intoxicados. Estes resultados sugerem que a intoxicação experimental com citrato de alumínio induz déficits de aprendizado e memória, bem como alterações patológicas na morfologia hipocampal, o que reforça a hipótese de que o acúmulo patológico deste metal pesado possui uma ação deletéria sobre os processos mnemônicos hipocampais.

Palavras-chave: Rato, Citrato de Alumínio, Hipocampo, Memória, Aprendizado

## ABSTRACT

Experimental evidences suggest that aluminium is a neurotoxic agent with deleterious actions on cognitive processes. Nevertheless, few studies have systematically investigated both neurobehavioral and neuropathological effects of experimental intoxication with aluminium. In this study, we have investigated the neurobehavioral effects of experimental contamination with aluminium citrate on the mnemonic processes of adult Wistar rats. 29 adult male Wistar rats weighing 230-250 g, were divided into 1 control group (G1) and 3 aluminium citrate-treated groups (G2, G3 and G4) with survival times of 8, 17 and 31 days, respectively. It has been used a 320 mg/kg dose of aluminium citrate. The neurotoxicant was intragastrically administered during 4 days. Animals were submitted to behavioral tests of open field and elevated T-maze. Animals were perfused with 0.9% saline solution and 4% paraformaldehyde. Immunohistochemistry has been performed to evaluate neuronal loss (anti-neuN) and astrocyte activation (anti-GFAP) in coronal sections containing CA1 and CA3 hippocampal regions. There was an increase in locomotor activity in open field test for G2 in comparison to control group and other groups. The elevated T-maze avoidance latency in the four trials showed a high statistically significant difference for all groups. The permanency time of the animals in the closed arm from the base line to the avoidance 2 significantly increased and in the avoidance 3 (memory test) performed at 72 h after the avoidance 2 abruptly decreased for all groups, except for the control group, indicating a learning deficit. There were no significant differences for 1 and 2 escape. The immunohistochemical data revealed an intense neuronal loss and a progressive decrease in the astrocytic activation in both CA1 and CA3 hippocampal regions in the brains of intoxicated animals. These results suggest that the experimental intoxication with aluminium citrate induces deficits on learning and memory as well as pathological alterations on the hippocampal morphology. This reinforces the hypothesis that the pathological accumulation of this heavy metal possesses deleterial actions on the mnemonic hippocampal processes.

Key Words: Rat, Aluminium Citrate, Hippocampus, Memory. Learning

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A estrutura do complexo Al-citrato.....	21
<b>Figura 2.</b> Diagrama da organização sináptica do hipocampo.....	28
<b>Figura 3.</b> Campo aberto utilizado para verificação das reações comportamentais depois da intoxicação por citrato de Al.....	42
<b>Figura 4.</b> Labirinto em T elevado.....	46
<b>Figura 5.</b> Procedimento de perfusão.....	48
<b>Figura 6.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) no campo aberto (distância percorrida).....	52
<b>Figura 7.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) no campo aberto ((levantamento, auto limpeza e congelamento).....	53
<b>Figura 8.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na linha de base teste do LTE).....	55
<b>Figura 9.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na esquiua 1 no teste do LTE.....	55
<b>Figura 10.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na esquiua 2 no teste do LTE.....	56
<b>Figura 11.</b> Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na esquiua 3 no teste do LTE.....	57
<b>Figura 12.</b> Gráfico comparativo das tentativas de esquiua no braço fechado do LTE do Grupo 1.....	58
<b>Figura 13.</b> Gráfico comparativo das tentativas de esquiua no braço fechado do LTE do Grupo 2.....	58
<b>Figura 14.</b> Gráfico comparativo das tentativas de esquiua no braço fechado do LTE do Grupo 3.....	59
<b>Figura 15.</b> Gráfico comparativo das tentativas de esquiua no braço fechado	

do LTE do Grupo 4.....	60
<b>Figura 16.</b> Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre preservação de pericários neuronais nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo .....	62
<b>Figura 17.</b> Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre preservação de pericários neuronais nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo.....	63
<b>Figura 18.</b> Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre ativação de astrócitos nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo.....	65

**LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos grupos de acordo com tratamento, doses: número de doses e tempo de sobrevivência.....	39
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros mensurados no Teste do Campo Aberto.....	43
<b>Tabela 3.</b> Médias dos grupos intoxicados por citrato de Al no Teste do LTE para latência de fuga.....	60

**LISTA DE ABREVIATURA**

AChE	Acetilcolinesterase
Al <sup>+3</sup>	Íon livre de Alumínio
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de Alumínio
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Sulfato de Alumínio
CS	Citrato de Sódio
CA	Cornos de Amon do Hipocampo
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
ChAT	Colina Acetil Transferase
DA	Doença de Alzheimer
DD	Doença Dialítica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTE	Labirinto em T Elevado
PBS	Tampão
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPA	Universidade Federal do Pará

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O ALUMÍNIO

O alumínio é um elemento químico de número atômico 13 (13 prótons e 13 elétrons) com massa atômica 27 u, sendo o metal mais abundante da crosta terrestre. Sua leveza, condutividade elétrica, resistência à corrosão e baixo ponto de fusão lhe conferem uma multiplicidade de aplicações: embalagens, transporte, construção civil, bens de uso, combustível sólido para foguetes, produção de explosivos, transmissão elétrica, recipientes criogênicos até -200 °C e mesmo para a fabricação de caldeiras (ATSDR, 2006). Todavia, mesmo com baixo custo para sua reciclagem, o que aumenta sua vida útil e a estabilidade do seu valor, a elevada quantidade de energia necessária para sua obtenção reduz sobremaneira o campo de aplicação do alumínio, além das implicações ecológicas negativas no rejeito dos subprodutos do processo de reciclagem, ou mesmo de produção do alumínio primário (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Durante muitos anos considerou-se que o alumínio fosse um elemento que não tivesse efeitos nocivos aos seres vivos, entretanto, há uma série de relatos científicos demonstrando que o alumínio possui fortes efeitos toxicológicos observados nas mais diferentes formas de vida, como algas marinhas, microorganismos, plantas e animais e, obviamente, no homem (KISS, 1995; TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

Estudos apontam que o alumínio é um agente neurotóxico e que as condições neuropatológicas estão associadas com elevadas concentrações de alumínio no cérebro (KLATZO et al., 1965; DEVOTO e YOKEL, 1994; KISS, 1995;



TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998). Devido a estes estudos, houve um avanço no conhecimento dos efeitos do alumínio no sistema nervoso central (SNC), mas, no entanto ainda permanece obscura a atividade funcional do metal tanto nesse sistema quanto nos demais. Isso implica em uma avaliação médica mais detalhada em pessoas que foram expostas à esse metal, pois, a maioria dos médicos, clínicos gerais, desconhece o quadro de sintomas clínicos ou condição subclínica de intoxicação, pelo fato dessas informações ainda estarem sendo geradas por pesquisadores em laboratórios, a partir de estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* ou de campo (LIBERAL, 2003).

## 1.2 BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO

Formando cerca de 8,13% da crosta terrestre, o alumínio é o metal mais abundante em nosso planeta e o terceiro elemento nele mais profuso (AZEVEDO e CHASIN, 2003; ZATTA et al.,2003). Sua biodisponibilidade decorre principalmente de chuvas ácidas, as quais o liberam do solo na água fresca, tornando-o acessível aos seres vivos (KISS, 1995).

O alumínio é um elemento naturalmente presente ou introduzido em nosso ambiente. Todavia, a atividade antropogênica é bem diversificada tanto na forma quanto na sua aplicabilidade, o que contribui para aumento do processo de liberação do alumínio. Desde sais de alumínio usados em sistemas de tratamento de água como o sulfato de alumínio e em medicamentos antiácidos à base de hidróxido de alumínio até recipientes para o cozimento ou conservação de alimentos líquidos ou sólidos. Nestas condições, reações com diversos tipos de sais provocam oxidação e resultam na liberação do alumínio de seus revestimentos (MARTINS, 1986 TAPPARO et al.,1995, ZATTA et al., 1998).

Segundo DeVoto e Yokel (1994), o aumento desse processo de liberação do alumínio, nos últimos anos tem implicado, inevitavelmente, na exposição de seres humanos a esse metal. Segundo eles, a média da ingestão oral diária da população geral seria cerca de 30 a 50 mg.

A biodisponibilidade e os processos de liberação do alumínio têm sido alvos de vários estudos como os de Alfrey (1986); DeVoto e Yokel (1994); WHO (1994) e; Sabino et al. (2004) para tentar compreender a toxicologia deste metal, bem como as principais fontes de exposição e os níveis de concentrações de alumínio no ambiente.

Os estudos de Alfrey (1986) e DeVoto e Yokel (1994), apontam que o alumínio pode ser encontrado na água potável em uma concentração de 2 a 4 mg/l. WHO (1994), revela que em águas macias, presentes em solos ácidos, as concentrações de alumínio podem atingir 200 a 300 µg/L, podendo aumentar para 600 µg/L em áreas reflorestadas. Nas águas de superfície, DeVoto e Yokel (1994) afirmam que o alumínio é encontrado em uma concentração de 0,016 a 1,17 mg/l.

Ainda de acordo com os estudos de DeVoto e Yokel (1994) os níveis de concentração de alumínio no ar urbano em uma área de 5000 ng/m<sup>3</sup> é de aproximadamente 0,14 a 0,2 mg.

Sabino et al. (2004) realizando um estudo sobre a biodisponibilidade de diversos metais, dentre eles, o alumínio, nos sedimentos, no solo e em vegetais (alface) na bacia hidrográfica da Pampulha, situada em Belo Horizonte, Minas Gerais, encontraram uma concentração de alumínio nos sedimentos de 113000 ppm, no solo de 4700 ppm e na alface de 50 µg/g.

Esse considerável número de trabalhos acerca das diversificadas fontes de exposição do alumínio, só nos reforça a idéia de que os seres humanos estão constantemente correndo o risco de vir a sofrer intoxicação por esse metal pesado.

### 1.3 TOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO

Durante anos pensou-se que o alumínio fosse um elemento que não oferecesse efeitos danosos aos organismos vivos. No entanto, este cenário vem se modificando desde a década de 60 com os primeiros trabalhos publicados por Klatzo et al.(1965) mostrando uma degeneração neurofibrilar no SNC de coelho, após intoxicação com fosfato de alumínio.

Nos últimos anos, essa evidência se fortaleceu por dois motivos independentes, mas convergentes: a maior biodisponibilidade ambiental do íon livre do alumínio, o  $Al^{+3}$ , aos seres vivos, decorrente de chuvas ácidas (MARTIM, 1994; KISS, 1995) e os estudos recentes que demonstram o acúmulo de  $Al^{+3}$  em fluidos, tecidos e sistemas biológicos como agente tóxico sobre plantas, animais e no homem (KISS, 1995; TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998).

Rondon-Barragán et al. (2007) relatam que em plantas, o primeiro lugar de acumulação e toxicidade do alumínio é no meristema da raiz, sugerindo que o metal interaja com as células que apresentam mitose ativada, porém não com as células maduras da região basal.

Nos microorganismos o alumínio parece afetar a regulação de íons e de cálcio; nas algas ele afeta a concentração de clorofila e peixes morrem asfixiados também por quebra da regulação iônica (AZEVEDO & CHASIN, 2003; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

Aves e outros animais terrestres submetidos a uma dieta rica em alumínio sofrem de perda de apetite, redução no ganho de peso ou perda de peso, sendo que em ruminantes observa-se o quadro conhecido como tetania fatal, caracterizado por fasciculações musculares, galope alterado, convulsões, hipersensibilidade, incontinência urinária seguido de morte (AZEVEDO E CHASIN, 2003).

Em ratos submetidos à intoxicação por alumínio foi observado um efeito bifásico (aumento ou diminuição) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em regiões do cérebro estudadas (KUMAR, 1998). A resposta bifásica foi caracterizada por um aumento na resposta a dose baixa e uma diminuição em resposta a uma dose mais alta (KUMAR, 1999). Outro estudo mostrou a acumulação de alumínio no tecido cerebral de ratos após intoxicação crônica (PONSAR et al, 1997).

Nos seres humanos o alumínio pode se acumular nos ossos, fígado, rins, coração, sangue, e principalmente no encéfalo pela sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica onde se acumula nas células nervosas, chegando a alcançar concentrações micromolares nessas células (AREMU e MESHITSUKA, 2006; KAIZER, 2008). A acumulação do alumínio principalmente no encéfalo pode ocasionar diversas manifestações neurológicas, dentre elas podemos citar a perda de memória, tremores, espasmos, enfraquecimento da coordenação motora, movimentos lentos, perda de entusiasmo e convulsão generalizada com sintomas de epilepsia (ZATTA et. al, 1991).

Segundo Veer Bala Gupta et al. (2005) e Kaizer (2008), recentes estudos epidemiológicos, neuropatológicos e bioquímicos têm verificado que é possível uma ligação entre a neurotoxicidade do alumínio e a patologia Mal de Alzheimer. Porém, essa relação ainda é muito discutida na comunidade científica mundial. Segundo

Ferreira et al. (2008), o Mal de Alzheimer é provavelmente o resultado de um processo de envelhecimento multifatorial que está associado à componentes genéticos e ambientais. Entre os fatores ambientais está a exposição ao alumínio.

### 1.3.1 TOXICOCINÉTICA DO ALUMÍNIO

O trânsito do alumínio no organismo ainda não está completamente elucidado. Em mamíferos, sabe-se que o alumínio é pouco absorvido no trato gastrointestinal após sua ingestão, sendo que a maior parte dos compostos é transformada em sais insolúveis (principalmente fosfato de alumínio) no tubo digestivo (BAST, 1993).

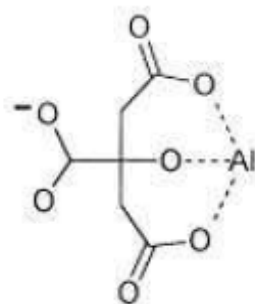
A absorção do alumínio depende da rota de ingestão e esta, por sua vez, depende da forma química do metal (BAST, 1993; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007) e da habilidade gastrointestinal para dissolver o alumínio e também da acidez das secreções gástricas (LIBERAL, 2003; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

Dependendo da forma química da substância, o alumínio pode formar complexos insolúveis ou solúveis no trato gastrointestinal, o que pode favorecer (i) a precipitação e eliminação do alumínio pelo trato gastrointestinal ou (ii) o acúmulo em tecidos após a absorção no trato intestinal, respectivamente. (MARTIN, 1986; MARTIN, 1994; TAPPARO et al., 1995, ZATTA et al., 1998).

Bast (1993) verificou que 10% do alumínio presente na dose 200 mg/ kg de  $Al_2(SO_4)_3$  (dose elevada) foi absorvido pelo trato gastrointestinal de ratos. Cunat et al. (2000) verificaram que o alumínio é melhor absorvido quando presente em sais de citrato que em outros sais (tartarato de alumínio, gluconato de alumínio, lactato de alumínio, cloreto de alumínio, sulfato de alumínio e Nitrato de alumínio).

Alguns autores afirmam que o citrato torna o alumínio solúvel e uma considerável fração ocorre como um complexo neutro, capaz de atravessar facilmente as membranas, atuando como um veículo que facilita a absorção do metal no organismo (MARTIN, 1986, 1994; TAPPARO et al., 1995; ZATTA et al., 1998; CUNAT et al., 2000; MESHITSUKA e AREMO, 2007).

O citrato atua como veículo, onde a passagem do alumínio depende de sua ligação a um citrato livre (EXLEY, 1999). O complexo Al-citrato é formado pela ligação do alumínio com o grupo hidroxil e dois terminais carboxilados do citrato (GREGOR & POWELL, 1986). (Figura 1)



**Figura 1.** A estrutura do complexo Al-citrato. Adaptado de Yokel et al. (1999).

Uma das hipóteses levantadas é que o citrato aumenta a biodisponibilidade no intestino por aumentar a permeabilidade dos canais paracelulares, possivelmente através da desregulação na homeostasia do cálcio. Este mecanismo pode ser único para o complexo alumínio-citrato, estando em conformidade com a maior biodisponibilidade deste complexo em comparação com outros complexos ligantes (CUNAT et al., 2000; MOORE et al., 2000). Segundo Liberal (2003), o fato da absorção intestinal de ambos depender do mesmo mecanismo, reforça a idéia de

que o alumínio pode ser captado pelo mesmo transportador de citrato. Pajor (1999) relatou que a absorção de citrato está acoplada a um transportador de sódio, o  $\text{Na}^{+1}$  / dicarboxilato cotransportador, o qual se associa ao cloreto, liberando o citrato para ligações com alumínio.

Em condições aquosas ácidas, como no estômago ( $\text{pH}\approx 2-3$ ), o baixo pH permite a dissolução total de compostos alumínicos que seriam insolúveis em outras regiões corpóreas. Essa dissolução gera o  $\text{Al}^{+3}$  (alumínio livre) que fica disponível para novas ligações e possível absorção no trato intestinal (DEVOTO e YOKEL, 1994).

O alumínio solubilizado presente no estômago pode formar novos complexos com a união do composto de alumínio que foi inicialmente ingerido ou formar novos complexos provenientes da dieta. Os ácidos mono-, di- e tricarbóxicos (particularmente o ácido cítrico) desempenham um papel importante na formação desses complexos (TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998; MESHITSUKA e AREMO, 2007).

Venugopal e Luckey (1978) e Devoto e Yokel (1994) sugeriram que, após absorvido, o alumínio é distribuído principalmente no esqueleto, fígado, testículos, rins e cérebro e em menores quantidades em outros tecidos moles.

Ratos alimentados com dietas contendo hidróxido de alumínio apresentaram níveis aumentados de alumínio no tecido ósseo, muscular e renal (GREGER e DONNAUBAUER, 1986 apud de BAST, 1993).

Ao ser administrado por via oral em coelhos, o alumínio pode atravessar a barreira placentária e se acumular no feto, podendo ser também transferido para o recém nascido através do leite (CAIPIRA e MCNAMARA, 1985; CRANMER et al., 1986 apud de BAST, 1993).

O alumínio, por si só, não sofre metabolismo na medida em que é absorvido e excretado inalterado. No entanto, este metal é facilmente vinculado a outras moléculas pequenas no organismo e seu destino é determinado pela sua afinidade com cada um dos ligantes e de seu metabolismo (ATSDR, 2006). A associação do alumínio com moléculas pequenas (peptídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos e citrato) facilita a absorção tecidual, particularmente pelo cérebro, onde pode ser absorvido por transportadores acoplados (DELONCLE et al., 1990).

Segundo Berton (1998), a rota de distribuição do alumínio pode ser fisiológica por meio transcelular (membranas, citoplasma e basolateral) ou extracelular (difusão passiva).

Nos sistemas biológicos, o alumínio compete com cátions, especialmente o  $Mg^{2+}$  e se liga ao citrato na corrente sanguínea. A maior parte do  $Al^{+3}$  no sangue se liga à transferrina, cerca de 89%, podendo acessar o SNC através do sistema comum ao transporte de ferro via endocitose mediada por complexo receptor-transferrina (XU et al., 1992; YOKEL et al., 1999).

Berton (1998) e ATSDR (2006) relataram que boa parte do alumínio é excretado/eliminado pelas fezes, urina e suor. Segundo Berton (1998), a eliminação do alumínio depende muito do complexo ao qual o metal está associado e da dieta consumida. Com a administração de 5 mg/dia de alumínio, 74% do metal é excretado nas fezes e só 1,3 mg permanece. Já com a ingestão de 125 mg/dia, 96% é excretado ficando apenas 5 mg. Conforme comentado anteriormente, vale ressaltar que a presença de citrato na dieta pode aumentar a quantidade de alumínio absorvida.



### 1.3.2 TOXICODINÂMICA DO ALUMÍNIO

O alumínio é conhecidamente um elemento neurotóxico. A evidência dessa neurotoxicidade é a sua presença no SNC, uma vez que o mesmo ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica alterando o fluxo de moléculas e íons dentro e fora do cérebro (MESHITSUKA e AREMO, 2007). Dessa forma, há o reconhecimento do alumínio como um agente neurotóxico, e vários estudos atribuem seu envolvimento na etiologia da Doença de Alzheimer (DA) e Demência Dialítica (DD) (TAPPARO et al 1995; YOKEL et al.,1999; VEER BALA GUPTA, et al., 2005; AREMU e MESHITSUKA, 2006)

Há também relatos de que este metal pode ocasionar outras desordens/doenças, tais como: (a) estresse ou morte celular de neurônios e células gliais. A morte dessas células ocorre devido o alumínio diminuir a habilidade neuroprotetora dos astrócitos para a manutenção e vida dos neurônios (MESHITSUKA e AREMO, 2007). Já o estresse oxidativo é caracterizado por um significativo aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células e tecidos pelo alumínio (KAIZER, 2008); (b) peroxidação lipídica ocorre devido o aumento do metabolismo oxidativo nas células, pois a interação do alumínio com as membranas celulares, constituem seu principal alvo, induzindo alterações estruturais e funcionais das membranas (KAIZER, 2008); (c) bloqueio dos sistemas de transmissão intracelular, resultando na geração de radicais livres de oxigênio (KOENIG e JOPE, 1987; WOOD et al., 1994); (d) interferência no sítio de ligação de cálcio dentro da célula. Um dos sítios primários de toxicidade do alumínio pode estar relacionado com sua inserção nos domínios de ligação de metais nas enzimas e lipídeos, causando uma alteração no metabolismo e sinalização celular

(MARTIN, 1992); (e) danos no transporte axonal (TRONCOSO et al., 1985); (f) perda de memória (YATES, et al., 1980; ARENDT, et al., 1985; RONDON-BARRAGÁN et al 2007); (g) esclerose lateral amiotrófica e (h) parkinsonismo (AZEVEDO e CHASIN, 2003; BARRETO e ARAUJO, 2008).

Estas desordens/doenças estão associadas com o acúmulo de  $Al^{+3}$  em neurônios cerebrais, os quais sofrem degeneração neurofibrilar em forma de emaranhados neurofibrilares, bem como a formação de placas senis (GARRUTO et al, 1995; VEER BALA GUPTA, et al., 2005).

Tais evidências permitiram, nas últimas décadas, um aumento considerável na utilização de modelos animais experimentais na tentativa de se compreender melhor a forma de ação desse metal não apenas nos sistemas fisiológicos, mas principalmente suas possíveis implicações em processos cognitivos, bem como em fatores tróficos (STRUYS-PONSAR et al, 1997).

Essa gama de evidências acerca dos efeitos tóxicos do alumínio, inclusive com a utilização de modelos animais, levou os investigadores da área a tentar formular hipóteses acerca de possíveis modos de ação desse íon metálico no SNC.

A hipótese mais consistente que se tem até o momento é conhecida como a *hipótese do astrócito*. Em experimentos com cultura de neurônios e astrócitos, diversos autores (GUO-ROSS et al., 1999; SUAREZ FERNANDES et al., 2001; AREMU e MESHITSUKA, 2006; MESHITSUKA e AREMO, 2007) têm mostrado, através de tratamentos com alumínio *in vitro*, que o tratamento com este metal diminui a habilidade dos astrócitos em proteger os neurônios e que esse efeito poderia estar ocorrendo por três mecanismos: os astrócitos, após sofrerem os efeitos da contaminação desse metal secretariam um fator que torna os neurônios mais suscetíveis à toxicidade induzida por glutamato; a secreção de um fator

neurotóxico na presença do glutamato; a redução da secreção de fatores tróficos que protegem os neurônios da excitotoxicidade do glutamato, como as neurotrofinas que são moléculas neuroprotetoras que estimulam a sobrevivência neuronal. Esta última opção tem se mostrado a mais plausível (AREMU e MESHITSUKA, 2006; MESHITSUKA e AREMO, 2007), estando sustentada por trabalhos como os de Ahlemeyer et al. (2003) que demonstrou que a ativação de astrócitos altera sua capacidade para proteger os neurônios depois de um dano de excitotoxicidade devido a diminuição na liberação de fatores solúveis termolábeis.

Um estudo realizado por Theiss e Meller (2002) evidenciou que o alumínio altera a comunicação celular quando acumulado no astrócito, causando fragmentações típicas de apoptose, levando a morte dessas células gliais e a conseguinte degeneração de neurônios no hipocampo (RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

## 1.4 PROCESSOS NEUROBIOLÓGICOS DE MEMÓRIA

### 1.4.1 Considerações gerais

A memória é a capacidade que o homem e os animais possuem de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (LENT, 2001). Xavier (1993) define memória como a capacidade de alterar o comportamento em função de experiências anteriores e Lent (2001) a difere da aprendizagem, argumentando que esta seria apenas o processo de aquisição das informações.

A memória envolve um complexo mecanismo que abrange o arquivo e a recuperação de experiências anteriores e, portanto, está intimamente associada à

aprendizagem. Esta seria a aquisição de novos conhecimentos, enquanto a memória seria a retenção dos conhecimentos aprendidos (CARDOSO, 1997; LENT, 2001).

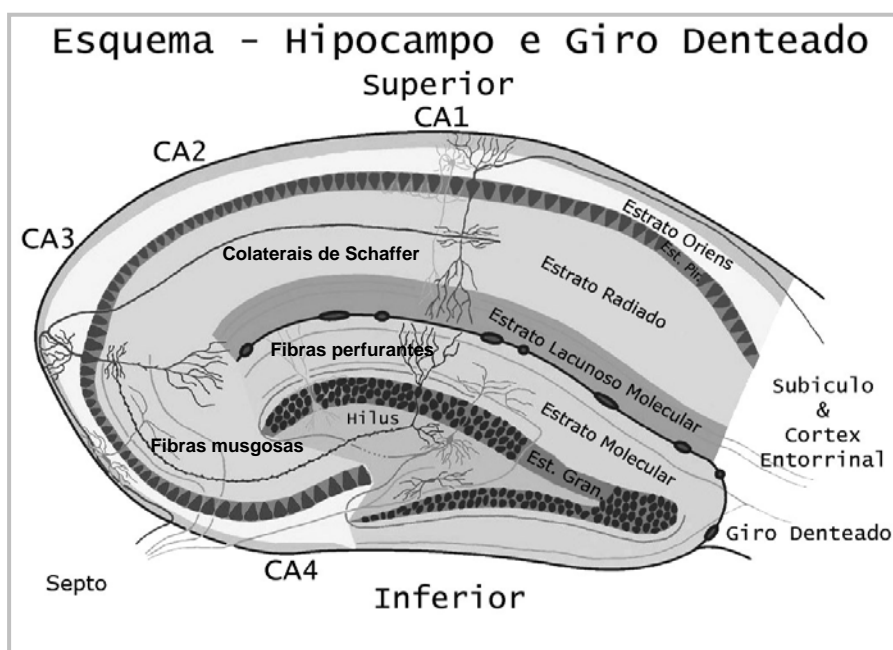
Pode-se afirmar que a memória é a base do conhecimento, estando envolvida com a orientação no tempo e no espaço e com as habilidades intelectuais e mecânicas. Aprendizagem e memória são suporte para todo o nosso saber, habilidades e planejamento, fazendo considerarmos o passado e nos situarmos no presente, prevendo o futuro (CARDOSO, 1997).

Uma das estruturas fundamentais para o aprendizado e memória é o hipocampo, localizado medialmente ao ventrículo lateral e consistindo em duas finas áreas de neurônios, dobradas uma sobre a outra (GAZZANIGA et al., 2006). Uma área é denominada de *cornu de Amon* e é dividida em 4 regiões denominadas CA1, CA2, CA3 e CA4. O cornu de Amon forma o hipocampo propriamente dito. A CA2 é pequena, e indistinta em algumas espécies, por isso ele é freqüentemente incluído em CA1 nas análises. A outra área é denominada de *giro denteado* (LENT, 2004). Estudos sugerem que essa estrutura está envolvida com os aspectos emocionais do aprendizado e memória (BEAR, 1996; LOMBARDO et al., 2001; REZAYAT et al., 2009).

O hipocampo é constituído por três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum e stratum lacunosum-moleculare*). Já o giro denteado é formado por camada polimórfica (hilus), camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é continua com o hipocampo (GAZZANIGA et al., 2006).

As conexões no hipocampo são realizadas pelas fibras perfurantes que são aferentes externos ao hipocampo e fazem sinapse com as células granulares do

giro denteado. Os axônios das células granulares, por sua vez, estabelecem sinapses com os dendritos das células piramidais e se estendem até a região de CA3. A partir daí, as células piramidais podem percorrer dois caminhos: projetar seus axônios para fora do hipocampo ou enviar os colaterais de Schaffer à região CA1, onde fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais, cujos axônios projetam para fora do hipocampo (LENT, 2004; SQUIRE & KANDEL, 2003) (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama da organização sináptica do hipocampo. As fibras Colaterais de Schaffer conectam a região CA3 a CA1. A região de CA3 comunica-se com o giro denteado através das fibras musgosas. As fibras perforantes são provenientes do córtex entorrinal e conduzem informações sensoriais ao giro denteado. Na camada de neurônios piramidais (CA1) encontramos o estrato oriens. O giro denteado divide-se em camadas: molecular, granular e polimórfica (ou hilo). Figura adaptada encontrada em [www.sciencephoelibrary.com](http://www.sciencephoelibrary.com).

O hipocampo armazena memórias de média duração, sendo fundamental para a consolidação da memória. Após a consolidação da memória na região do hipocampo, estas informações são transferidas para outras regiões do córtex cerebral (neocórtex) (GAZZANIGA et al., 2006).

As regiões envolvidas com a consolidação da memória são: hipocampo (CA1 e CA3 principalmente), córtex entorrinal, córtex perirrinal e giro parahipocampal. Sendo que as lesões no córtex perirrinal, levam à déficits de memória (EICHENBAUM et al.,2007).

#### **1.4.2 Tipos de Memória**

São vários os tipos e subtipos de memória. De fato, de acordo o referencial adotado, classificações diferentes surgem para esta faculdade. Quando se leva em conta o tempo de retenção de uma dada informação, pode-se considerar a memória como sendo ultra-rápida, de curta duração ou de longa duração. Por outro lado, se levarmos em conta a funcionalidade da memória, possuímos memória espacial, memória emocional, memória episódica, memória de procedimento, etc (LENT, 2001; SQUIRE & KANDEL, 2003; FUENTES et al.,2008).

Um dos tipos de memória mais investigada é a memória espacial. Este tipo de memória é essencial para a sobrevivência dos animais, uma vez que é responsável pelo armazenamento dos parâmetros de relações ambientais (MORRIS, 1984).

A memória espacial posiciona o animal de forma adequada à melhor realizar suas atividades no meio ambiente, sejam elas básicas como encontrar alimento e abrigo, sejam elas atividades mentais superiores, como as coordenadas

geográficas utilizadas pelo homem. Através da memória espacial os animais constroem um mapa de seu mundo externo e o internalizam com sua disposição, sua temporalidade e, acima de tudo, no caso do homem, com sua significação. Circuitos cerebrais e sistemas de neurotransmissão específicos garantem esse processo (MORRIS, 1984; SANTOS, 1997).

Outro tipo de memória, quanto à sua natureza, amplamente investigado, é a chamada memória emocional. Ao contrário da memória espacial, esse tipo de memória funciona como um sistema de alerta, caracterizado pelo seu componente subjetivo, que sinaliza perigo à integridade física do animal ou expressa o significado de algo. Esse tipo de memória requer circuitos neuronais e neurotransmissores diferenciados da memória espacial, ainda que ambas estejam relacionadas na construção integral da atividade dos animais (VIANA et al., 1994; ZANGROSSI e GRAEFF, 1997).

## 1.5 ALUMINOSSES E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES SOBRE OS PROCESSOS DE MEMÓRIA

Estudos mostram que o alumínio não estaria envolvido apenas em quadros sintomáticos de doenças orgânicas e neurodegenerativas, mas também em uma série de processos cognitivos, como memória e emoção (KING, 1984; CHONG e SUH, 1995; DLUGASZEK et al, 2000; VER BALA GUPTA, 2005; NEHRU, BHALLA e GARG, 2006; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

Nas últimas quatro décadas estudos têm evidenciado que importantes tipos de memória estariam sendo afetados pelos compostos do alumínio, como por exemplo, a memória espacial e a memória emocional. Dentre alguns estudos,

podemos citar Mcdermott et al. (1977); Basun et al. (1991) e Bondy e Truong (1999) e Bush (2000) que, através da técnica de análises teciduais *post-mortem*, verificaram um grande acúmulo de alumínio em emaranhados fibrilares e placas senis em pacientes com sintomas semelhantes a doença de Alzheimer, cujo selo histopatológico do diagnóstico é exatamente a presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis. Por outro lado, um dos principais sintomas da doença de Alzheimer é a deterioração da memória espacial, com perda das referências ambientais.

As evidências da degeneração de determinados grupos de neurônios e da deterioração da memória espacial em paciente com DA levaram a um diversificado campo de investigação acerca das estruturas anatômicas e dos neurotransmissores envolvidos em tais processos (VEER BALA GUPTA, 2005).

Através de estudos bioquímicos e neuroquímicos tem sido mostrando alterações nos circuitos neurais em estruturas límbicas do encéfalo, principalmente no hipocampo, utilizando majoritariamente o sistema acetilcolinérgico de neurotransmissão, parecem ser cruciais para o quadro histológico da DA (LENT, 2001; SQUIRE & KANDEL, 2003). Interessantemente, esses mesmos métodos têm demonstrado que o alumínio inibe a glicólise e diminui a atividade da enzima colina acetil transferase (ChAT), bem como o transporte de colina em cérebro de ratos (YATES et al, 1980; KING, 1984; KUMAR, 1998).

Esses dados corroboram uma hipótese acerca do papel do alumínio nos déficits de memória, característicos da DA, uma vez que a ChAT e o transporte de colina são parâmetros para a síntese de acetilcolina, o principal neurotransmissor envolvido nos processos de armazenamento de informação e que também encontra-se diminuída na DA (YATES et al, 1980; ARENDT et al, 1985).



As implicações do alumínio em desordens neurológicas e cognitivas sugerem que esse metal pode ser um fator etiológico de danos aos processos de aprendizagem e de memória. A importância de se compreender as bases moleculares e celulares dos efeitos neurotóxicos do alumínio tem estimulado enormes esforços no desenvolvimento de modelos moleculares, celulares e animais (TAPPARO et al., 1995).

## 1.6 UTILIZAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS ACERCA DOS EFEITOS DO ALUMÍNIO

O uso de modelos animais na investigação do alumínio teve início na década de 1960 com Klatzo et al (1965), os quais desenvolveram um procedimento experimental de degeneração neurofibrilar, que consistia na administração intracerebral de fosfato de alumínio em coelhos, resultando no desenvolvimento de convulsões e modificações neuronais (degeneração neurofibrilar) no SNC.

Na opinião de Tapparo et al (1995), o maior avanço no desenvolvimento de modelos animais, para medir a toxicidade de alumínio, só foi possível dez anos mais tarde, através de dois trabalhos, realizados de forma independente. O primeiro foi em 1976, Alfrey et al que publicaram as primeiras provas convincentes de que a sobrecarga de alumínio em pacientes que são submetidos à diálise estaria fortemente relacionada com a *demência dialítica*. O segundo foi publicado no mesmo ano por McLachlan et al, os quais relataram que níveis significativamente elevados de alumínio encontravam-se presentes em áreas específicas do cérebro de pacientes afetados pela *Doença de Alzheimer*.

Dentre diversos estudos utilizando modelos animais, podemos citar Hermenegildo et al (1999) que mostram danos à rota do GMP cíclico do glutamato - óxido nítrico (Glu-NO GMPc), em ratos expostos a sulfato de alumínio na água ingerida durante 3-5 semanas; Kumar (1998), que após administrar oralmente a dose de 320 mg/kg de cloreto de alumínio por 4, 14 e 60 dias, observou efeito bifásico de alumínio sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em neurônios do bulbo olfatório e do hipotálamo de ratos; Stryus-Ponsar et al, (1997) relataram, após intoxicação por via intraperitoneal de gluconato de alumínio em ratos, durante 3 meses, acumulação do alumínio no tecido cerebral, sendo maior no córtex temporal, no núcleo olfatório anterior e no hipocampo, média no córtex frontal e parietal, e baixa no cerebelo e na medula. Ainda neste experimento, foram realizados testes comportamentais no labirinto radial para conhecer as relações entre acúmulo de alumínio e comportamento, os quais foram inconclusivos e, na opinião dos autores, precisariam ser refeitos e ampliados.

Sethi et al. (2008), avaliaram os efeitos a longo prazo da administração oral de cloreto de alumínio através de ensaios eletrofisiológicos, bioquímicos e comportamentais para investigar possíveis fisiopatologias associadas com a alta toxicidade do alumínio. Os resultados desta pesquisa revelaram através dos ensaios eletrofisiológicos que os animais apresentaram hiper-excitabilidade; os dados histopatológicos demonstraram que a toxicidade do alumínio diminuiu significativamente o número de células das regiões de cornos de Amon do hipocampo (CA). As regiões afetadas nesse estudo foram CA1 e CA3, onde observou-se desorganização celular dos neurônios piramidais. Por outro lado, os dados comportamentais do campo aberto mostraram que os ratos tiveram a

atividade ambulatorial elevada e do labirinto aquático de Morris os animais apresentaram um déficit de aprendizagem e memória.

O uso de modelos animais apresenta como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos, mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos (CHORILLI et al., 2007).

## 1.7 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A investigação da etiologia e da prevalência de doenças associadas à contaminação por metais pesados, em nossa região, tem nítida relevância teórica e social. No caso do alumínio o seu papel toxicológico ainda permanece pouco esclarecido, embora existam diversos trabalhos na literatura como os de Kiss, 1995; Tapparo et al (1995) e Sethi et al. (2008) apontando efeitos, de caráter degenerativo, em diferentes formas de vida. Esses trabalhos demonstram uma série de implicações desse metal à saúde, atingindo principalmente o SNC e causando desordens neurológicas e cognitivas.

Existem estudos sugerindo uma relação entre acúmulo de alumínio em áreas do SNC, dentre elas o hipocampo, e um quadro histopatológico e comportamental semelhante a DA, no qual se observa a deterioração de processos de memória e degeneração de células hipocampais. No entanto, nestes estudos os procedimentos experimentais utilizados apresentam inconsistências nos métodos e doses de administração do alumínio, nas diferenças de amostras biológicas e nos períodos de exposição (STRYUS-PONSAR et al, 1997; KUMAR, 1998). Além disso, o correlato neural das alterações comportamentais, como o padrão de degeneração das camadas hipocampais, não foi investigado de forma sistemática.

A hipótese desta investigação é a de que a intoxicação por via oral com citrato de alumínio pode interferir nos processos de memória no sentido de prejudicar o aprendizado ou a retenção de uma tarefa no labirinto em T elevado. Do ponto de vista morfológico, espera-se verificar um padrão degenerativo de células hipocampais.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Geral

Analisar os efeitos neurocomportamentais da contaminação experimental com citrato de alumínio sobre os processos mnemônicos de ratos *Wistar* adultos, fazendo uma relação com o padrão histopatológico do hipocampo.

### 1.8.2 Específicos

- Investigar os efeitos da administração oral de citrato de alumínio sobre atividade exploratória e locomotora de ratos *Wistar* submetidos ao teste do campo aberto.
- Verificar os efeitos da administração oral de citrato de alumínio sobre o desempenho comportamental em ratos *Wistar* submetidos ao teste de memória do labirinto em T elevado.
- Investigar qualitativamente os efeitos da contaminação experimental com citrato de alumínio sobre o padrão de perda neuronal e astrocitose no hipocampo de ratos *Wistar* adultos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, experimentalmente ingênuos com peso entre 230 e 250 g com 5 meses de vida fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Psicobiologia da Universidade Federal de Pará (UFPA).

Os animais foram alojados aos pares em gaiolas-viveiro de plástico, com dimensões de 30 cm x 20 cm x 12 cm, divididos em grupos de acordo com tratamento. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum* e permaneceram em uma temperatura de 25 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h.

Todas as condições experimentais e os procedimentos éticos estão de acordo com as normas locais do Comitê de Ética em Pesquisa com animais experimentais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde o presente trabalho foi aprovado (CEPAE/UFPA), tendo o PARECER PSI002/2008.

### 2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO

A solução foi preparada no Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará, pelo técnico especializado Natalino Valente, seguindo o protocolo adaptado de Martin (1994) descrito a seguir:

Primeiramente foi pesado 14,23 g de ácido cítrico e 17,89 g de cloreto de Alumínio hexahidratado. Logo após, ambos os reagentes foram colocados em um

Becker e adicionado 100 ml de água deionizada. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 200 ml de hidróxido de amônia na solução para o pH chegar até 7. Depois a solução foi agitada a uma temperatura de 60 °C por alguns minutos e completada com água deionizada para um balão volumétrico de 500 ml.

### 2.3 PROCEDIMENTOS DE INTOXICAÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A intoxicação dos animais experimentais foi realizada por citrato de alumínio (CaI) administrada na dose de 320 mg/kg injetada em um volume de até 2 ml por via oral (gavagem) de acordo com o peso do animal, sempre no horário entre 9:00 e 11:00 h da manhã.

Já o grupo controle recebeu a administração de citrato de sódio (CNa) por via intragástrica na mesma dose e volume do grupo experimental, conforme está representado na tabela 01.

A distribuição dos grupos foi feita por tempo de sobrevivência/ grupo experimental, sendo três experimentais e um controle, conforme descrito a seguir:

- **Grupo 1 (Animais controle):** Os animais deste grupo (N=7) foram tratados com citrato de sódio durante quatro (4) dias consecutivos e após 24h foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e Labirinto em T elevado) durante três (3) dias, e em seguida os animais foram perfundidos (8º dia do início do tratamento).

- **Grupo 2 (Animais intoxicados com citrato de alumínio e perfundidos ao 8° dia):** Os animais deste grupo (N=7) foram tratados com CAI durante quatro (4) dias consecutivos e após 24h foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e labirinto em T elevado) durante três (3) dias, e em seguida os animais foram perfundidos (8° dia do início da contaminação).
- **Grupo 3 (Animais intoxicados com citrato de alumínio e perfundidos ao 17° dia):** Os animais pertencentes a este grupo (N= 7) foram intoxicados com CAI durante quatro (4) dias consecutivos. Dez (10) dias depois foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e labirinto em T elevado) durante três (3) dias, e em seguida os animais foram perfundidos (17° dia do início da contaminação).
- **Grupo 4 (Animais intoxicados com citrato de alumínio e perfundidos ao 31° dia):** Este grupo (N=8) foi intoxicado com CAI durante quatro (4) dias consecutivos. Vinte e quatro (24) dias depois foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e labirinto em T elevado) durante três (3) dias, e em seguida, os animais foram perfundidos (31° dia do início da contaminação).

**Tabela 1.** Distribuição dos grupos de acordo com tratamento, doses, número de doses e tempo de sobrevivência.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>N° de doses</b>	<b>Tempo de sobrevivência</b>
01	CNa	320	4	8 dias
02	CAI	320	4	8 dias
03	CAI	320	4	17 dias
04	CAI	320	4	31 dias



## 2.4 TESTE PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES BÁSICAS DE ATIVIDADES LOCOMOTORAS E EXPLORATÓRIAS APÓS O PROTOCOLO DE INTOXICAÇÃO

### 2.4.1 Campo Aberto

#### 2.4.1.1 Fundamento:

No presente estudo foi utilizado uma arena que, em sua essência lembra aquele que ficou conhecido como o modelo do campo aberto (AGUIAR, 1995). O campo aberto foi desenvolvido por Calvin Hall (1934) o qual utilizou a quantidade de defecção e urina do animal como índice de emocionalidade. A partir daí o número de variáveis dependentes utilizadas nesse modelo aumentaram consideravelmente.

A metodologia do campo aberto consiste basicamente em mensurar os comportamentos elucidados por um animal colocado em um espaço aberto, que represente novidade para ele e do qual não consegue fugir, por existir paredes ao redor desse espaço. Esse modelo permite amplamente avaliar tanto medidas de exploração (locomoção, levantamento, farejamento) como medidas aversivas (defecação, micção, congelamento), relacionados a atividade motora a construtos teóricos sobre exploração e medo (NAHAS, 1997, 2001).

O campo aberto pode variar amplamente no tamanho, na forma (quadrado, retangular ou circular) e nos parâmetros das respostas a serem avaliados. Dessa forma, esse teste pode ser utilizado tanto para medir o comportamento do animal mediante uma simples situação de novidade, como pode servir para avaliar efeitos de drogas, de lesões, estimulação elétrica do SNC, habituação, bem como a aprendizagem em respostas ao meio ambiente experimental (AGUIAR, 1995).

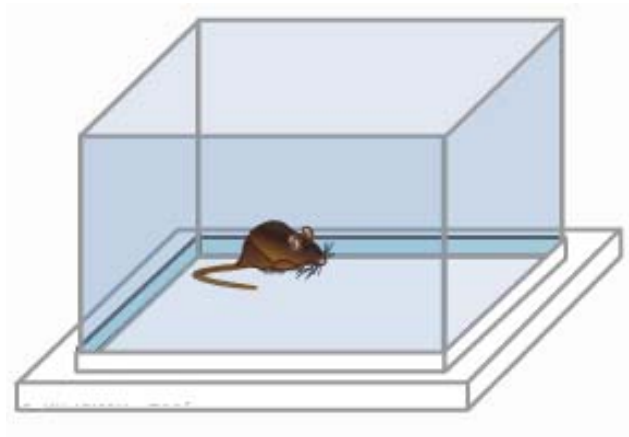
Por estar historicamente relacionado a pesquisas com emocionalidade, o campo aberto vem sendo utilizado para avaliar o potencial ansiolítico de drogas, pois respostas emotivas em ratos ocorrem em maior frequência e/ou duração em ambientes amplos, nos quais os roedores, por instinto, se locomovem perto das paredes, onde se sentem mais protegidos. Agentes ansiolíticos aumentam a passagem dos animais pelo centro desta arena e diminuem a defecação e/ou micção e ainda aumentam a frequência e a duração de respostas de congelamento (NAHAS, 2001).

O objetivo da utilização desse modelo neste trabalho foi (i) verificar se a intoxicação não estaria afetando as atividades locomotoras e exploratórias dos animais experimentais, cujo prejuízo poderia mascarar ou impedir a avaliação de possíveis efeitos tóxicos do citrato do alumínio nos processos cognitivos que estamos tentando investigar e (ii) favorecer a exploração dos animais no teste do Labirinto em T elevado (LTE).

#### 2.4.1.2 Equipamento:

Para o teste do campo aberto utilizou-se aparelho de campo aberto; *webcam*, computador, *software Any Maze Stoelting*<sup>®</sup> e cronômetro.

O aparelho do campo aberto utilizado nesse estudo era de madeira coberta com fórmica impermeável, ocupando uma área de 100 cm<sup>2</sup>, tendo assoalho negro dividido em 25 quadrados e cercado por paredes de madeira de 30 cm de altura, conforme a figura 2. A iluminação do ambiente foi feita com uma lâmpada fluorescente branca de 80 watts à altura de 2,60 m do centro da arena.



**Figura 3.** Campo aberto utilizado para verificação das reações comportamentais depois da intoxicação por citrato de Al.

#### 2.4.1.3 Procedimento:

O animal foi colocado no centro do campo aberto e exposto, individualmente, ao mesmo por um período de 5 minutos, durante os quais os comportamentos foram capturados por uma *webcam*, que se encontrava a 1 m de distância do modelo, para análise posterior, utilizando o *software Any Maze Stoelting*<sup>®</sup> que é especializado em medir parâmetros comportamentais importantes da atividade exploratória, e assim contribuir para investigar com maior resolução se as condições de alojamento (ambiente versus gaiola padrão) afetam o comportamento no campo aberto dos animais.

Na análise foram avaliados os seguintes parâmetros: a taxa de ambulação, do levantar, da auto-limpeza e do congelamento (NAHAS, 1997). A tabela 3 apresenta os parâmetros mensurados neste teste.

**Tabela 2.** Parâmetros mensurados no Teste do Campo Aberto

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Unidades</b>
Distância percorrida	Cm
Levantamento ( <i>rearing</i> )	Freqüência
Auto-limpeza ( <i>grooming</i> )	Freqüência
Congelamento ( <i>freezing</i> )	Segundo

A taxa de ambulação foi mensurada através da distância percorrida pelo animal no aparato com as 4 patas; o levantamento (*rearing*) foi analisado como o apoio do tronco, em posição próxima à vertical, apenas sobre as patas traseiras; a auto-limpeza (*grooming*) foi considerada como movimentos dirigidos à cabeça ou ao corpo, efetuados com as patas dianteiras; o congelamento (*freezing*) foi avaliado quando o animal permaneceu imobilizado por mais de 10 segundos consecutivos (NAHAS, 2001).

Antes e depois da exposição de cada animal foi realizada a limpeza do assoalho do campo aberto com álcool etílico a 30% e toalhas de papel, deixando-o secar bem e receber a circulação normal de ar.

## 2.5 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

### 2.5.1 Labirinto em T elevado

#### 2.5.1.1 Fundamento

O Labirinto em T elevado (LTE) é uma modificação do labirinto em cruz elevado (LCE), o qual foi desenvolvido por Handley e Mithani em 1984, com o objetivo de detectar os efeitos de drogas ansiolíticas e que se consolidou como um

modelo comportamental largamente utilizado para o estudo da ansiedade (VIANA et al,1994; AGUIAR, 1995).

Handley e Mithani utilizando o LCE confirmaram os achados de Montgomery publicados em 1955, o qual foi o primeiro a utilizar um modelo de labirinto elevado, demonstrando que a exposição a um braço aberto desse aparato era capaz de provocar uma situação de conflito em ratos entre a motivação para explorar um ambiente novo e o medo gerado pelo espaço aberto e a altura. Ele verificou que essa relação conflituosa não estava presente quando ao animal era permitido a exploração de um braço fechado desse labirinto (AGUIAR, 1995).

É sabido que os modelos animais de ansiedade necessariamente envolvem interferências de processos psicobiológicos, tais como as habilidades motoras, motivação, percepção, aprendizado e memória. No entanto, a maioria desses modelos, como é o caso do LCE, um modelo etológico que surgiu para eliminar situações aversivas, como estímulos dolorosos, não costuma levar em conta os processos de aprendizado e memória que sabidamente estão envolvidos em situações de ansiedade. Além disso, uma grande quantidade de evidências experimentais indica que estruturas cerebrais envolvidas na ansiedade e na modulação da memória, em particular a memória emocional, estão associadas (GRAEFF et al., 1993; VIANA et al., 1994).

Na tentativa de criar um modelo onde se possa fazer essa correlação Graeff et al.(1993) e Viana et al.(1994) padronizaram o LTE com objetivo de analisar em animais os diferentes tipos de ansiedade, e ao mesmo tempo avaliar a memória. A partir daí, este modelo comportamental passou a ser utilizado para investigar os efeitos de drogas na memória e nos substratos neurais envolvidos nos comportamentos emocionais e processos de aprendizado (GRAEFF et al., 1993).

O LTE é um modelo etológico que permite a avaliação de fenômenos biológicos naturais, tais como medo, pânico, fobias e ansiedade representando uma homologia aos fenômenos humanos observados na clínica (FERREIRA e FERREIRA, 2003).

O LTE foi desenvolvido para medir respostas relacionadas tanto ao medo aprendido como ao medo inato (medo incondicionado) no mesmo indivíduo, e simultaneamente a avaliação de memória para estes comportamentos (VIANA et al., 1994). Este modelo é construído com pelo menos dois ambientes e com diferentes níveis de aversão: frequentemente provoca medo e favorece o comportamento exploratório, levando a um adequado conflito de esquiva (HANDLEY e MCBLANE, 1993; MONTGOMERY, 1955). A ausência de paredes e a impossibilidade de girar com as patas traseiras parecem ser a base da aversão de roedores a espaços abertos, sugerindo que esta característica deva ser a base do comportamento de esquiva em relação aos braços abertos do LTE (GRAEFF, 1999).

Zangrossi e Graeff (1997) demonstraram que o fator motivacional crítico no modelo do LTE é a natureza aversiva dos braços abertos. Enquanto a esquiva inibitória do braço aberto supostamente representa o medo aprendido, a resposta de fuga representaria o medo inato.

As análises realizadas neste modelo comportamental são baseadas na quantificação dos comportamentos de esquiva inibitória e fuga, considerados por alguns autores como uma medida do grau de ansiedade e medo, respectivamente (GRAEFF et al., 1993; VIANA et al., 1994).

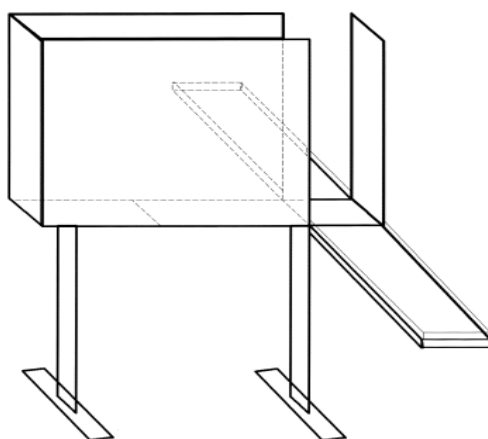
A metodologia deste modelo consiste basicamente em colocar o animal repetidamente dentro do braço fechado para explorar o labirinto permitindo ao mesmo aprender o comportamento de esquiva inibitória dos braços abertos. Por

outro lado, o posicionamento do animal no final de um dos braços abertos leva a uma resposta de fuga do mesmo (VIANA et al., 1994).

Esses parâmetros contribuem para as pesquisas experimentais acerca de processos relacionados ao aprendizado e memória, bem como contribuir para a avaliação de efeitos drogas ou agentes neurotóxicos, como o alumínio, metal utilizado neste estudo.

#### 2.5.1.2 Descrição do aparato

O LTE é constituído por três braços de madeira, medindo cada um 50 cm de comprimento por 12 cm de largura. Um dos braços é circundado lateralmente por paredes opacas de 40 cm e é disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Todo o conjunto está elevado 50 cm do solo. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma tira de madeira de 1 cm de altura, ilustrado na figura 4 (GRAEFF, 1993; ZANGROSSI JR e GRAEFF, 1997).



**Figura 4.** Labirinto em T elevado, construído a partir do modelo descrito por Zangrossi Jr e Graeff (1996).

### 2.5.1.3 Procedimento

O procedimento adotado neste estudo foi baseado no trabalho de Viana et al (1994), o qual foi constituído de uma linha de base, duas tentativas de esquiva inibitória e uma de fuga. A linha de base iniciou-se com o animal colocado pelo experimentador no fim do braço fechado com a cabeça voltada para o centro do labirinto para se medir a latência (tempo) de saída do animal, com as quatro patas desse ambiente em um período de 300 segundos, que foi o tempo padronizado para o teste. Em seguida foi realizada a primeira tentativa de esquiva inibitória, cujo procedimento era o mesmo da linha de base; 30 segundos depois foi realizada a segunda tentativa de esquiva inibitória. Logo após o teste de esquiva inibitória, realizou-se o teste de fuga, onde o animal foi colocado no fim do braço aberto direito do labirinto para registrar a latência (tempo) que o animal levaria para sair com as quatro patas do braço aberto.

Os testes para a verificação da retenção da memória para as respostas de esquiva e fuga no LTE foram realizados 72 horas após os procedimentos descritos anteriormente, quando se fez mais uma tentativa de esquiva inibitória e uma de fuga.

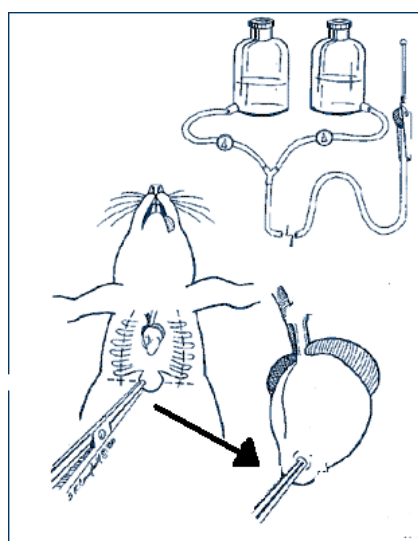
Cabe salientar que o início dos testes no LTE começaram logo após os animais terem sido submetidos ao teste do campo aberto.

## 2.6 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nos diferentes tempos de sobrevivência descritos anteriormente, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (72 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina



(9 mg/kg) (*i.p.*). Após a ausência dos reflexos corneanos e de retirada da pata, iniciou-se rapidamente a toracotomia para a visualização do coração. Em seguida, foi realizado o clampeamento da aorta descendente e uma cânula foi introduzida no ventrículo esquerdo e direcionada até a porção inicial da aorta. Foi também realizada uma pequena incisão no ventrículo direito para a eliminação do sangue do animal, conforme a figura 5. O protocolo utilizado para esse procedimento foi baseado no trabalho de Gomes-Leal et al (2004).



Perfusion Setup Diagram

**Figura 5.** Procedimento de perfusão. Após a anestesia, cada animal foi perfundido transcárdiacamente com salina heparinizada, seguido de fixação, para posterior craniotomia. A seta indica o posicionamento que a agulha foi inserida no coração. Fonte: <http://www.neuroscienceassociates.com/images/Graphics/perfusion.gif>

A perfusão dos animais foi realizada com solução salina a 0,9% heparinizada seguida de paraformaldeído a 4% para a fixação. Após a pós-fixação, os encéfalos foram submetidos ao processo de crioproteção utilizando o seguinte protocolo: i) solução crioprotetora a 25% por um dia; solução crioprotetora a 50% por dois dias e; solução crioprotetora a 100% por sete dias. Depois da crioproteção, o tecido foi congelado em gel de imersão para criostato (Tissue Tek) a  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  e secções coronais do encéfalo com espessura de  $30\text{ }\mu\text{m}$  foram obtidas. Os cortes

foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas que foram mantidas a temperatura ambiente por um período mínimo de 48 horas e guardadas logo em seguida em freezer a -20 °C para posterior estudo de imunistoquímica.

## 2.7 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

### 2.7.1 Estudos Imunistoquímicos

Para identificar corpos neuronais e células gliais nas diferentes regiões do hipocampo (CA1 e CA3) após a intoxicação por Citrato de Alumínio, foram realizados estudos imunistoquímicos. Utilizou-se os seguintes anticorpos: anti-NeuN (1:100, Chemicon) para a marcação de neurônios e; proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:1000, DAKO) para a identificação de astrócitos (MULLEN et al., 1992; ROBINSON et al., 1986).

O protocolo de imunistoquímica adotado neste estudo foi baseado no trabalho de Gomes-Leal et al., (2002, 2004) e será resumido a seguir:

- (a) As lâminas foram retiradas do freezer à -20 °C e colocadas em estufa à 60 °C por 10 minutos;
- (b) Lavagem em PBS por 3 minutos no agitador;
- (c) Pré-tratamento com tampão borato à 60 °C por 25 minutos;
- (d) As lâminas foram retiradas do tampão borato para resfriar em temperatura ambiente por 20 minutos;
- (e) As secções foram circundados com caneta hidrofóbica;
- (f) Lavagem em PBS por 3 minutos no agitador; lavagem no metanol/H<sub>2</sub>O (30%) por 20 minutos;
- (g) Lavagem em PBS/TWEEN em 3 séries de 3 minutos no agitador;

- (h) As lâminas foram levadas para a câmara úmida para serem incubadas com soro normal de cavalo (para os anticorpos primários NeuN) ou soro normal de cabra (para o anticorpo primário GFAP) a 10% em PBS (1ml de soro para 9 ml de PBS) e deixados por 1 hora;
- (i) As secções receberam o anticorpo primário anti-NeuN (1:100) ou GFAP (1:1000) diluídos em PBS e deixados em *overnight*;
- (j) As lâminas foram retiradas da câmara úmida e lavadas em PBS/TWEEN em 3 séries de 3 minutos no agitador;
- (l) As secções foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários: horse anti-mouse (1:100) para NeuN e goat anti-rabbit (1:200) para GFAP;
- (m) Lavagem em PBS/TWEEN (3 vezes de 3 minutos no agitador);
- (n) As secções foram incubadas no complexo avidina-biotina-peroxidase (1gota de A + 1 gota de B em 5 ml de PBS por 2 horas);
- (o) Lavagem em PBS/TWEEN (4 vezes de 3 minutos);
- (p) As secções foram reagidas através do método DAB-rápido até a formação de um cromógeno marrom na estrutura estudada;
- (q) Lavagem em PB 0,1M (2 vezes de 5 minutos) para a interrupção da reação e lavagem para a remoção do excesso de DAB;
- (r) Montagem entre lâmina e lamínula com entellan.

## 2.8 ANÁLISE QUALITATIVA

Para avaliar a perda neuronal e astrocitose nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo dos animais intoxicados e controle, todas as secções marcadas pelos diferentes métodos de imunistoquímicos foram inspecionadas em microscópio

óptico (Olympus BX41). Imagens de secções contendo os campos mais ilustrativos dos animais em todos os tempos de sobrevivência e animais controle foram obtidas com o uso de uma câmera digital acoplada ao microscópio utilizado (Olympus Evolt E-330).

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

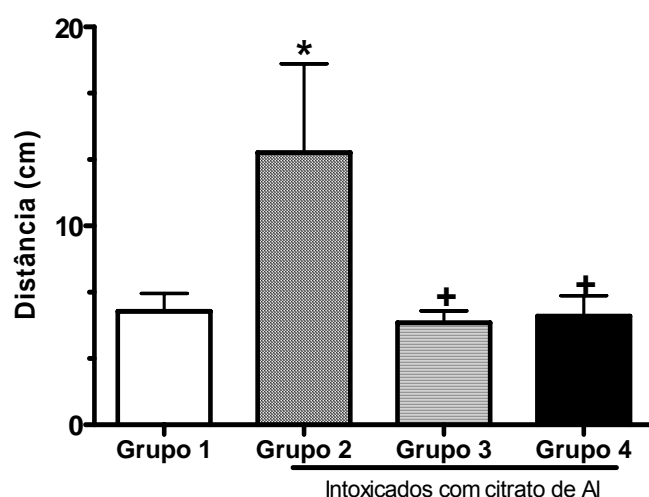
Para a análise dos dados comportamentais foi utilizado análise de variância (ANOVA) de um critério com comparações *post hoc* realizadas através do teste de Bonferroni quando necessário, testes de Friedman para  $K \geq 3$  medidas repetidas e o Kruskal-Wallis para verificar as diferenças amostrais entre os grupos. O nível de significância adotado neste estudo foi  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE AS ATIVIDADES LOCOMOTORAS E EXPLORATÓRIAS NO TESTE DO CAMPO ABERTO

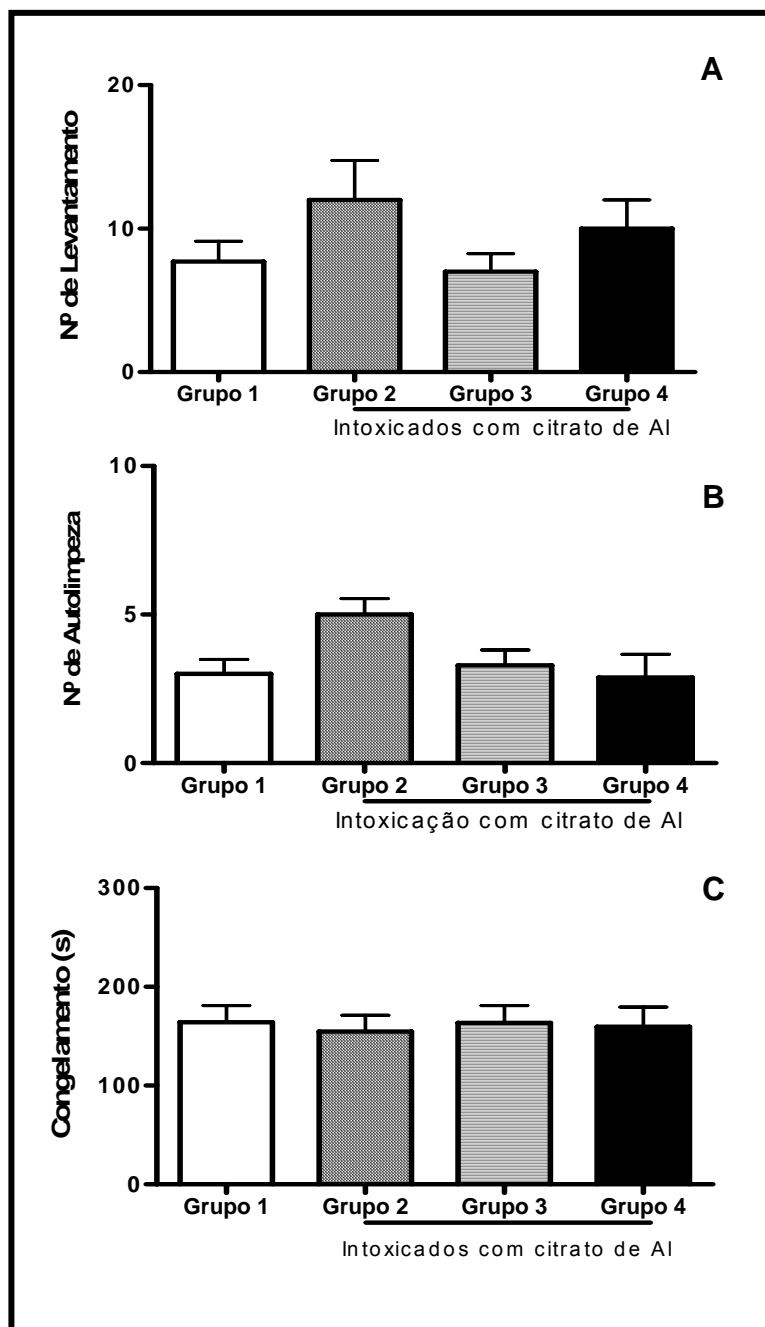
Os animais tratados com citrato de alumínio não apresentaram perda de peso corpóreo, quando comparados ao grupo controle, em quase a totalidade dos períodos avaliados. Os mesmos mantiveram o peso durante e após o tratamento com citrato de alumínio. Além disso, a administração de citrato de alumínio não causou morte de nenhum animal.

A administração oral de citrato de alumínio resultou em aumento da atividade locomotora, caracterizada pelo aumento da distância percorrida, para o grupo 2 (intoxicado) (ANOVA  $P < 0.05$ ) em comparação ao grupo 1 (controle) e aos demais grupos intoxicados, conforme a figura 6.



**Figura 6:** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) no campo aberto. A frequência da resposta de distância percorrida no campo aberto está expressa como média  $\pm$  EPM.  $N = 07$  animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e  $N = 08$  animais para o grupo 4 (intoxicado). \*  $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo 1 (controle) e +  $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo 2 (ANOVA / Bonferroni).

Com relação aos episódios de levantamento, comportamento de auto-limpeza e congelamento, a administração de citrato de alumínio não resultou em diferença significativa entre os grupos intoxicados (2, 3 e 4) com citrato de alumínio em comparação ao grupo controle (1), conforme mostram o figura 7 (A-C).



**Figura 7.** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) no campo aberto. A freqüência das respostas de levantamento (A), auto limpeza (B) e congelamento (C) no campo aberto está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA). N= 07 animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e N= 08 animais para o grupo 4 (intoxicado).

## 3.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO NO TESTE DE MEMÓRIA NO LABIRINTO EM T ELEVADO

No Teste do LTE dois parâmetros foram avaliados através das tentativas de esquiva inibitória no braço fechado e fuga no braço aberto: a latência de esquiva inibitória e a latência de fuga.

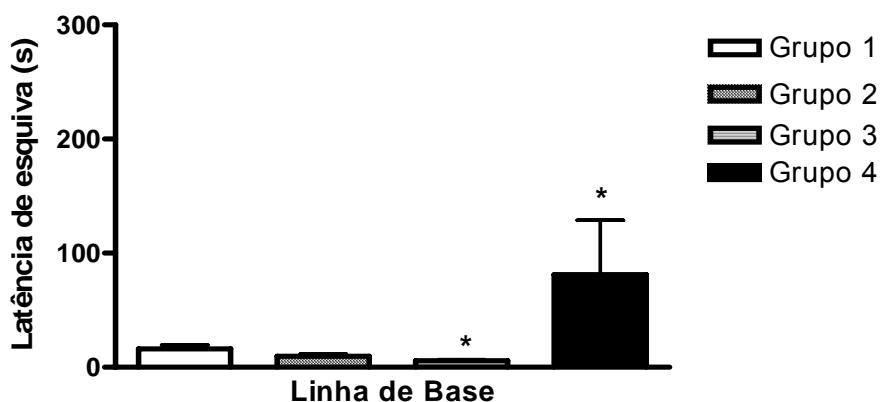
Para a latência de esquiva, uma análise global das médias totais ( $M_{base} = 29,96$ ;  $M_{E1} = 103,52$ ;  $M_{E2} = 156,75$  e  $M_{E3} = 75,06$ ) nas quatro tentativas (Linha de base, esquiva 1, esquiva 2 e esquiva 3) foi feita por meio do teste de Friedman para  $K \geq 3$  medidas repetidas, e a diferença foi altamente significativa:  $\chi^2 (3, N = 29) = 17,43$ ,  $p < 0,001$ . Pode-se observar que a latência de esquiva, ou seja, o tempo de permanência do rato no braço fechado desde a linha de base até a esquiva 2 aumentou significativamente e já na esquiva 3 (teste de memória) realizada 72 horas após a esquiva 2 diminuiu bruscamente em todos os grupos, com exceção do grupo controle ( $p < 0,005$ ), caracterizando um déficit no aprendizado.

### 3.2.1 Análise das diferenças entre os grupos em cada tentativa de esquiva

#### 3.3.1.1 Linha de Base

Na primeira exposição ao LTE para avaliação dos níveis basais do tempo de esquiva, os grupos 3 e 4 (intoxicados) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$  – ANOVA / Bonferroni) em relação ao grupo 1 (controle). A média da latência de esquiva do grupo 4 foi de 81,12 segundos, enquanto que dos grupos 2 e 3 foi 16,00 e 5,71 segundos, respectivamente. Contudo, o grupo 3 apresentou pior

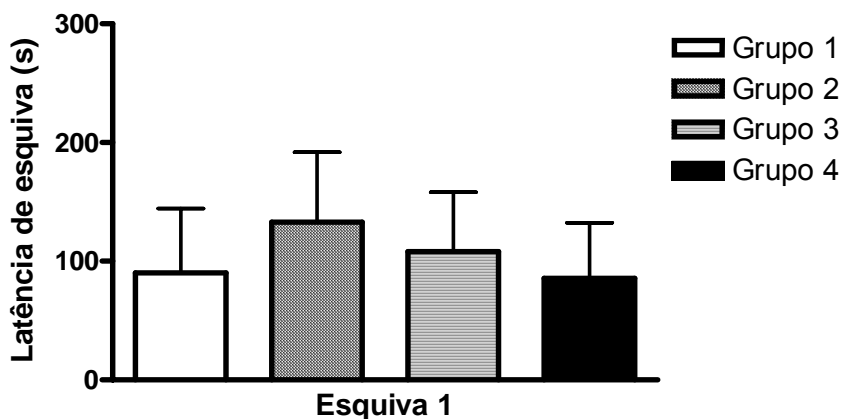
desempenho em relação grupo controle, pois apresentou redução no tempo de permanência no braço fechado (figura 8).



**Figura 8.** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na linha de base no teste do LTE. A latência de linha de base no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA / Bonferroni). N= 07 animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e N= 08 animais para o grupo 4 (intoxicado). \*  $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo 1 (controle).

### 3.2.1.2 Esquiwa 1

Após 30 segundos do teste de linha de base, os animais foram novamente submetidos ao braço fechado do LTE para avaliação do tempo da esquiwa 1, conforme figura 9. Observou-se nesta etapa do teste que todos os grupos elevaram a latência no braço fechado, no entanto não apresentaram diferenças significativas no tempo de esquiwa.

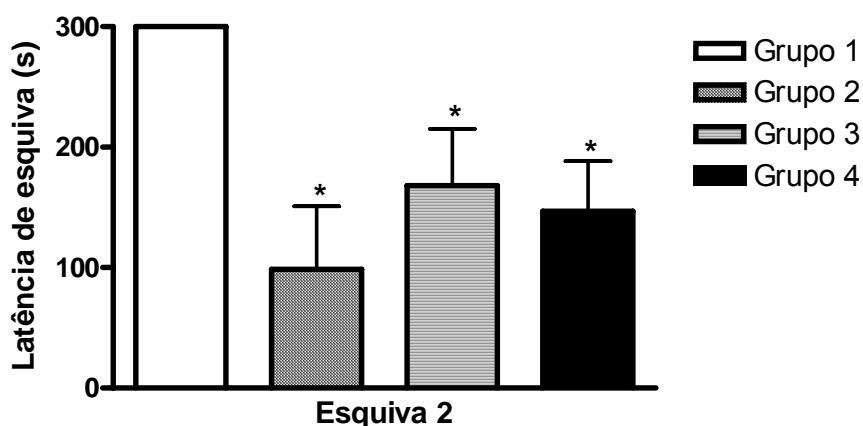


**Figura 9.** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na esquiwa 1 no teste do LTE. A latência de esquiwa 1 no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA). N= 07 animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e N= 08 animais para o grupo 4 (intoxicado).



### 3.2.1.3 Esquiva 2

Na terceira exposição (esquiva 2), após 30 segundos da obtenção do tempo de esquiva 1, a ANOVA revelou que todos os grupos aumentaram o tempo de permanência no braço fechado. Usando o teste *post hoc* de Bonferroni para averiguar tal diferença, observou-se diferenças significativas entre o grupo controle em relação aos grupos intoxicados ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com citrato de alumínio não permaneceram por muito tempo no braço fechado do LTE. A média total do grupo 1 (controle) foi de 300,00 segundos, enquanto que as médias dos grupos 2, 3 e 4 (intoxicados) foram bem baixas 98,57, 168,00 e 146,87 segundos, respectivamente (Figura 10).

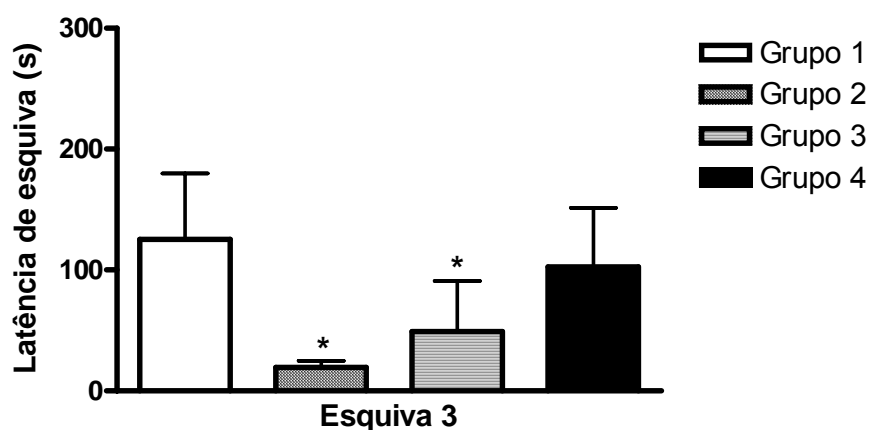


**Figura 10.** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) no teste do LTE. A latência de esquiva 2 no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA / Bonferroni). N= 07 animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e N= 08 animais para o grupo 4 (intoxicado). \*  $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo 1 (controle).

### 3.2.1.4 Esquiva 3 (Teste de Memória)

Na quarta exposição (esquiva 3), considerada como teste de memória, realizada 72 horas após a obtenção de esquiva 2, ANOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle. Observa-se

também que em relação à esquiua 2 todos os grupos, com exceção do grupo controle, apresentaram uma queda brusca no tempo de permanência no braço fechado do labirinto, sugerindo um déficits no aprendizado (Figura 11).

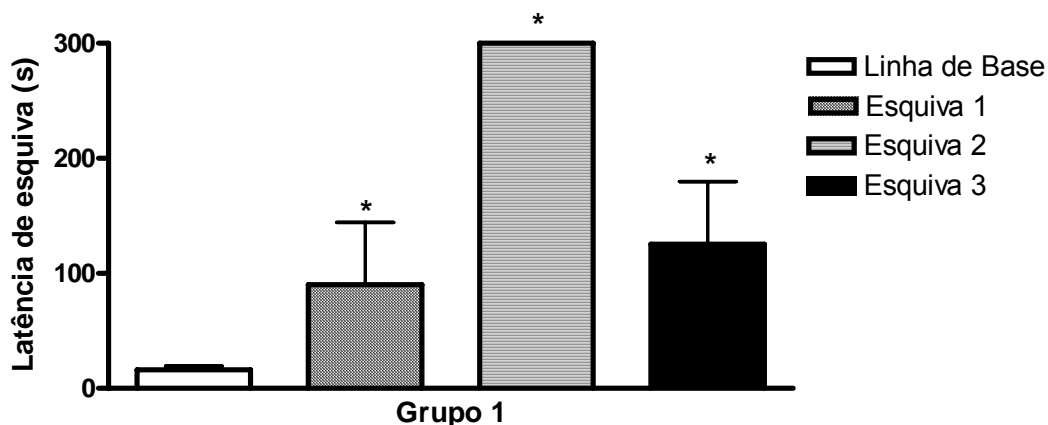


**Figura 11.** Efeitos comportamentais dos grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4 (intoxicados com citrato de Al) na esquiua 3 no teste do LTE. A latência de esquiua 3 no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA de um critério). N= 07 animais para os grupos 1 (controle), 2 e 3 (intoxicados) e N= 08 animais para o grupo 4 (intoxicado). \*  $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo 1 (controle).

### 3.2.2 Análise comparativa entre todas as tentativas de esquiua de cada grupo

#### 3.2.2.1 Grupo 1 (controle)

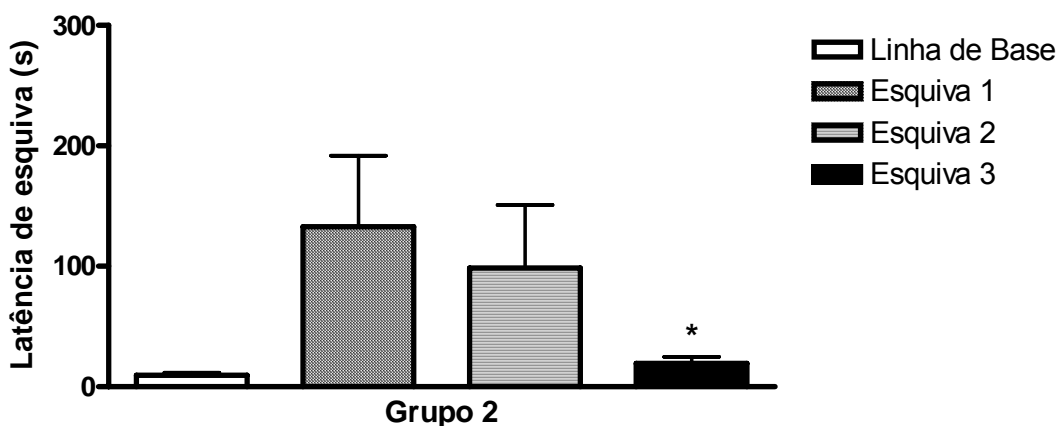
Com já esperado o grupo controle apresentou um aumento significativo nas tentativas de esquivas 1, 2 e 3 em relação a linha de base ( $M_{base} = 16,00$ ;  $M_{E1} = 90,00$ ;  $M_{E2} = 215,00$  e  $M_{E3} = 125,42$   $p < 0,05$ ), sugerindo a retenção do aprendizado da tarefa (Figura 12).



**Figura 12.** Gráfico comparativo das tentativas de esquiva no braço fechado do LTE do Grupo 1. N= 07 animais. A latência de esquiva no braço fechado está expressa como média ± EPM (ANOVA / Bonferroni). \*P< 0.05 (LB versus Esquiva 1, 2 e 3).

### 3.2.2.2 Grupo 2

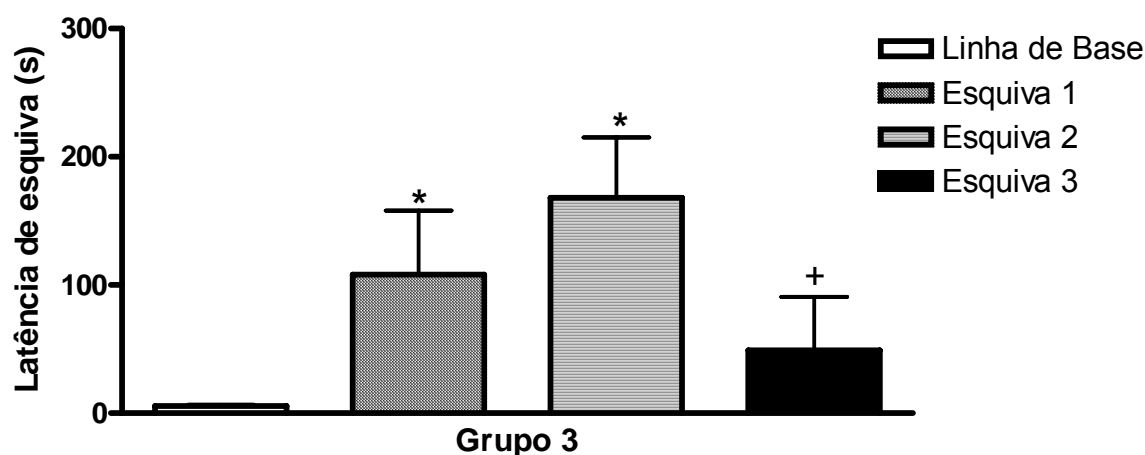
No grupo 2 (intoxicado) houve uma diferença estatisticamente significativa na esquiva 3 em relação a esquiva 1 ( $p < 0,05$  – ANOVA), podemos observar através das médias de cada tentativa, que este grupo teve o tempo de permanência maior no braço fechado apenas na esquiva 1 ( $M_{E1} = 132,85$ ) (Figura 13), enquanto que nas esquivas 2 e 3 houve uma brusca diminuição ( $M_{E2} = 98,57$  e  $M_{E3} = 19,28$ ), caracterizando um déficit de memória.



**Figura 13.** Gráfico comparativo das tentativas de esquiva no braço fechado do LTE do Grupo 2. N= 07 animais. A latência de esquiva no braço fechado está expressa como média ± EPM (ANOVA). \*P< 0.05 em relação à esquiva 1.

### 3.2.2.3 Grupo 3

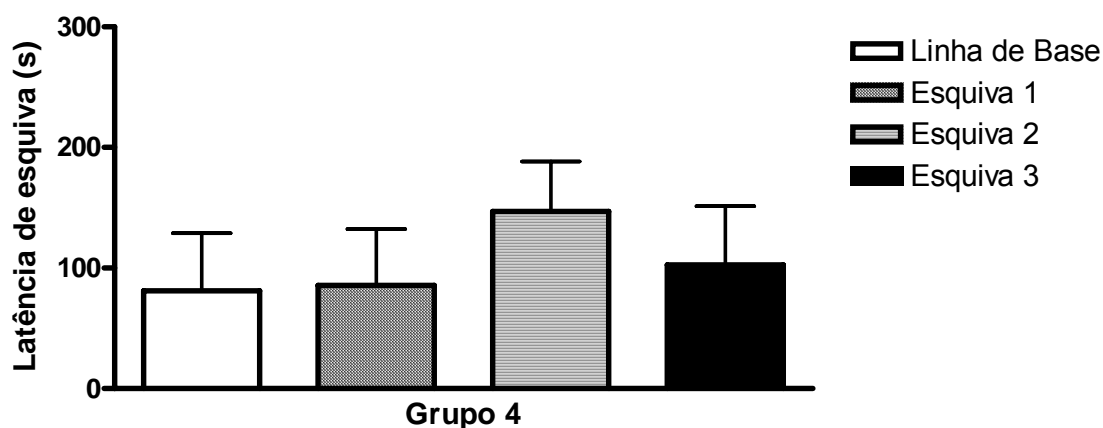
A análise deste grupo intoxicado demonstrou que houve um aumento na latência no braço fechado nas esquiva 1 e 2, entretanto na esquiva 3 houve uma diminuição em relação as tentativas anteriores realizadas 72 horas antes da esquiva 3 ( $p < 0,05$  – ANOVA / Bonferroni). Esse resultado aponta um prejuízo no aprendizado que pode estar associado à contaminação com alumínio (Figura 14).



**Figura 14.** Gráfico comparativo das tentativas de esquiva no braço fechado do LTE do Grupo 3. N= 07 animais para os grupos 3 (intoxicado). A latência de esquiva no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA / Bonferroni). \* $p < 0,05$  (LB versus esquiva 1 e 2) e  $^+ P < 0,05$  (Esquiva 3 versus LB e Esquivas 2 e 3).

### 3.2.2.4 Grupo 4

Este grupo não apresentou diferenças significativas entre as tentativas de esquiva, pois o tempo de permanência no braço fechado do LTE foram bem semelhante ( $p > 0,05$  – ANOVA). Entretanto o que observa neste grupo é que houve um aumento da latência nas primeiras tentativas de esquiva, com exceção da esquiva 3, pois o grupo não conseguiu elevar o seu tempo de permanência no braço fechado em relação a terceira tentativa de esquiva realizada 72 horas depois da esquiva 2 (Figura 15).



**Figura 15.** Gráfico comparativo das tentativas de esquiva no braço fechado do LTE do Grupo 4. N= 08 animais. A latência de esquiva no braço fechado está expressa como média  $\pm$  EPM (ANOVA).

### 3.2.3 Análise das latências de fuga dos grupos em cada tentativa do LTE

Para a latência de fuga a partir do braço aberto do LTE, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para verificar as diferenças amostrais entre os grupos, o qual não revelou nenhuma diferença significativa entre os grupos, conforme mostra a tabela 3.

A latência de fuga dos grupos intoxicados em relação o grupo controle foram bem semelhantes, caracterizando que a resposta de fuga representada pelo medo inato não foi comprometida pela intoxicação.

**Tabela 3.** Médias dos grupos intoxicados por citrato de Al no Teste do LTE para latência de fuga.

GRUPO	N	Fuga 1		Fuga 2	
		M	DP	M	DP
1	7	26,57	23,04	50,42	110,27
2	7	56,42	107,76	11,14	10,44
3	7	16,00	7,39	12,71	8,15
4	8	47,12	102,44	54,75	101,67
<b>TOTAL</b>	29	36,89	74,15	33,03	75,24

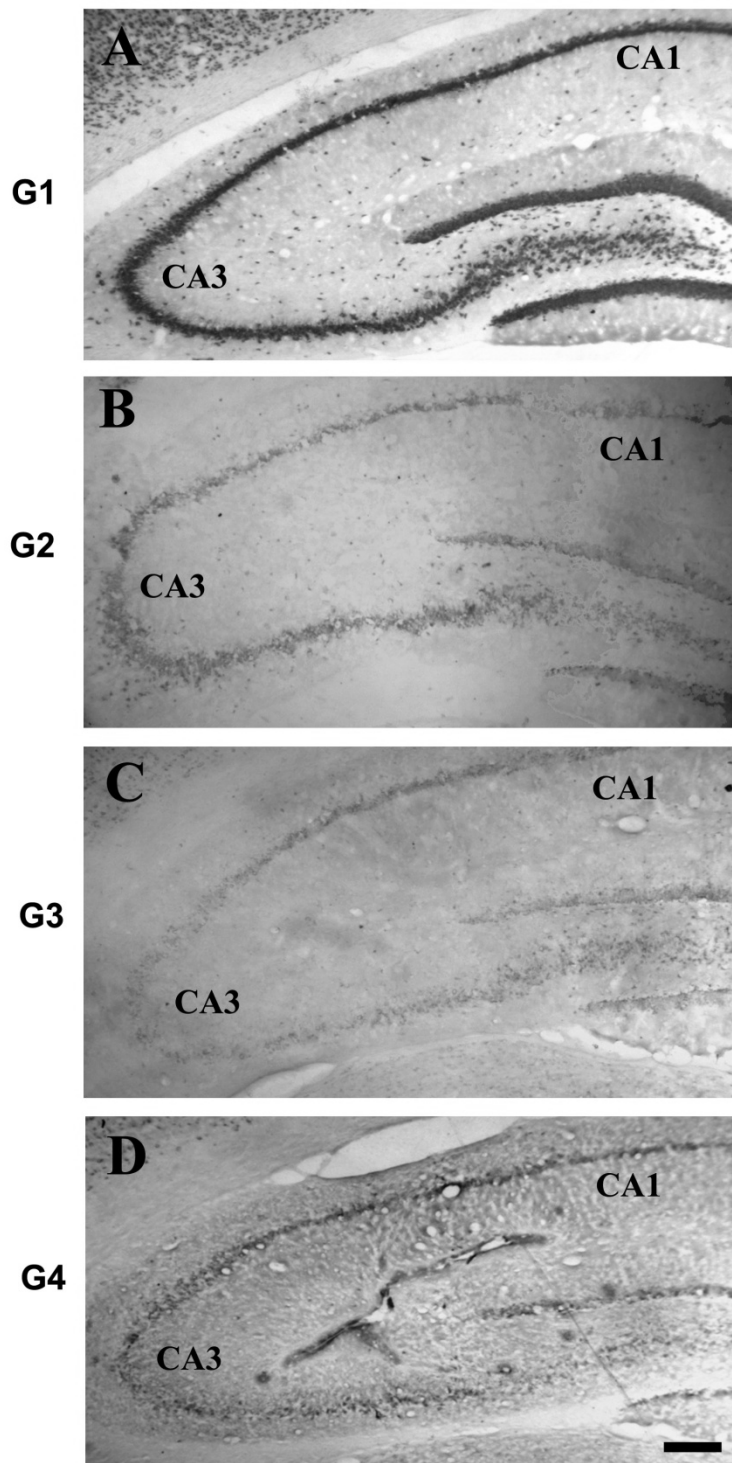
\* N= número de animais, M= média e DP = desvio padrão

### 3.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO HIPOCAMPO APÓS ADMINISTRAÇÃO COM CITRATO DE ALUMÍNIO EM RATOS

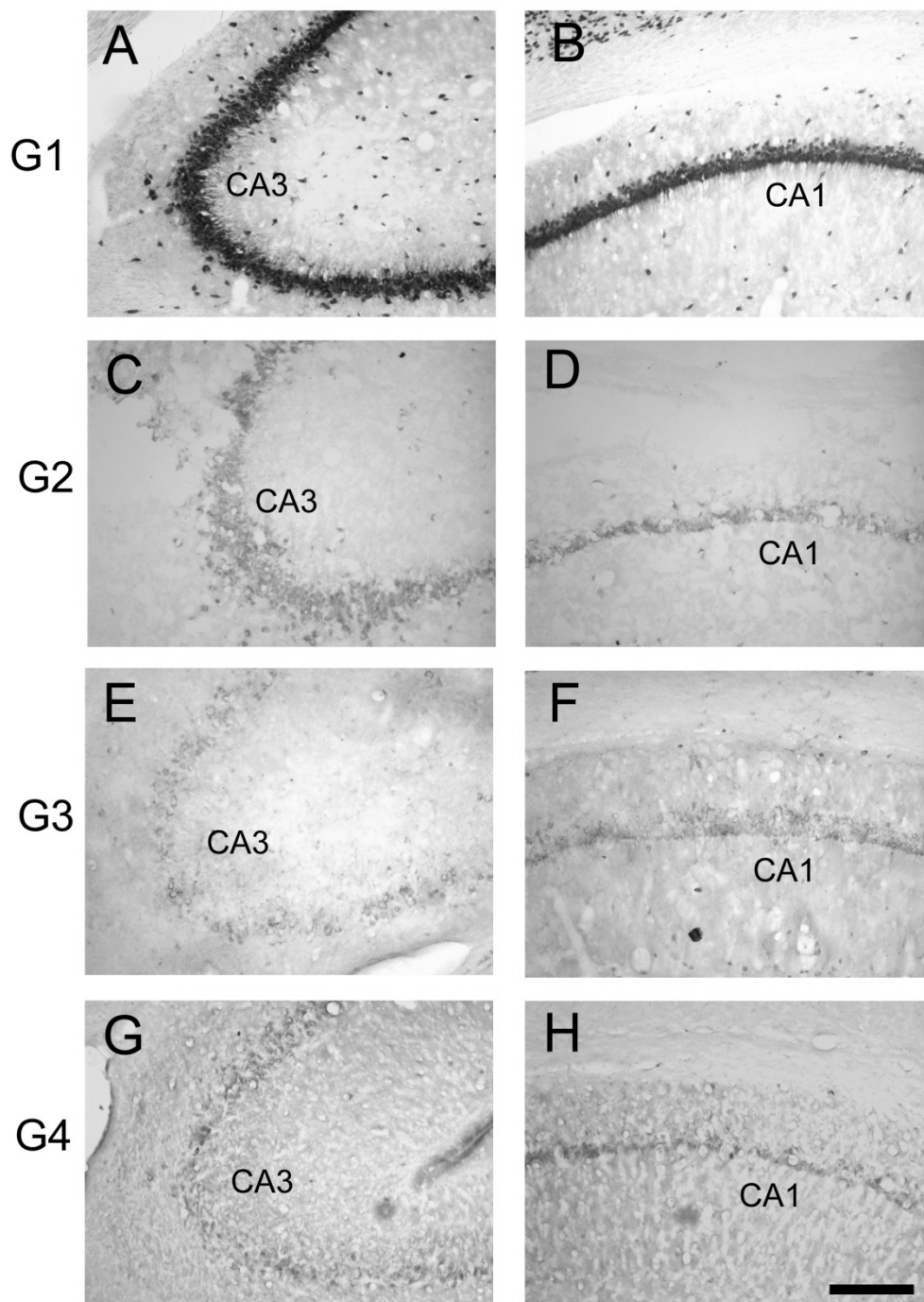
#### 3.3.1 Preservação Neuronal

Para avaliarmos os efeitos da administração de citrato de alumínio no SNC, mais especificamente nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, sobre a preservação neuronal, realizamos imunohistoquímica para NeuN, um marcador específico de neurônios, em secções de todos os grupos experimentais (Figura 16).

A administração de citrato de alumínio induziu conspícua perda neuronal nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo nos grupos intoxicados (G2, G3 e G4) em relação ao grupo controle (G1), o que originou clara desorganização celular nestas camadas hipocampais (Figura 16 e 17).



**Figura 16.** Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre preservação de pericários neuronais nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo reveladas pela imunohistoquímica anti-NeuN. Animais controle (G1) e animais intoxicados (G2, G3 e G4). Notar a desorganização das regiões CA3 e CA1 nos grupos de animais intoxicados pelo alumínio (B-D). No grupo controle, estas regiões hipocâmpais apresentam um padrão morfológico normal (A). Escala de 300  $\mu\text{m}$ .

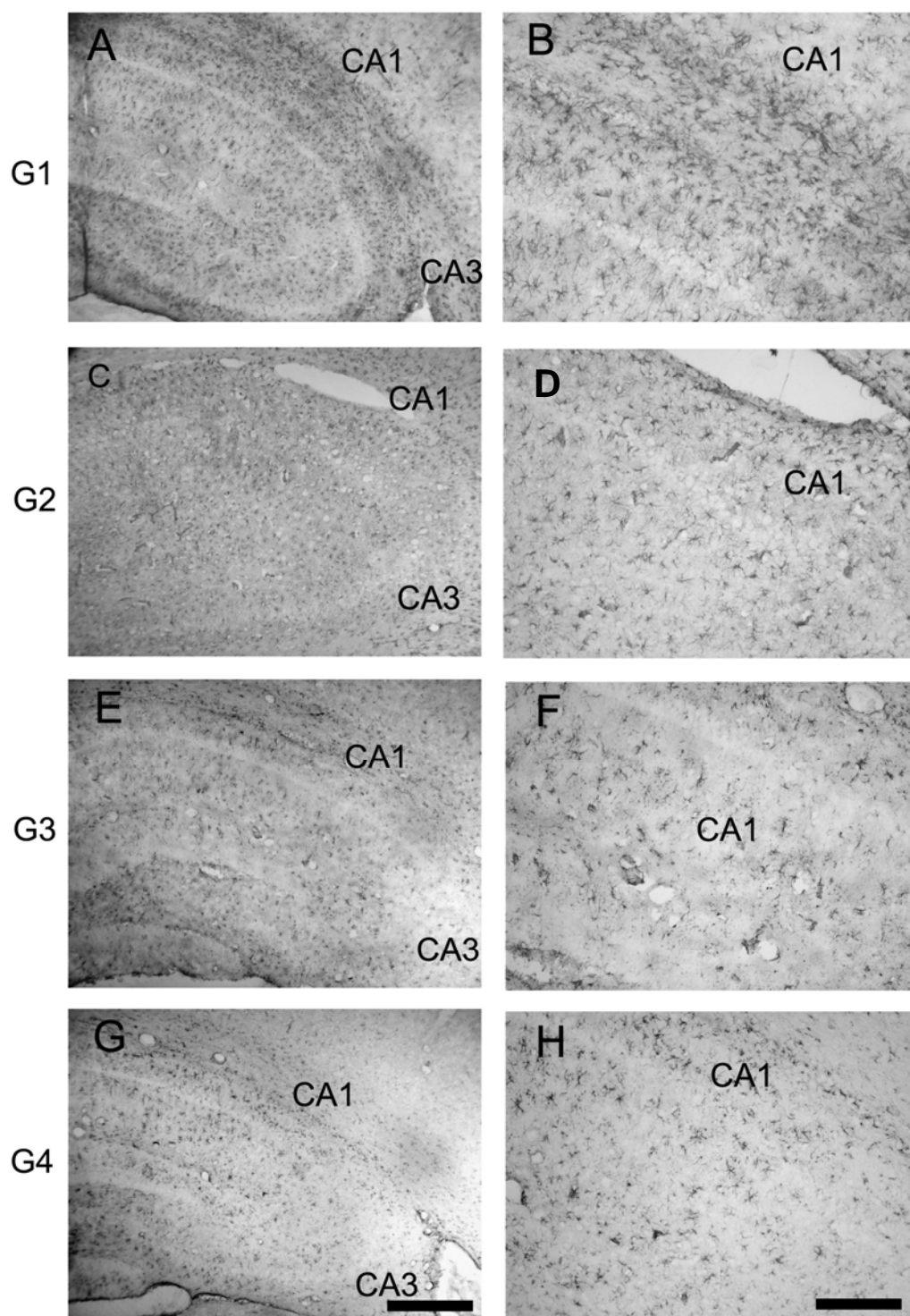


**Figura 17.** Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre preservação de pericários neuronais nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo reveladas pela imunistoquímica anti-NeuN. Animais controle (G1) e animais intoxicados (G2, G3 e G4). No quadro acima, pode-se observar uma redução no número de células das regiões CA1 e CA3 e uma desorganização na citoarquitetonia nos grupos de animais intoxicados pelo alumínio (C-G). No grupo controle, estas regiões hipocâmpais apresentam um padrão morfológico normal (A e B). Escala de 300  $\mu$ m.



### **3.3.2 Ativação Astrocitária**

Para investigarmos os efeitos da administração de citrato de alumínio sobre os padrões de ativação de astrócitos, utilizamos a imunoistoquímica para GFAP, um marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004). A ativação de astrócitos foi observada nas margens dos ventrículos laterais e hipocampo dos animais controle e intoxicados com citrato de alumínio. No grupo controle, os astrócitos apresentaram-se bem reativos no hipocampo, enquanto que nos grupos intoxicados houve uma diminuição progressiva da reatividade astrocítica (Figura 18). Esta diminuição de reatividade foi máxima no grupo com tempo de sobrevivência mais tardio (grupo 4).



**Figura 18.** Efeitos da intoxicação com citrato de alumínio sobre a ativação de astrócitos nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo reveladas pela imunohistoquímica anti-GFAP. Animais controle (A-B) e animais intoxicados (C-H). Notar a diminuição progressiva no padrão de ativação e número de astrócitos nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo nos grupos de animais intoxicados com Citrato de alumínio (C-G). O efeito é mais marcante nos tempos de sobrevivência tardios (grupos G3 e G4). No grupo controle (G1), estas regiões hipocâmpais apresentam um padrão morfológico normal (A-B). Escala de 300  $\mu$ m.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

O papel toxicológico do alumínio ainda não foi totalmente esclarecido, embora existam diversos trabalhos na literatura que utilizaram diferentes métodos de intoxicação, dose e compostos de alumínio para estudar os efeitos deste metal nas mais diferentes formas de vida (KISS, 1995; ZATTA et al., 1998; RODON-BARRAGÁN et al., 2007). No entanto, não existe consenso sobre os parâmetros mais adequados que devem ser utilizados nos estudos com intoxicação experimental pelo alumínio (MARTIN, 1994; TAPPARO et al., 1995; STRYUS-PONSAR et al., 1997).

Um dos problemas observados nos modelos experimentais de intoxicação pelo alumínio é a absorção inadequada do composto utilizado. Alguns estudos sugerem que a absorção deste metal é maior quando administrado em forma de complexo, em especial o citrato de alumínio, pois torna o alumínio solúvel e facilmente consegue atravessar as membranas, atuando como um veículo que facilita a absorção do metal no organismo (MARTIN, 1994). A escolha do composto citrato de alumínio como veículo de intoxicação se baseou nos estudos que relatam que é na forma de tal complexo que o alumínio ultrapassa a barreira gastrointestinal para o sangue (MARTIN, 1994). Deste modo, acredita-se que o protocolo utilizado neste estudo propiciou melhor penetração do alumínio através da barreira hematoencefálica, com resultados conspícuos no SNC.

## 4.2 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS

Neste estudo, primeiramente avaliamos os possíveis efeitos do citrato de alumínio nas atividades locomotoras e exploratórias em ratos Wistar através do teste do campo aberto. O teste do campo aberto foi utilizado neste estudo com o objetivo de verificar se a intoxicação com alumínio não afetaria as atividades locomotoras e exploratórias dos animais, cujo prejuízo poderia mascarar ou impedir a avaliação de possíveis efeitos tóxicos do citrato do alumínio nos processos cognitivos que estávamos investigando.

Os resultados do campo aberto sugerem que o citrato de alumínio não prejudicou os episódios de levantamento, autolimpeza e tempo de congelamento, o que é corroborado por estudos prévios com nitrato de alumínio que sugerem que o mesmo não interfere nas atividades locomotoras de ratos submetidos ao teste do campo aberto (DOMINGOS et al., 1996).

No entanto, houve diferença significativa no grupo intoxicado com o menor tempo de sobrevida (grupo 2) para o parâmetro distância percorrida. Este grupo de animais apresentou um aumento na distância percorrida no campo aberto. Resultados similares foram relatados em estudos recentes utilizando outros compostos de alumínio (RIBES et al., 2008; SETHI et al., 2008).

Ribes et al.(2008) revelaram que a administração de lactato de alumínio causou diferenças significativas na distância percorrida em camundongos transgênicos. Os camundongos intoxicados com lactato de alumínio apresentaram um aumento na distância percorrida no campo aberto em relação ao grupo controle. Em um outro estudo, Sethi et al. (2008) demonstraram que o alumínio causou um

efeito de hiper excitabilidade, mensurado por ensaios eletrofisiológicos e apoiados pelo teste do campo aberto em ratos contaminados com cloreto de alumínio por via oral. Segundo esses autores, os resultados obtidos podem estar relacionados a parâmetros de estresse ou ansiedade causados pela intoxicação.

Quando os animais foram submetidos ao modelo do labirinto em T elevado, observou-se que nas primeiras três tentativas de esquiva os animais dos grupos intoxicados com tempo de sobrevivência menor e intermediário (grupos 2 e 3) não apresentaram a latência no braço fechado do labirinto igual ou próxima do grupo controle. Isto pode significar que a administração de citrato de alumínio dificultou o aprendizado das respostas de esquiva. Resultados similares foram verificados por estudos prévios, os quais revelaram que a administração periférica (via intraperitoneal e via oral) de cloreto e sulfato de alumínio causou déficits de aprendizagem e memória (STRYUS-PONSAR et al., 1997; KUMAR, 1998; SETHI et al., 2008). Estes resultados sugerem que a intoxicação com citrato de alumínio pode interferir nos mecanismos de aprendizado (aquisição) e memória.

Quando avaliado o tempo de permanência do animal no braço fechado, nas três primeiras tentativas de esquiva, observou-se que na primeira tentativa, considerada a linha de base, o grupo intoxicado com tempo de sobrevivência maior (grupo 4) teve um desempenho diferente em relação aos demais grupos, no sentido de ter permanecido por mais tempo no braço fechado do labirinto. É importante esclarecer que estudos com drogas ansiolíticas, utilizando este mesmo modelo, demonstram que a primeira latência no braço fechado do Labirinto em T elevado é sempre menor que as subseqüentes tentativas, devido à primeira exposição ser novidade para o animal, o que o leva a uma maior exploração nos braços abertos, quando comparado com o braço fechado (VIANA et al., 1994; GRAEFF et al., 1998).

Portanto, a maior permanência dos animais intoxicados no braço fechado do labirinto pode ser uma consequência patológica da intoxicação experimental por citrato de alumínio

Ao ser realizada a segunda tentativa (esquiva1), foi observado que o comportamento de aversão aos braços abertos foi alterado em todos os grupos, pois todos conseguiram elevar o seu tempo de permanência no braço fechado do labirinto. Esse fato está de acordo com a observação feita por Graeff et al.(1998), de que as tentativas posteriores à primeira sempre se observa esse aumento de tempo de permanência no braço fechado do labirinto.

Quando avaliada a terceira exposição ao braço fechado do LTE (esquiva 2), observa-se que todos os grupos intoxicados diminuíram o tempo de permanência no braço fechado, em relação ao grupo controle. Esse dado sugere um efeito tóxico do citrato de alumínio na chamada memória de curta duração.

Com relação à quarta tentativa (esquiva 3), realizada 72 horas após a esquiva 2, avaliou-se a chamada memória de longa duração. Observou-se que os animais dos grupos intoxicados apresentaram déficits de memória, caracterizado pelos valores reduzidos do tempo de permanência no braço fechado em relação ao grupo controle. Izquierdo et al.(1997) e Squire e Kandel (2003) afirmam que a consolidação da memória de longa duração ocorre em apenas algumas horas, através de modificações bioquímicas do processo de consolidação, podendo ser recuperada em dias ou até mesmo meses após o estímulo aversivo. Uma vez que os grupos intoxicados apresentaram dificuldade no aprendizado de esquiva, é possível que a intoxicação com alumínio tenha causado prejuízo no processo de

consolidação do aprendizado das respostas de esquiva, ou seja, um déficit na memória de longa duração.

Os resultados encontrados neste trabalho são corroborados por outros estudos que utilizaram modelos de intoxicação experimental por metais pesados, incluindo alumínio (ROLOFF et al., 2002; KANECO et al., 2006) e metilmercúrio, além de outros neurotóxicos, como o etanol (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; MAIA et al., 2009). Nos estudos com metilmercúrio e etanol, os animais intoxicados apresentaram prejuízo no aprendizado, caracterizado pela diminuição no tempo de permanência no braço fechado em relação ao grupo controle (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; MAIA et al., 2009). Além disso, os animais intoxicados apresentaram comprometimento nos processos da chamada memória de curta duração, os quais ocorrem nas primeiras tentativas de esquiva (com um intervalo de 30 segundos entre elas), bem como na memória de longa duração, observada nas tentativas realizadas 24 horas depois. Em animais intoxicados com alumínio em diferentes composições, houve déficits de memória quando submetidos ao teste de memória espacial do Labirinto Aquático de Morris (ROLOFF et al., 2002; KANECO et al., 2006).

#### 4.3 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA HIPOCAMPAL

Considerando que protocolos experimentais utilizando diferentes compostos do alumínio, têm sido motivo de controvérsias na literatura, seja com relação à doses ou rotas de administração, na tentativa de dar maior consistência aos estudos comportamentais, decidiu-se avançar para uma avaliação a nível

histopatológico de uma estrutura anatômica considerada fundamental no processo de consolidação do aprendizado, o hipocampo. Para tal, utilizamos a técnica de imunistoquímica para a marcação de neurônios e astrócitos nas áreas CA1 e CA3 dessa estrutura.

Os resultados dessa técnica revelaram que os animais intoxicados com citrato de alumínio apresentaram intensa perda neuronal e desorganização das camadas CA1 e CA3 do hipocampo. As alterações morfológicas observadas nessas áreas podem estar influenciando o déficit de memória observado neste estudo, uma vez que as áreas CA1 e CA3 do hipocampo são reconhecidamente responsáveis pelos processos de consolidação da memória. Nossos resultados sugerem que as alterações morfológicas observadas podem ter prejudicado a capacidade de aprendizagem dos ratos intoxicados com citrato de alumínio. Este dado está de acordo com estudos prévios que mostram alterações morfológicas e perda neuronal em ratos tanto em modelos comportamentais quanto em trabalhos *in vitro* (LÉVESQUE et al., 2000; MESHITSUKA e AREMO, 2007; SETHI et al., 2008).

EI-Rahman (2003) também relatou em seus estudos com sulfato de alumínio, administrado durante 35 dias que esse metal causa desorganização dos neurônios piramidais, perda neuronal e degeneração neurofibrilar no hipocampo, que, interessante, são semelhantes aos emaranhados neurofibrilares observado na doença de Alzheimer. Além disso, Sethi et al. (2008) relataram em seus estudos que a administração do alumínio afetou as áreas CA 1 e CA3 do hipocampo causando, também, enorme perda neuronal e desorganização do neurônio piramidais.

Outros trabalhos relatam que além do hipocampo, outras áreas do SNC podem ser afetadas pelo acúmulo de alumínio, entre as quais neocórtex, bulbo



olfatório, hipotálamo, cerebelo e estriado (XU et al., 1992; STRYUS-PONSAR et al., 1997; KUMAR, 1998).

Além de perda neuronal, os resultados mostraram uma diminuição progressiva da ativação astrocítica nos grupos de animais intoxicados com citrato de alumínio. Esta diminuição de reatividade foi máxima no tempo de sobrevivência mais tardio (grupo 4). A alteração na ativação astrocítica é um fenômeno comumente observado em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo lesão cerebral, lesão na medula espinhal (GOMES-LEAL et al., 2004) e a doença de Alzheimer (MCGEER & MCGEER, 1998; MEDA et al., 2001).

É interessante ressaltar o fato de que, segundo a literatura a ativação de astrócitos pode ocorrer tanto em lesões severas como em lesões leves no SNC. Acredita-se que em lesões leves a ativação de astrócitos pode contribuir para fenômenos neuroplásticos induzindo neuroproteção, mas em lesões severas a ativação de astrócitos pode contribuir para a liberação excessiva de glutamato induzindo lesão secundária por excitotoxicidade (PANICKAR & NOREMBERG, 2005).

Estudos *in vitro*, usando cultura de neurônios e astrócitos, sugerem que a intoxicação por citrato e cloreto de alumínio induz perda neuronal (SASS et al., 1993; LÉVESQUE et al., 2000; AREMU e MESHITSUKA, 2006; MESHITSUKA e AREMO, 2007). Nestes estudos, os autores sugerem que a morte neuronal ocorre pelo fato de que os astrócitos, ao serem contaminados com o metal, perdem ou diminuem sua habilidade em proteger os neurônios da excitotoxicidade do glutamato.

Em outro estudo, Suarez-Fernández et al. (1999) encontraram acúmulo de alumínio em neurônios e astrócitos após exposições de 8 a 12 dias e de 15 a 18 dias. Nas exposições de 8 a 12 dias, esse metal causou fortes mudanças na

morfologia dos astrócitos, bem como encolhimento dos corpos celulares. Já nas exposições de 15 a 18 dias, foi observada uma redução de 50% na viabilidade dos astrócitos.

No presente estudo, a diminuição da reatividade astrocítica pode indicar comprometimento patológico desta população de células gliais. É possível que este fenômeno possa contribuir para a perda neuronal observada no hipocampo, o que está de acordo com a hipótese anteriormente mencionada, qual seja, os astrócitos possuem uma função neuroprotetora que é perdida durante a intoxicação por citrato de alumínio.

Esse conjunto de resultados reforça a hipótese mais consistente acerca desses efeitos, conhecida como a *hipótese do astrócito* (GUO-ROSS et al., 1999; SUAREZ FERNANDES et al., 2001; AREMU e MESHITSUKA, 2006; MESHITSUKA e AREMO, 2007).

É importante mencionar, que observou-se uma intensa ativação de astrócitos tanto nas margens dos ventrículos laterais e terceiro ventrículo como no hipocampo de animais não intoxicados. Sabe-se que existem populações de células tronco neurais na parede das regiões ventriculares, o que contribui para a neurogênese no cérebro adulto (KRIEGSTEIN e ALVAREZ-BUYLLA, 2009). Acredita-se que esta neurogênese endógena pode contribuir para mecanismos de aprendizado e memória no hipocampo (BALU e LUCKI, 2009). A intoxicação por alumínio induziu uma diminuição geral no padrão de reatividade astrocitária, inclusive nas áreas neurogênicas mencionadas. É possível que a intoxicação experimental com citrato de alumínio prejudique a neurogênese no cérebro adulto, incluindo a existente nas regiões hipocâmpais. Este fato pode contribuir para os déficits de aprendizado e memória observados nos animais intoxicados, no entanto,

esta hipótese deve ser investigada em estudos futuros, nos quais marcadores específicos de neurogênese hipocampal sejam utilizados nos animais intoxicados e controle.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, ratos adultos intoxicados experimentalmente com citrato de alumínio apresentaram déficits de aprendizado e memória, nos grupos 2 e 3, ou seja, aqueles animais que foram intoxicados com 320 mg/kg com o citrato de alumínio e testados 1 dia e 10 dias, respectivamente, depois da intoxicação nos modelos comportamentais. Já com relação a avaliação histopatológica em células hipocâmpais foram verificadas perdas neuronais e astrocitose nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Estes resultados sugerem um efeito patológico do acúmulo de alumínio sobre os processos mnemônicos.

A relevância desses resultados preliminares levam à necessidade de estudos complementares que possam aprofundar a análise sobre o papel do alumínio em processos cognitivos, como a memória, tanto ao nível da investigação de seus aspectos funcionais como das possíveis implicações morfológicas em estruturas específicas do SNC. Considerando os inúmeros trabalhos relatados na literatura que apontam para a participação do hipocampo nos mecanismos do aprendizado e da memória, bem como do papel neurotóxico do alumínio, tanto nesses processos cognitivos quanto nos padrões celulares dessa estrutura é necessário se avançar nos estudos com a utilização de outros modelos animais, como o labirinto radial, o qual analisa parâmetros relacionados a memória espacial, a qual parece envolver diretamente o hipocampo em seus diferentes núcleos.

Para avançarmos nos aspectos morfológicos, os quais dão relevante suporte à análise comportamental, é fundamental levarmos adiante a hipótese de que o alumínio poderia prejudicar a neurogênese, processo esse que parece cumprir

papel relevante nos mecanismos da memória levados a cabo pelo hipocampo. Uma vez que este trabalho demonstrou uma intensa ativação de astrócitos, tanto nas margens dos ventrículos laterais quanto no terceiro ventrículo, os quais possuem reservas de células tronco neurais envolvidas no processo de neurogênese, a utilização de marcadores específicos para neurogênese hipocampal deve ser uma dos primeiros passos a ser seguido no futuro.

Outro relevante aspecto do debate acerca do papel do alumínio nos processos mnemônicos, particularmente aqueles de responsabilidade do hipocampo, que não foi contemplado neste trabalho é o neuroquímico. Todavia existem diversos trabalhos que mostram o prejuízo causado pelo alumínio em sistemas de neurotransmissores, particularmente a Ach, interessadamente nas regiões hipocampais. O que tem sido observado é que esse quadro é comumente encontrado em pacientes intoxicados por alumínio e que desenvolvem sintomas semelhantes ao mal de Alzheimer, o que levou à chamada hipótese colinérgica dessa patologia.

Assim, torna-se necessário a utilização de métodos neuroquímicos que possam medir os neurotransmissores liberados nas regiões hipocampais de animais intoxicados e submetidos aos modelos de memória. Um método adequado à essa investigação é a microdiálise com a leitura por eletroforese, técnica essa largamente utilizada para dosagem de neurotransmissores clássicos. Um outro método que certamente contribuirá para uma melhor caracterização do papel do alumínio em nossos estudos seria o cromatográfico, o qual garantiria a localização, bem mais precisa, do alumínio nas diversas regiões do SNC.

## REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for Aluminum (Draft for Public Comment)**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2006.

AGUIAR, M. S. S. **Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos**. Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1995.

AHLEMEYER, B., Kolker, S., Zhu, Y., Hoffmann, G. F., KRIEGLSTEIN, J. Cytosine arabinofuranoside-induced activation of astrocytes increases the release of soluble factors. **Neurochem. Int.** v. 42, p. 567-581, 2003.

ALFREY, A. C. Aluminum. In MERTZ, W. (Ed.). Trace elements in human and animal nutrition. 5ed. **San Diego: academia Press** v.2, p. 225-244, 1986.

AREMU, D. A., MESHITSUKA, S. Some aspects of astroglial functions and aluminium implications for neurodegeneration. **Brain Res Rev.** v.52, p.193-200, 2006.

ARENDRT, T., BIGL, V., TENNSTEDT A., ARENDRT, A. Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v.14, p. 1-14, 1985.

AZEVEDO, F. A. CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

BALU, D. T., LUCKI, I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 33(3):232-52, 2009.

BARRETO, F.C. & ARAÚJO, S.M.H.A. Intoxicação Alumínica na DRC. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 30, p.18-22, 2008.

BASUN, H., FORSSELL, L. G., WETTERBERG, L., WINBLAD, B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal ageing and Alzheimer's Disease. **J. Neural Transm. [P-D-Sect]**, v. 4, p. 231-258, 1991.

BAST, C. B. Toxicity Summary for Aluminum. Oak Ridge: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, 1993. Disponível em: <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/aluminum.shtml>  
Acesso em: 20 agos. 2009.

BERTHON, G. **Chemical speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity**. Coordination Chemistry Reviews, v.149, p. 241-280, 2006.

BONDY, S. C., TRUONG, A. Potentiation of beta-folding of  $\beta$ -amyloid peptide 25-35 by aluminum salts. **Neuroscience Letters**, v. 267, p. 25-28, 1999.

BUSH, A. Metals and neuroscience. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 184-191, 2000.

CARDOSO, S. H. Memória Humana: O que é e como melhorá-la?. **Brain & Mind - Electronic Magazine on Neuroscience**. São Paulo, n. 1 - Março-Maio 1997. Disponível em: <http://www.cerebromente.org.br/n01/memo/memoria.htm>. Acesso em 10 fev. 2008.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. **Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 yaers on**. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CHONG, Y.-H. & SUH, Y.-H. Aggregation of amyloid precursor proteins by aluminum in vitro. **Brain Research**, v. 670, p. 137-141, 1995.

CHORILLI. M., MICHELIN, D. C & SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 28, p.11-23, 2007.

CONDE, C., COSTA, V. & TOMAZ, C. Measuring Emocional Memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 63, p. 63-69, 1999.

CONDE, C., COSTA, V. & TOMAZ, C. Effects of emocional reactivity on inhibitory avoidance in the elevated T-maze. **Brazilian J Med Biol Res**, v. 33, p. 233-236, 2000.

CUNAT, L., LANHERS, M. C., JOUYEUX, M. & BURNEL, D. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents. **Biol. Trace. Res**, v. 76, p. 31-55, 2000.

DAVIS, MICHAEL. Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emocional response (CER) and the fear-potentiated strattle effect. **The Pharmac.**, v. 47, p. 147-165, 1990.

DELONCLE, R., GUILLAR, O., COUTOIS, P. & PIRIOU, A. Aluminum transfer as glutamate complex trough blood-brain barrier. **Biol. Trace Element.**, v. 25, p. 39-45, 1990.

DEVOTO, E. & YOKEL, R. A. The Biological Speciation and Toxicokinetics of Aluminum. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 940-951, 1994.

DOMINGO, J. L., LLORENS, J., SANCHEZ, D. J., GOMEZ, M., LLOBET, J. M., CORBELLÀ, J. Age-related effects of aluminum ingestion on brain aluminum accumulation and behavior in rats. **Life Sci**. 1996;58(17):1387-95.

DLUGASZEK, M., FIEJKA, M.A., GRACZYK, A., ALEKSANDROWICZ, J.C. & SLOWIKOWSKA, M. Effects of Various Aluminium Compounds Given Orally to Mice on Al Tissue Distribution and Tissue Concentrations of Essential Elements. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, p. 135–139, 2000.

EL-RAHMAN, S. S. Neuropathology of aluminum toxicity in rats (glutamate and GABA impairment). **Pharmacol Res**. 2003 Mar;47(3):189-94

EXLEY, C. **A molecular mechanism of aluminum-induced Alzheimer's disease?** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 76, p. 133-140, 1999.

FERREIRA, L. M.; FERREIRA L. R. K. **Experimental model: historic and conceptual revision**. Acta Cir Bras v. 18, 1-3, 2003

FUENTES, D.; MALLOY-DINIZ, L. F.; CAMARGO, C. H. P. COSENZA, R. M. et al. **Neuropsicologia: teoria e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2008



GARRUTO, R. M., SWYT, C., FIORI, C. E., YANAGIHARA, R., GAJDUSEK, D. C. Intraneuronal deposition of calcium and aluminium in amyotrophic lateral sclerosis of Guam (Letters to Editor). **The Lancet**, v. 14, p. 1353, 1995.

GOLUB, M. S., HAN, B., & KEEN, C. L. Aluminum uptake and effects on transferrin mediated iron uptake in primary cultures of rat neurons, astrocytes and oligodendrocytes. **Neurotoxicol**, v. 20, p. 961-970, 1999.

GOMES-LEAL, W., CORKILL, D. J., FREIRE, M. A., PICANCO-DINIZ, C. W., PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, p. 456-467, 2004.

GUO-ROSS, S. X., YANG, E. Y., WALSH, T. J., BONDY, S.C. Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment. **J. Neurochem**, v. 73, p. 1609-1614, 1999.

GRAEFF, F. G., VIANA, M. B. & TOMAZ, C. The elevated T maze, new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian J Med Biol Res**, v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F. G., NETTO, C. F., ZANFROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 237-246, 1998.

GRAEFF, F. G. **Bases Psicológicas In: Fundamentos de Psicologia**. Ed. Atheneu. São Paulo, 1999

GREGOR, J. E.; POWELL, H. K. J. Aluminium (III)-citrate complex a potentiometric and <sup>13</sup>C N.M.R. study. **Australian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 1851-1864, 1986.

HALL, C. S. Emotion behavior in the rat. I. Defaecation and uriantio as measures of individuals differences in emotionality. **Jornal of Comparative Psychology**, v. 18, 385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 29, p. 129-138, 1993.

HERMENEGILDO, C.; SÁEZ, R.; MINOIA, C.; MANZO, L.; FELIPO, V. Chronic exposure to aluminum impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in the rat in vivo. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 245-253, 1999.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, v. 68, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res**. 1999 Aug;103(1):1-11.

KAIZER, R. R. **Sistemas purinérgico e colinérgico e perfil oxidativo no encéfalo de roedores: influência do Alumínio e de diferentes dietas**. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

KANEKO, N., TAKADA, J., YASUI, H., SAKURAI, H. Memory deficit in mice administered aluminum-maltolate complex. **Biometals**. 2006 Feb;19(1):83-9.

KLATZO, I., WISNIEWSKI, H., STREICHER, E. Experimental production of neurofibrillary degeneration: light microscopic observations. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 24, p. 187-199, 1965.

KISS, T. Interaction of aluminum with biomolecules - any relevance to Alzheimer's disease? **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 21, p. 99-112, 1995.

KING, R. G. Do raised brain aluminium levels in Alzheimer's dementia contribute to cholinergic neuronal deficits? **Medical Hypotheses**, v. 14, p. 301-306, 1984.

KOENIG, M. L. & JOPE, R. S. Aluminum inhibits the fast phase of voltage-dependent calcium influx into synaptosomes. **J. Neurochem**, v. 49, p. 316-320, 1987.

KUMAR, S. Biphasic effect of aluminium on cholinergic enzyme of rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 248, p. 121-123, 1998.

KUMAR, S. Aluminium-induced biphasic effect. *Medical Hypotheses*, v. 52, p. 557-559, 1999.

KRIEGSTEIN, A., ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu Rev Neurosci.** v. 32, p.149-84, 2009.

LENT, Roberto. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

LEVESQUE, L., Mizzen, C.A., McLachlan, D.R., Fraser, P.E. Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. **Brain Research,** v. 877, p. 191-202, 2000.

LIBERAL, S. S. **Efeitos do Alumínio sobre os níveis cerebrais e circulantes de peptídeo atrial natriurético e nitrato em ratas castradas e em ratas submetidas a terapia hormonal substitutiva.** Dissertação de Mestrado (Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.

MAIA, C. S. F., LUCENA, G. M. R. S., CORRÊA, P. B. F., SERRA, R. B, MATOS, R. W. M., MENEZES, F. C, SANTOS, S. N, DE SOUSA, J. B, DA COSTA, E. T, FERREIRA, V. M. M. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. **Neurotoxicology** 2009; 30: 23-30.

MARTIN, R.B. The Chemistry of Aluminum as Related to Biology and Medicine. **Clinical Chemistry,** v. 32, p. 1797-1806, 1986.

MARTIN, R.B. Aluminum: A Neurotoxic Product of Acid Rain. **Accounts of Chemistry Research,** v27, p. 204-210, 1994.

MATOS, M. M. & TOMANARI, G. Y. **A análise do comportamento no laboratório didático.** São Paulo: Editora Manole, p 35-44, 2002.

MESHITSUKA & AREMO, <sup>13</sup>C heteronuclear NMR studies of the interaction of cultured neurons and astrocytes and aluminum blockade of the preferential release of citrate from astrocytes. **J. Biol. Inorg Chem** , p. 130-137, 2007.

MEDA, L., BARON, P., SCARLATO G (2001) Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Aβ and its associated proteins. **Neurobiol Aging** 22:885-893.

MCDERMOTT, J. R., IQBAL, K., WISNIEWSKI, H. M. Aluminium and Alzheimer's disease. **The Lancet,** v. 1, p. 710, 1977.

MCGEER, P. L., MCGEER, E. G. (1998) Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12:S1-6.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, v. 48, p. 254-260, 1955.

MOORE P. B., DAY J. P., TAYLOR G. A., FERRIER I. N., FIFIELD L. K. and EDWARDSON J. A. Absorption of <sup>26</sup>aluminum in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.** v. 11, p. 66–69, 2000.

MORRIS, R. Developments of a water – maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47 -60, 1984.

MULLEN, R.J.; BUCK, C.R.; SMITH AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, p. 201-211, 1992.

NAHAS, T. R. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: FeSBE, p.135-146, 1997.

NAHAS, T. R. **O teste do Campo Aberto**. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2001.

NEHRU, BIMLA; BHALLA, PUNITA; GARG, AARTI. Evidence for Centrophenoxine as a protective drug in aluminium induced behavioral and biochemical alteration in rat brain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, p. 33–42, 2006.

PAJOR, A. M. Citrate Transport by the kidney and intestine. **Semin. Nephrol**, v. 19, p. 195-200, 1999.

PANICKAR, K. S., NORENBURG, M. D. (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. **Glia** 50:287-298

PLATT, B., Fiddler, G., Riedel, G., Henderson, Z. Aluminum toxicity in the rat brain: Histochemical and immunocytochemical evidences. **Brain Research Bulletin**, v. 55, p. 257-267, 2001.

QUINTAES, K. D. Utensilios para alimentos e implicações nutricionais. **Rev. Nutr**, v. 13, p. 151-156, 2000.

RIBES, D., COLOMINA, M. T., VICENS, P., DOMINGO, J. L., Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 214, p. 293-300, 2008.

RIFAT, S. L., EASTWOOD, M. R., MCLACHLAN, D. R. C., COREY, P. N. Effect of exposure of miners to aluminum powder. **Lancet**, v. 336, p. 1162-1165, 1990.

ROBINSON, A.P.; WHITE, T.M.; MASON, D.W. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. **Immunology**, v. 57, p. 239-247, 1986.

ROLOFF, E. L., PLATT, B., RIEDEL, G. Long-term study of chronic oral aluminum exposure and spatial working memory in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, nº2, p. 351-356, 2002.

RONDON-BARRAGÁN, I.S., RAMÍREZ DUARTE, W.F., BARATO, P. & ESLAVA MOCHA, P.R. Importancia del ciclo biogeoquímico del Aluminio (Al) con relación con la acidez de los suelos en la producción piscícola y la salud pública ¿Cual seria el caso de la Orinoquia? **Revista Orinoquia**, v. 11, p. 81-94, 2007.

SABINO, Claudia de Vilhena Schayer et al. Estudo da biodisponibilidade de metais nos sedimentos da Lagoa da Pampulha. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2004.

SANSON, L. T.; CAROBREZ, A. P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 101, p. 59-64, 1999.

SANTOS, A. M. G. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: FeSBE, p.102-118, 1997.

SASS, J. B, ANG L. C, JUURLINK, B. H. Aluminum pretreatment impairs the ability of astrocytes to protect neurons from glutamate mediated toxicity. **Brain Res**. 1993 **Sep 10;621(2):207-14**.

SETHI, P., JYOTI, A., SINGH, R., HUSSAIN, E., SHARMA, D. Aluminium-induced electrophysical, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. **NeuroToxicology**, v. 29, p. 1069-1079, 2008.

SUAREZ-FERNANDES, M. B., SOLDADO, A. B., SANZ-MENDEL, A., VEJA, J. A., NOVELLI, A., FERNANDES-SANCHEZ, M. T. Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death. **Brain Res.** v. 835, p. 125-136, 1999.

SQUIRE, L. R., KANDEL, E. R. **Memória: Da mente às moléculas.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2003.

STRUYS-PONSAR, C., KERKHOFS, A., GAUTHIER, A., SOFFIÉ, M., DE AGUILAR, VAN DEN B. Effects of aluminum exposure on behavioral parameters in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 56, p. 643-648, 1997.

TAPPARO, A., SOLDÀ, L., GIORGIO BOMBI, G., ZAMBENEDETTI, P., ZATTA, P.F., BERTANI, R. & CORAIN, B. Analytical Validation of a General Protocol for the Preparation of Dose-controlled Solutions in Aluminium Toxicology. **Analyst**, v. 120, p. 2425-2429, 1995.

THEISS, C. MELLER, K. Aluminum Impairs gap junctional intercellular communication Between Astroglial Cells In Vitro. **Cell Tissue Res**, V. 310, p. 143-154, 2002.

TRONCOSO, J. C., HOFFMAN, P. N., GRIFFIN, J. W., HESS-KOZLOW, K. W. & PRICE, D. L. Aluminum intoxication: a disorder of neurofilament transport in motor neurons. **Brain Res**, v. 342, p. 172-175, 1985.

VEER BALA GUPTA, ANITHA, S., HEDGE, M.L., ZECCA, L., GARRUTO, R.M., RAVID, R., SHANKAR, S.K., STEIN, R., SHANMUGAVELO, P. & JAGANNATHA RAO, K.S. Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 143-158, 2005.

VIANA, M. B; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The Elevated T-Maze: a new animal modelo of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 49, p. 549-554, 1

XAVIER, G. F. A modularidade da memória e o sistema nervosa. **Psicologia USP. S. Paulo**, v. 4, p. 61-115, 1993.

XU, Z. C., TANG, J. P., XU, Z. X. & MELETHIL, S. Kinetics of aluminum in rats. IV: Blood and cerebrospinal fluid kinetics. **Toxicology Letters**, v. 63, p. 7-12, 1992.

ZANGROSSI JR, H. & GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. .44, p.15, 1997.

ZATTA, P., CERVELLIN, D. & ZAMBENEDETTI, P. Effects of the Aluminium Speciation on the Morphology of Rabbit Erythrocytes: a Toxicological Model. **Toxicology in Vitro**, v. 12, p. 287-293, 1998.

ZATTA, P., LUCCHINI, R., VAN RENSBURG, S.J. & TAYLOR, A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 15–28, 2003.

YATES, C. M., SIMPSON, J., RUSSELL, D., GORDON, A. Cholinergic enzymes in neurofibrillary degeneration produced by aluminium. **Brain Research**, v. 197, p. 269-274, 1980.

YOKEL, R.A., ALLEN, D.D. & ACKLEY, D.C. The distribution of aluminum into and out of the brain. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 76, p. 127–132, 1999.

YUAN, Y., GUO, J., ZHOU, Q. The homeostasis of iron and suppression of HO-1 involved in the protective effects of nimodipine on neurodegeneration induced by aluminum overloading in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, p. 100-105, 2008.

World Health Organization (WHO). (1994). Drinking Water Quality\_ Problems and Solutions. **Published by John Wiley & Sons**. Ireland, Dublin.

WOOD, P. C., WOJCIKIEWICZ, R. J. H., BURGESS, J., CASTLEEDEN, C. M. & NAHORSKI, S. R. Aluminium inhibits agonist muscarinic agonist-induced inositol 1, 4, 5-trisphosphate production and calcium mobilization in permeabilized SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **J. Neurochem**,v. 62, p. 2219-2223, 1994.

# 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](#)