



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE
ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS MOTORES, COGNITIVOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS.**

BELÉM
2018

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS MOTORES, COGNITIVOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM
2018

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO SOBRE PARÂMETROS MOTORES, COGNITIVOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Orientador
Instituto de Ciências da Biológicas – ICB-UFPA

Prof. Dr. Jose Luiz Fernandes Vieira - Examinador
Instituto de Ciências da Saúde – ICS - UFPA

Prof. Dr. Marco Aurélio de Moura Freira - Examinador
Faculdade de Ciências Biomédicas - UERN

Dra. Lygia Segal Nogueira - Examinador
Instituto Evandro Chagas – IEC - PA

Profa. Dra. Luanna de Melo Pereira Fernandes - Suplente
Universidade da Amazônia

BELÉM

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará**

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

F363a Fernandes, Rafael Monteiro.

Avaliação dos efeitos decorrentes da exposição ao Cloreto de Alumínio sobre parâmetros motores, cognitivos e de estresse oxidativo em ratos / Rafael Monteiro Fernandes. — 2018.

84 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Tese (Doutorado) - 0, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Toxicologia. 2. Sistema Nervoso Central. I. Título.

CDD 615.9

“Em todo o tempo ama o amigo e para a
hora da angústia nasce o irmão.”

Provérbios.

Aos meus pais, Oswaldo e Jane, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos nós, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com a minha ausência durante essa longa jornada.

Muitíssimo obrigado.

AGRADECIMENTOS

Sempre achei esta a pior parte da tese para escrever, talvez porque a vida não se coloca o valor de p para descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Gratidão é o sentimento maior que trago comigo após o término desta minha tese e, assim sendo, gostaria, em primeiro lugar, de agradecer a Deus, Senhor da minha vida e o responsável por me conceder a sabedoria necessária para fazer este trabalho. Do mesmo modo tenho que agradecer o acalento maternal de Nossa Senhora de Nazaré que, nos meus momentos de descrença e aflição, me encobriu com o Seu Manto protetor e colocou a Sua mão antes da minha em todas as minhas ações.

Aos meus pais, Oswaldo e Jane, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais.

À minha namorada Caroline Azulay, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros e depois de tantos momentos de lazer perdidos. Obrigado pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

Ao meu compadre Ênio, um grande amigo nessa jornada, que sempre me deu forças e me ensinou que na vida não tem que se “ensebar” com um problema: é resolver e pronto! E ainda agradeço pelos presentes: minha comadre Bárbara e meu afilhado Heitor.

Aos meus tios Carlitão (*in memoriam*) e Graça que em vários momentos da minha vida esteve presente nas minhas vitórias e tristezas. E também aos meus tios Vanessa, Beto e Fábio.

Ao professor Rafael Rodrigues Lima, pela oportunidade de tê-lo como orientador de Mestrado e Doutorado. Aprendendo a trabalhar em grupo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), em especial Priscila, Micaele e Maria, por terem tornado o dia a dia na pós-graduação tão prazeroso! Foi extremamente enriquecedor conhecer e

conviver com cada um de vocês e também pela grande ajuda em muitos momentos do trabalho que hoje se conclui.

Aos meus amigos Railson, Márcio entre outros que não menciono o nome, mas sabem quem são, amigos que estiveram ao meu lado durante essa fase, pelo companheirismo, força e apoio em certos momentos difíceis.

Aos professores Walther Carvalho, Maria Lucia, Maria Tereza e Erica Franco por terem ao longo da graduação, me mostrado os caminhos da pesquisa.

Aos meus amigos Ingrid, Julius, Arthur, Sadalla, Eduardo Japa, Tameirão, Luene, Miguel, Tiago, José e tantos outros que fizeram parte de minha vida e sempre estiveram no meu lado

Aos meus amigos Heyder e Ângela, que durante todo esse período sempre tiveram uma palavra amiga e um sorriso no rosto.

Ao Rael, Alexandre e André, por deixar essa caminhada mais leve com muitas risadas na xerox do ICB.

Nesse caminho existiram pessoas que sem elas eu não estaria na pós-graduação: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, Profa. Dra. Cristiane Maia, Profa. Dra. Marta Monteiro, Profa. Dra. Márcia Kronka, Prof. Dr. Edimar, Profa. Dra. Maria Elena Crespo, Prof. Dr. Evander, Prof. Dr. Hamoy, Prof. Dr. Enéas Fontes Junior, Profa. Dra. Dielly, Prof. Dr. Edivaldo Herculano, Profa. Dra. Iracilda, Profa. Dra. Rossineide, Prof. Dr. Manuel Filho, Prof. Dr. Agenor, Profa. Dra. Barbarella, Prof. Dr. Zé Luis, Profa. Dra. Edilene, Prof. Dr. Anderson Herculano, Profa. Dra. Karen, Profa. Dra. Gilmara, Profa. Dra. Marcia Freitas, Prof. Dr. Carlomagno e Auxiliadora.

À equipe incansável da secretaria da Pós-graduação, especialmente à Socorro que sempre me ajudou a resolver da maneira mais fácil todos os problemas que surgiram e também a todos que fazem parte da secretaria do ICB.

À Coordenação do PNBC, Prof. Dr. Carlo Magno, e a Profa. Dra. Gilmara.

À universidade Federal do Pará e ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

Ao Reginaldo, Amarildo, Marcelinho, Irmão e Perninha, incansáveis na gerência do Biotério Central, sem eles não teria nem os animais para pesquisa e nem os momentos de risadas pelos corredores.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho, obrigado por doarem a sua vida à ciência.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) por ter me concedido o apoio financeiro para a realização deste trabalho e, conseqüentemente, para a conclusão do meu doutorado.

RESUMO

O alumínio (Al) é o terceiro metal mais abundante na crosta terrestre, estando presente em grandes quantidades no solo e na água, sua alta biodisponibilidade o torna um importante agente para o desequilíbrio ambiental. Al é considerado um agente neurotóxico e se acumula no sistema nervoso, sendo associado a várias doenças neurodegenerativas. Assim, este estudo investigou os efeitos da exposição crônica ao cloreto de alumínio (AlCl₃) na cognição, comportamento motor e estresse oxidativo. Para isso, ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos: Al1 (8,3 mg / kg / dia), Al2 (5,2 mg / kg / dia) e Controle (Água destilada) expostos por via oral por 60 dias. Após o período de exposição, parâmetros comportamentais, histológicos, de estresse oxidativo e quantificação dos níveis de alumínio no sangue foram realizados. Não houve alterações no comportamento motor, houve mudança em apenas um parâmetro exploratório e na cognição. Não foram encontradas diferenças na população de neurônios Purkinje entre os grupos experimentais. A exposição ao Al aumentou os níveis desse metal no sangue, alterando também os parâmetros da bioquímica oxidativa. Assim, podemos afirmar que a exposição ao Al em ratos em doses equivalentes à exposição urbana é capaz de promover a quebra da homeostase sanguínea, alterando o equilíbrio bioquímico do hipocampo, gerando um estado de estresse oxidativo e dano cognitivo, mas não sendo capaz de promover mudanças significativas. o cerebelo e os parâmetros motores.

Palavras-Chave: alumínio, cognição, comportamento motor, estresse oxidativo

ABSTRACT

Aluminum (Al) is the third most abundant metal in the earth's crust, being present in large amounts in soil and water, its high bioavailability makes it an important environmental contaminant. Al is considered a neurotoxic agent and accumulates in the nervous system, being this behavior associated with several neurodegenerative diseases. However, little is known about its effects at doses similar to human consumption in the nervous and biochemical systems. Thus, this study investigated the effects of chronic exposure to aluminum chloride ($AlCl_3$) on cognition, motor behavior and oxidative stress. For this, adult Wistar rats were divided into three groups: Al1 (8.3 mg / kg / day), Al2 (5.2 mg / kg / day) and Control (Distilled water) being exposed orally for 60 days. After the exposure period, behavioral, histological, oxidative stress parameters and quantification of aluminum levels in the blood were performed. There were no changes in motor behavior, there was change in only one exploratory parameter and in cognition. No differences were found in the population of the purkinje neurons between the experimental groups. Exposure to Al increased levels of this metal in the blood, also altering the parameters of oxidative biochemistry. Thus, we can affirm that exposure to Al in rats, at doses equivalent to urban exposure and in potentially safe doses are capable of promoting breakage of blood homeostasis, altering hippocampal biochemical balance, generating a state of oxidative stress and cognitive damage, not being able to promote significant changes in the cerebellum and motor parameters.

Keywords: aluminum, cognition, motor behavior, oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo metodológico sobre período de exposição, coleta de sangue, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e demais análises.	24
Figura 2	Níveis de Alumínio	36
Figura 3	Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, na atividade locomotora espontânea de ratos Wistar com 90 dias de idade em (A) Open Field Test.	37
Figura 4	Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, no comportamento ansioso de ratos Wistar com 90 dias de idade em labirinto em cruz elevado.	38
Figura 5	Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, no comportamento ansioso de ratos Wistar com 90 dias de idade em labirinto em cruz elevado.	39
Figura 6	Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, na coordenação motora fina e no equilíbrio.	40
Figura 7	Efeitos da exposição ao alumínio na memória de reconhecimento de curto prazo de ratos adultos no teste de reconhecimento de objetos.	40
Figura 8	Os efeitos da exposição ao alumínio na memória de curto e longo prazo. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da latência de descida (step down) (s) na fase de Treino no Teste 1 (memória de curto prazo) e no Teste 2 (memória de longa duração).	41
Figura 9	Avaliação da densidade de células de Purkinje	42
Figura 10	Avaliação da bioquímica oxidativa nos eritrócitos. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias.	44
Figura 11	Avaliação da bioquímica oxidativa nos Plasma. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da	46

bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias.

Figura 12 Avaliação da bioquímica oxidativa no hipocampo. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. 48

Figura 13 Avaliação da bioquímica oxidativa no córtex pré-frontal. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. 50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

●OH	Radical hidroxil
ABAP	Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina)
ABTS	(2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolina, 6-sulfonato)
ABTS ^{•+}	Radical (2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolina, 6-sulfonato)
ACAP	Capacidade antioxidante contra radical peroxil
Al(OH) ³	Hidróxido de alumínio
Al ₂ O ₃	Trióxido de alumínio
Al ³⁺	Alumínio III
AlC ₅ H ₅ O ₇	Citrato de Alumínio
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
AlO(OH)	Óxido Hidróxido de alumínio
AlO ₂ ^{•2+}	Aluminato
AlPO ₄	Fosfato de alumínio
BWT	Teste de equilíbrio em vigas graduadas
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalse
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTNB	Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico)
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
LCE	Labirinto em cruz elevado
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
O ₂ •—	Superóxido
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio Instituto Memorial Roswell Park
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O Alumínio	15
1.2 Toxicologia ambiental	16
1.3 Exposição ao homem	17
1.4 Cinética do alumínio	17
1.5 Neurotoxicidade do alumínio	19
1.5.1 Alumínio e Estresse Oxidativo	19
1.6 Problemática do trabalho	21
2 OBJETIVO.....	22
2.1 Objetivos específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Animais experimentais.....	23
3.2 Protocolo de exposição ao Al	23
3.3. Ensaio comportamentais.....	25
3.3.1. Teste da atividade locomotora espontânea/campo aberto	25
3.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	25
3.3.3. Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod test).....	26
3.3.4. Teste de equilíbrio em vigas graduadas (<i>Beam Walking Test- BWT</i>)	26
3.3.5. Teste de Reconhecimento do objeto	27
3.3.6 Teste da esQUIVA inibitória	28
3.4 Eutanásia e coleta de materiais biológicos	29
3.4.1 Perfusão, processamento e análise histológica	29
3.4.2 Coleta de sangue e sistema nervoso central para análises.....	30
3.4.2.1 Dosagem de alumínio	31
3.4.2.2 Ensaio de avaliação de parâmetros bioquímicos	32
3.4.2.2.1 Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	32
3.4.2.2.2 Determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)	32
3.4.2.2.3 Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD).....	33
3.4.2.2.4 Determinação da atividade de catalase (CAT).....	33
3.4.2.2.5 Determinação dos níveis de glutatona (GSH).....	34

3.4.2.3.6 Análise da capacidade antioxidante contra radical peroxil (ACAP)	34
3.5 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	36
4.1 Quantificação dos níveis de alumínio no sangue	36
4.2 Efeitos comportamentais/funcionais	36
4.2.1 Exploração espontânea horizontal e vertical	36
4.2.2 Parâmetros ansiogênicos	37
4.2.3 Coordenação motora forçada	39
4.2.4 Coordenação motora fina e equilíbrio	39
4.2.5 Memória de reconhecimento a curto prazo	40
4.2.6 Memória de curto e longo prazo	41
4.2.7 Avaliação da densidade de células de Purkinje	42
4.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo:	42
4.3.1 Em eritrócitos	42
4.3.2 No plasma sanguíneo	44
4.3.3 Em hipocampo	46
4.3.4 Em cortex pré-frontal	48
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Efeitos da exposição crônica ao alumínio no sangue	52
5.2 A exposição crônica ao alumínio e o comprometimento motor	54
5.3 Efeitos da exposição crônica ao alumínio e a cognição	56
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	61
8 ANEXO	81
8.1 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Alumínio

O alumínio (Al) é o terceiro metal mais abundante na crosta terrestre, estando presente em grandes quantidades no solo e na água (Krewski *et al.*, 2007). Na natureza, não é encontrado na sua forma elementar, pois possui alta afinidade pelo oxigênio, geralmente combina-se com óxidos ou silicatos, sendo, portanto, encontrado naturalmente em sua composição iônica (Al^{+3}) (Krewski *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015).

A fonte natural de Al, é a Bauxita ($Al(OH)^3 + AlO(OH)$), rica em formas impuras de minerais de Al como gibbsita ($Al(OH)^3$) e diásporo ($AlO(OH)$), sendo formado pela erosão de rochas como a nefelina e argilas (Krewski *et al.*, 2007; Donoghue *et al.*, 2014; Kvande e Drabløs, 2014). Deste minério, é extraída a alumina (Al_2O_3), utilizada universalmente para a fabricação do Al primário (Donoghue *et al.*, 2014).

Este metal está presente no cotidiano em várias formas, por possuir alta resistência, ductibilidade, capacidade de conduzir energia e calor (Totten e Mackenzie, 2003). É utilizado na indústria de embalagens, materiais dúcteis, bebidas, ligas condutoras para eletricidade e construção civil, aeronaves, veículos blindados, aditivos alimentares, drogas e cosméticos (Totten e Mackenzie, 2003; Hirsch *et al.*, 2006). Em sua reciclagem, 100% do metal é reaproveitado com o mínimo de perda na qualidade. Além do refinamento primário, cerca de 7 milhões de toneladas são produzidas a partir de reciclagem. A refundição requer apenas cerca de 5% da energia utilizada para produzir o metal primário (Li *et al.*, 2015; Mahinroosta e Allahverdi, 2018).

Além destas formas de utilização, o Al pode ser conjugado com outros elementos iônicos e formar sais. O mais conhecido é o cloreto de alumínio ($AlCl_3$), utilizado nos processos de tratamento da água, por floculação (Krewski *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015; Exley, 2016), um processo rápido e de custo baixo, quando comparado aos coagulantes inorgânicos (Li *et al.*, 2015). Outra vantagem é que não causa alterações no controle de qualidade da água tratada, tais como alcalinidade e turbidez da água. No entanto, há uma preocupação

sobre quais são os possíveis efeitos da exposição crônica ao Al em nível ambiental e humano (Rondeau *et al.*, 2009; Exley, 2016).

1.2 Aspectos toxicológicos do alumínio

A presença do Al no ambiente ocorre geralmente por duas vias, a primeira por processos naturais, como a formação de rochas; e a segunda pelas atividades humanas, como resultado do emprego do metal em processos industriais, aumentando a concentração atmosférica deste metal e contaminando efluentes residuais, que são resíduos provenientes de indústrias. (Matsumoto, 2000; Goonetilleke *et al.*, 2005).

O aumento de poluentes no ambiente gera um constante aumento da acidez atmosférica e como consequência disto, a ocorrência de chuvas ácidas que, por sua vez, acarretam alterações no pH tanto dos solos quanto das águas (W. Barabasz *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

A rede hidrográfica do Brasil é diversa e complexa, considerando as múltiplas espécies que dependem deste sistema para o seu desenvolvimento, incluindo a flora e a fauna aquática (Anderson *et al.*, 2018). Nos rios brasileiros, porém, são encontradas altas concentrações de Al, devido à própria natureza do solo e por consequência das ações do homem (Lima *et al.*, 2011; De Meyer *et al.*, 2017).

A bacia Amazônica, a maior bacia hidrográfica do mundo, possui 3 vezes a concentração de Al permitida pela OMS nos depósitos arenosos subterrâneos (Santos *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 2011; De Meyer *et al.*, 2017). O rio Tietê, mesmo nas regiões da cabeceira, onde as condições são mais favoráveis para a fauna aquática, em determinadas épocas do ano a concentração de Al chega a ser 18 vezes maior do que o tolerado por peixes, além disso o pH da água é ácido, aumentando os efeitos tóxicos deste metal (Da Silva *et al.*, 2002; Mortatti *et al.*, 2013; Ussami e Martins Guilhoto, 2018)

De fato, como consequência do pH ácido das águas e solos, há um aumento da solubilidade do Al, pois o mesmo sofre alteração da forma particulada e orgânica, menos tóxicas, para espécies de monômeros inorgânicos tóxicos, tais como Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})^4^-$ (Guibaud e Gauthier, 2003; Wang *et al.*, 2010), que causam alterações no crescimento de plantas, redução do número colheitas e alteração das funções metabólicas não só de

plantas, como também de humanos e animais, devido à sua capacidade de atravessar barreiras biológicas (W. Barabasz *et al.*, 2002)(Santos *et al.*, 1984; Da Silva *et al.*, 2002; De Meyer *et al.*, 2017).

1.3 Exposição ao homem

A exposição humana ao Al ocorre pela ingestão de alimentos, água potável, produtos farmacêuticos e utensílios domésticos (Lin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010; Poole *et al.*, 2012; De Meyer *et al.*, 2017). Um adulto consome entre 1 a 20 mg/dia de Al, oriundo das diferentes fontes de exposição. Através da ingestão de alimentos, o consumo alcança em média 8mg. Pessoas que utilizam medicamentos que contém Al, podem consumir até 5g/dia (Atsdr, 2008; Jecfa, 2008; Who, 2010). Em zonas industriais, onde os níveis de Al no ar são mais elevados, o consumo pode exceder 0,1mg/dia. Derivado da exposição ocupacional, os trabalhadores podem inalar entre 3,5 e 7 mg/dia de alumínio (Jecfa, 2008).

Apesar dos alimentos serem a principal forma de exposição do corpo ao Al, a maior preocupação científica está nas águas de consumo público. Isto ocorre pois na água o alumínio está em sua forma mais biodisponível, o que facilita a sua absorção pelo organismo (Weng *et al.*, 2002; Who, 2010).

1.4 Cinética do alumínio

O Al pode ser absorvido pelo corpo humano por várias vias, principalmente a via oral, seguida da intranasal, transdérmica e vias parenterais. Os principais locais de absorção incluem o trato gastrointestinal (Cunat, Lisiane *et al.*, 2000), pele (Pineau *et al.*, 2012; Ligt *et al.*, 2018) e os epitélios olfatório e oral (Donoghue, 2004; Exley, 2013).

Após a ingestão oral, a biodisponibilidade do sal é baixa, cerca de 0,06 a 1,5% (Moore *et al.*, 2000; Yokel e Mcnamara, 2008). A absorção através do trato gastro-intestinal é dependente de diversos fatores, como pH e a dieta. O pH baixo aumenta a solubilidade das espécies de alumínio, desta forma aumentando a absorção do metal. Já na dieta, alguns ácidos orgânicos como citrato, lactato, ácido ascórbico são capazes de formar complexos com o metal, aumentando também a sua absorção e retenção tecidual de Al (Cunat, L. *et al.*, 2000; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). No entanto, substâncias como o fósforo

parecem diminuir a absorção do Al, pois formam um precipitado na forma de sal insolúvel ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); a sílica, presente na alimentação, também diminui a absorção e desempenha um papel protetor contra a intoxicação por alumínio (Berthon, 2002).

No estômago, em decorrência do pH baixo, a maior parte do Al é convertida em espécies monomoleculares solúveis, uma parte destas espécies forma complexos com ácidos orgânicos presentes no estômago e isso permite que o íon continue solúvel em pH mais alto (Yokel, 1989; Domingo *et al.*, 2011). O intestino é o local onde ocorre a absorção do Al, mas o mecanismo preciso dessa absorção ainda não é totalmente conhecido. Sugere-se que ocorra por células absorptivas e junções de adesão envolvendo processos passivos e processos de transporte ativo, como aqueles envolvidos no transporte de cálcio e sódio (Cunat, L. *et al.*, 2000).

Após ser absorvido para a corrente sanguínea, o Al circula no plasma sanguíneo ligado à transferrina, citrato, albumina e aos compostos de baixo peso molecular (Nagaoka e Maitani, 2005). A sua distribuição no organismo é desigual, devido às diferenças de pH dentro do próprio corpo, barreiras biológicas, tipo de Al administrado, via utilizada, pH, dose, tempo de exposição, idade, função renal e dieta.

Com a finalidade de reduzir os níveis plasmáticos do Al, os sistemas de excreção são responsáveis por sua eliminação, neste caso a excreção biliar representa apenas 2% da eliminação total de Al. Um sistema renal saudável, é responsável por excretar aproximadamente 95% do alumínio, na forma de citrato de alumínio ($\text{AlC}_5\text{H}_5\text{O}_7$) (Shirley e Lote, 2005; Jones *et al.*, 2017). Quando existe perda da funcionalidade dos rins, há um aumento do risco de acúmulo e toxicidade. Por exemplo, a relação do desenvolvimento de encefalopatia progressiva pela deposição de Al em pacientes com insuficiência renal em tratamento hemodialítico, descrita na literatura. (Wills e Savory, 1989; Shirley e Lote, 2005).

O acúmulo do Al não depende apenas da taxa de excreção pela via renal, mas também da idade do indivíduo. As concentrações de Al nos pulmões, ossos e cérebro aumentam com a idade e já foi descrito que pessoas mais jovens possuem menor concentração de Al do que em idosos (Shirley e Lote, 2005; Exley, 2013; 2016).

A deposição de Al no cérebro, ocorre em uma taxa baixa e contínua que, somado à baixa taxa de eliminação deste metal do sistema nervoso, potencializa seu acúmulo a cada ano de vida (Exley e House, 2011). O tempo de eliminação do Al é correlacionado com o tempo da exposição ao mesmo. Diferentes tempos já foram relatados, sugerindo que existem compartimentos em que este metal é lentamente eliminado (Yokel *et al.*, 2001). Foi observado que o osso armazena aproximadamente 58% do alumínio presente no corpo humano, mas a sua eliminação é muito mais rápida quando comparada com o cérebro, devido à renovação óssea e a falta de renovação de neurônio (Aslam *et al.*, 2009).

1.5 Neurotoxicidade do alumínio

O Al é considerado um metal não essencial (Exley, 2016), por não possuir nenhuma função biológica descrita. A neurotoxicidade deste metal é descrita desde o século 19 e está sendo relacionada com o aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas. De fato, este metal está implicado na encefalopatia de diálise, osteomalácia, anemia, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Esparza *et al.*, 2018).

Apesar dos diversos estudos sobre a neurotoxicidade, nenhum mecanismo foi identificado, embora várias hipóteses sejam propostas, dando ênfase para o início dos danos cerebrais em virtude do acúmulo de alumínio (Kawahara e Kato-Negishi, 2011; Exley, 2016; Esparza *et al.*, 2018).

1.5.1 Alumínio e Estresse Oxidativo

A neurotoxicidade resultante do estresse oxidativo é um dos modelos mais reconhecidos de neurotoxicidade relacionada ao alumínio, mas o substrato molecular pelo qual o metal causa dano oxidativo ao cérebro é incerto (Nehru e Anand, 2005). Foi confirmada a existência de um desequilíbrio do estresse oxidativo na maioria das doenças neurodegenerativas nas quais o alumínio está envolvido (Exley, 2004; Kawahara e Kato-Negishi, 2011; Esparza *et al.*, 2018). Além disso, vários estudos observaram aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) após a exposição de Al, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em alguns casos, porém, os resultados mostram-se controversos, pois este metal possui características tanto pró-oxidantes quanto antioxidantes, estando relacionado ao tempo de exposição e à concentração utilizada (Exley, 2004).

O cérebro é altamente suscetível aos danos oxidativos por vários motivos: alto consumo de oxigênio (Wang e Michaelis, 2010; Adamczyk e Adamczyk-Sowa, 2016), baixas concentrações de antioxidantes enzimáticos, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx); maior concentração de ácido graxos poli-insaturados oxidáveis nas membranas neuronais e um teor alto de ferro (Salim, 2017).

Várias sugestões existem para tentar explicar a possível ligação entre o alumínio e a geração de estresse oxidativo (Exley, 2004). Embora o Al não seja um metal de transição, não sofre reações redox, é capaz de gerar estresse oxidativo tanto in vivo e in vitro por diversos mecanismos (Nehru e Anand, 2005; Sánchez-Iglesias *et al.*, 2009). Foi observado sua capacidade de induzir a peroxidação lipídica, oxidação de NADH e a formação de radicais livres. (Amador *et al.*, 2001; Abubakar *et al.*, 2003).

O Al intensifica a capacidade de transição dos metais pró-oxidantes, como Ferro (Fe) e Cobre (Cu), que estão presentes nos compartimentos onde existe uma tendência a ocorrer estresse oxidativo (Exley, 2004). Isto, então, gerou a hipótese de que o alumínio forma complexos com estes metais pró-oxidantes e assim, participa por muito mais tempo da reação de Fenton, processo catalítico que oxida Fe^{2+} para Fe^{3+} na presença de peróxido de hidrogênio, formando um radical hidroxil e um hidróxido como produto da reação. O ferro Fe^{3+} é reduzido novamente para Fe^{2+} na presença de outra molécula de peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroperóxido, ou seja a reação global consiste na formação de duas espécies de reativas de oxigênio e água (Ruipérez *et al.*, 2012).

Foi visto que ânion superóxido (O_2^-), é a espécie reativa de oxigênio com a menor capacidade oxidante, mas esta pode passar por uma transferência de elétron e gerar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo então participar da reação de Fenton e na presença de íons metálicos reduzidos, ser convertido em $\bullet OH$, aumentando o seu potencial redox (Winterbourn, 1995; Von Sonntag, 2008). Vários estudos propõe que o alumínio pode otimizar a oxidação por O_2^- em diferentes sistemas que geram esta EROS: o sistema xantina/xantina oxidase, oxidação de NADH mediada por vanádio, entre outros (Kong *et al.*, 1992; Abubakar *et al.*, 2003).

Da mesma forma, os cátions trivalentes que possuem relação química e física com o Al, tais como latânio, gálio e escândio também aumentam a capacidade oxidativa do O_2^- (Shainkin-Kestenbaum *et al.*, 1989; Trenfield *et al.*, 2015).

A formação do complexo do $Al^{3+} + O_2^-$ ($AlO_2 \bullet 2+$), pode explicar a atividade pró-oxidante do alumínio e também o potencial catalizador das atividades biológicas oxidativas mediadas por superóxido e ferro, uma vez que este complexo é mais potente que o próprio superóxido (Lu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2015).

1.6 Problemática do trabalho

O alumínio é encontrado em abundância na natureza, estando presente em diversos aspectos da vida humana, desde a água potável até produtos eletrônicos (Saiyed e Yokel, 2005). É fortemente relacionado com diversas alterações nos sistemas fisiológicos, como por exemplo no sistema nervoso, onde está associado ao aumento de estresse oxidativo e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer.

A literatura atual apresenta inúmeros de estudos descrevendo o impacto das propriedades pró-oxidantes do alumínio relacionadas com alterações no comportamento motor e na memória (Yokel e Mcnamara, 2001; Yokel, 2002; Saiyed e Yokel, 2005; Exley, 2008), mas ainda não há mecanismos claros sobre as alterações encontradas.

Com o objetivo de tentar elucidar este problema, esta tese busca descrever os efeitos decorrentes da exposição ao alumínio em doses que mimetizam o consumo humano em áreas urbanas, baseada em análises comportamentais, teciduais e oxidativas da exposição ao cloreto de alumínio.

2 OBJETIVO

Investigar as alterações oxidativas em sangue e no sistema nervoso, bem como no comportamento de ratos wistar decorrentes da exposição sub-crônica a doses que mimetizam o consumo humano de cloreto de alumínio em áreas urbanas.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar, no modelo proposto, os níveis de alumínio em sangue periférico de animais expostos e comparar se houve diferença em relação às doses de exposição ao cloreto de alumínio nos grupos experimentais;
- Avaliar o padrão comportamental motor em animais expostos, comparando se houve diferença em relação às doses de exposição ao cloreto de alumínio nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a função mnemônica em animais expostos, comparando se houve diferença em relação às doses de exposição ao cloreto de alumínio nos grupos experimentais;
- Verificar o comportamento oxidativo em plasma, eritrócitos, córtex pré-frontal e hipocampo, comparando se houve diferença em relação às doses de cloreto de alumínio nos grupos experimentais;
- Avaliar alteração na população de neurônios de purkinje em cerebelo de animais expostos e comparar se houve diferença em relação as doses de exposição ao cloreto de alumínio nos grupos experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados 60 ratos da linhagem *Wistar* com 30 dias de vida, machos, com massa corpórea variando entre 120 e 150g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos experimentais e as manipulações com os animais foram realizados em obediência às normas sugeridas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (Ferdowsian e Beck, 2011) e o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPA (CEUA-UFPA) aprovado sob parecer nº 5923210617 (Anexo 1)

Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, com 5 animais por caixa durante todo o período de experimentação. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água destilada, permanecendo em uma temperatura de 25°C em ciclo escuro/claro de 12 horas, com início do ciclo claro às 7:00 horas da manhã.

A distribuição dos animais foi realizada aleatoriamente em 3 grupos contendo 20 animais cada, dispostos da seguinte maneira: C – Controle, AI1 – 8,3 mg/Kg/Dia de cloreto de alumínio por 60 dias, AI2 – 32 mg/Kg/Dia de cloreto de alumínio por 60 dias

3.2 Protocolo de exposição ao Al

Para a exposição ao alumínio foram utilizadas duas doses extrapoladas, segundo cálculo base da FDA (Food and Drug Administration) de concentrações de exposição diária ao alumínio por um humano adulto. Uma das concentrações (AI1) foi de 8,3 mg/Kg/Dia e outra dose utilizada (AI2) foi a de 5,2 mg/Kg/Dia de $AlCl_3$ preconizada pela OMS (Who, 2010), quando extrapolada chega a 32 mg/Kg/Dia. (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para o reajuste de dose. A administração de Al ocorreu uma vez ao dia durante 60 dias via oral por gavagem intragástrica (Fig. 1)

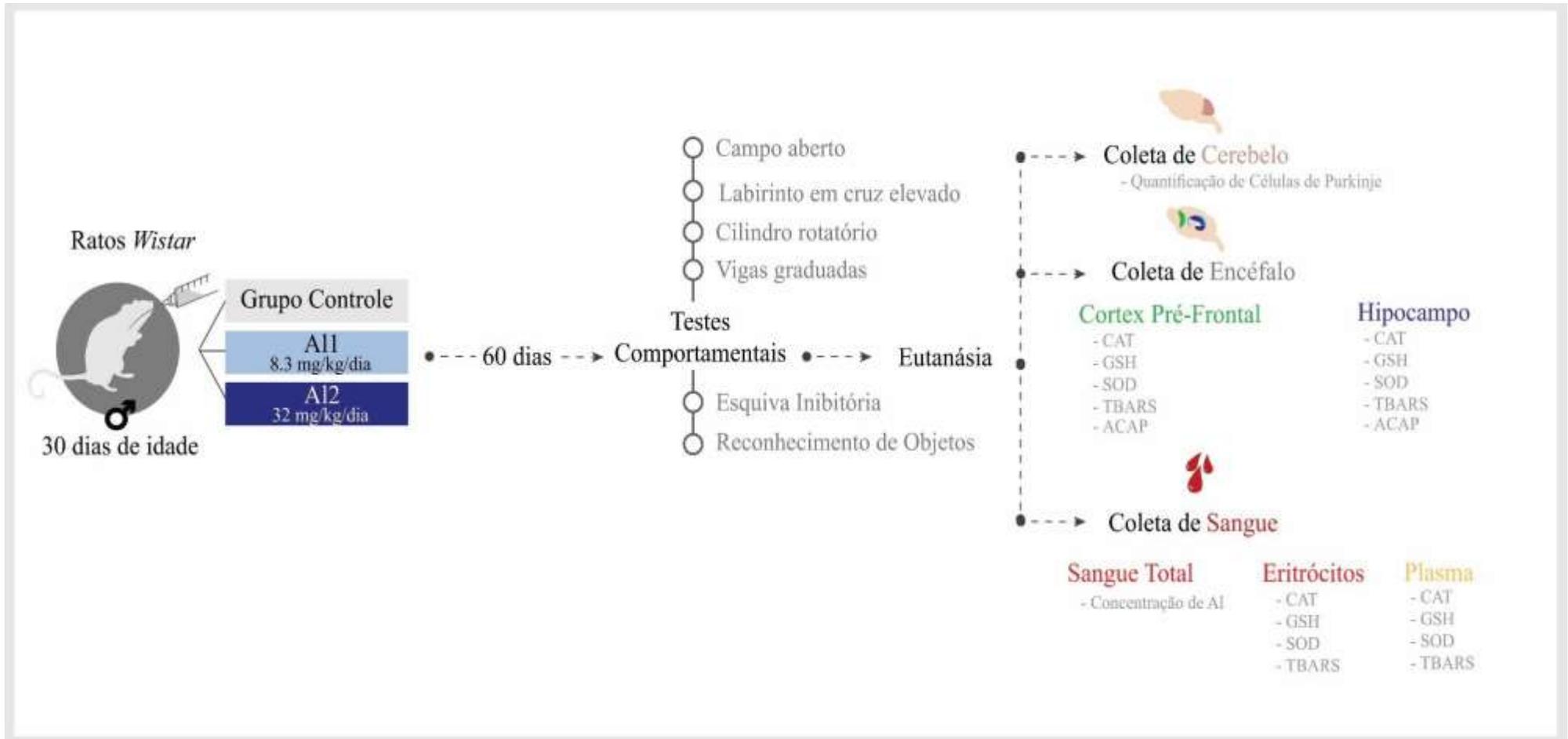


Figura 1: Resumo metodológico sobre período de exposição, coleta de sangue, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e demais análises.

3.3. Ensaio comportamentais

Após 24 horas a última administração de cloreto de alumínio, os ensaios comportamentais foram realizados em parte dos animais (10 animais por grupo). Todos os testes foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lux).

3.3.1. Teste da atividade locomotora espontânea/campo aberto

Neste teste, foi utilizado uma arena em madeira (100 x 100 x 40 cm), pintada com material não permeável na cor preta. O objetivo deste teste foi avaliar a atividade locomotora espontânea (Pandolfo *et al.*, 2007), de acordo com dois parâmetros: a distância total percorrida (em metros) e o número de levantamentos (“rearing”) executados pelos animais, durante 5 minutos. O primeiro parâmetro foi analisado pelo *software* ANY-maze (Stoelting Co., San Diego, CA) e o segundo foi registrado com o uso de um contador manual. O ato de levantar foi considerado quando o animal se apoiou nas 2 patas traseiras mantendo as 2 patas dianteiras levantadas (Brenes *et al.*, 2009).

3.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um dos modelos validados para verificar comportamento do tipo ansiogênico em ratos (Pellow *et al.*, 1985). É baseado em respostas incondicionadas aos ambientes potencialmente perigosos, tais como a aversão natural de roedores aos espaços abertos (Treit *et al.*, 1993). Os índices principais de ansiedade no teste compreendem medidas espaço-temporais de fuga dos braços abertos (Acevedo *et al.*, 2014).

O teste ocorre em um equipamento de madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e dois abertos (50 x 10 x 1 cm), opostos entre si (Handley e Mithani, 1984). Nos braços abertos há uma proteção de 1 cm de altura circundando-os à fim de impedir a queda dos animais do aparato

Após o teste do campo aberto, cada animal foi posicionado no centro do LCE com a face voltada para um dos braços fechados permitindo a exploração espontânea por 5 minutos. Um observador, que não teve conhecimento prévio do grupo ao qual pertencia cada animal, registrou o número de entradas nos

braços abertos (EBA) e fechados (EBF), assim como o tempo de permanência nos braços abertos (TBA). O percentual de EBA (%EBA) e de TBA (%TBA) foram calculadas de acordo com as fórmulas: $(EBA / EBA + EBF) \times 100$; $(TBA / TBA + TBF) \times 100$ (Pellow *et al.*, 1985).

Foi possível observar resposta do tipo ansiedade através da diminuição na entrada e/ou tempo de permanência nos braços abertos. O parâmetro EBF foi utilizado para avaliar prováveis alterações motoras nos animais.

3.3.3. Teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod test)

Neste teste foi avaliada a força e coordenação motora dos animais. O rotarod é um equipamento de alumínio que apresenta um eixo giratório automatizado e que possui a capacidade de aumentar as rotações do eixo. Os animais foram treinados a manterem-se sobre o eixo giratório do equipamento por um período de 120 segundos a quinze rotações por minuto (15 RPM). Após o treino, os animais foram submetidos ao teste propriamente dito que consistiu na submissão dos animais ao aparato em cinco etapas de 120 segundos cada, com a primeira exposição à 18 RPM, sendo seguida por exposições de 20 RPM, 25 RPM, 28 RPM e por fim 37 RPM, respeitando o período de 120 segundos entre as exposições. Foi contabilizado o número de quedas da barra de rolagem do *rota-rod* nas cinco etapas.

3.3.4. Teste de equilíbrio em vigas graduadas (Beam Walking Test- BWT)

O BWT é utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio de roedores, medindo-se a capacidade dos animais em atravessar uma série graduada de vigas estreitas até alcançar uma plataforma segura (Stanley *et al.*, 2005).

O aparato é construído em madeira e consiste de 2 extremidades de vigas com 1m de extensão suspensas a 50 cm do chão. Em uma extremidade situa-se o início do aparato, onde os animais foram colocados e na outra extremidade é localizada a plataforma segura, uma caixa fechada (20 cm²), para a qual o animal poderia escapar. As vigas apresentaram 2 tipos de secção transversal de diferentes diâmetros: quadrada (28, 12 e 5 mm) e circular (28, 17 e 11 mm), e eram posicionadas entre as duas extremidades para que o animal percorresse e cumprisse a tarefa de travessia das vigas (Karl *et al.*, 2003).

O protocolo foi modificado de Carter e colaboradores (2001), em que os animais inicialmente foram colocados na caixa fechada para ambientação e, em seguida, sobre as vigas graduadas posicionados na extremidade de início. Todos os ensaios do BWT foram iniciados posicionando os animais nas vigas quadradas e em seguida sobre as circulares, sempre da maior para a menor secção, onde o tempo máximo de travessia de uma extremidade à outra foi de 60 segundos, sendo 2 tentativas por viga, com intervalo de 60 segundos. Para os animais que caíssem do equipamento, a contagem era interrompida, eram recolocados no início da viga e continuava a contagem a partir do tempo marcado na queda, até que se completasse o tempo máximo de cada tentativa.

Neste experimento, por vezes os animais pararam enquanto atravessavam as vigas, assim, as medidas de latência de travessia sobre cada uma das vigas foram consideradas difíceis de interpretar e não são relatadas neste estudo. Dessa forma, foi contabilizado o número de vezes em que pelo menos uma das patas traseiras escorregou. O deslizamento de duas patas traseiras de uma só vez foi contabilizado como duas falhas (Crabbe *et al.*, 2003).

3.3.5. Teste de Reconhecimento do objeto

O teste de reconhecimento do objeto foi conduzido na mesma arena de madeira utilizada para o teste de atividade locomotora espontânea e foi analisado através do *software* ANY-maze (Stoelting Co., San Diego, CA). Esse teste baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (Hughes, 2007). Esta preferência foi utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar. O procedimento realizado foi adaptado de Pires *et al* (2009), o qual consiste de 4 fases: uma fase de habituação, uma fase de treino e duas fases de testes.

A fase de habituação foi considerada a partir do momento em que o animal explorou livremente o aparato no teste de campo aberto, sem objetos, por 5 minutos. As fases de treino e de testes duraram 3 minutos cada e tiveram intervalo de 30 minutos entre elas, a fim de avaliar a memória de curta duração. Após 30 minutos da fase de habituação, previamente à fase de treino foram fixados dois objetos idênticos em formato de cubo (C1 e C2) em cantos opostos

da arena, a 10 cm distantes das paredes e aproximadamente 70 cm afastados um do outro.

Antecipadamente às fases de testes, uma cópia idêntica do objeto familiarizado (C3) e um objeto novo (X) foram dispostos na arena nos mesmos locais anteriormente ocupados pelos objetos C1 e C2 da fase de treino. Os novos objetos foram selecionados seguindo um raciocínio de aumentar as diferenças estruturais com os cubos: um em forma de “T” (T) e outro em forma de pirâmide (P) foi utilizado para cada fase de teste. Todos os objetos foram construídos com blocos de plástico Lego (São Paulo, SP, Brasil).

Cada animal foi posicionado delicadamente no centro do aparato nas decorrentes fases e os objetos foram contrabalançados em cada sessão a fim de excluir qualquer preferência por algum canto do aparato. Depois de transcorridos 3 minutos em cada sessão, o animal foi retirado do aparato e devolvido para sua caixa de moradia. No final de cada procedimento comportamental, o campo aberto foi limpo com papel toalha e álcool 70%.

Contabilizou-se o tempo despendido na investigação pelos animais em cada objeto registrado a partir de uma câmera fixada sobre o campo aberto. A exploração de um objeto foi definida como a cabeça do animal voltada para o objeto a uma distância igual ou inferior a 4 cm (Ennaceur *et al.*, 1997). As análises foram realizadas considerando o tempo de exploração total gasto nos dois objetos na fase de treino (C1 + C2) e o índice de reconhecimento o qual foi definido pela diferença no tempo de exploração entre o novo objeto e o familiar divididos pelo tempo total gasto de exploração entre os mesmos objetos nas fases de teste $(X - C3) / (X + C3)$.

3.3.6 Teste da esquiva inibitória

O teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* baseia-se num modelo de memória que utiliza estímulo aversivo como fator para a obtenção da resposta comportamental (Izquierdo e Medina, 1997). O teste foi realizado em uma caixa de alumínio (50 x 50 x 35 cm), com o assoalho constituído por 15 barras de cobre paralelas, distribuídas a uma distância de 1 cm entre si, conectadas a um estimulador elétrico. Em posição lateral ao assoalho de barras encontra-se uma plataforma que não é conectada ao estimulador elétrico.

O protocolo utilizado foi adaptado por Costa e Tomaz (1998). O teste consistiu em uma sessão de habituação de 180 segundos, na qual foi permitida a exploração interna no aparato. Após 24 horas, os animais foram reexpostos à plataforma segura com a face voltada de forma oposta ao observador e imediatamente após o animal descer da plataforma e colocar as quatro patas sobre as grades, foi aplicado um choque elétrico de 0,4 mA durante 1 segundo (estímulo aversivo). A medida da retenção da memória de curta duração foi avaliada em uma sessão de teste realizada 1,5 hora (uma hora e trinta minutos) após o estímulo aversivo. Para isto, foi realizado o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo novamente cronometrado o tempo em que o animal levou para descer da plataforma. Foi estabelecido um tempo limite de 180 segundos para a execução do trabalho.

Neste teste, a retenção da memória consistiu em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um tempo maior do que aquele observado na sessão de treino (Roesler *et al.*, 2000).

3.4 Eutanásia e coleta de materiais biológicos

3.4.1 Perfusão, processamento e análise histológica

Após os testes comportamentais, os animais que realizaram esses testes (10 animais por grupo) foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg). Com os animais anestesiados, foi feita a exposição do conteúdo torácico e a coleta sanguínea direto do ventrículo esquerdo. Após isso, foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina a 0.9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%.

Após a perfusão dos animais, somente os cerebelos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados por 4 horas em solução de bouin, sendo processados em bateria de álcool e xilol e incluídos em Paraplast (McCormick).

Secções coronais de 7 micrômetros de espessura foram realizadas do cerebelo, em toda a extensão. Em seguida, o material foi destinado para análise histopatológica. Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas em estufa na temperatura de 55°C por, no máximo, 24 h antes de qualquer outro procedimento histológico.

As lâminas com as secções foram desparafinizadas em dois banhos de xilol, 2 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de (ABS II, ABS I, 90%, 80% e 70%), 1 minuto em cada, lavados em água corrente por 1 minuto e em tampão fosfato (PBS) por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente.

Depois, corados pela eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas com os cortes foram desidratadas em bateria crescente de Etanol (70%, 80%, 90%, ABS I, ABS II) e depois desalcoholizadas e diafanizadas em Xilol (Xilol I e Xilol II). Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e Entellan (Merck, USA), posteriormente submetidas à análise em microscopia óptica.

Para a avaliação quantitativa dos padrões histopatológicos foram realizadas contagens usando microscópio binocular Nikon Eclipse E200, através de uma gradícula de contagem de 0,00625 mm² acoplada a uma das oculares, em objetiva 40x. Foram contados 3 campos (gradículas) em 3 folhas cerebelares, sendo usadas 3 secções por animal, quantificando-se o número de neurônios de Purkinje.

3.4.2 Coleta de sangue e sistema nervoso central para análises

Os animais (10 animais por grupo) que não foram submetidos aos testes comportamentais, foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg). Com os animais anestesiados, foi feita a exposição do conteúdo torácico, seguido da coleta sanguínea direto do ventrículo esquerdo.

O sangue coletado foi encaminhado para a realização de quantificação de alumínio; e a outra, centrifugada a 3000 rpm durante 10 min, sendo o plasma e uma parte de hemácias armazenadas separadamente em microtubos. Em seguida, a suspensão de eritrócitos restante foi submetida a três lavagens sucessivas com NaCl 0,9% e o pellet de glóbulos vermelhos foi isolado e diluído em NaCl 0,9% para resultar em uma suspensão com hematócrito de aproximadamente 50% e volume final aproximado de 5 mL para cada amostra. Sendo assim, o plasma e a suspensão de eritrócitos a 50%, foram utilizados para os testes: TEAC, TBARS, GSH, CAT e SOD.

Após esse procedimento, as calotas cranianas foram removidas. Do cérebro foram separados o córtex pré-frontal e o hipocampo. Estes foram removidos rapidamente com o auxílio de um esteromicroscópio. Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato/salina (PBS 1x) e imersos em nitrogênio líquido para o congelamento imediato e armazenados, posteriormente em ultrafreezer.

As amostras oriundas do cérebro foram descongeladas e ressuspendidas em PBS 1X, em seguida foram sonicadas para ocorrer desagregação do tecido (concentração aproximada de 1g/mL). O homogenato das amostras foi armazenado em ultrafreezer até o momento dos ensaios da bioquímica oxidativa.

O córtex pré-frontal e o hipocampo, foram utilizados para os ensaios: TEAC, TBARS, GSH, SOD e ACAP.

3.4.2.1 Dosagem de alumínio

As amostras destinadas a essa análise foram liofilizadas com auxílio de um liofilizador modelo L 101 (Liotop, São Carlos, Brasil). Após a liofilização, foi feito um pool de amostras por grupo em virtude da pequena quantidade de massa das amostras.

Em seguida, a massa das amostras foi digerida em ácido nítrico diluído (HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em um forno de microondas com cavidade (START E, Milestone) a uma temperatura de 200 °C, durante 25 minutos.

Um volume de aproximadamente 20 µL da amostra digerida foi introduzida no espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite para a quantificação do alumínio. Cada amostra foi analisada em triplicata.

A exatidão do método foi avaliada utilizando o teste de adição e recuperação. Concentrações de 12 – 20 µg/L foram adicionadas nas amostras digeridas e assim, as recuperações de alumínio foram obtidas para o procedimento de análise proposta.

3.4.2.2 Ensaios de avaliação de parâmetros bioquímicos

3.4.2.2.1 Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O TBARS consiste em um teste colorimétrico que quantifica, a partir da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), substâncias que são geradas como metabólitos secundários da peroxidação lipídica (Dominguez-Rebolledo *et al.*, 2010) e que, portanto, atuam como indicadores da ocorrência de estresse oxidativo. Neste estudo, a avaliação de TBARS foi baseada no método de Khonn e Livesedge (1944) e adaptado por Ondei *et al.* (2013). Conforme a técnica, foi preparada, inicialmente, uma solução de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5) para preparação do TBA (10 nM). Em seguida, adicionou-se 100 μl de amostra a 500 μl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM e levou-se ao banho-maria por 60 minutos a 95°C. Após a incubação, deixou-se esfriar em temperatura ambiente por 10 minutos e adicionou-se 4,0 mL de álcool 1-butílico, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 2.500 rpm durante 10 minutos. Um volume de 3 mL de sobrenadante foram adicionados em cubeta de quartzo de 3mL e a leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mL.

3.4.2.2.2 Determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC)

O TEAC é um ensaio inespecífico destinado a medir a capacidade antioxidante total da amostra em inibir a oxidação de um composto específico, o ABTS (2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolina, 6-sulfonato) (Crews *et al.*, 2001). O nível de TEAC foi medido utilizando um método proposto por Miller *et al.* (1993) modificado por Re *et al.* (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação do ABTS (SigmaAldrich A1888) com persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da

capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação, que pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734 nm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mL}$.

3.4.2.3.3 Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada a partir da metodologia proposta por McCord e Fridowich (1969), que avalia de forma indireta a atividade de SOD a partir da inibição da redução do citocromo C, que é mediada por ânions superóxido gerados pelo sistema xantina/xantina oxidase e pode ser avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550 nm.

Para isso, uma alíquota de 50 μL foi adicionada a uma mistura de tampão, citocromo C 0,075mM, hipoxantina (Sigma-Aldrich) 1,5 mM e xantina oxidase (Sigma-Aldrich) 56 mM. A solução resultante foi incubada a 37°C e ao abrigo da luz e, após 15 minutos, foi realizada uma única leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo C para determinação da concentração enzimática, que foi expressa em unidade SOD/mg de proteína, sendo que uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo C em pH 7,8. A atividade da enzima SOD foi expressa em nmol/mL.

3.4.2.3.4 Determinação da atividade de catalase (CAT)

A atividade de CAT foi determinada de acordo com um método descrito por Aebi (1984). Para verificar o decaimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alíquotas das amostras diluídas foram adicionadas a 900 μl de solução de ação (Tris base, H_2O_2 30% e água ultrapura, pH 8). A diminuição da concentração de H_2O_2 foi estabelecida em $\lambda = 240\text{nm}$ a 25°C durante 60 segundos. A atividade de CAT foi definida como a atividade necessária para degradar 1mol de H_2O_2 durante 60 segundos (pH 8 e 25°C) e foi expressa como U/mg de proteína. Os dados da atividade enzimática obtidos nos ensaios CAT foram normalizados pelas concentrações totais de proteína, utilizando o kit comercial (Doles, Brasil).

3.4.2.3.5 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

A concentração de GSH foi determinada utilizando o protocolo descrito por Ellman (1959), com modificações. Esta técnica baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich) para ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm. Para isso, as amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Removeu-se uma alíquota de 20 µL da amostra a partir da suspensão de eritrócitos e adicionou-se num tubo de ensaio com 20 µL de água destilada e 3 mL de tampão PBS/EDTA para registrar a primeira leitura da amostra (T0), e adicionou-se 100 µL de DTNB e após 3 minutos foi feita a segunda leitura da amostra (T3) para determinar a concentração de GSH, que foi expressa em µg/ml.

3.4.2.3.6 Análise da capacidade antioxidante contra radical peroxil (ACAP)

Uma alíquota do homogenato bruto foi retirada para mensurar a capacidade antioxidante total através do método de avaliação da capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (Amado *et al.*, 2009). As amostras foram centrifugadas a 9700 RPM durante 20 min a 4°C. O sobrenadante das amostras foi exposto, em triplicatas em uma microplaca transparente de 96 poços, a um gerador de radicais peroxil, o 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich) e em outra triplicata recebeu somente água ultrapura. Após 30 minutos de reação entre a amostra e ABAP, foram levadas para mensuração da fluorescência gerada, com leituras realizadas a cada 5 minutos durante um período de 1 hora em leitor de microplaca opaca (Victor 2, Perkin Elmer), à temperatura de 35°C. Os resultados foram expressos de acordo com a diferença da área da unidade de fluorescência das curvas geradas da mesma amostra com e sem ABAP.

3.5 Análise estatística

Após tabulação dos resultados obtidos nas diversas avaliações, os valores obtidos foram inseridos no software GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software 7, INC). A verificação da normalidade de distribuição dos dados foi

testada pelo método de Shapiro Wilk ($p > 0.05$). Para as variáveis que apresentaram normalidade foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via com critério de correção a *posteriore* de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos textualmente e em gráficos com média e erro padrão (média \pm erro padrão).

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação dos níveis de alumínio no sangue

A concentração de alumínio presente no sangue dos animais expostos por 60 dias em ambos os grupos AL1 (56.4 ± 3.941) e AL2 (92.93 ± 10.27) (Fig. 2) foi maior do que o grupo não exposto (Cont – 24.61 ± 5.21).

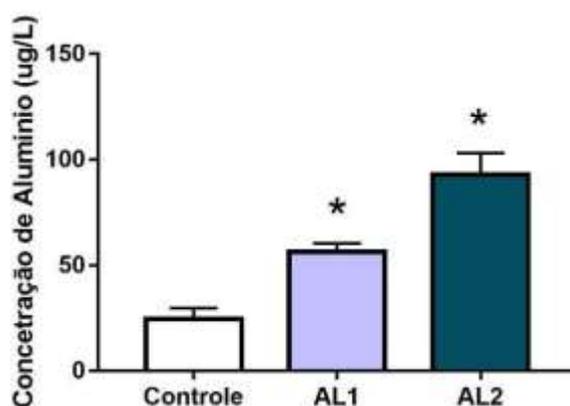


Figura 2: Concentração de alumínio no sangue de ratos expostos ao cloreto de alumínio. Os gráficos representam os resultados dos níveis de alumínio nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. One-way ANOVA seguido por Tukey's test, $p < 0.05$. * Diferença estatística em relação ao controle.

4.2 Efeitos comportamentais/funcionais

4.2.1 Exploração espontânea horizontal e vertical

Na atividade locomotora espontânea (Figura 3A) avaliada pelo teste do campo aberto, os grupos de exposição ao Al tiveram menor distância total percorrida (AL1: $5,98 \pm 0,44$; AL-D2: $6,03 \pm 0,64$) quando comparados ao grupo controle (Controle: $12,58 \pm 1,04$; $p < 0,0001$, Figura 3B). A avaliação da distância periférica executada pelos animais de ambos os grupos de alumínio (AL1: $5,42 \pm 0,94$; AL2: $5,88 \pm 1,01$) foi menor do que no grupo controle (Controle: $10,96 \pm 1,59$; $p = 0,0089$, Figura 3C) e não foi observada diferença na distância central entre todos os grupos (Controle: $0,32 \pm 0,06$; AL1: $0,23 \pm 0,02$; AL2: $0,20 \pm 0,03$; $p = 0,17$, Figura 3D), reforçando que o comprometimento motor foi não relacionado ao comportamento do tipo ansioso, uma vez que a distância central realizada não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo Al apresentam menor comportamento exploratório vertical

(AL1: $0,55 \pm 0,24$; AL2: $1,1 \pm 0,40$) em comparação ao grupo controle (Controle: $3,1 \pm 0,72$; $p = 0,0041$, Figura 3E).

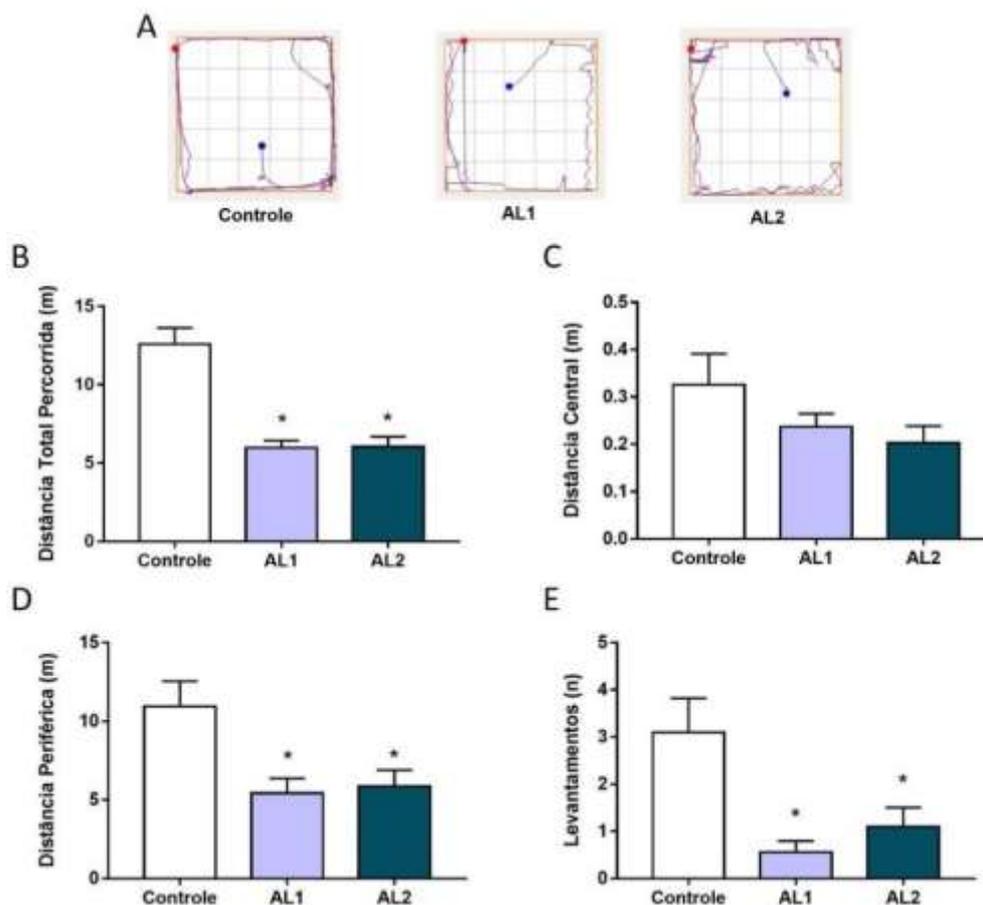


Figura 3: Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, na atividade locomotora espontânea de ratos *Wistar* com 90 dias de idade em (A) Open Field Test. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de (B) distância total em metros; (C) distância central em metros; (D) distância periférica em metros e (E) número de elevações. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao grupo controle.

4.2.2 Parâmetros ansiogênicos

O teste do labirinto em cruz elevado é um dos ensaios comportamentais mais utilizados para estimar a ansiedade em roedores. Os resultados mostram que nenhuma diferença estatística entre todos os grupos ocorreu nos parâmetros de entrada nos braços abertos (Controle: $41,4 \pm 2,07$; AL1: $30,53 \pm 7,53$; AL2: $28,02 \pm 6,94$; $p = 0,1895$, Figura 4A), tempo em braços abertos (Controle: $15,38 \pm 3,95$; AL1: $13,29 \pm 4,5$; AL2: $15,57 \pm 4,91$; $p = 0,924$, Figura 4B) e entradas no braço fechado (Controle: $4,066$; AL1: $3,66,05$; AL2: $3,85,093$; $p =$

0,961, Figura 4C). Estes resultados demonstram que a exposição em ambas as doses ao cloreto de alumínio não apresentou perfil ansiolítico.

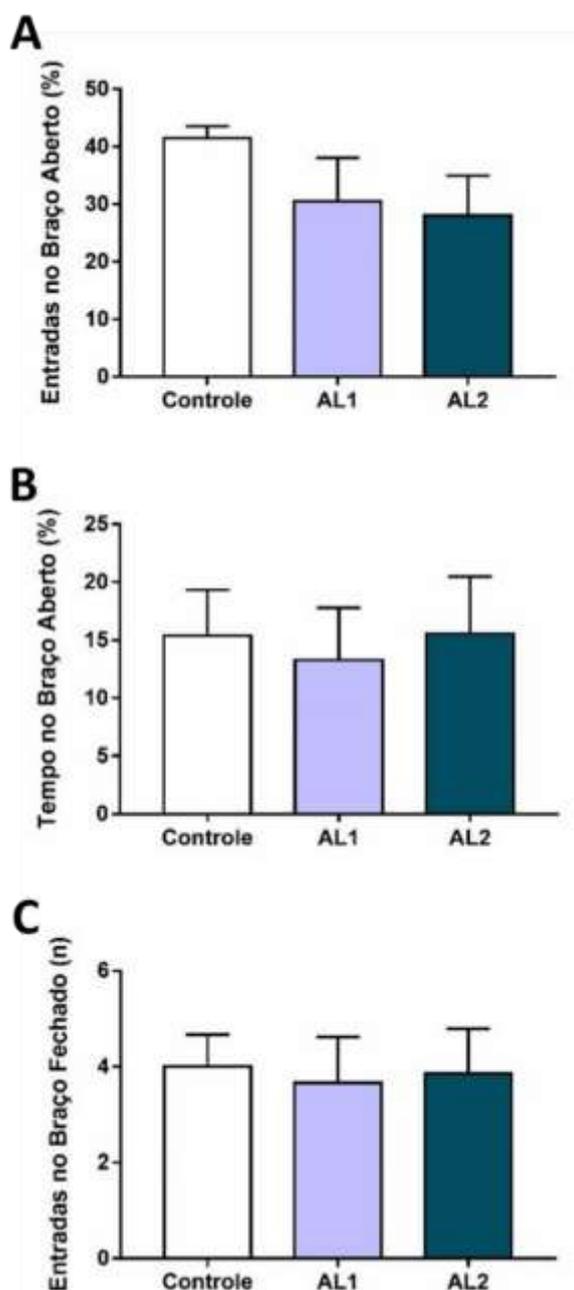


Figura 4: Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, no comportamento ansioso de ratos Wistar com 90 dias de idade em labirinto em cruz elevado. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão; (A) frequência de entrada em braços abertos (%); (B) tempo nos braços abertos (%); (C) número de entradas no braço fechado. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey, $p > 0,05$.

4.2.3 Coordenação motora forçada

Exposição ao cloreto de alumínio nas doses AL1 (8RPM: $2,7 \pm 0,39$; 16RPM: $3,7 \pm 0,76$; 20RPM: $3,6 \pm 0,85$; 25RPM: $3,2 \pm 0,57$) e AL2 (8RPM: $2,3 \pm 0,36$; 16RPM: $1,7 \pm 0,74$; 20RPM: $1,8 \pm 0,69$; 25RPM: $1 \pm 0,49$) não se mostraram eficazes em alterar o controle motor em animais quando expostos à locomoção forçada, analisada no teste do cilindro rotatório (*Rotarod*), com o número de quedas não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle (Controle: 8RPM: $2,1 \pm 0,57$, 16RPM: $2,62 \pm 0,77$; 20RPM: $2,4 \pm 0,79$; 25RPM: $1,5 \pm 0,61$; Interação: $p = 0,4901$, Figura 5).

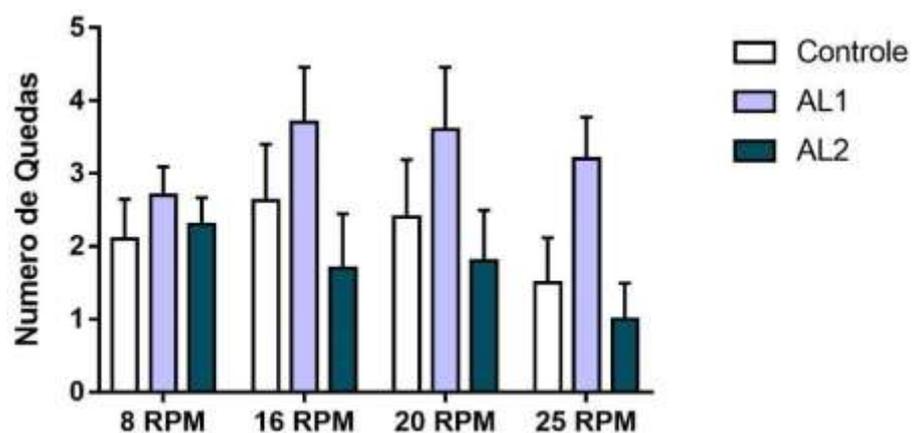


Figura 5: Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, na locomoção forçada de ratos Wistar com 60 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. ANOVA two-way e teste post-hoc de Tukey, $p > 0,05$.

4.2.4 Coordenação motora fina e equilíbrio

Para avaliação da coordenação motora fina e equilíbrio, analisamos o número de quedas na travessia das vigas suspensas do BWT. Os animais expostos em AL1 (S12mm: $5,83 \pm 0,94$; S5mm: $4 \pm 0,44$; C17mm: $1,33 \pm 0,71$; C11mm: $5,5 \pm 1,08$) e AL2 (S12mm: $5,07 \pm 0,6$; S5mm: $4,67 \pm 0,89$; C17mm: $2,5 \pm 0,34$; C11mm: $4,75 \pm 0,58$) não apresentaram diferenças na coordenação motora e equilíbrio em relação aos animais do grupo controle (S12mm: $4,11 \pm 0,28$; S5mm: $3,38 \pm 0,53$; C17mm: $0,81 \pm 0,29$; C11mm: $5,66 \pm 0,86$; Interação: $p = 0,4$, Figura 6).

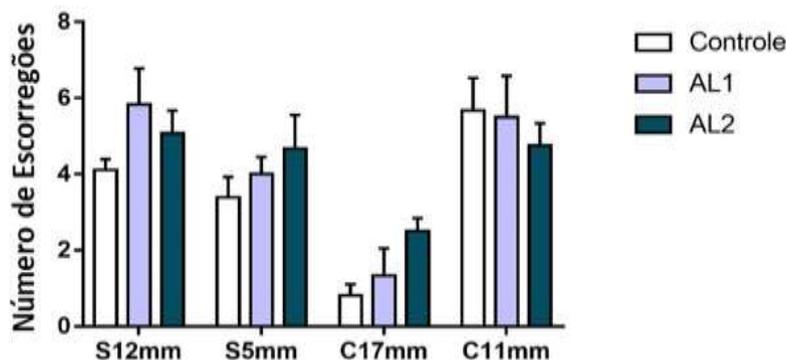


Figura 6: Efeitos da administração de alumínio, durante 60 dias, na coordenação motora fina e no equilíbrio de ratos Wistar com 60 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão dos números de falha em vigas quadradas de 12 mm e 5 mm (S); Vigas circulares de 17 mm e 11 mm (C) do teste Beam Walking. ANOVA two-way e teste post-hoc de Tukey, $p > 0,05$.

4.2.5 Memória de reconhecimento a curto prazo

Durante a fase de treino no teste de reconhecimento de objetos (Figura 7A) os animais não mostram diferenças significativas no comportamento exploratório das peças na arena (Controle: $6,22 \pm 17,36$; AL1: $3,71 \pm 1,26$; AL2: $6,77 \pm 0,74$; $p > 0,05$), mostrando que as doses de alumínio não foram capazes de interferir neste tipo de comportamento. Meia hora após a fase de treino (Figura 7B), durante a fase de teste, quando foram expostos a um objeto novo na arena, podemos ver um comportamento diferente, no qual os animais expostos à dose AL2 ($-0,2036 \pm 0,1019$) não apresentaram uma preferência na exploração deste novo objeto em relação aos animais do grupo controle ($0,5714 \pm 0,202$; $p < 0,05$). Já o grupo AL1 ($0,2 \pm 0,2$) não apresentou diferença em relação aos demais grupos experimentais.

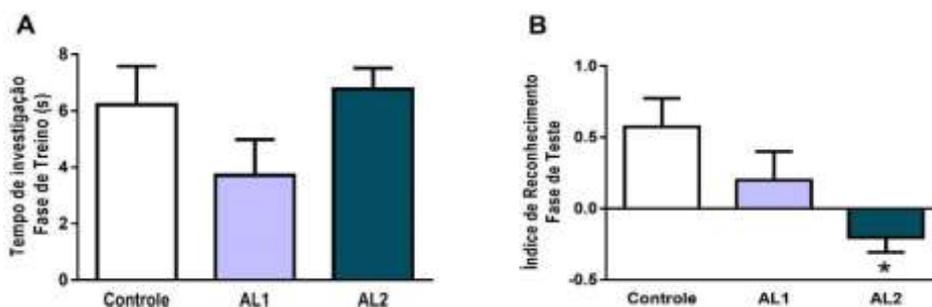


Figura 7: Efeitos da exposição ao alumínio na memória de reconhecimento de curto prazo de ratos adultos no teste de reconhecimento de objetos. Os resultados são expressos como média

± erro padrão do(s) tempo(s) de investigação na fase de treinamento e (B) o índice de reconhecimento na fase teste realizado 30 minutos após a sessão de treinamento, calculado como a razão do tempo gasto pelos ratos investigando os objetos novos e familiares. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação aos demais grupos.

4.2.6 Memória de curto e longo prazo

A exposição ao cloreto de alumínio não provocou diferença na fase de treino dos animais durante teste da esQUIVA inibitória (Controle: $11,7 \pm 4,16$; AL1: $6,83 \pm 1,70$; AL2: $3,62 \pm 0,96$; $p > 0,05$; Figura 8). Quando expostos novamente, 1.5 horas depois, os animais do grupo AL2 ($22,7 \pm 8,51$; $p < 0,05$) permaneceram por um tempo menor na plataforma do que os demais animais (Controle: $110,3 \pm 24,28$; AL1: $104,2 \pm 23,24$). Quando avaliados 24 horas após a sessão do treino podemos ver que os dois grupos expostos ao alumínio (AL1: $24,5 \pm 6,56$; AL2: $17,83 \pm 7,69$; $p < 0,05$) apresentaram um comportamento semelhante, com redução do tempo sobre a plataforma em relação aos animais do grupo controle ($137,9 \pm 23,53$).

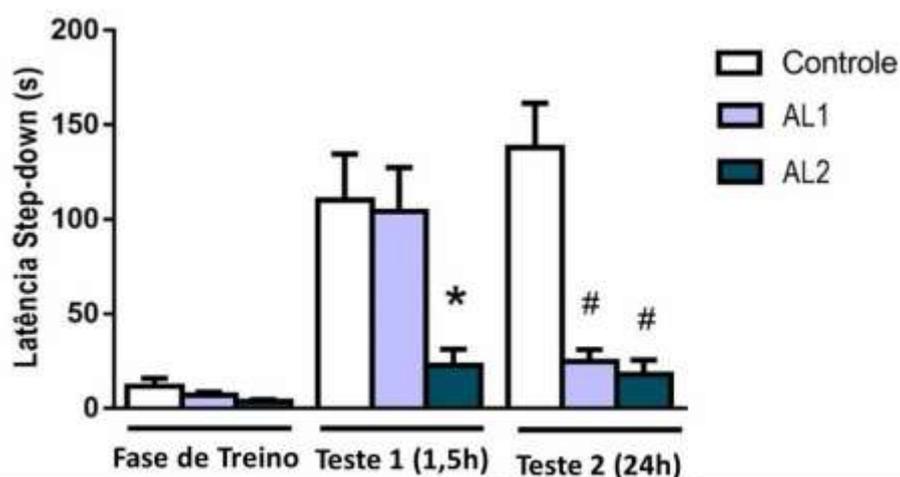


Figura 8: Os efeitos da exposição ao alumínio na memória de curto e longo prazo. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da latência de descida (step down) (s) na fase de Treino no Teste 1 (memória de curto prazo) e no Teste 2 (memória de longa duração). One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação aos demais grupos do Teste 1. # Diferença estatística em relação ao grupo controle no Teste 2.

4.2.7 Avaliação da densidade de células de Purkinje

A densidade de células de Purkinje no cerebelo dos animais expostos por 60 dias ao cloreto de alumínio em ambos os grupos (AL1 – $8,35 \pm 0,40$; AL2 – $7,75 \pm 0,55$) (Fig. 9) não se mostrou diferente ao encontrado no grupo não exposto (Cont – $9,33 \pm 0,5$).

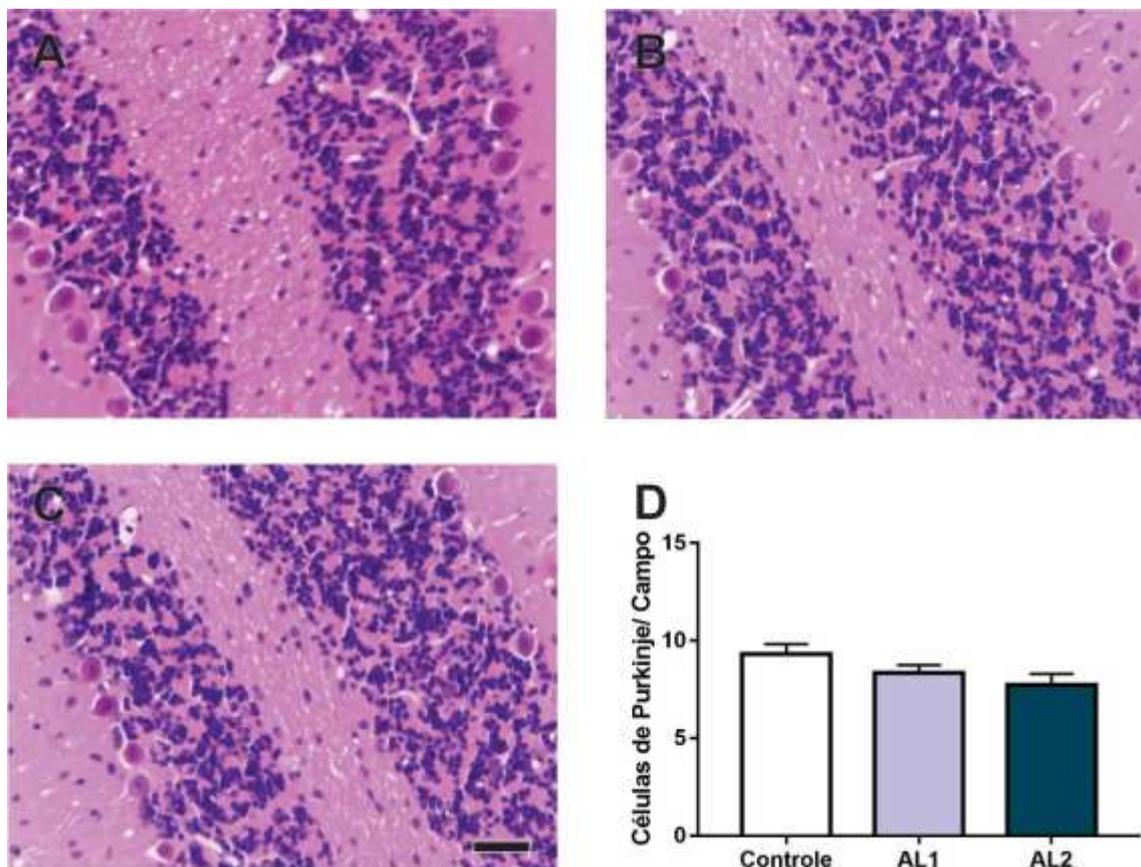


Figura 9: Efeitos da exposição crônica ao alumínio, durante 60 dias, em células de Purkinje no cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa o controle e em B e C (AL1 e AL2, respectivamente). Em D gráfico representando análise quantitativa de células de Purkinje nos grupos. Resultados expressos com média erro padrão. One-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey, $p < 0,005$ comparado ao grupo controle. Escala = $100\mu\text{m}$.

4.3 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo:

4.3.1 Em eritrócitos

A capacidade antioxidante total (Figura 10A) nos eritrócitos nos grupos AL1 ($1,92 \pm 0,06 = 81,3\% \pm 2,74\%$, respectivamente) e AL2 ($2,05 \pm 0,11 = 86,97\% \pm 4,78\%$, respectivamente), mostraram-se reduzidas quando comparadas ao grupo controle ($2,36 \pm 0,06 = 100\% \pm 2,9\%$, respectivamente; $p > 0,05$). Os níveis de peroxidação lipídica (Figura 10B) mostraram-se elevados nos

animais do grupo AL2 ($1,12 \pm 0,03 = 128,7\% \pm 3,44\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($0,87 \pm 0,02 = 100\% \pm 3,27\%$, respectivamente), no grupo AL1 não houve diferença significativa ($0,93 \pm 0,08 = 107,3\% \pm 9,41\%$, respectivamente).

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de GSH (Figura 10C) quando comparado todos os grupos experimentais (Controle: $11,34 \pm 0,75 = 100\% \pm 6,67\%$, respectivamente; AL1: $11,33 \pm 0,81 = 99,91\% \pm 7,14\%$, respectivamente; AL2: $12,51 \pm 0,38 = 110,3\% \pm 3,40\%$, respectivamente; $p > 0,05$). Este padrão também foi encontrado na atividade da SOD (Figura 10D) não havendo diferença significativa entre os grupos (Controle: $202 \pm 2,09 = 100\% \pm 1,00\%$, respectivamente; AL1: $202,8 \pm 1,51 = 95,58\% \pm 0,75\%$, respectivamente; AL2: $203,8 \pm 1,12 = 98,95\% \pm 0,56\%$, respectivamente; $p > 0,05$) após os 60 dias de exposição do animal ao alumínio.

A atividade da catalase (Figura 10E) nos grupos tratados com alumínio (AL1: $0,024 \pm 0,0012 = 136,4\% \pm 6,98\%$, respectivamente; AL2: $0,026 \pm 0,0015 = 146,9\% \pm 8,40\%$, respectivamente; $p < 0,05$) mostrou-se elevada em relação ao grupo controle ($0,018 \pm 0,0013 = 100\% \pm 7,52\%$, respectivamente).

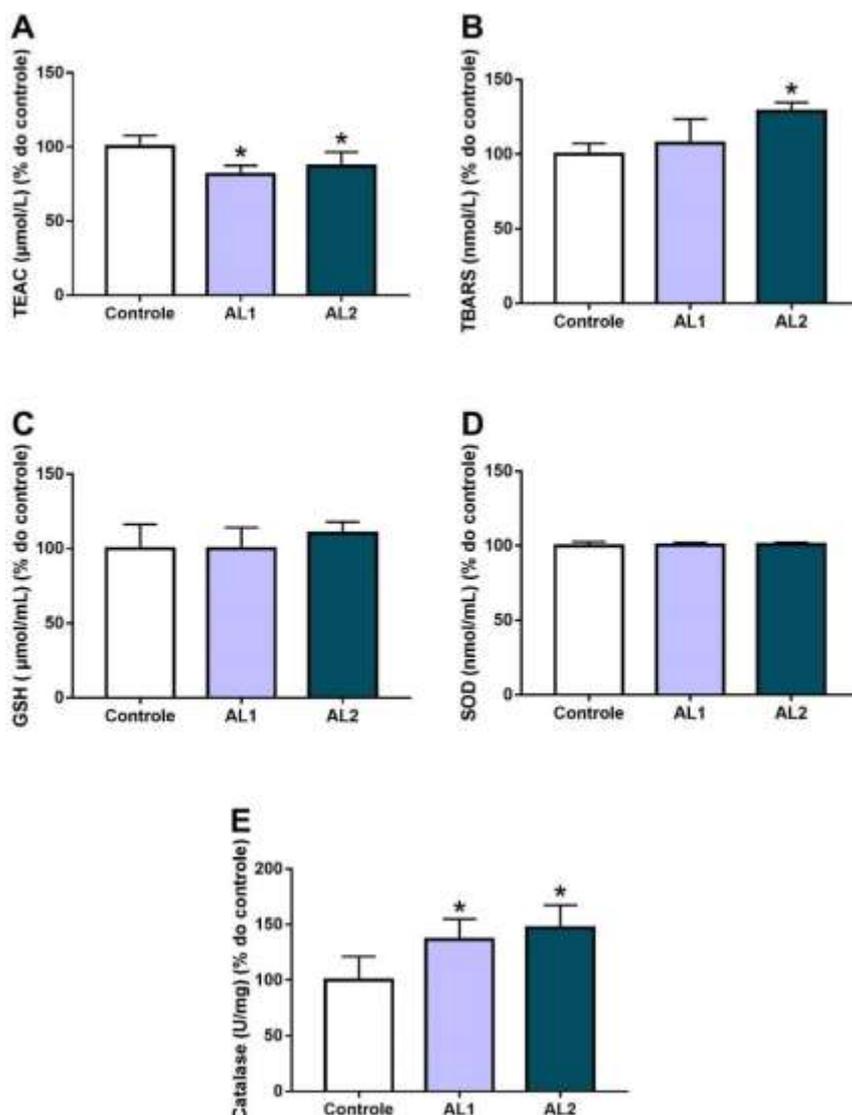


Figura 10: Avaliação da bioquímica oxidativa nos eritrócitos. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. (A) TEAC, (B) TBARS, (C) GSH, (D) SOD e (E) Catalase. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao controle.

4.3.2 No plasma sanguíneo

Os níveis de TEAC (Figura 11A) no plasma sanguíneo foram reduzidos no grupo AL2 ($3,24 \pm 0,055 = 103,9\% \pm 1,77\%$, respectivamente) em comparação com o grupo AL1 ($3,06 \pm 0,022 = 98,2\% \pm 0,72\%$, respectivamente; $p < 0,5$), mas sem diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ($3,12 \pm 0,03 = 100\% \pm 1,09\%$, respectivamente; $p > 0,05$).

Na avaliação da peroxidação lipídica (Figura 11B), observamos um aumento nos níveis de TBARS nos grupos AL1 ($3,29 \pm 0,032 = 182,3\% \pm$

17,74%, respectivamente) e AL2 ($3,88 \pm 0,21 = 215\% \pm 11,89\%$, respectivamente) quando comparados ao controle ($1,80 \pm 0,17 = 100\% \pm 9,7\%$, respectivamente; $p < 0,05$).

Os níveis de GSH (Figura 11C) não sofreram alterações significativas nos grupos experimentais ($p < 0,05$). Comportamento semelhante foi observado na atividade da SOD (Figura 10D), onde não houve diferença significativa (Controle: $140,7 \pm 3,57 = 100\% \pm 2,54\%$, respectivamente), AL1: $134,4 \pm 3,14 = 95,58\% \pm 2,23\%$, respectivamente; AL2: $139,2 \pm 6,41 = 98,95\% \pm 4,55\%$, respectivamente; $p > 0,05$) após 60 dias de exposição do animal ao alumínio.

No entanto, a atividade da catalase (Figura 11E) foi reduzida no grupo AL2 ($0,045 \pm 0,001 = 69,24\% \pm 3,05\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($0,063 \pm 0,005 = 100\% \pm 7,89\%$, respectivamente), mas o grupo AL1 não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle ($0,055 \pm 0,005 = 84,97\% \pm 8,53\%$, respectivamente).

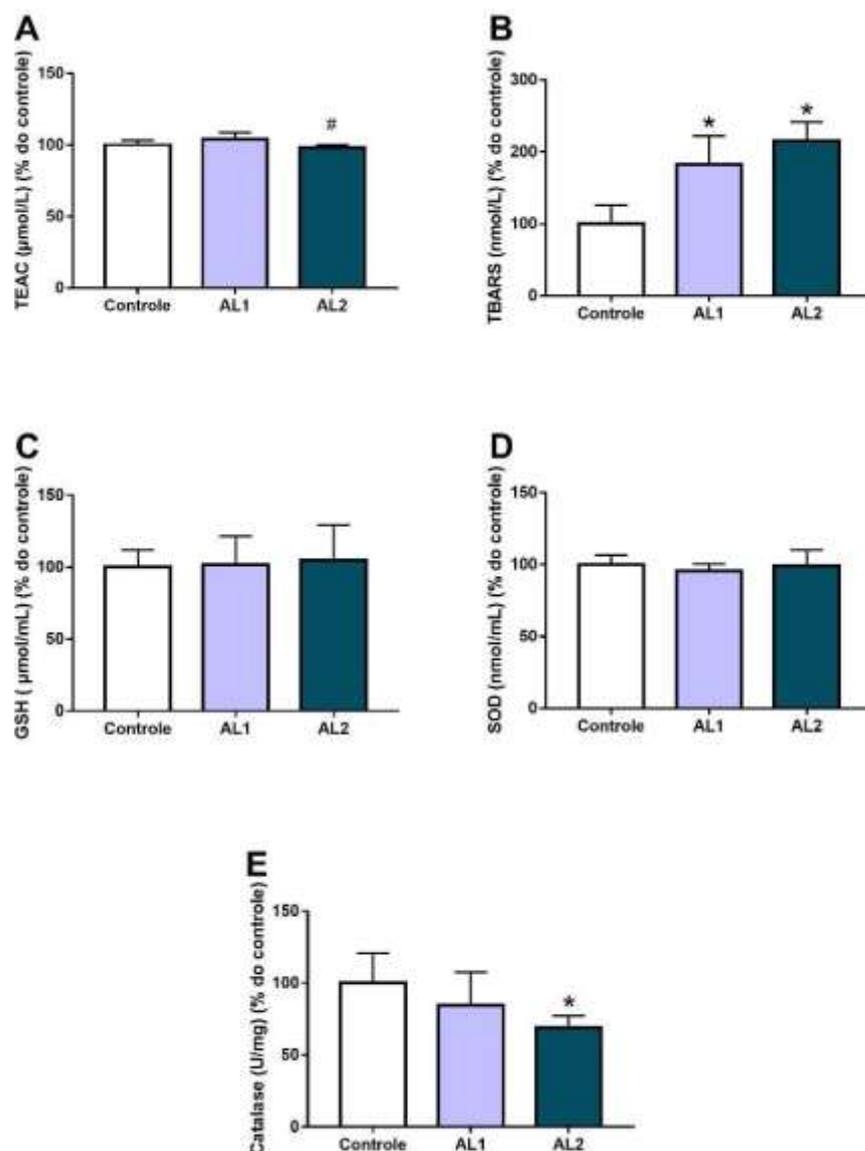


Figura 11: Avaliação da bioquímica oxidativa nos Plasma. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. (A) TEAC, (B) TBARS, (C) GSH, (D) SOD e (E) Catalase. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao controle; # diferença estatística em relação ao grupo AL1.

4.3.3 Em hipocampo

O efeito do alumínio no hipocampo sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) (Figura 12A), mostrou-se reduzida nos animais do grupo AL1 ($4,97 \pm 2,48 = 69,31\% \pm 7,48\%$, respectivamente; $p < 0,5$) e do grupo AL2 ($3,42 \pm 1,43 = 54,62\% \pm 12,16\%$, respectivamente; $p < 0,5$) em relação ao grupo controle

($6,16 \pm 2,51 = 100\% \pm 12,3\%$, respectivamente). Na avaliação da peroxidação lipídica, foi observado um aumento dos níveis de TBARS (Figura 12B) nos animais do grupo AL1 ($106,7 \pm 4,30 = 143,3\% \pm 5,78\%$, respectivamente) e AL2 ($138,3 \pm 13,22 = 185,8\% \pm 17,76\%$) em relação ao grupo controle ($74,44 \pm 7,43 = 100\% \pm 9,98\%$, respectivamente; $p < 0,05$).

Os níveis de GSH (Figura 12C) nos grupos experimentais e controle não mostram diferenças significativas (Controle: $87,23 \pm 8,33 = 100\% \pm 9,55\%$, respectivamente; AL1: $77,04 \pm 5,00 = 88,32\% \pm 5,73\%$, respectivamente; AL2: $72,41 \pm 2,07 = 83,01\% \pm 2,37\%$, respectivamente; $p > 0,05$). O mesmo comportamento acontece na atividade da SOD (Figura 12D), não há diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle (Controle: $195,8 \pm 0,623 = 100\% \pm 0,31\%$, respectivamente; AL1: $189,5 \pm 2,11 = 96,61\% \pm 1,07\%$, respectivamente; AL2: $191,9 \pm 1,89 = 97,86\% \pm 0,96\%$, respectivamente; $p > 0,05$) após os 60 dias de exposição do animal ao alumínio.

No entanto, a atividade da catalase (Figura 12E) mostrou-se reduzida nos grupos AL1 e AL2 (AL1: $0,129 \pm 0,009 = 63,27\% \pm 4,84\%$, respectivamente; AL2: $0,090 \pm 0,008 = 44,27\% \pm 4,01\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação aos animais controles ($0,209 \pm 0,010 = 100\% \pm 5,23\%$, respectivamente). Comportamento semelhante foi encontrado nos níveis de ACAP, com os animais controles ($5,38 \pm 0,48 = 100\% \pm 8,99\%$, respectivamente) possuindo níveis elevados em relação aos grupos AL1 e AL2 (AL1: $3,11 \pm 0,30 = 57,79\% \pm 5,73\%$, respectivamente; AL2: $2,18 \pm 0,39 = 40,59\% \pm 7,29\%$, respectivamente; $p < 0,05$).

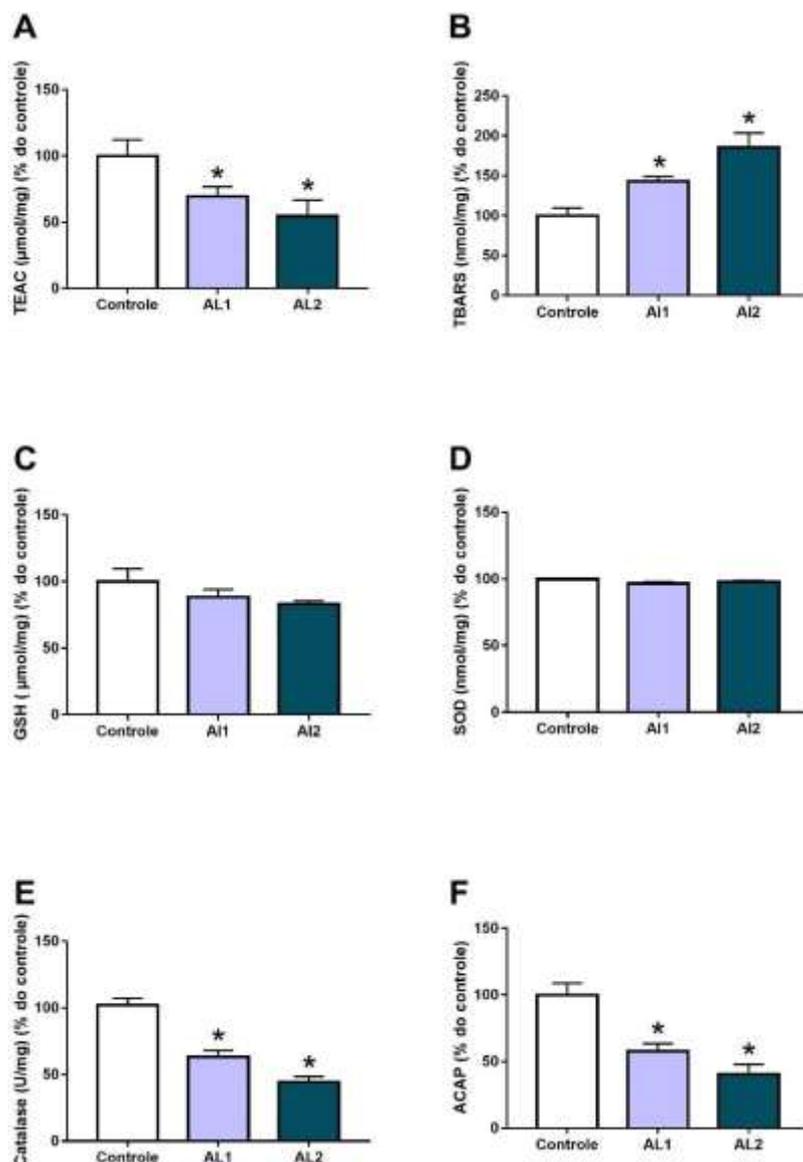


Figura 12: Avaliação da bioquímica oxidativa no hipocampo. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. (A) TEAC, (B) TBARS, (C) GSH, (D) SOD, (E) Catalase e (F) ACAP. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao controle.

4.3.4 Em cortex pré-frontal

A capacidade antioxidante total (Figura 13A) presente no córtex pré-frontal, mostrou-se significativamente reduzida no grupo AL2 ($13,03 \pm 0,88 = 66,01\% \pm 4,47\%$, respectivamente; $p < 0,5$) em relação ao grupo controle (Controle: $19,75 \pm 1,53 = 100\% \pm 7,77\%$, respectivamente; AL1: $15,85 \pm 1,30 = 80,23\% \pm 6,59\%$, respectivamente). Na avaliação da peroxidação lipídica, os

níveis de TBARS (Figura 13B) mostraram-se elevados nos grupos AL1 ($105,6 \pm 10,42 = 200,0\% \pm 19,73\%$, respectivamente) e AL2 ($157,6 \pm 9,36 = 298,6\% \pm 17,8\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($52,78 \pm 5,24 = 100,0\% \pm 9,93\%$, respectivamente).

Os níveis de GSH (Figura 13C) não mostraram diferenças significativas quando comparados os grupos experimentais e controle (Controle: $77,05 \pm 5,07 = 100\% \pm 6,58\%$, respectivamente; AL1: $85,15 \pm 2,21 = 110,5\% \pm 2,87\%$, respectivamente; AL2: $78,59 \pm 4,08 = 102,0\% \pm 5,30\%$, respectivamente; $p > 0,05$). Comportamento semelhante foi verificada na atividade da SOD (Figura 13D), onde não há diferenças significativas entre todos os grupos. (Controle: $190,7 \pm 2,66; 100,0\% \pm 1,40\%$, respectivamente; AL1: $184,5 \pm 1,43 = 97,64\% \pm 0,75\%$, respectivamente; AL2: $183,2 \pm 1,84 = 96,98\% \pm 0,97\%$, respectivamente; $p > 0,05$) após 60 dias de exposição do animal ao alumínio.

No entanto, a atividade da CAT (Figura 13E) foi reduzida no grupo AL2 (AL2: $0,150 \pm 0,017 = 31,72\% \pm 4,31\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação aos animais controle e AL1 (Controle: $0,154 \pm 0,012 = 100,0\% \pm 7,84\%$, respectivamente; AL1: $0,050 \pm 0,006 = 94,0\% \pm 11,02\%$, respectivamente). Os níveis de ACAP estão elevados nos animais controles ($6,33 \pm 0,51 = 100,0\% \pm 8,17\%$, respectivamente) em relação aos grupos expostos ao alumínio (AL1: $2,33 \pm 0,50 = 36,9\% \pm 7,94\%$, respectivamente; AL2: $2,26 \pm 0,42 = 35,69\% \pm 6,73\%$, respectivamente; $p < 0,05$).

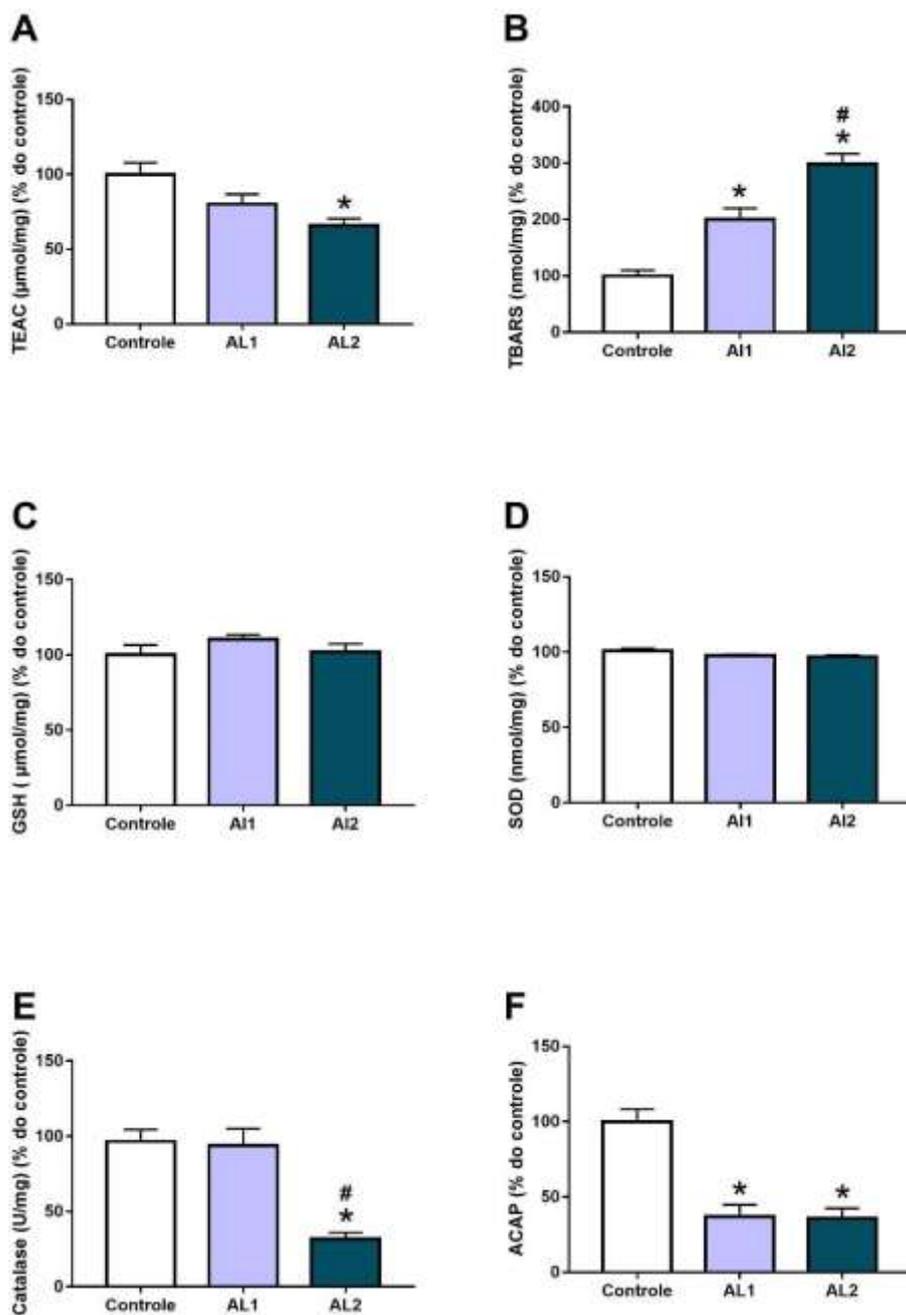


Figura 13: Avaliação da bioquímica oxidativa no córtex pré-frontal. Os gráficos representam, como percentual do controle, os resultados da bioquímica da oxidação nos grupos que receberam Alumínio por período de 60 dias. (A) TEAC, (B) TBARS, (C) GSH, (D) SOD, (E) Catalase e (F) ACAP. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao controle; # diferença estatística em relação ao grupo AL1.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo observamos déficits exploratórios, entretando sem promover alterações em parâmetros de ansiedade ou coordenação motora fina e equilíbrio; houve alteração nos níveis de alumínio no hipocampo, redução na cognição e desbalanço na bioquímica oxidativa nas regiões associadas a memória (hipocampo e córtex pré-frontal) e também observamos alterações hematológicas e um estado de estresse oxidativo gerado pela exposição crônica ao alumínio por 60 dias.

Para este estudo utilizamos duas doses de alumínio, estas tem como base a exposição média de centros urbanos (1.5 mg / kg / day) (Barabasz *et al.*, 2002) e o total de AL máximo preconizado pela WHO (5.2 mg/kg/day) (Who, 2010) tendo como base o somatório dos níveis relatados pelo consumo de alimentos e água. Neste trabalho realizamos um ajuste de dose de humanos para roedores segundo Reagan-Shaw (2008), de forma que 1,5 mg para 8,3mg e a dose 5,2 mg foi para 32mg. Esse ajuste permite adequar uma dose representativa em humanos, para uma dose realmente equivalente roedores, devido o seu mecanismo de metabolização e excreção ser mais elevado por possuir menor área de superfície corpórea (Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Sharma e Mcneill, 2009).

Neste trabalho escolhemos a via oral, onde o AL é absorvido no intestino via paracelular através dos enterócitos por processos passivos (Exley *et al.*, 1996). Embora existam evidências da baixa absorção do Al por via oral, nosso trabalho mesmo em baixas doses conseguiu mostrar que essa via e nessas doses há sim alterações relacionadas a ingestão do metal (Roskams e Connor, 1990; Cunat, L. *et al.*, 2000) e transcelular envolvendo processos ativos, como transporte de sódio (Yokel, 2002; Akinrinade *et al.*, 2015). Uma vez na corrente sanguínea, o Al liga-se a várias proteínas plasmáticas, por exemplo, 93% é ligada a transferrina (Roskams e Connor, 1990; Nagaoka e Maitani, 2005). Além disso, é distribuído de forma desigual nos tecidos de animais experimentais tratados com alumínio, sendo este comportamento também encontrado em humanos (Roskams e Connor, 1990; Greger e Sutherland, 1997; Yokel e Mcnamara, 2001; Yokel, 2002). Em nosso trabalho podemos observar que a

exposição crônica a Al por 60 dias gerou um nível deste metal no sangue periférico equivalente a 92.93µg/mL.

O alumínio que está presente no sangue periférico pode utilizar a proteína plasmática transferrina para penetrar na barreira hematoencefálica por endocitose, elevando assim a concentração deste metal no sistema nervoso central (SNC) (Nagaoka e Maitani, 2005). Vários estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* relacionam o acúmulo deste metal no encéfalo com doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, por modificar o metabolismo e influenciar em diversas funções do SNC (Yokel, 2000; Zatta *et al.*, 2002; Kawahara e Kato-Negishi, 2011).

5.1 Efeitos da exposição crônica ao alumínio no sangue

Os resultados deste estudo demonstraram que a exposição crônica ao cloreto de alumínio (AlCl₃), em baixa dose, foi capaz de promover alterações hematológicas e estado de estresse oxidativo. A presença destas alterações está associada à capacidade do Al em participar de reações importantes para a osmeostase do sistema sanguíneo.

O plasma é um tecido especial líquido, cuja as suas principais funções são transporte de nutrientes, hormônios e proteínas (Yu *et al.*, 2011; Benjamin Mclaughlin, 2012). Sendo assim, exerce um papel crucial no funcionamento do corpo humano, carregando todos os componentes sanguíneos essenciais para o organismo como plaquetas, eritrócitos e leucócitos (Benjamin e Mclaughlin, 2012). Desta forma, utilizamos o plasma como primeira linha de investigação para a predição do estresse oxidativo. A capacidade antioxidante do plasma é a principal medida para avaliar o estado e/ou potencial de estresse oxidativo (Wendland *et al.*, 2001; Tonin *et al.*, 2015). Em nosso estudo observamos que os níveis de TEAC no grupo AL2 diminuíram em relação ao grupo AL1.

Embora não tenhamos encontrado alterações nas atividades de GSH e SOD, a atividade de CAT diminuiu nos grupos AL1 e AL2, a fim de confirmar um estado de estresse oxidativo, quantificamos os níveis de TBARS e observamos um aumento da peroxidação lipídica no grupo AL2, nesse sentido observamos um desequilíbrio do sistema antioxidante no plasma (Ayala *et al.*, 2014; Montes-Nieto *et al.*, 2017).

Esse desequilíbrio ocorre, pois a catalase é inibida na presença de acúmulo de radical superóxido (Kono e Fridovich, 1982; Galbusera *et al.*, 2006), esse possui a capacidade de formar um complexo mais potente com o Al (Mujika *et al.*, 2011), prejudicando a sua remoção pela SOD consequentemente não decompondo o peróxido de hidrogênio de forma rápida (Halliwell, 2006), isso pode explicar os níveis de catalase baixos encontrados nesse trabalho.

Além disso, mesmo sem diferenças significativas em SOD, é possível que os níveis inalterados dessa enzima estejam relacionados à reação $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot NO$, mais rápida em relação à SOD (Halliwell, 2006; Fukai e Ushio-Fukai, 2011), além do fato desta agir de maneira eficiente em condições normais, com baixa concentração de $O_2^{\cdot-}$ (Ushio-Fukai, 2009; Fukai e Ushio-Fukai, 2011). Somando-se a isso, os valores de GSH permaneceram inalterados, possivelmente pela oxidação de NADH oriundo acúmulo do complexo alumínio/superóxido (Ushio-Fukai, 2009).

A fim de continuar investigando a influência do alumínio nos demais componentes do tecido sanguíneo, foram avaliados os eritrócitos, pois possuem como papel principal o transporte de oxigênio e gás carbônico para os tecidos, são responsáveis pela manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo, também são equipados com um sistema antioxidante, essenciais para a sua integridade (Kuhn *et al.*, 2017). Assim, verificamos que a capacidade antioxidante total nos grupos expostos estão diminuídas em relação ao controle, os níveis de SOD mantiveram-se inalterados, isto pode ocorrer pois o Al possui a capacidade de complexar-se com cofatores desta enzima, prejudicando a eficácia da mesma, pois mesmo em situação estresse, esta via não consegue responder positivamente ao estímulo (Rui e Yongjian, 2010; Liu *et al.*, 2018).

Os níveis de GSH permaneceram inalterados (Murakami e Yoshino, 2004) e a atividade da CAT aumentou (Bhalla e Dhawan, 2009), esse comportamento foi visto em outros trabalhos, onde a atividade de GSH foi limitada e por um sistema compensatório a CAT foi estimulada positivamente (Wang *et al.*, 2012). Nesse contexto, para confirmando um estado de estresse oxidativo, os níveis de TBARS estão aumentados, mostrando que existe peroxidação lipídica (Gangwar *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho podemos observar a complexidade do sistema sanguíneo frente a um estado de estresse oxidativo, possuindo diferentes

comportamentos a uma mesma exposição, mostrando ser suscetível aos danos oxidativos e estes danos sendo repercutido de maneira sistêmica.

5.2 A exposição crônica ao alumínio e o comprometimento motor

O controle motor, depende da interação de diversas regiões para receber as informações, processar e enviar o comando motor gerado para os efetores que produzem essa resposta.(Schalow e Zach, 2000; Berniker e Kording, 2009; D'avella e Lacquaniti, 2013). Nesse contexto, para avaliar o controle motor, a locomoção é uma excelente ferramenta, uma vez que todos os mecanismos, desde a geração de padrões simples, como uma caminhada, até ajustes de controles complexos e precisos de coordenação e equilíbrio estão envolvidos na locomoção (Clarac *et al.*, 2004; Goulding, 2009; Lacquaniti *et al.*, 2012; Kiehn, 2016)

O primeiro teste utilizado para avaliar o desempenho motor do animal, foi a locomoção espontânea, onde o animal explorou uma arena e os seguintes parâmetros foram avaliados, distância total percorrida, distância percorrida no centro e na periferia da arena e a quantidade de levantamentos(Lau *et al.*, 2008; Tatem *et al.*, 2014). Observamos que após o período de exposição em ambas as concentrações, os animais apresentaram uma redução na capacidade exploratória total (horizontal e vertical), além de reduzir a distância percorrida na distância do aparato. Este dado mostra uma diminuição da capacidade motora espontânea desse animal. Entretanto, este teste não é sensível para avaliar a causa da disfunção motora, devido a fatores externos, tais como cognição, ansiedade e condições ambientais, que podem contribuir significativamente para um aumento da variabilidade do comportamento motor desse animal (Carola *et al.*, 2002; Lecorps *et al.*, 2016).

Buscando um fator que possa ter influenciado neste parâmetro motor, avaliamos ansiedade/emocionalidade neste animal, utilizando o plus maze test, um teste sensível que utiliza a aversão do animal por ambientes elevados e abertos, instigando a dualidade do mesmo, uma vez que ratos possuem uma tendência natural a explorar novos ambientes (Morato e Brandão, 1997; Komada *et al.*, 2008; Deacon, 2013b; Biedermann *et al.*, 2017). Observamos que em ambas as concentrações utilizadas de Al, os animais não apresentaram

alterações no comportamento ansiogênico ou ansiolítico. Desta forma, podemos sugerir que as alterações nos parâmetros motores não estão relacionadas a alterações emocionais.

Sendo o parâmetro emocional inconclusivo, outro fator que poderia determinar alterações na exploração espontânea, seria a presença de disfunções motoras, estas investigadas a partir de um estímulo motor forçado no animal, utilizando o teste do rotarod, metodologia sensível e com alta reprodutibilidade (Hamm *et al.*, 1994; Galante *et al.*, 2009; Deacon, 2013a). O animal é posicionado on a rotating rod e tem que manter o equilíbrio, um sensor embutido logo abaixo registra o tempo até que o animal perca o equilíbrio e caia from the rotating rod (Deacon, 2013a; Teixeira *et al.*, 2014). Quando avaliamos o número de quedas, nosso estudo mostrou que não houve alterações no controle motor, quando avaliado o componente equilíbrio.

Ainda buscando avaliar possíveis disfunções motoras, investigamos componentes da coordenação motora fina, por meio do teste Beam Walking, onde os animais encontravam-se em uma extremidade da vara, este um local alto e aberto, sendo então encorajados a percorrer até a outra extremidade da vara, onde encontra-se a safe box, como forma de evidenciar parâmetros de coordenação motora fina e equilíbrio, que pode ser visto pela quantidade de deslizamentos das patas do animal nas varas de diferentes tamanhos e espessuras (Goldstein e Davis, 1990; Stanley *et al.*, 2005; Luong *et al.*, 2011), não mostrando diferença ao final dos 60 dias de exposição nas duas doses de AL.

Os movimentos voluntários, podem sofrer esta influência devido ao seu complexo conjunto de redes e vias neuronais localizadas em várias regiões do cérebro, como o córtex, responsável pelo planejamento, programação motora, assim como ser a região efetora do movimento (Rothwell *et al.*, 2002; Christie *et al.*, 2007; Harrison e Murphy, 2012). O mesmo apresenta várias camadas em sua morfologia, sendo na camada 4, onde pode-se encontrar a população de neurônios piramidais, os principais neurônios envolvidos por gerar grande parte da excitação iniciada no córtex, enviando comandos via medula espinhal até os músculos para o movimento ser realizado (Harrison e Murphy, 2012; Vitrac *et al.*, 2014; Kawaguchi, 2017), sendo um excelente marcador de dano motor (Oliveira *et al.*, 2014). A rede de regiões corticais motoras, pré-motoras e somatossensoriais (Misra e Coombes, 2015), são responsáveis pelo controle do movimento, onde

cada uma desempenha um papel específico desde a preparação, execução e movimento voluntário (Sheets e Shepherd, 2011).

Além disso, outras regiões estão envolvidas nesse processo, como os gânglios de base e o cerebelo, este sendo responsável por modular as vias motoras, produzindo movimentos planejados e coordenados, bem como aprendizagem motora (Robinson e Fuchs, 2001; Prevosto e Sommer, 2013; Coco e Perciavalle, 2015; Sokolov *et al.*, 2017). Entre os tipos celulares de Purkinje não se mostraram sensíveis a exposição ao Alumínio, estes neurônios são fundamentais na circuitaria cerebelar, responsáveis pelo processamento de informações durante eventos motores buscando uma perfeita execução do movimento, contribuindo no controle motor (Prevosto e Sommer, 2013; Sauerbrei *et al.*, 2015; Gaffield *et al.*, 2016). Sendo assim, a população cerebelar de células analisadas no intuito de avaliar o dano (Pascual *et al.*, 1998; Louis *et al.*, 2014).

Nosso trabalho traz evidências que a exposição em baixas doses alumínio não é capaz de promover alterações motoras significativas, não influenciando em um quadro emocional não promovendo um efeito ansiogênico.

5.3 Efeitos da exposição crônica ao alumínio e a cognição

Uma vez no sistema nervoso, o alumínio intensifica a capacidade de transição dos metais pró-oxidantes, como Ferro (Fe) e Cobre (Cu) (Exley 2004). Sendo assim, é capaz de participar de reações responsáveis pela formação de radicais livres, como superóxido ($O_2 \bullet-$), hidroperóxil, hidroxila e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ruipérez *et al.*, 2012). Este metal possui a capacidade de formar um complexo com o superóxido, otimizando as reações de oxidação nos diferentes sistemas biológicos, por exemplo na oxidação da nicotinamida adenina dinucleotid (NADH) e xantina/xantina oxidase (Kong *et al.*, 1992; Abubakar *et al.*, 2003).

A enzima responsável pela conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, a superóxido dismutase (SOD) (Yasui *et al.*, 2005), não sofreu alteração no modelo proposto. Corroborando com nossos dados, já foi relatado que a exposição ao alumínio em baixa dose (15mg/kg) em ratos, também não foi capaz de modificar os níveis de SOD, gerando um acúmulo de radicais superóxido. O acúmulo de superóxido no sistema nervoso, pode ser um dos

possíveis mecanismos envolvidos da redução da atividade da catalase (Kakkar *et al.*, 1995), inclusive essa diminuição foi demonstrada em nosso estudo. Outro fator que pode interferir nessa atividade é a redução do pH do microambiente, influenciado pelo acúmulo de outros radicais livres, como peróxido de hidrogênio (Ciriolo *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2008).

O peróxido de hidrogênio, também pode ser convertido em água pela Glutathione (GSH) (Ng *et al.*, 2007), porém esta não respondeu a exposição ao Al proposta neste estudo, possivelmente devido uma redução de um de seus cofatores (Berndt e Lillig, 2017), o NADH, este sendo oxidado pelo complexo alumínio/superóxido, sendo este um possível fator para a não responsividade desta via antioxidante. (Exley, 2004; Mujika *et al.*, 2011) Nesse contexto, a capacidade antioxidante da amostra mostrou-se diminuída, tanto por TEAC quanto por ACAP, confirmando a capacidade do Al em influenciar a atividade de antioxidantes enzimáticos como glutathione, superóxido dismutase e catalase, devido a sua capacidade em mimetizar o comportamento de metais essenciais para o equilíbrio redox (Joshi *et al.*, 1994; Yokel, 2000).

Os desequilíbrios no sistema antioxidante enzimático, levam ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, estas envolvidas em processos oxidativos de membranas e macromoléculas (Birben *et al.*, 2012), consequentemente gerando um aumento dos níveis de peroxidação lipídica (Mseddi *et al.*, 2015), como visto em nosso estudo. Desta forma, sugere-se que o estresse oxidativo é uma via potencial para as alterações no sistema nervoso promovidas pela exposição ao alumínio.

Muitos estudos mostram a associação entre o estresse oxidativo e o baixo nível de antioxidantes com declínios cognitivos, tais como memória, orientação e funções executivas (Berr *et al.*, 2000; Berr, 2002; Harrison, 2012; Cervellati *et al.*, 2014; Baierle *et al.*, 2015; Okubo *et al.*, 2017; Hajjar *et al.*, 2018).

Esta associação tem sido descrita em processos de envelhecimento e aparecimento de doenças neurodegenerativas, como comprometimento cognitivo leve e demência, onde podemos observar a vulnerabilidade do cérebro aos danos oxidativos (Baierle *et al.*, 2015; Okubo *et al.*, 2017; Hajjar *et al.*, 2018).

Dentro os processos envolvidos na cognição, a formação de memória é um dos mais importantes e depende de vários estágios para sua elaboração. As regiões que participam deste processo são o córtex pré-frontal, hipocampo e

áreas adjacentes (Preston e Eichenbaum, 2013; Snow, 2016), nesse processo cada área executa um papel específico para formação da memória, sendo eles codificação, consolidação e recuperação (Preston e Eichenbaum, 2013). As memórias podem ser classificadas de acordo com a sua duração em memória de trabalho: memória imediata, dura segundos ou poucos minutos; memória de curto-prazo, se desenvolve em segundos e dura por horas; memória de longo-prazo, consolida-se lentamente e é permanente (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Por certo, memórias de curto e longo prazo são entidades distintas (IZQUIERDO *et al.*, 1998) e podem ser avaliadas em animais por diferentes tarefas comportamentais.

Entre estas tarefas, o teste de reconhecimento de objetos é utilizado para acessar a memória imediata/curto-prazo, baseando na propensão natural do animal em explorar o objeto novo ao invés do conhecido (Broadbent *et al.*; Bertaina-Anglade *et al.*, 2006; Warburton e Brown, 2015). Em nosso estudo, apenas os animais que receberam a maior dose de alumínio apresentaram alterações de memória.

A fim de continuar investigando a influência do alumínio nos demais tipos de memória, utilizamos o teste esquiva inibitória (Martel *et al.*, 2010; Canto-De-Souza e Mattioli, 2016), baseado na esquiva inibitória. Neste estudo, o alumínio na menor dose não alterou a memória curta, diferentemente do grupo que recebeu a maior dose. Na consolidação da memória aprendida de longo-prazo ambos os grupos sofreram danos no processo, ocasionados pela exposição crônica ao alumínio.

Percebemos que a exposição ao Al, mesmo em baixas doses, foi capaz de gerar um desequilíbrio pró-oxidante, desencadeando declínio cognitivo nos animais, isto ocorre pois o sistema nervoso é muito vulnerável ao estresse oxidativo devido ao grande consumo de oxigênio, presença de ferro, ácidos graxos poli-insaturados e quantidades reduzidas de antioxidantes (Di Penta *et al.*, 2013; Baierle *et al.*, 2015).

Portanto, nosso trabalho traz evidências que a exposição em baixas doses de alumínio é capaz de promover desbalanço oxidativo, alterando o funcionamento dos antioxidantes enzimáticos e promovendo peroxidação lipídica, conseqüentemente gerando alterações cognitivas, especificamente em memória de longo e curto prazo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos da exposição ao Al 60 por dias em doses equivalentes a exposição em áreas urbanas e na dose máxima considerada segura pela OMS, em ratos adultos, nos permite concluir:

- Os níveis de Al se mostraram maiores nos animais expostos em comparação aos animais controle, desencadeando estresse oxidativo sanguíneo.
- A exposição ao Al não foi capaz de promover alterações motoras significativas, sendo evidenciado apenas um déficit exploratório;
- A exposição sistêmica ao Al foi capaz de desencadear alterações em memória associada ao estresse oxidativo em hipocampo e Córtex Pré-Frontal, regiões estás essenciais para a cognição.

Dessa forma, podemos afirmar que a exposição ao Al em ratos, em doses equivalentes a exposição urbana e em doses potencialmente seguras são capazes de promover quebra da homeostasia sanguínea, alterando o equilíbrio bioquímico hipocampal, gerando um estado de estresse oxidativo e dano cognitivo, porém não sendo capaz de promover alterações significativas no cerebelo e em parâmetros motores.

Permanecendo o questionamento sobre como estas baixas doses são capazes de promover alterações a nível molecular, na interação do alumínio com as diversas enzimas do sistema antioxidante endógeno e a sua influência no perfil proteômico de regiões envolvidas na cognição.

7 REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, M. G.; TAYLOR, A.; FERNS, G. A. A. Aluminium administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. **International journal of experimental pathology**, v. 84, n. 1, p. 49-54, 2003.

ACEVEDO, M. B. et al. Relationship between ethanol-induced activity and anxiety in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behav Brain Res**, v. 265, p. 203-15, 2014.

ADAMCZYK, B.; ADAMCZYK-SOWA, M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 18, 2016.

AKINRINADE, I. D.; MEMUDU, A. E.; OGUNDELE, O. M. Fluoride and aluminium disturb neuronal morphology, transport functions, cholinesterase, lysosomal and cell cycle activities. **Pathophysiology**, v. 22, n. 2, p. 105-15, 2015.

AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Sci Total Environ**, v. 407, n. 6, p. 2115-23, 2009.

AMADOR, F. C.; SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, C. R. Lipid peroxidation and aluminium effects on the cholinergic system in nerve terminals. **Neurotox Res**, v. 3, n. 3, p. 223-33, 2001.

ANDERSON, E. P. et al. Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by hydropower dams. **Science advances**, v. 4, n. 1, p. eaao1642-eaao1642, 2018.

ASLAM et al. Noninvasive measurement of aluminium in human bone: preliminary human study and improved system performance. **J Inorg Biochem**, v. 103, n. 11, p. 1585-90, 2009.

ATSDR. **Toxicological profile for Aluminum**. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, P. H. S. Atlanta, GA: U.S. 2008.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 360438-360438, 2014.

BAIERLE, M. et al. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, p. 804198-804198, 2015.

BARABASZ, W. et al. Ecotoxicology of Aluminium. v. 11, n. 3, p. 199-203, 2002.

BENJAMIN, R. J.; MCLAUGHLIN, L. S. Plasma components: properties, differences, and uses. **Transfusion**, v. 52 Suppl 1, p. 9s-19s, 2012.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. **Antioxid Redox Signal**, v. 27, n. 15, p. 1235-1251, 2017.

BERNIKER, M.; KORDING, K. Bayesian Models of Motor Control. In: SQUIRE, L. R. (Ed.). **Encyclopedia of Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2009. p.127-133. ISBN 978-0-08-045046-9.

BERR, C. Oxidative stress and cognitive impairment in the elderly. **J Nutr Health Aging**, v. 6, n. 4, p. 261-6, 2002.

BERR, C. et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Arteriel. **J Am Geriatr Soc**, v. 48, n. 10, p. 1285-91, 2000.

BERTAINA-ANGLADE, V. et al. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 54, n. 2, p. 99-105, 2006.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, n. 2, p. 319-341, 2002.

BHALLA, P.; DHAWAN, D. K. Protective role of lithium in ameliorating the aluminium-induced oxidative stress and histological changes in rat brain. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, n. 4, p. 513-21, 2009.

BIEDERMANN, S. V. et al. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. **BMC Biology**, v. 15, p. 125, 2017.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E. et al. Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1767-1767, 2017.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behav Brain Res**, v. 197, n. 1, p. 125-37, 2009.

BROADBENT, N. J. et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 5-11,

CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurobiol Learn Mem**, v. 130, p. 44-51, 2016.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, p. Unit 8.12, 2001.

CERVELLATI, C. et al. Systemic oxidative stress and conversion to dementia of elderly patients with mild cognitive impairment. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 309507, 2014.

CHRISTE, B. et al. Clinical assessment of motor function: a processes oriented instrument based on a speed-accuracy trade-off paradigm. **Behav Neurol**, v. 18, n. 1, p. 19-29, 2007.

CIRIOLO, M. R. et al. Loss of GSH, Oxidative Stress, and Decrease of Intracellular pH as Sequential Steps in Viral Infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 5, p. 2700-2708, 1997.

CLARAC, F.; BROCARD, F.; VINAY, L. The maturation of locomotor networks. **Prog Brain Res**, v. 143, p. 57-66, 2004.

COCO, M.; PERCIAVALLE, V. Where did the motor function of the cerebellum come from? **Cerebellum & Ataxias**, v. 2, p. 10, 2015.

COSTA, J. C.; TOMAZ, C. Posttraining administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnesic effects of diazepam. **Neurobiol Learn Mem**, v. 69, n. 1, p. 65-70, 1998.

CRABBE, J. C. et al. Genotypic differences in ethanol sensitivity in two tests of motor incoordination. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 4, p. 1338-51, 2003.

CREWS, H. et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. **Br J Nutr**, v. 86 Suppl 1, p. S5-35, 2001.

CUNAT, L. et al. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 76, n. 1, p. 31-55, 2000.

CUNAT, L. et al. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents. **Biol Trace Elem Res**, v. 76, n. 1, p. 31-55, 2000.

D'AVELLA, A.; LACQUANITI, F. Control of reaching movements by muscle synergy combinations. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 7, p. 42, 2013.

DA SILVA, I. S. et al. Heavy metal distribution in recent sediments of the Tietê-Pinheiros river system in São Paulo state, Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 17, n. 2, p. 105-116, 2002.

DE MEYER, C. M. C. et al. Arsenic, manganese and aluminum contamination in groundwater resources of Western Amazonia (Peru). **Sci Total Environ**, v. 607-608, p. 1437-1450, 2017.

DEACON, R. M. J. Measuring Motor Coordination in Mice. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 75, p. 2609, 2013a.

_____. The Successive Alleys Test of Anxiety in Mice and Rats. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 76, p. 2705, 2013b.

DI PENTA, A. et al. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e54722, 2013.

DOMINGO, J. L.; GOMEZ, M.; COLOMINA, M. T. Oral silicon supplementation: an effective therapy for preventing oral aluminum absorption and retention in mammals. **Nutr Rev**, v. 69, n. 1, p. 41-51, 2011.

DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A. E. et al. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 6, p. e360-8, 2010.

DONOGHUE, A. M. Occupational health hazards in mining: an overview. **Occup Med (Lond)**, v. 54, n. 5, p. 283-9, 2004.

DONOGHUE, A. M.; FRISCH, N.; OLNEY, D. Bauxite mining and alumina refining: process description and occupational health risks. **J Occup Environ Med**, v. 56, n. 5 Suppl, p. S12-7, 2014.

ENNACEUR, A.; NEAVE, N.; AGGLETON, J. P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Exp Brain Res**, v. 113, n. 3, p. 509-19, 1997.

ESPARZA, J. L.; GOMEZ, M.; DOMINGO, J. L. Role of Melatonin in Aluminum-Related Neurodegenerative Disorders: a Review. **Biol Trace Elem Res**, 2018.

EXLEY, C. The pro-oxidant activity of aluminum. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 3, p. 380-7, 2004.

_____. Comment on "Avoidance of aluminum toxicity in freshwater snails involves intracellular silicon-aluminum biointeraction". **Environ Sci Technol**, v. 42, n. 14, p. 5374; author reply 5375-6, 2008.

_____. Human exposure to aluminium. **Environ Sci Process Impacts**, v. 15, n. 10, p. 1807-1816, 2013.

_____. The toxicity of aluminium in humans. **Morphologie**, v. 100, n. 329, p. 51-5, 2016.

EXLEY, C. et al. Aluminum toxicokinetics. **J Toxicol Environ Health**, v. 48, n. 6, p. 569-84, 1996.

EXLEY, C.; HOUSE, E. R. Aluminium in the human brain. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 142, n. 4, p. 357-363, 2011.

FERDOWSIAN, H. R.; BECK, N. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24059-e24059, 2011.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GAFFIELD, M. A. et al. Chronic imaging of movement-related Purkinje cell calcium activity in awake behaving mice. **J Neurophysiol**, v. 115, n. 1, p. 413-22, 2016.

GALANTE, M. et al. Impairments in motor coordination without major changes in cerebellar plasticity in the Tc1 mouse model of Down syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 8, p. 1449-1463, 2009.

GALBUSERA, C. et al. Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 12, p. 1747-52, 2006.

GANGWAR, M. et al. Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich Mallotus philippenensis Fruit Extract on Human Erythrocytes: An In Vitro Study %J The Scientific World Journal. v. 2014, p. 12, 2014.

GOLDSTEIN, L. B.; DAVIS, J. N. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. **J Neurosci Methods**, v. 31, n. 2, p. 101-7, 1990.

GOONETILLEKE, A. et al. Understanding the role of land use in urban stormwater quality management. **Journal of Environmental Management**, v. 74, n. 1, p. 31-42, 2005.

GOULDING, M. Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 507-518, 2009.

GREGER, J. L.; SUTHERLAND, J. E. Aluminum exposure and metabolism. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 34, n. 5, p. 439-74, 1997.

GUIBAUD, G.; GAUTHIER, C. Study of aluminium concentration and speciation of surface water in four catchments in the Limousin region (France). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 16-25, 2003.

HAJJAR, I. et al. Oxidative stress predicts cognitive decline with aging in healthy adults: an observational study. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 17-17, 2018.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HAMM, R. J. et al. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 2, p. 187-96, 1994.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HARRISON, F. E. A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 29, n. 4, p. 711-26, 2012.

HARRISON, T. C.; MURPHY, T. H. Towards a circuit mechanism for movement tuning in motor cortex. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 6, p. 127, 2012.

HIRSCH, J.; LEROY, C.; GREEN, A. AluMATTER, a New Interactive e-Learning Tool. **Materials Science Forum**, v. 519-521, p. 1209-1214, 2006.

HUGHES, R. N. Neotic preferences in laboratory rodents: Issues, assessment and substrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 441-464, 2007.

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, n. 3, p. 285-316, 1997.

JECFA. **Health Canada Review of Dietary Exposure to Aluminum**. EPA, C. 2008.

JONES, K. et al. Urinary Excretion of Aluminium and Silicon in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. **EBioMedicine**, v. 26, p. 60-67, 2017.

JOSHI, J. G. et al. Iron and aluminum homeostasis in neural disorders. **Environmental health perspectives**, v. 102 Suppl 3, n. Suppl 3, p. 207-213, 1994.

KAKKAR, R. et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 151, n. 2, p. 113-9, 1995.

KARL, T.; PABST, R.; VON HORSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Exp Toxicol Pathol**, v. 55, n. 1, p. 69-83, 2003.

KAWAGUCHI, Y. Pyramidal Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Layer 5 of Rat Frontal Cortex. **Cereb Cortex**, v. 27, n. 12, p. 5755-5771, 2017.

KAWAHARA, M.; KATO-NEGISHI, M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. **International journal of Alzheimer's disease**, v. 2011, p. 276393-276393, 2011.

KIEHN, O. Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 224-238, 2016.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. ON A NEW AEROBIC METABOLITE WHOSE PRODUCTION BY BRAIN IS INHIBITED BY APOMORPHINE, EMETINE, ERGOTAMINE, EPINEPHRINE, AND MENADIONE. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292, 1944.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated Plus Maze for Mice. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 22, p. 1088, 2008.

KONG, S.; LIOCHEV, S.; FRIDOVICH, I. Aluminum(III) facilitates the oxidation of NADH by the superoxide anion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 79-81, 1992.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J Biol Chem**, v. 257, n. 10, p. 5751-4, 1982.

KREWSKI, D. et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 10 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 1-269, 2007.

KUHN, V. et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 13, p. 718-742, 2017.

KVANDE, H.; DRABLØS, P. A. The aluminum smelting process and innovative alternative technologies. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 56, n. 5 Suppl, p. S23-S32, 2014.

LACQUANITI, F.; IVANENKO, Y. P.; ZAGO, M. Patterned control of human locomotion. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. Pt 10, p. 2189-2199, 2012.

LAU, A. A. et al. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. **Behav Brain Res**, v. 191, n. 1, p. 130-6, 2008.

LECORPS, B.; RODEL, H. G.; FERON, C. Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. **Physiol Behav**, v. 157, p. 209-16, 2016.

LI, L. et al. A comparison of the potential health risk of aluminum and heavy metals in tea leaves and tea infusion of commercially available green tea in Jiangxi, China. **Environ Monit Assess**, v. 187, n. 5, p. 228, 2015.

LIGT, R. et al. Assessment of Dermal Absorption of Aluminum from a Representative Antiperspirant Formulation Using a ²⁶Al Microtracer Approach. **Clinical and Translational Science**, v. 11, n. 6, p. 573-581, 2018.

LIMA, M. D. O. et al. Assessment of surface water in two Amazonian rivers impacted by industrial wastewater, Barcarena City, Pará State (Brazil). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 8, p. 1493-1504, 2011.

LIN, J. L. et al. Aluminum utensils contribute to aluminum accumulation in patients with renal disease. **Am J Kidney Dis**, v. 30, n. 5, p. 653-8, 1997.

LIU, L. et al. Aluminum toxicity related to SOD and expression of presenilin and CREB in *Bombyx mori*. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 99, n. 2, p. e21480, 2018.

LIU, Y. et al. Prediction of new thermodynamically stable aluminum oxides. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9518, 2015.

LOUIS, E. D. et al. Reduced Purkinje cell dendritic arborization and loss of dendritic spines in essential tremor. **Brain**, v. 137, n. 12, p. 3142-3148, 2014.

LU, Y. C.; DIECKMANN, R.; SASS, S. L. Formation of an aluminum peroxide oxide, AlO_2 , by interfacial reaction between Pt and $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 55, n. 10, p. 1083-1095, 1994.

LUONG, T. N. et al. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 49, p. 2376, 2011.

MAHINROOSTA, M.; ALLAHVERDI, A. Hazardous aluminum dross characterization and recycling strategies: A critical review. **J Environ Manage**, v. 223, p. 452-468, 2018.

MARTEL, G.; JAFFARD, R.; GUILLOU, J. L. Identification of hippocampus-dependent and hippocampus independent memory components in step-down inhibitory avoidance tasks. **Behav Brain Res**, v. 207, n. 1, p. 138-43, 2010.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Int Rev Cytol**, v. 200, p. 1-46, 2000.

MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci (Lond)**, v. 84, n. 4, p. 407-12, 1993.

MISRA, G.; COOMBES, S. A. Neuroimaging Evidence of Motor Control and Pain Processing in the Human Midcingulate Cortex. **Cereb Cortex**, v. 25, n. 7, p. 1906-19, 2015.

MONTES-NIETO, R. et al. Plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in young adults: Obesity increases fasting levels only in men whereas glucose ingestion, and not protein or lipid intake, increases postprandial concentrations regardless of sex and obesity. **Mol Nutr Food Res**, v. 61, n. 11, 2017.

MOORE, P. B. et al. Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 11, n. 2, p. 66-9, 2000.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1113-1120, 1997.

MORTATTI, J. et al. Distribution of heavy metals in the geochemical phases of sediments from the Tietê River, Brazil. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 25, n. 3, p. 194-200, 2013.

MSEDDI, M. et al. Lipid peroxidation, proteins modifications, anti-oxidant enzymes activities and selenium deficiency in the plasma of hashitoxicosis patients. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v. 6, n. 5, p. 181-188, 2015.

MUJIK, J. I. et al. Pro-oxidant activity of aluminum: stabilization of the aluminum superoxide radical ion. **J Phys Chem A**, v. 115, n. 24, p. 6717-23, 2011.

MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Aluminum decreases the glutathione regeneration by the inhibition of NADP-isocitrate dehydrogenase in mitochondria. **J Cell Biochem**, v. 93, n. 6, p. 1267-71, 2004.

NAGAOKA, M. H.; MAITANI, T. Binding affinity of aluminium to human serum transferrin and effects of carbohydrate chain modification as studied by HPLC/high-resolution ICP-MS--speciation of aluminium in human serum. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 9, p. 1887-94, 2005.

NEHRU, B.; ANAND, P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. **J Trace Elem Med Biol**, v. 19, n. 2-3, p. 203-8, 2005.

NG, C. F. et al. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. **Free Radic Res**, v. 41, n. 11, p. 1201-11, 2007.

OKUBO, H. et al. Association between dietary patterns and cognitive function among 70-year-old Japanese elderly: a cross-sectional analysis of the SONIC study. **Nutr J**, v. 16, n. 1, p. 56, 2017.

OLIVEIRA, G. B. et al. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. **Brain Research**, v. 1561, p. 23-34, 2014.

ONDEI, S. et al. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia heterozygotes. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 35, n. 6, p. 409-13, 2013.

PANDOLFO, P. et al. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 141-8, 2007.

PASCUAL, R. et al. Purkinje cell impairment induced by early movement restriction. **Biol Neonate**, v. 73, n. 1, p. 47-51, 1998.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

PINEAU, A. et al. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 110, p. 21-26, 2012.

PIRES, V. A. et al. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of

attention-deficit hyperactivity disorder. **Behav Pharmacol**, v. 20, n. 2, p. 134-45, 2009.

POOLE, R. L. et al. Aluminum exposure in neonatal patients using the least contaminated parenteral nutrition solution products. **Nutrients**, v. 4, n. 11, p. 1566-1574, 2012.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. **Current biology : CB**, v. 23, n. 17, p. R764-R773, 2013.

PREVOSTO, V.; SOMMER, M. A. Cognitive control of movement via the cerebellar-recipient thalamus. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 7, p. 56, 2013.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-7, 1999.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **Faseb j**, v. 22, n. 3, p. 659-61, 2008.

ROBINSON, F. R.; FUCHS, A. F. The role of the cerebellum in voluntary eye movements. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 981-1004, 2001.

ROESLER, R. et al. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**, v. 11, n. 11, p. 2537-40, 2000.

RONDEAU, V. et al. Aluminum and Silica in Drinking Water and the Risk of Alzheimer's Disease or Cognitive Decline: Findings From 15-Year Follow-up of the PAQUID Cohort. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 489-496, 2009.

ROSKAMS, A. J.; CONNOR, J. R. Aluminum access to the brain: a role for transferrin and its receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 22, p. 9024-7, 1990.

ROTHWELL, J. C.; MACKINNON, C. D.; VALLS-SOLÉ, J. Role of brainstem–spinal projections in voluntary movement. **Movement Disorders**, v. 17, n. 2, p. S27-S29, 2002.

RUI, D.; YONGJIAN, Y. Aluminum chloride induced oxidative damage on cells derived from hippocampus and cortex of ICR mice. **Brain Res**, v. 1324, p. 96-102, 2010.

RUIPÉREZ, F. et al. Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 118-123, 2012.

SAIYED, S. M.; YOKEL, R. A. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. **Food Addit Contam**, v. 22, n. 3, p. 234-44, 2005.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201, 2017.

SÁNCHEZ-IGLESIAS, S. et al. Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 3, p. 879-888, 2009.

SANTOS, U. D. M. et al. Rios da Bacia Amazônica. I. Afluentes do rio Negro. **Acta Amazonica**, v. 14, n. 1-2, p. 222-237, 1984.

SAUERBREI, B. A.; LUBENOV, E. V.; SIAPAS, A. G. Structured variability in Purkinje cell activity during locomotion. **Neuron**, v. 87, n. 4, p. 840-852, 2015.

SCHALOW, G.; ZACH, G. A. Reorganization of the human central nervous system. **Gen Physiol Biophys**, v. 19 Suppl 1, p. 11-240, 2000.

SHAINKIN-KESTENBAUM, R. et al. Effect of aluminium on superoxide dismutase. **Clin Sci (Lond)**, v. 77, n. 5, p. 463-6, 1989.

SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 6, p. 907-21, 2009.

SHEETS, P. L.; SHEPHERD, G. M. G. Cortical Circuits for Motor Control. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 365-366, 2011.

SHIRLEY, D. G.; LOTE, C. J. Renal Handling of Aluminium. **Nephron Physiology**, v. 101, n. 4, p. p99-p103, 2005.

SNOW, P. J. The Structural and Functional Organization of Cognition. **Frontiers in human neuroscience**, v. 10, p. 501-501, 2016.

SOKOLOV, A. A.; MIALL, R. C.; IVRY, R. B. The Cerebellum: Adaptive Prediction for Movement and Cognition. **Trends Cogn Sci**, v. 21, n. 5, p. 313-332, 2017.

STANLEY, J. L. et al. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. **J Psychopharmacol**, v. 19, n. 3, p. 221-7, 2005.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 91, p. 51785, 2014.

TEIXEIRA, F. et al. Evaluation of the Effects of Chronic Intoxication with Inorganic Mercury on Memory and Motor Control in Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 9, p. 9171, 2014.

TONIN, F. S. et al. Impact of Natural Juice Consumption on Plasma Antioxidant Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22146-56, 2015.

TOTTEN, G. E.; MACKENZIE, D. S. **Handbook of Aluminum: Volume 2: Alloy Production and Materials Manufacturing**. CRC Press, 2003. ISBN 9780203912607. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=XImAKOjvnrnC> >.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 463-9, 1993.

TRENFIELD, M. A. et al. Aluminium, gallium, and molybdenum toxicity to the tropical marine microalga *Isochrysis galbana*. **Environ Toxicol Chem**, v. 34, n. 8, p. 1833-40, 2015.

USHIO-FUKAI, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 6, p. 1289-99, 2009.

USSAMI, K. A.; MARTINS GUILHOTO, J. J. Economic and water dependence among regions: The case of Alto Tiete, Sao Paulo State, Brazil. **Economia**, 2018.

VITRAC, C. et al. Dopamine control of pyramidal neuron activity in the primary motor cortex via D2 receptors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, p. 13, 2014.

VON SONNTAG, C. Advanced oxidation processes: mechanistic aspects. **Water Sci Technol**, v. 58, n. 5, p. 1015-21, 2008.

W. BARABASZ et al. Ecotoxicology of Aluminium. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 11, n. 3, p. 199-203, 2002.

WANG, D. et al. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. **Cell Stress Chaperones**, v. 17, n. 4, p. 423-33, 2012.

WANG, W. et al. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 2, p. 211-217, 2010.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 2, p. 12-12, 2010.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 131-139, 2015.

WENDLAND, B. E. et al. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 2, p. 259-64, 2001.

WENG, L.; TEMMINGHOFF, E. J.; VAN RIEMSDIJK, W. H. Aluminum speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICA-Donnan. **Water Res**, v. 36, n. 17, p. 4215-26, 2002.

WHO. **Aluminium in drinking-water**, . Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. WHO. Geneva 2010.

WILLS, M. R.; SAVORY, J. Aluminum and chronic renal failure: sources, absorption, transport, and toxicity. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 27, n. 1, p. 59-107, 1989.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicol Lett**, v. 82-83, p. 969-74, 1995.

YASUI, K. et al. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. **Free Radic Res**, v. 39, n. 7, p. 755-62, 2005.

YOKEL, R. A. Benefit vs. risk of oral aluminum forms: antacid and phosphate binding vs. absorption. **Drug Chem Toxicol**, v. 12, n. 3-4, p. 277-86, 1989.

_____. The toxicology of aluminum in the brain: a review. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 813-28, 2000.

YOKEL, R. A. Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. Suppl 5, p. 699-704, 2002.

YOKEL, R. A.; MCNAMARA, P. J. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. **Pharmacol Toxicol**, v. 88, n. 4, p. 159-67, 2001.

YOKEL, R. A.; MCNAMARA, P. J. Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 159-167, 2008.

YOKEL, R. A. et al. Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single (26)Al exposure. **Toxicol Sci**, v. 64, n. 1, p. 77-82, 2001.

YU, Z. et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21230-e21230, 2011.

ZATTA, P. et al. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. **Brain Res Bull**, v. 59, n. 1, p. 41-5, 2002.

ZHAO, J. J. et al. The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 41-5, 2008.

8 ANEXO

8.1 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL, TECIDUAL, BIOQUÍMICA E EXPRESSÃO GENICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM MODELOS DE DOSE/RESPOSTA DE EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE ALUMÍNIO.", protocolada sob o CEUA nº 5923210617, sob a responsabilidade de **Rafael Rodrigues Lima e equipe; Rafael Monteiro Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 21/09/2017.

We certify that the proposal "BEHAVIORAL ASSESSMENT, TISSUE, BIOCHEMISTRY AND EXPRESSION OF GENETIC CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS DOSE MODELS / ALUMINUM CHLORIDE EXPOSURE RESPONSE.", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 5923210617, under the responsibility of **Rafael Rodrigues Lima and team; Rafael Monteiro Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 09/21/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **08/2018**

Área: **Instituto de Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério FACFAR**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 30 dias**

N: **120**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **60 a 80 g**

Local do experimento: **Laboratório de Biologia estrutural e Funcional**

Belé, 30 de outubro de 2017

M^a Viviana B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará