



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

**ADEMIR FERREIRA DA SILVA JÚNIOR**

**INTOXICAÇÃO CRÔNICA EXPERIMENTAL COM ALUMÍNIO: PADRÕES  
DEGENERATIVOS, COMPORTAMENTAIS E TERAPIA EXPERIMENTAL COM  
MAGNÉSIO APÓS LESÃO HIPOCAMPAL**

Belém  
2013

ADEMIR FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

**INTOXICAÇÃO CRÔNICA EXPERIMENTAL COM ALUMÍNIO: PADRÕES  
DEGENERATIVOS, COMPORTAMENTAIS E TERAPIA EXPERIMENTAL COM  
MAGNÉSIO APÓS LESÃO HIPOCAMPAL**

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

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Belém

2013

ADEMIR FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

**INTOXICAÇÃO CRÔNICA EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO:  
PADRÕES DEGENERATIVOS, COMPORTAMENTAIS E TERAPIA  
EXPERIMENTAL COM MAGNÉSIO APÓS LESÃO HIPOCAMPAL**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia – Co-orientadora  
Instituto de Ciências da Saúde – ICS-UFPA

---

Profa. Dra. Kelly Fernandes Dantas - Examinadora  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – ICEN-UFPA

---

Profa. Dra. Maria Socorro dos Santos Aguiar- Examinadora  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

---

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

---

Profa. Dra. Márcia Cristina Freitas da Silva - Examinadora  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Belém

2013

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, pela oportunidade concedida, pelo suporte incondicional, pelas requisições de qualidades científicas ao trabalho e por ter contribuído na minha formação acadêmica, muito obrigado.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra Cristiane do Socorro Maia Ferraz, pela orientação competente, as quais sempre foram pertinentes, e por ter aberto as portas do Laboratório de Farmacologia da UFPA para que eu pudesse desenvolver uma parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima, pela amizade que construímos e firmamos durante esta empreitada e pela força que sempre me deu afim de eu levar ao termo esse projeto: muito obrigado.

À Profa. Dra. Kelly Dantas, por todo o suporte dado durante as análises químicas realizada pelo no Laboratório do Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada (GEAAP) e por toda humildade e atenção com que sempre me atendeu todas as vezes que precisei.

As Professoras Andrea Campos, Márcia Freitas e Socorro Aguiar, pela amizade, companheirismo e contribuições durante a realização desse projeto.

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

Ao Msc. João Batista Júnior pela ajuda na preparação da digestão das amostras para análise de alumínio.

Aos meus alunos de iniciação científica do Laboratório de Ciências Aplicadas, Ian Gomes, Tiago Costa, Danilo Rodrigues, Nilza Magno e Bruna Ramos, pelo apoio, amizade e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos Colegas de Laboratório, Luana Fernandes, Luana Santana, Rafael Fernandes, Ana Carolina e Gedeão que me auxiliaram durante todas as etapas deste projeto com as intoxicações dos animais, testes comportamentais, perfusão, criostato e nas imunoistoquímicas, muito obrigado!

Ao Bioterista, Amarildo Melo que dentro do possível sempre atendeu as minhas solicitações.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que concedeu a minha bolsa de doutorado e a taxa de bancada para que eu pudesse desenvolver este projeto durante dois anos e seis meses.

*"Na vida todo mundo tem um sonho. Um sonho grande ou um sonho pequeno, um sonho vivo ou um sonho morto, um sonho possível ou um sonho impossível, não importa, é um sonho e cada um tem o seu, e é correndo atrás dos sonhos que vamos transformando a vida e transformando o mundo."*

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELA

### LISTA DE ABREVIATURA

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	ALUMÍNIO.....	16
1.2	ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO ALUMÍNIO.....	17
1.3	BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO.....	19
1.4	TOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO.....	20
1.5	TOXICOCINÉTICA DO ALUMÍNIO.....	22
1.6	NEUROTOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO.....	26
1.7	ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS E NEUROCOMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AO ALUMÍNIO.....	29
1.8	O USO DE MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS ACERCA DOS EFEITOS DO ALUMÍNIO.....	32
1.9	TERAPIA DE TRATAMENTO PARA A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO.....	35
1.10	O USO DO MAGNÉSIO COMO AGENTE ANTINFLAMATORIO E NEUROPROTETOR.....	36
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
2.1	GERAL.....	38
2.2	ESPECÍFICOS.....	38
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
3.2	PREPARO DA SOLUÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO.....	39
3.3	PROCEDIMENTOS DE INTOXICAÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40



3.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	41
3.5	ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	43
<b>3.5.1</b>	<b>Teste do Campo Aberto.....</b>	<b>43</b>
3.5.1.1	Fundamento.....	43
3.5.1.2	Equipamento.....	44
3.5.1.3	Procedimento.....	45
<b>3.5.2</b>	<b>Teste do Rota rod.....</b>	<b>46</b>
3.5.2.1	Fundamento.....	46
3.5.2.2	Descrição do aparato.....	47
3.5.2.3	Procedimento.....	48
<b>3.5.3</b>	<b>Teste de Reconhecimento social.....</b>	<b>49</b>
3.5.3.1	Fundamento.....	49
3.5.3.2	Descrição do aparato.....	51
3.5.3.3	Procedimento.....	51
<b>3.5.4</b>	<b>Teste do Labirinto em T elevado.....</b>	<b>52</b>
3.5.4.1	Fundamento.....	52
3.5.4.2	Descrição do aparato.....	54
3.5.4.3	Procedimento.....	55
3.6	COLETA DE SANGUE.....	56
3.7	ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	57
3.7.1	<b>Avaliação da capacidade antioxidante total.....</b>	<b>57</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Dosagem de Nitratos e Nitritos.....</b>	<b>58</b>
3.8	DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM AMOSTRAS DE SORO.....	59
3.9	DECAPITAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM AMOSTRAS DE HIPOCAMPO.....	60
3.10	PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	62
3.11	PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICO.....	63
<b>3.11.1</b>	<b>Análise histopatológica geral.....</b>	<b>63</b>
<b>3.11.2</b>	<b>Análise imunoistoquímica.....</b>	<b>63</b>
3.12	ANÁLISE QUALITATIVA.....	64
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>

4.1 AVALIAÇÃO DO GANHO DE MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS.....	65
4.2 DOSAGEM DE ALUMÍNIO NO SORO DE RATOS ADULTOS.....	66
4.3 DOSAGEM DE ALUMÍNIO EM HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS.....	67
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO DOS ANIMAIS APÓS A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO.....	68
<b>4.4.1 Concentração de Nitrato e Nitrito.....</b>	<b>68</b>
<b>4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total (TEAC).....</b>	<b>69</b>
4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE AS ATIVIDADES LOCOMOTORAS E EXPLORATÓRIAS NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	70
4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TESTE DO ROTA ROD.....	72
4.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	74
4.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO.....	76
4.6 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE A DENSIDADE CELULAR E REATIVIDADE ASTROCITÁRIA NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS.....	82
<b>4.6.1 Avaliação histopatológica.....</b>	<b>82</b>
<b>4.6.2 Ativação Astrocitária.....</b>	<b>84</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
5.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS.....	88
5.2 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO E A TERAPIA COM MAGNÉSIO NÃO ALTERAM O GANHO DE MASSA CORPORAL.....	87
5.3 A INTOXICAÇÃO CRÔNICA DE CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ AUMENTO NAS CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO NO SORO E NO HIPOCAMPO.....	87
5.4 A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO.....	88

5.5 A TERAPIA COM MAGNÉSIO REVERTEU AS ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS DA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO.....	91
5.6 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ DIMINUIÇÃO NA DENSIDADE CELULAR E REATIVIDADE ASTROCITÁRIA NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS.....	96
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>112</b>

## RESUMO

Evidências experimentais sugerem que o alumínio é um agente neurotóxico com ações deletérias sobre os processos cognitivos. Neste estudo, investigou-se os efeitos comportamentais, histopatológicos e bioquímicos da intoxicação crônica com citrato de alumínio sobre o hipocampo de ratos adultos, e ao mesmo tempo aplicou-se uma terapia experimental de tratamento com magnésio para a reversão das alterações neuropatológicas encontradas. Utilizou-se 70 ratos Wistar machos de 200-250 g, divididos em grupos da seguinte maneira: controle, citrato de sódio (CNa), citrato de alumínio (CAI), citrato de alumínio + sulfato de magnésio (CAI+Mg), citrato de sódio + sulfato de magnésio (CNa+Mg). A dose usada de citrato de alumínio foi de 100 mg/kg e sulfato de magnésio 250 mg/kg durante 30 dias. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto, Rota rod, Reconhecimento social e Labirinto em T elevado (LTE), análise bioquímica, histopatológica e imunoistoquímica para GFAP. Além disso, foram verificados os níveis de alumínio no plasma e no hipocampo dos animais em espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Os resultados obtidos mostraram que o grupo CAI apresentou um aumento da atividade locomotora no teste do campo aberto em comparação ao grupo controle e já o grupo CAI+Mg apresentou uma diminuição ( $P < 0.001$ ). Nos testes de memória do LTE e de Reconhecimento social, os animais do grupo CAI apresentaram déficits no cognitivos em relação aos demais grupos enquanto os animais do grupo CAI+Mg apresentaram um bom desempenho nos teste ( $P < 0.001$ ). Os níveis de alumínio encontrados no hipocampo do grupo CAI foram consideravelmente elevados e nos demais grupos os níveis ficaram abaixo do limite de detecção. Na análise histopatológica e imunoistoquímica, os animais do grupo CAI apresentaram diminuição da densidade celular e reatividade astrocitária nas camadas CA1, CA3 e hilo do hipocampo. Estes resultados sugerem que a intoxicação experimental com citrato de alumínio induz déficits de aprendizado e memória e que a administração de sulfato de magnésio pode ter a capacidade de minimizar os danos causados pelo metal no hipocampo de animais intoxicados.

**Palavras-chave:** Magnésio, Citrato de Alumínio, Hipocampo, Memória, Aprendizado

## ABSTRACT

Experimental evidence suggests that aluminum is a neurotoxic agent with harmful effects on cognitive processes. In this study, we investigated the behavioral, biochemical and histopathological effects of chronic intoxication with aluminum citrate on the hippocampus of adult rats, in the same time investigated experimental therapy treatment with magnesium for reversing the neuropathological changes. We used 70 male Wistar rats of 200-250 g that were divided in groups as follows: control, sodium citrate (CNa), aluminum citrate (CAI), aluminum citrate + magnesium sulphate (CAI+Mg), sodium citrate + sulfate magnesium (Mg+CNa). The dose used of aluminum citrate was 100 mg/kg and 250 mg/kg of magnesium sulfate. The neurotoxic compound was taken orally for 30 days. The animals were subjected to behavioral tests of open field, Rota Rod, social recognition and the elevated T maze (LTE). Furthermore, aluminum levels in plasma and hippocampus of animals was found by atomic absorption spectrometer graphite furnace (GF AAS), biochemical analysis, histopathology and immunohistochemistry for GFAP. It was found that the CAI group showed increase locomotor activity in the open field test compared to the control group, and CAI+Mg group showed a decrease ( $P < 0.001$ ). In memory tests of LTE and social Recognition, the CAI group showed cognitive deficits in relation to other groups, and CAI+Mg group performed well in the test ( $P < 0.001$ ). Aluminum levels found in the hippocampus of CAI group were considerably higher but in the other groups the levels were below to the detection limit of the equipment. Histopathology and imunistochemistry analysis in CAI group showed decreased in cell density and astrocytic reactivity in layers CA1, CA3 and hilus of the hippocampus. These results suggest that the experimental poisoning with aluminum citrate induce deficits of learning and memory and that the administration of magnesium sulphate may have the ability to minimize the damage caused by metal in the hippocampus of intoxicated animals.

**Key Words:** Magnesium, Aluminium Citrate, Hippocampus, Memory, Learning

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A utilização do alumínio em diversos segmentos.....	17
<b>Figura 2.</b> A estrutura do complexo Al-citrato.....	23
<b>Figura 3.</b> Desenho esquemático dos experimentos.....	42
<b>Figura 4.</b> Campo aberto dividido em 25 quadrantes utilizado para avaliar as atividades locomotoras dos animais após o período de intoxicação.....	45
<b>Figura 5.</b> Rota rod de 4 baias utilizado para avaliar as atividade motora dos animais após o período de intoxicação.....	48
<b>Figura 6.</b> Memória social avaliada no teste de reconhecimento social.....	51
<b>Figura 7.</b> Labirinto em T elevado, construído a partir do modelo descrito por Zangrossi Jr e Graeff (1996).....	55
<b>Figura 8.</b> Espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (Modelo AA240Z, Marca Varian, Mulgrave, Austrália).....	59
<b>Figura 9.</b> Forno microondas com cavidade (START E, Milestone).....	61
<b>Figura 10.</b> Procedimento de perfusão.....	62
<b>Figura 11.</b> Efeitos da intoxicação crônica de citrato de alumínio, sobre o ganho de massa corporal em ratos Wistar adultos, administrado por via oral durante 30 dias consecutivos.....	65
<b>Figura 12.</b> Efeitos da intoxicação crônica de citrato de alumínio, sobre a concentração de alumínio no plasma dos ratos Wistar adultos, após 30 dias consecutivos.....	66
<b>Figura 13.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio, sobre a concentração de Nitrato/Nitrito no plasma dos ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos.....	68
<b>Figura 14.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio, com relação à dosagem da capacidade antioxidante total em ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos.....	69

<b>Figura 15.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio avaliados durante 5 minutos no teste do campo aberto.....	70
<b>Figura 16.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no Teste do Rota rod.....	73
<b>Figura 17.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no tempo de investigação social de ratos adultos, quando o mesmo rato jovem foi exposto após um período de 30 minutos da primeira apresentação.....	74
<b>Figura 18.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio em relação ao número de reexposições de ratos no Teste do LTE.....	77
<b>Figura 19.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio na aquisição de esquiva no LTE.....	79
<b>Figura 20.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no tempo de fuga do braço aberto do LTE.....	80
<b>Figura 21.</b> Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no teste e reteste no LTE. O teste foi realizado 24 horas, após as exposições de esquiva, com intervalo de 30 segundos e mediu a latência do animal no braço fechado.....	81
<b>Figura 22.</b> Micrografias de secções do hipocampo coradas com violeta de cresila em CA1, CA3 e Hilo hipocampal.....	83
<b>Figura 23.</b> Micrografias de imunomarcção para GFAP nas regiões CA1, CA3 e Hilo do hipocampo nos diferentes grupos experimentais.....	85

**LISTA DE ABREVIATURA**

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



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ALUMÍNIO

O alumínio é o metal mais abundante em nosso planeta e o terceiro elemento nele mais profuso (ZATTA et al.,2003; KUMAR et al.,2011; WU et., 2012). A presença quase que onipresente deste metal no ambiente é tão forte que a exposição à ele é praticamente inevitável (KUMAR et al.,2009).

O alumínio possui uma forte afinidade pelo oxigênio, podendo ser encontrado na forma de seus compostos, principalmente como argilas e micas. A bauxita é o mineral mais importante para sua extração. Os compostos do alumínio têm sido utilizados em inúmeras aplicações industriais, como por exemplo, adsolventes, floculantes, espessantes, entre outros (NOREMBERG, 2010).

O alumínio é um elemento não essencial ao qual os seres humanos são frequentemente expostos. Durante muitos anos considerou-se que o alumínio fosse um elemento que não tivesse efeitos nocivos aos seres vivos, entretanto, há uma crescente série de relatos científicos demonstrando que o alumínio possui fortes efeitos toxicológicos observados nas mais diferentes formas de vida, como algas marinhas, microorganismos, plantas e animais e, obviamente, no homem (KISS, 1995; TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007; CHENG et al., 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2013).

A exposição de seres humanos ao alumínio pode ocorrer de diversas formas, como por exemplo, por via inalatória, através de nanopartículas que entram no corpo e são incorporadas em vários tecidos e órgãos e/ou por via oral, através de água ou alimentos, e parenteral através de preparados de nutrição parenteral, medicamentos e soluções de diálise (BOHRER et al., 2002; NOREMBERG, 2010).

Estudos apontam que o alumínio é um agente neurotóxico e que as condições neuropatológicas estão associadas com elevadas concentrações de alumínio no cérebro (KLATZO et al., 1965; DEVOTO e YOKEL, 1994; KISS, 1995; TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998; KUMAR et al.,2009; CHENG et al., 2012).

Apesar dos diversos estudos sobre o possível envolvimento do alumínio em uma variedade de doenças humanas e o avanço no conhecimento dos efeitos deste metal no sistema nervoso central (SNC), ainda permanece obscuro o mecanismo exato e a atividade funcional do alumínio tanto nesse sistema quanto nos demais. Isso implica em uma avaliação médica mais detalhada em pessoas que foram expostas por esse metal e a realização de um protocolo padrão de atendimento para um possível tratamento para minimizar os danos da intoxicação, pois, a maioria dos médicos, clínicos gerais, desconhecem o quadro de sintomas clínicos ou condição subclínica de intoxicação, pelo fato dessas informações ainda estarem em análises por pesquisadores em laboratórios, a partir de estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* ou de campo (LIBERAL, 2003; KUMAR et al.,2009; SILVA JÚNIOR et al., 2009).

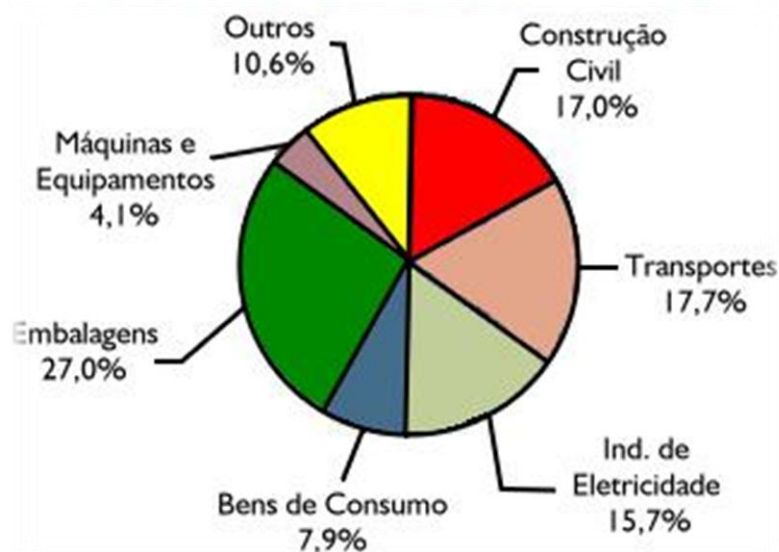
## 1.2 ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO ALUMÍNIO

O alumínio é um elemento químico de número atômico 13 (13 prótons e 13 elétrons) com massa atômica 27 u. Com poucas exceções, encontra-se nos compostos químicos na forma de  $Al^{3+}$ . São conhecidos nove isótopos do alumínio, com números de massa entre 23 e 30, ocorrendo naturalmente, apenas, os isótopos  $^{27}Al$  e  $^{26}Al$ , sendo o primeiro o mais abundante e o segundo o mais estável (AZEVEDO e CHASIN, 2003; BUNDY, 2010).

O alumínio é uma das espécies mais reativas que se conhece. A temperaturas elevadas, cerca dos 180°C, reage com a água, produzindo hidróxido

de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), e com outros óxidos metálicos, produzindo o respectivo metal e óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Ele pode também complexar com espécies ricas em elétrons, como o flúor e o cloro (AZEVEDO e CHASIN, 2003; ATSDR, 2006).

O alumínio tem sido amplamente usado em diversos segmentos, pois apresenta leveza, condutividade elétrica, resistência à corrosão e baixo ponto de fusão que lhe conferem uma multiplicidade de aplicações: embalagens, transporte, construção civil, bens de uso, combustível sólido para foguetes, produção de explosivos, transmissão elétrica, recipientes criogênicos até  $-200\text{ }^\circ\text{C}$  e mesmo para a fabricação de caldeiras, conforme podemos ver na figura 1 (ATSDR, 2006).



**Figura 1.** A utilização do alumínio em diversos segmentos. Fonte: <http://www.rocelaluminio.com.br>

Todavia, mesmo com baixo custo para sua reciclagem, o que aumenta sua vida útil e a estabilidade do seu valor, a elevada quantidade de energia necessária para sua obtenção reduz sobremaneira o campo de aplicação do alumínio, além das implicações ecológicas negativas no rejeito dos subprodutos do processo de

reciclagem, ou mesmo de produção do alumínio primário (RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

### 1.3 BIODISPONIBILIDADE DO ALUMÍNIO

Formando cerca de 8% da crosta terrestre, o alumínio possui uma biodisponibilidade muito grande (ZATTA et al.,2003; KUMAR et al., 2009; WU et al., 2012). Sua biodisponibilidade decorre principalmente de chuvas ácidas, as quais o liberam do solo na água fresca, tornando-o acessível aos seres vivos (KISS, 1995).

A atividade antropogênica do alumínio é bem diversificada tanto na forma quanto na sua aplicabilidade, o que contribui para aumento do processo de liberação deste metal. Desde sais de alumínio usados em sistemas de tratamento de água como o sulfato de alumínio e em medicamentos antiácidos à base de hidróxido de alumínio até recipientes para o cozimento ou conservação de alimentos líquidos ou sólidos. Nestas condições, reações com diversos tipos de sais provocam oxidação e resultam na liberação do alumínio de seus revestimentos (MARTINS, 1986; TAPPARO et al.,1995, ZATTA et al., 1998; BONDY, 2010).

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

A biodisponibilidade e os processos de liberação do alumínio têm sido alvos de vários estudos como os de Alfrey (1986); DeVoto e Yokel (1994); WHO (1994); Sabino et al.(2004) e; Colino et al. (2009) para tentar compreender a toxicologia deste metal, bem como as principais fontes de exposição e os níveis de concentrações de alumínio no ambiente.

Na água potável podemos encontrar concentrações de alumínio de 0,2 mg/L, segundo revela a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde. WHO (1994), afirma que em águas macias, presentes em solos ácidos, as concentrações de alumínio podem atingir 200 a 300 µg/L, podendo aumentar para 600 µg/L em áreas reflorestadas. Nas águas de superfície, DeVoto e Yokel (1994) afirmam que o alumínio é encontrado em uma concentração de 0,016 a 1,17 mg/L.

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

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

Em um estudo realizado por Colino et al. (2009) para investigar os níveis de metais pesados em peixes da espécie *Brachyplatystoma vailantii*, popularmente conhecida como piramutaba, capturadas na Baía de Marajó e comercializada no município de Belém, foi encontrada uma concentração elevada de alumínio, com valores variando entre 6,28 a 19,93 mg/kg, o que é extremamente preocupante haja vista que o consumo de peixes desta espécie é relativamente alta na região norte.

#### 1.4 TOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO

Durante anos pensava-se que o alumínio fosse um elemento que não oferecesse efeitos danosos aos organismos vivos. No entanto, este cenário vem se modificando desde a década de 60 com os primeiros trabalhos publicados por Klatzo

et al.(1965) mostrando uma degeneração neurofibrilar no SNC de coelho, após intoxicação com fosfato de alumínio.

Nos últimos anos, essa evidência se fortaleceu por dois motivos independentes, mas convergentes: a maior biodisponibilidade ambiental do íon livre do alumínio, o  $Al^{+3}$ , aos seres vivos, decorrente de chuvas ácidas (MARTIM, 1994; KISS, 1995) e os estudos recentes que demonstram o acúmulo de  $Al^{+3}$  em fluidos, tecidos e sistemas biológicos como agente tóxico sobre plantas, animais e no homem (KISS, 1995; TAPPARO, 1995; ZATTA et al., 1998; ABU-TAWEL et al.,2012).

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

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

Aves e outros animais terrestres submetidos a uma dieta rica em alumínio sofrem de perda de apetite, redução no ganho de peso ou perda de peso, sendo que em ruminantes observa-se o quadro conhecido como tetania fatal, caracterizado por fasciculações musculares, galope alterado, convulsões, hipersensibilidade, incontinência urinária seguido de morte (AZEVEDO E CHASIN, 2003; KUMAR et al., 2009; ABU-TAWEEL et al., 2012).

Em ratos submetidos à intoxicação por alumínio foi observado um efeito bifásico (aumento ou diminuição) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em

regiões do cérebro estudadas (KUMAR,1998). A resposta bifásica foi caracterizada por um aumento na resposta a dose baixa e uma diminuição em resposta a uma dose mais alta (KUMAR, 1999). Outro estudo mostrou a acumulação de alumínio no tecido cerebral de ratos após intoxicação crônica (STRYUS-PONSAR et al,1997).

Nos seres humanos o alumínio pode se acumular nos ossos, fígado, rins, coração, sangue, e principalmente no encéfalo pela sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica onde se acumula nas células nervosas, chegando a alcançar concentrações micromolares nessas células (AREMU e MESHITSUKA, 2006; KAIZER, 2008; WU et al., 2012). A acumulação do alumínio principalmente no encéfalo pode ocasionar diversas manifestações neurológicas, dentre elas podemos citar a encefalopatia, déficits de memória, tremores, espasmos, enfraquecimento da coordenação motora, movimentos lentos, perda de entusiasmo e convulsão generalizada com sintomas de epilepsia (ZATTA et. al, 1998; WU et al., 2012).

Segundo Veer Bala Gupta *et al.* (2005) e Kaizer (2008), recentes estudos epidemiológicos, neuropatológicos e bioquímicos têm verificado que é possível uma ligação entre a neurotoxicidade do alumínio e a patologia Mal de Alzheimer. Contudo, essa relação ainda é muito discutida na comunidade científica mundial. Segundo Ferreira *et al.* (2008), o Mal de Alzheimer é provavelmente o resultado de um processo de envelhecimento multifatorial que está associado à componentes genéticos e ambientais. Entre os fatores ambientais está a exposição ao alumínio.

## 1.5 TOXICOCINÉTICA DO ALUMÍNIO

O trânsito do alumínio no organismo ainda não está completamente elucidado. Em mamíferos, sabe-se que o alumínio é pouco absorvido no trato gastrointestinal após sua ingestão, sendo que a maior parte dos compostos é

transformada em sais insolúveis (principalmente fosfato de alumínio) no tubo digestivo (BAST, 1993; BONDY, 2010).

A absorção do alumínio depende da rota de ingestão e esta, por sua vez, depende da forma química do metal (FIMREITE et al., 1997; ROBERTS et al., 1998 apud BAST, 1993) e da habilidade gastrintestinal para dissolver o alumínio e também da acidez das secreções gástricas (LIBERAL, 2003; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007).

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

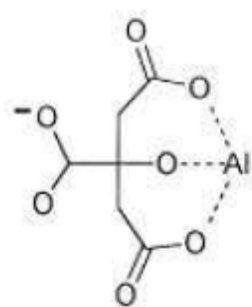
Bast (1993) verificou que 10% do alumínio presente na dose 200 mg/ kg de  $Al_2(SO_4)_3$  (dose elevada) foi absorvido pelo trato gastrintestinal de ratos. Cunat et al. (2000) verificaram que o alumínio é melhor absorvido quando presente em sais de citrato que em outros sais (tartarato de alumínio, gluconato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

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

O citrato atua como veículo, onde a passagem do alumínio depende de sua ligação a um citrato livre (EXLEY, 1999). O complexo Al-citrato é formado pela



ligação do alumínio com o grupo hidroxil e dois terminais carboxilados do citrato (GREGOR & POWELL, 1986). (Figura 2)



**Figura 2.** A estrutura do complexo Al-citrato. Adaptado de Yokel et al. (1999).

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

Segundo Liberal (2003), o fato da absorção intestinal de ambos depender do mesmo mecanismo, reforça a ideia de que o alumínio pode ser captado pelo mesmo transportador de citrato. Pajor (1999) relatou que a absorção de citrato está acoplada a um transportador de sódio, o  $\text{Na}^{+1}$  / dicarboxilato cotransportador, o qual se associa ao cloreto, liberando o citrato para ligações com alumínio.

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

para novas ligações e possível absorção no trato intestinal (DEVOTO e YOKEL, 1994).

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

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

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

Ao ser administrado por via oral em coelhos, o alumínio pode atravessar a barreira placentária e se acumular no feto, podendo ser também transferido para o recém-nascido através do leite (CAIPIRA e MCNAMARA, 1985; COLOMINA et al., 2005; ABUL-TAWEEL et al., 2012).

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

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

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

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

## 1.6 NEUROTOXICOLOGIA DO ALUMÍNIO

O alumínio é conhecidamente um elemento neurotóxico. A evidência dessa neurotoxicidade é a sua presença no SNC, uma vez que o mesmo ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica alterando o fluxo de moléculas e íons dentro e fora do cérebro (MESHITSUKA e AREMO, 2007; BONDY, 2010). Dessa forma, há o reconhecimento do alumínio como um agente neurotóxico, e vários estudos atribuem seu envolvimento na etiologia da Doença de Alzheimer (DA) e Demência

Dialítica (DD) (TAPPARO et al 1995; YOKEL et al., 1999; VEER BALA GUPTA, et al., 2005; AREMU e MESHITSUKA, 2006; BONDY, 2010).

Há também relatos de que este metal pode ocasionar outras desordens/doenças, tais como: (a) estresse ou morte celular de neurônios e células gliais. A morte dessas células ocorre devido o alumínio diminuir a habilidade neuroprotetora dos astrócitos para a manutenção e vida dos neurônios (MESHITSUKA e AREMO, 2007).

Já o estresse oxidativo é caracterizado por um significativo aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células e tecidos pelo alumínio (KAIZER, 2008); (b) peroxidação lipídica ocorre devido o aumento do metabolismo oxidativo nas células, pois a interação do alumínio com as membranas celulares, constituem seu principal alvo, induzindo alterações estruturais e funcionais das membranas (KAIZER, 2008); (c) bloqueio dos sistemas de transmissão intracelular, resultando na geração de radicais livres de oxigênio (KOENIG e JOPE, 1987; WOOD et al., 1994); (d) interferência no sítio de ligação de cálcio dentro da célula. Um dos sítios primários de toxicidade do alumínio pode estar relacionado com sua inserção nos domínios de ligação de metais nas enzimas e lipídeos, causando uma alteração no metabolismo e sinalização celular (MARTIN, 1992); (e) danos no transporte axonal (TRONCOSO et al., 1985); (f) perda de memória (YATES, et al., 1980; ARENDT, et al., 1985; RONDON-BARRAGÁN et al 2007); (g) esclerose lateral amiotrófica e (h) parkinsonismo (BARRETO e ARAUJO, 2008; BONDY, 2010).

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

al, 1995; VEER BALA GUPTA, et al., 2005). Essa gama de evidências acerca dos efeitos tóxicos do alumínio, inclusive com a utilização de modelos animais, levou os investigadores da área a tentar formular hipóteses acerca de possíveis modos de ação desse íon metálico no SNC.

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

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

## 1.7 ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS E NEUROCOMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AO ALUMÍNIO

Nos últimos anos tem crescido a preocupação sobre os potenciais efeitos adversos do alumínio na saúde, em especial no sistema nervoso central (SNC), uma vez que este sistema é extremamente afetado pelo neurotóxico (BUNDY, 2010).

Muitas regiões do SNC, afetadas pelo neurotóxico, pertencem ao sistema límbico, que está envolvido com o comportamento emocional humano (STRYUS-PONSAR et al., 1997; LI et al., 2008; BONDY, 2010). Formam esse sistema a área septal, amígdala, hipocampo, corpos mamilares, giro do cíngulo e o giro parahipocampal, que possuem conexões com o hipotálamo, córtex pré-frontal e o tálamo que, por sua vez, possui conexões com os núcleos da base (SCORZA et al., 2005).

Estudos mostram que o alumínio não estaria envolvido apenas em quadros sintomáticos de doenças orgânicas e neurodegenerativas, mas também em uma série de processos cognitivos, como memória e emoção (KING, 1984; CHONG e SUH, 1995; DLUGASZEK et al, 2000; VER BALA GUPTA, 2005; NEHRU, BHALLA e GARG, 2006; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007; SILVA JÚNIOR et al., 2013).

A memória é a base do conhecimento, estando envolvida com a orientação no tempo e no espaço e com as habilidades intelectuais e mecânicas. Aprendizagem e memória são suporte para todo o nosso saber, habilidades e planejamento, fazendo considerarmos o passado e nos situarmos no presente, prevendo o futuro (PINTO, 1998; QUEVEDO et al., 2003).

Uma das estruturas fundamentais para o aprendizado e memória é o hipocampo, localizado medialmente ao ventrículo lateral e consistindo em duas finas áreas de neurônios, dobradas uma sobre a outra (SCORZA et al., 2005). Uma área é denominada de *cornu de Amon* e é dividida em 4 regiões denominadas CA1, CA2,

CA3 e CA4. O corno de Amon forma o hipocampo propriamente dito. A CA2 é pequena, e indistinta em algumas espécies, por isso ele é frequentemente incluído em CA1 nas análises. A outra área é denominada de *giro denteado*. Estudos sugerem que essa estrutura está envolvida com os aspectos emocionais do aprendizado e memória (LOMBARDO et al., 2001; REZAYAT et al., 2009).

Nas últimas quatro décadas estudos têm evidenciado que importantes tipos de memória estariam sendo afetados pelos compostos do alumínio, como por exemplo, a memória espacial e a memória emocional (SILVA JÚNIOR, 2013).

A memória espacial posiciona o animal de forma adequada à melhor realizar suas atividades no meio ambiente, sejam elas básicas como encontrar alimento e abrigo, sejam elas atividades mentais superiores, como as coordenadas geográficas utilizadas pelo homem. Através da memória espacial os animais constroem um mapa de seu mundo externo e o internalizam com sua disposição, sua temporalidade e, acima de tudo, no caso do homem, com sua significação. Circuitos cerebrais e sistemas de neurotransmissão específicos garantem esse processo (MORRIS, 1984; SANTOS, 1997).

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

As implicações do alumínio em desordens neurológicas e cognitivas sugerem que esse metal pode ser um fator etiológico de danos aos processos de aprendizagem e de memória. A importância de se compreender as bases

moleculares e celulares dos efeitos neurotóxicos do alumínio tem estimulado enormes esforços no desenvolvimento de modelos moleculares, celulares e animais (TAPPARO et al., 1995; WU et al., 2012).

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

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

Através de estudos bioquímicos e neuroquímicos tem sido mostrando alterações nos circuitos neurais em estruturas límbicas do encéfalo, principalmente no hipocampo, utilizando majoritariamente o sistema acetilcolinérgico de neurotransmissão, parecem ser cruciais para o quadro histológico da DA (BUSH, 2000; VER BALA GUPTA, 2005; SETHI et al, 2008). Interessantemente, esses mesmos métodos têm demonstrado que o alumínio inibe a glicólise e diminui a atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT), bem como o transporte de colina em cérebro de ratos (YATES et al, 1980; KING,1984; KUMAR,1998).

Esses dados corroboram uma hipótese acerca do papel do alumínio nos déficits de memória, característicos da DA, uma vez que a ChAT e o transporte de



colina são parâmetros para a síntese de acetilcolina, o principal neurotransmissor envolvido nos processos de armazenamento de informação e que também encontra-se diminuída na DA (YATES et al, 1980; ARENDT et al,1985).

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

## 1.8 O USO DE MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS ACERCA DOS EFEITOS DO ALUMÍNIO

O uso de modelos animais na investigação do alumínio teve início na década de 60 com Klatzo et al (1965), os quais desenvolveram um procedimento experimental de degeneração neurofibrilar, que consistia na administração intracerebral de fosfato de alumínio em coelhos, resultando no desenvolvimento de convulsões e modificações neuronais (degeneração neurofibrilar) no SNC.

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

Dentre diversos estudos utilizando modelos animais, podemos citar Hermenegildo et al (1999) que mostram danos à rota do GMP cíclico do glutamato - óxido nítrico (Glu-NOGMPc), em ratos expostos a sulfato de alumínio na água ingerida durante 3-5 semanas; Kumar (1998), que após administrar oralmente a dose de 320 mg/kg de cloreto de alumínio por 4, 14 e 60 dias, observou efeito bifásico de alumínio sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em neurônios do bulbo olfatório e do hipotálamo de ratos; Stryus-Ponsar et al, (1997) relataram, após intoxicação por via intraperitoneal de gluconato de alumínio em ratos, durante 3 meses, acumulação do alumínio no tecido cerebral, sendo maior no córtex temporal, no núcleo olfatório anterior e no hipocampo, média no córtex frontal e parietal, e baixa no cerebelo e na medula. Ainda neste experimento, foram realizados testes comportamentais no labirinto radial de 8 braços para conhecer as relações entre acúmulo de alumínio e comportamento, os quais foram inconclusivos e, na opinião dos autores, precisariam ser refeitos e ampliados.

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

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

Prabhakar *et al.* (2011), avaliaram o estresse oxidativo induzido por tratamento agudo via oral nas doses de 500, 1000 e 2000 mg com Trióxido de alumínio nanoparticulado, adotando grupos experimentais com diferentes concentrações (30 nm, 40 nm e solução saturada com pureza >90%), dando um tempo de sobrevivência de 14 dias. Os resultados deste estudo revelaram que o efeito do estresse oxidativo diminuiu de maneira inversamente proporcional ao aumento do tempo de sobrevivência e o exame histopatológico mostrou lesões apenas no fígado de animais que receberam a dose 2000 mg de Trióxido de alumínio.

Recentemente, Abu-Taweel *et al.* (2012), relataram os efeitos toxicológicos do alumínio em prole de camundongos, cuja as mães foram intoxicadas com cloreto de alumínio por via oral desde a gestação até 15º dia do período pós-natal. Os resultados deste estudo revelaram que os filhotes apresentaram redução no peso corporal, atraso na abertura dos olhos e no aparecimento de pêlos e déficits nos reflexos sensorio-motor durante o período de desmame. Já no período da adolescência, os camundongos apresentaram prejuízos significativos em sua atividade locomotora e perda de memória quando submetidos aos testes do campo aberto e labirinto aquático de Morris, respectivamente.

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

## 1.9 TERAPIA DE TRATAMENTO PARA A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO

Os tratamentos clínicos para intoxicação de pessoas expostas ao alumínio ainda não estão bem estabelecidas. Contudo, existem alguns estudos sugerindo possíveis tratamentos com quelantes, aminoácidos, fibras e antioxidantes (NICHOLAS et al, 1997)

Os quelantes mais utilizados são EDTA, bentonita e alginato que atuam ligando-se ao alumínio para a retirada do metal do organismo pela via intestinal. Já os aminoácidos usados são D, L-metionina e L-cisteína que atuam auxiliando nos processos de desintoxicação do organismo (NICHOLAS et al, 1997).

O tratamento com fibras vegetais também é utilizado, uma vez que as mesmas possuem propriedades de quelar alguns metais pesados e excretá-los do organismo (NICHOLAS et al, 1997). A terapia realizada com antioxidantes para desintoxicação de pessoas expostas ao alumínio é feita com medicamentos com base em  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) (NICHOLAS et al, 1997). A utilização destes medicamentos tem como objetivo inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (VASCONCELOS et al, 2007).

Recentemente, novos tratamentos estão sendo implementados em laboratórios com roedores antes de serem estabelecidos na clínica médica. Dentre estes, podemos destacar o uso combinado de EDTA com própolis que diminuiu significativamente a toxicidade de alumínio em ratos intoxicados agudamente com o metal (BHADAURIA, 2012); o uso de polifenóis extraídos da casca do fruto da jujuba chinês foram administrados em ratos *Wistar* após a intoxicação com alumínio e os resultados revelaram que este tratamento apresentou um efeito protetor sobre os

tecidos do coração e do sistema nervoso central em relação aos danos oxidativos causados pelo alumínio (CHENG et al, 2012); a administração de carvedilol também foi testada para avaliar o seu papel neuroprotetor sobre o sistema nervoso central, em especial no hipocampo de ratos intoxicados com alumínio e sua eficácia foi comprovada através de testes comportamentais de aprendizado e memória, onde os ratos que receberam esta substância apresentaram um ótimo desempenho comportamental nos referidos testes (KUMAR et al, 2011).

#### 1.10 O USO DO MAGNÉSIO COMO AGENTE ANTINFLAMATORIO E NEUROPROTETOR

O magnésio é o mais abundante e importante cátion bivalente intracelular, com uma variedade de funções (WALLACE, 2003). Seu uso na medicina teve início a partir de 1920, quando Lazard descreveu a utilização do sulfato de magnésio pela primeira vez como uma droga ideal tanto para a profilaxia como para o tratamento das convulsões eclâmpicas, indicando a efetividade e segurança da droga, que reduz significativamente o risco de convulsões, bem como o de morte materna (LAZARD, 1925).

As funções normais do cérebro, como aprendizagem e memória envolvem os amino ácidos excitatórios glutamato e aspartato nos receptores NMDA. E estes controlam as quantidades vitais de  $Ca^{2+}$ , mas, em situações anormais ocorre influxo de  $Ca^{2+}$  o que leva a formação espécies reativas de oxigênio e quantidades tóxicas de óxido nítrico (BLAYLOCK, 1999; MARK et al., 2001). E associados a desequilíbrios nos gradientes de cálcio, sódio e cloro levam ao aumento do tamanho neuronal e morte celular (GILLESSEN et al., 2002).

Neurônios necessitam de quantidades adequadas de magnésio para evitar a excessiva excitação neuronal pelo cálcio, que se não for controlada pode resultar em comportamento de depressão ou ansiedade, pois a exposição elevada ao cálcio e glutamato associada a quantidades mínimas de magnésio especialmente no hipocampo, desempenham um papel vital na disfunção de células cerebrais sináptica levando a um aumento da produção do óxido nítrico, que se expressa para os seres humanos como depressão e ansiedade, hiperexcitabilidade, convulsões, perda de memória e várias outras sintomas que vão da apatia à psicose (GEORGE et al, 2010).

O magnésio pode atuar como agente neuroprotetor e com ação antioxidante, uma vez que este elemento pode bloquear a entrada de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro dos neurônios através da atuação moduladora em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), pois sabe-se que o cálcio ativa enzimas intracelulares que degradam lipídios, liberando assim, radicais livres importantes na lesão celular (LIBIEN et al, 2005; TRINDADE, 2006; DITOR et al. 2007).

Estudos apontam o sulfato de magnésio como um agente antiinflamatório, que age sobre a diminuição da produção de superóxidos e limpando os radicais livres (WALLACE, 2003; LIBIEN et al, 2005; TRINDADE, 2006).

Em estudos com ratos, o tratamento sistêmico com magnésio resultou em resistência a crises convulsivas por estimulação elétrica e também na indução de crises pela estimulação de receptores NMDA hipocampais. O tratamento sistêmico com sulfato de magnésio causa uma significativa redução na capacidade de ligação dos receptores NMDA no cérebro (LIBIEN et al, 2005; TRINDADE, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar os efeitos comportamentais, histopatológicos e bioquímicos da intoxicação crônica com citrato de alumínio sobre o hipocampo de ratos adultos e, ao mesmo tempo delinear uma terapia experimental de tratamento com magnésio para a reversão das alterações neuropatológicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos da administração crônica de citrato de alumínio sobre atividade exploratória e locomotora dos animais submetidos aos testes do campo aberto e do Rota Rod;
- Verificar os efeitos da administração crônica de citrato de alumínio sobre o desempenho comportamental em ratos *Wistar* submetidos aos testes do labirinto em T elevado e de reconhecimento social;
- Determinar as concentrações de alumínio em amostras de hipocampo e soro de ratos adultos;
- Investigar qualitativamente os efeitos da intoxicação experimental com citrato de alumínio sobre o padrão de perda celular e astrocitose no hipocampo;
- Comparar os efeitos do tratamento com magnésio sobre os eventos neuropatológicos e;
- Avaliar a capacidade antioxidante total (TEAC) e nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) em soro de animais tratados com sulfato de magnésio em relação aos animais intoxicados com citrato de alumínio.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho foram utilizados 70 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, experimentalmente ingênuos com peso entre 170 e 230 g com 2 meses de vida fornecidos pelo Biotério central da Universidade Federal de Pará (UFPA).

Os animais foram alojados em gaiolas-viveiro de plástico, com dimensões de 30 cm x 20 cm x 12 cm, divididos em grupos de 5 animais por caixa de acordo com tratamento, no Biotério do Laboratório de Farmacodinâmica. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum* e permaneceram em uma temperatura de 25 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h.

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

#### 3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE CITRATO DE ALUMÍNIO

A solução foi preparada no Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará, seguindo o protocolo descrito a seguir:

Primeiramente, foi pesado 14,23 g de ácido cítrico e 17,89 g de cloreto de alumínio hexahidratado. Logo após, ambos os reagentes foram colocados em um becker e adicionado 100 ml de água deionizada. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 200 ml de hidróxido de amônia na solução para a obtenção de um



pH = 7. Depois a solução foi agitada a uma temperatura de 60 °C por alguns minutos e completada com água deionizada para um balão volumétrico de 500 ml.

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

A intoxicação dos animais foi realizada com citrato de alumínio administrada na dose de 100 mg/kg por via oral (v.o) e tratamento com sulfato de magnésio administrado na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) ambos em um volume de 1 mL/kg de peso corpóreo.

As doses de citrato de alumínio e sulfato de magnésio foram baseadas na literatura (MESHITSUKA e AREMO, 2007; SÁNCHEZ-IGLESIAS et al., 2007; DITOR et al. 2007) e em resultados pilotos realizados no Laboratório de Psicobiologia da UFPA.

Os grupos controles receberam a administração de citrato de sódio (CNa), solução salina (NaCl 0,9%) por v.o. na dose de 100 mg/kg. Por outro lado, os animais dos grupos controles positivos usados nos testes comportamentais, receberam os fármacos diazepam (DZP) (para o teste do campo aberto) na dose de 1 mg/kg, e cafeína (CAF) (para os testes de memória) na dose de 10 mg/kg, todos da sigma, os quais foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%).

As substâncias foram administradas pela via i.p, em um volume de 0,1 mL/100 g de peso corpóreo, 30 minutos antes dos experimentos de acordo com estudos prévios (PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005; PREDIGER *et al.*, 2008).

A distribuição dos grupos foi feita de acordo com o tratamento experimental, conforme descrição no quadro 1:

**Quadro 1:** Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

GRUPO	DESCRIÇÃO	DOSE	Nº DE ANIMAIS
G1	Controle - animais tratados com solução salina por (NaCl 0,9%) v.o.	100 mg/kg	10
G2	Controle - animais tratados com Citrato de sódio (CNa) por v.o.	100 mg/kg	10
G3	Animais tratados com Citrato de Alumínio por v.o.	100 mg/kg	10
G4	Animais tratados com Citrato de Alumínio por v.o. + Sulfato de Magnésio por via i.p.	100 mg/kg 250 mg/kg	10
G5	Animais tratados com Citrato de sódio por v.o. + Sulfato de Magnésio por via i.p.	100 mg/kg 250 mg/kg	10
G6	Controle positivo - animais tratados com Cafeína (CAF) por via i.p.	10 mg/kg	10
G7	Controle positivo - são animais tratados com Diazepam (DZP) por via i.p.	1 mg/kg	10
TOTAL			70

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental consistiu na realização de vários procedimentos (Figura 3). Primeiramente, os animais foram intoxicados com citrato de alumínio durante 30 dias. Em seguida, os ratos foram submetidos aos testes comportamentais durante dois dias. Imediatamente, após a finalização dos testes comportamentais, os animais foram encaminhados à coleta de sangue para posteriores avaliações bioquímicas e determinação das concentrações de alumínio nas amostras de soro, conforme mostra a Figura 3.

Por fim, os animais foram subdivididos em grupos para serem sacrificados por perfusão e decapitação para a retirada dos encéfalos da caixa craniana. Nos animais perfundidos e decapitados, a estrutura retirada do encéfalo foi o hipocampo

para posterior análise histoquímica/imunoistoquímica e quantificação de alumínio, respectivamente (Figura 3).

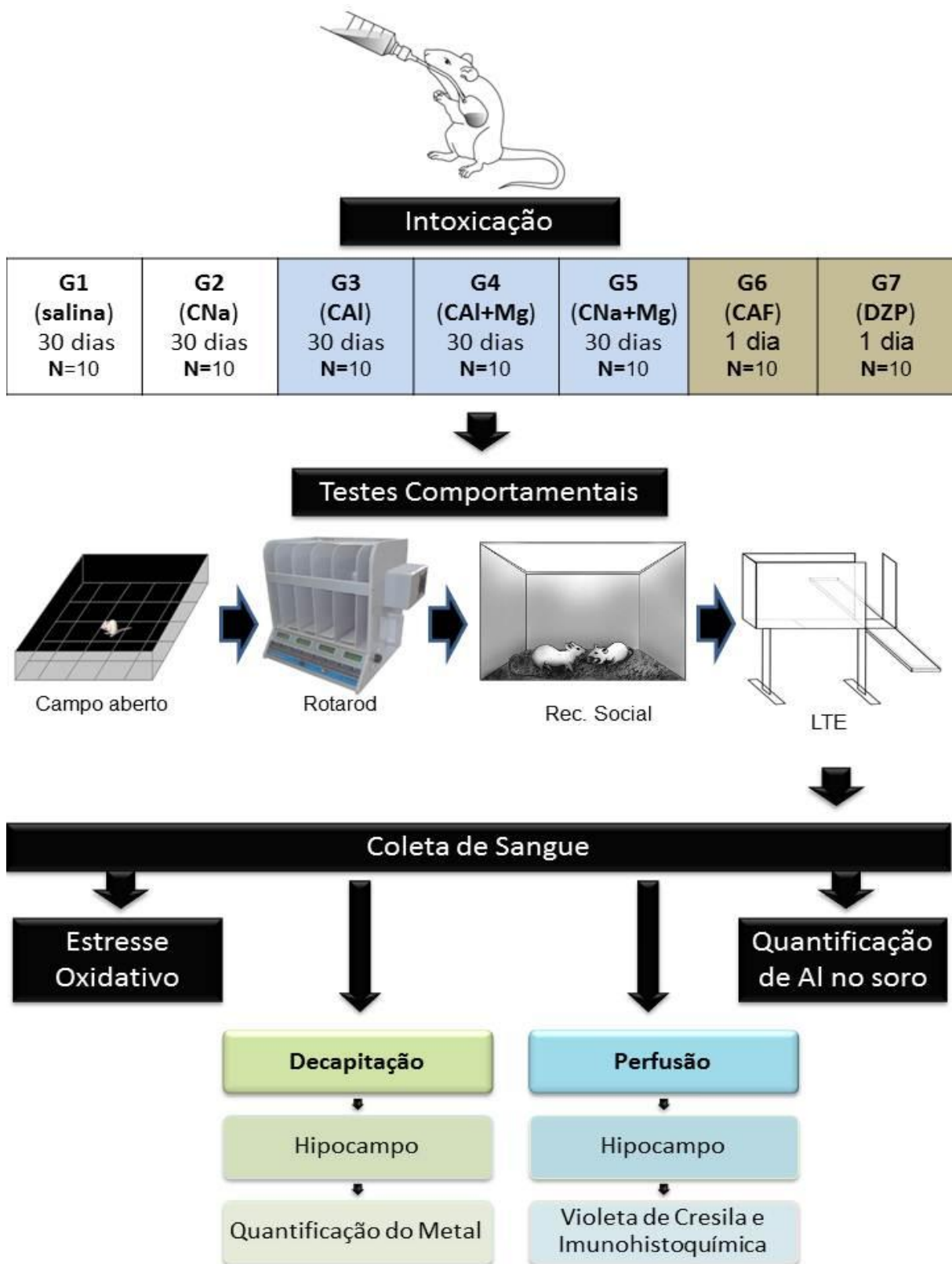


Figura 3. Desenho esquemático dos experimentos

## 3.5 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

### 3.5.1 Teste do Campo Aberto

#### 3.5.1.1 Fundamento:

Neste presente estudo, foi utilizada uma arena que, em sua essência lembra aquele que ficou conhecido como o modelo do campo aberto, desenvolvido por Calvin Hall em 1934, o qual utilizou a quantidade de defecação e urina do animal como índice de emocionalidade. A partir daí o número de variáveis dependentes utilizadas nesse modelo aumentaram consideravelmente (AGUIAR, 1995).

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

O campo aberto pode variar amplamente no tamanho, na forma (quadrado, retangular ou circular) e nos parâmetros das respostas a serem avaliados. Dessa forma, esse teste pode ser utilizado tanto para medir o comportamento do animal mediante uma simples situação de novidade, como pode servir para se avaliar efeitos de drogas, de lesões, estimulação elétrica do SNC, habituação, bem como a aprendizagem em respostas ao meio ambiente experimental (AGUIAR, 1995; NAHAS, 2001).

Por estar historicamente relacionado a pesquisas com emocionalidade, o campo aberto vem sendo utilizado para avaliar o potencial ansiolítico de drogas, pois

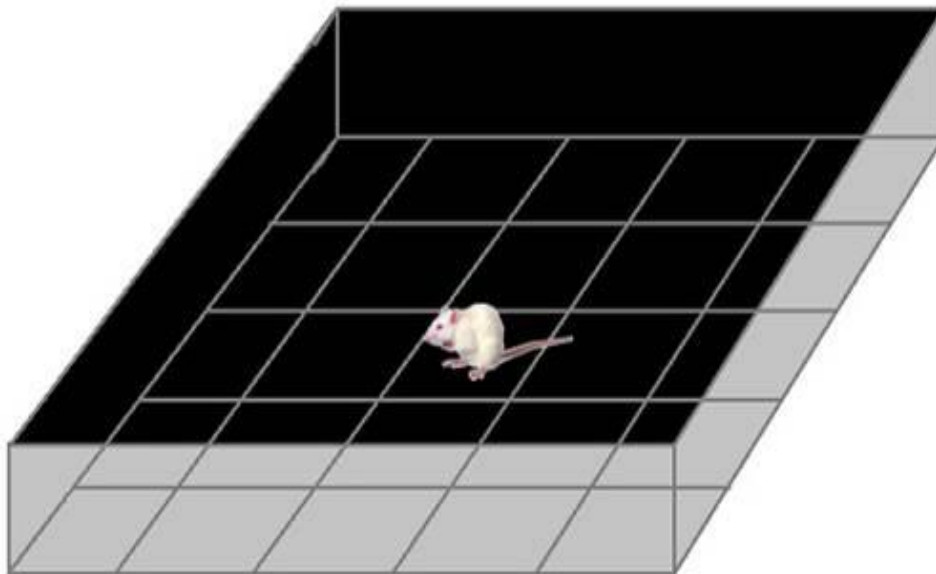
as respostas emotivas em ratos ocorrem em maior frequência e/ou duração em ambientes amplos, nos quais os roedores, por instinto, se locomovem perto das paredes, onde se sentem mais protegidos. Agentes ansiolíticos aumentam a passagem dos animais pelo centro desta arena e diminuem a defecação e/ou micção e ainda aumentam a frequência e a duração de respostas de congelamento (NAHAS, 2001; LAMPREA et al., 2008).

O objetivo da utilização desse modelo neste trabalho foi (i) verificar se a intoxicação não estaria afetando as atividades locomotoras e exploratórias dos animais experimentais, cujo prejuízo poderia mascarar ou impedir a avaliação de possíveis efeitos tóxicos do citrato do alumínio nos processos cognitivos que estamos tentando investigar e (ii) favorecer a exploração dos animais nos testes de Memória do Labirinto em T elevado (LTE) e Reconhecimento social.

#### 3.5.1.2 Equipamento:

Aparelho de campo aberto, *webcam*, computador, *software Any-Maze Stoelting®* e cronômetro.

O aparelho do campo aberto a ser utilizado nesse estudo é de madeira coberto com fórmica impermeável, ocupando uma área de 100 cm<sup>2</sup>, tendo assoalho negro dividido em 25 quadrados e cercado por paredes de madeira de 30 cm de altura, conforme a figura 4. A iluminação do ambiente foi feita com uma lâmpada fluorescente branca de 80 watts à altura de 2,60 m do centro da arena.



**Figura 4.** Campo aberto dividido em 25 quadrantes utilizado para avaliar as atividades locomotoras dos animais após o período de intoxicação.

#### 3.5.1.3 Procedimento:

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

Na análise foram avaliados os seguintes parâmetros: a distância percorrida, o levantamento, a autolimpeza e o tempo na área central do aparato (NAHAS, 1997). A Tabela 1 apresenta os parâmetros mensurados neste teste.

**Tabela 1.** Parâmetros mensurados no Teste do Campo Aberto

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Unidades</b>
Distância percorrida	Metro
Levantamento ( <i>rearing</i> )	Frequência
Autolimpeza ( <i>grooming</i> )	Frequência
Tempo Central	Segundos

A taxa de ambulação foi mensurada através da distância percorrida pelo animal no aparato com as 4 patas; o levantamento (*rearing*) foi analisado como o apoio do tronco, em posição próxima à vertical, apenas sobre as patas traseiras; a autolimpeza (*grooming*) foi considerada como movimentos dirigidos à cabeça ou ao corpo, efetuados com as patas dianteiras e; no tempo central foi avaliado a latência que o animal permaneceu no centro do aparato (NAHAS, 2001).

Antes e depois da exposição de cada animal foi realizada a limpeza do assoalho do campo aberto com álcool etílico a 10% e toalha de papel seca, deixando-o secar bem e receber a circulação normal de ar.

### **3.5.2 Teste do Rota rod**

#### **3.5.2.1 Fundamento**

O teste do rota rod foi desenvolvido por Dunham e Miya (1957) para avaliar o desempenho de roedores baseado na atividade motora forçada em um cilindro giratório de velocidade (rotação) fixa. Posteriormente, Jones e Robert (1968)

desenvolveram outra versão do teste, onde a rotação do cilindro era acelerada ao longo do experimento.

O teste atualmente é muito usado para avaliar o equilíbrio e a coordenação de ratos, em particular em modelos animais experimentais de transtornos neurológicos e efeitos de drogas. O rota rod é um dos testes mais utilizados para medir função motora dos roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para isto.

O objetivo da utilização desse modelo neste trabalho foi (i) verificar se a intoxicação não estaria afetando o equilíbrio e a coordenação motora dos animais experimentais, cujo prejuízo poderia mascarar ou impedir a avaliação de possíveis efeitos tóxicos do citrato do alumínio nos processos cognitivos que estamos tentando investigar e (ii) favorecer a exploração dos animais nos testes de Memória do Labirinto em T elevado (LTE) e Reconhecimento social.

#### 3.5.2.2 Descrição do aparato

Neste experimento, foi empregado um aparelho automatizado (Insight<sup>®</sup>, EFF-411), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 25 °C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, e que é mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias, de aproximadamente 10 cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente, conforme podemos observar na figura 5.





**Figura 5.** Rota rod de 4 baias utilizado para avaliar as atividade motora dos animais após o período de intoxicação. Fonte: <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-108-Rota-Rod>.

As quatro baias possuem sistema de detecção de queda do animal através de impacto, circuito microprocessador, para cronometragem de permanência do animal na baia e contagem de vezes em que o mesmo caiu.

### 3.5.2.3 Procedimento

O procedimento adotado neste estudo foi adaptado do trabalho de Sharma et al. (2009), onde cada animal foi colocado sobre o cilindro já em movimento, e foi medido o tempo que o rato conseguia se equilibrar até cair (latência) na baia. Os animais foram submetidos a quatro exposições (adaptação, Teste 1, Teste 2 e Teste 3) na barra giratória durante 180 segundos a 16 rotações por minuto. Para cada exposição com objetivo de verificar o tempo de permanência do animal. Os parâmetros avaliados foram o tempo de latência, isto é, o tempo de permanência do animal sobre a barra de rolagem do rota rod e o número de quedas.

A latência e o número de quedas foram verificados pelo próprio equipamento, o qual possui um sistema instalado no chão de cada baia que detecta o impacto da queda e registravam no cronômetro.

### **3.5.3 Teste de Reconhecimento social**

#### **3.5.3.1 Fundamento**

Estudos sobre os processos fisiológicos, celulares e moleculares vinculados aos comportamentos sociais em modelos animais têm contribuído para o entendimento de comportamentos complexos como a relação de agressão, dominância, subordinação e outros comportamentos. Tais comportamentos possuem como pano de fundo, lembranças de encontros sociais passados, também conhecidas como memórias de reconhecimento social (MOURA & XAVIER, 2010).

Existem peculiaridades na memória de reconhecimento social que, aparentemente, a distingue de outros tipos de memória. Por exemplo, sua duração é maior do que a da memória operacional, mas menor do que uma memória do tipo espacial ou aversiva. Isso tem levado alguns autores a caracterizá-la como um tipo específico de memória, distinto de outros já descritos na literatura da área (FERGUSON et al., 2002).

As investigações para identificar os comportamentos sociais em roedores iniciaram em 1933 com os estudos de Davis, que categorizou as interações sociais dos animais como comportamento de “luta” e os mesmos achados foram comprovados por Hall e Klein em 1942 (DAVIS, 1933; HALL & KLEIN, 1942). Já em 1963, Grant avaliou o comportamento de roedores e verificou que eles podem apresentar uma postura “agressiva” (GRANT & MACKINTOSH, 1963).

No mesmo ano, Grant (1963) realizou uma análise minuciosa das posturas observadas em encontros sociais de ratos entre 75 e 120 dias de idade, ao longo de sessões de 15 minutos, e relatou 60 tipos diferentes de posturas, incluindo as categorias “agressão” e “luta”. Grant (1963) ressaltou a ocorrência de posturas representativas de “atividade deslocada” como, por exemplo, comportamentos como beber, comer, escavar, autocatação, “postura de lado” em relação ao outro animal.

Na década de 90, os comportamentos sociais foram classificados em quatro categorias, incluindo comportamentos atentos (aproximação e perseguição), contato direto (passar por cima ou por baixo do outro animal, montar e catação sócia), comportamento agressivo (mordidas, “chutes” e posturas ameaçadoras) e comportamentos sociais de investigação. Esse último é caracterizado quando o rato obtém informações sobre o outro rato cheirando e lambendo, ou utilizando suas vibrissas para obter informações de natureza tátil (POPIK & VAN REE, 1998).

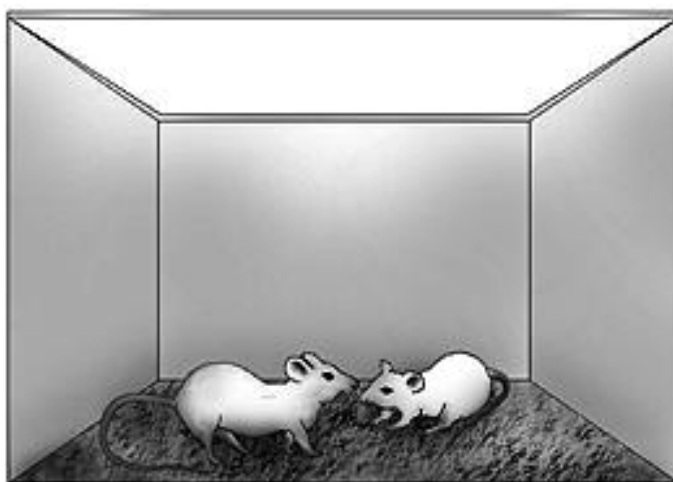
Recentemente, vários estudos com objetivo de simplificar a análise dos comportamentos sociais de roedores, passaram a registrar o tempo que os ratos permaneciam próximos de outros. Contudo, essa análise limita-se apenas as informações sobre a natureza dos comportamentos eliciados no encontro social e seu possível significado, restringindo a compreensão dos fatores que contribuem para a interação social, bem como para revelar a memória de reconhecimento social do animal (DANTZER et al., 1987; BURMAN & MENDL, 2000; FERGUSON, ALDAG, INSEL, & YOUNG, 2001; PREDIGER et al. 2005, 2010; MOURA & XAVIER, 2010).

A memória social é considerada um bom modelo animal para essa forma de memória em seres humanos que é principalmente gerada, a partir de estímulos olfativos. Esse modelo de memória é baseado no fato de que roedores gastam muito

mais tempo investigando intensamente um rato jovem não familiar do que um familiar (DANTZER e *et al.*,1987).

### 3.5.3.2 Descrição do aparato

O teste foi realizado em gaiola-viveiro de plástico, com dimensões de 30 x 20 x 12 cm, onde os mesmos foram habituados (Figura 6).



**Figura 6.** Memória social avaliada no teste de reconhecimento social. Fonte: Prediger, 2010.

### 3.5.3.3 Procedimento

O procedimento adotado neste estudo foi adaptado do trabalho de Prediger et al. (2010), onde foram utilizados ratos, machos, com 3 meses (idade atual no final da intoxicação) (adultos) e com 25 dias a 1 mês (jovens), sendo que esses últimos serviram somente de estímulo social para os animais adultos. Esses animais foram levados em gaiolas-viveiro de plástico para o Laboratório de Farmacodinâmica, da UFPA, onde foram habituados ao novo ambiente por um período de 1 hora antes do início dos testes. Todos os ratos juvenis foram isolados em gaiolas individuais 20 minutos antes do início do experimento.

Após o período de habituação, cada rato jovem foi exposto ao rato adulto duas vezes durante 5 minutos, separados por um intervalo de tempo de 30 minutos.

Em cada exposição, o parâmetro avaliado foi o tempo em que o rato adulto levava para explorar/investigar (cheirar, lambe ou comportamento decorrente de qualquer tipo de aproximação) o rato jovem, sendo que no final da primeira exposição, o rato jovem retornava à sua caixa específica e era reexposto ao mesmo animal, 30 minutos depois. O intervalo de 30 minutos foi usado como uma espécie de janela temporal para testar a memória do animal.

### **3.5.4 Teste do Labirinto em T elevado**

#### 3.5.4.1 Fundamento

O Labirinto em T elevado (LTE) é uma modificação do labirinto em cruz elevado (LCE), o qual foi desenvolvido por Handley e Mithani em 1984, com o objetivo de detectar os efeitos de drogas ansiolíticas e que se consolidou como um modelo comportamental largamente utilizado para o estudo da ansiedade (VIANA et al,1994; AGUIAR, 1995).

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

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

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

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

O LTE foi desenvolvido para medir respostas relacionadas tanto ao medo aprendido como ao medo inato (medo incondicionado) no mesmo indivíduo, e simultaneamente a avaliação de memória para estes comportamentos (VIANA et al., 1994). Este modelo é construído com pelo menos dois ambientes e com diferentes níveis de aversão: frequentemente provoca medo e favorece o comportamento

exploratório, levando a um adequado conflito de esquiva (HANDLEY e MCBLANE, 1993; MONTGOMERY, 1955). A ausência de paredes e a impossibilidade de girar com as patas traseiras parecem ser a base da aversão de roedores a espaços abertos, sugerindo que esta característica deva ser a base do comportamento de esquiva em relação aos braços abertos do LTE (GRAEFF, 1999).

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

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

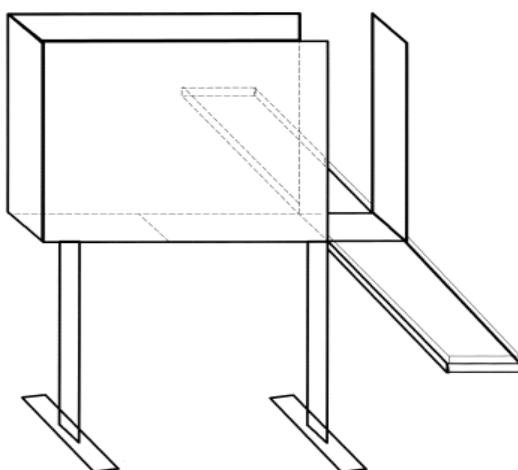
A metodologia deste modelo consiste basicamente em colocar o animal repetidamente dentro do braço fechado para explorar o labirinto permitindo ao mesmo aprender o comportamento de esquiva inibitória dos braços abertos. Por outro lado, o posicionamento do animal no final de um dos braços abertos leva a uma resposta de fuga do mesmo (VIANA et al., 1994).

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

#### 3.5.4.2 Descrição do aparato

O LTE é constituído por três braços de madeira, medindo cada um 50 cm de comprimento por 12 cm de largura, onde um dos braços é circundado

lateralmente por paredes opacas de 40 cm e é disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Todo o conjunto está elevado 50 cm do solo. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma tira de madeira de 1 cm de altura, ilustrado na Figura 7 (GRAEFF, 1993; ZANGROSSI JR e GRAEFF, 1997).



**Figura 7.** Labirinto em T elevado, construído a partir do modelo descrito por Zangrossi Jr e Graeff (1996).

#### 3.5.4.3 Procedimento

O procedimento adotado neste estudo foi adaptado do trabalho de Takahashi et al. (2005) e Silva Júnior et al. (2013), onde cada animal foi colocado pelo experimentador no fim do braço fechado com a cabeça voltada para o centro do labirinto para se medir a latência (tempo) de saída do animal para um dos braços abertos, com as quatro patas em um período de 300 segundos, que foi o tempo padronizado para o teste de aquisição de memória. Quando o animal posicionava as quatro patas em um dos braços abertos, o teste era finalizado e o animal retornava para o campo aberto de madeira por 30 segundos. Os ratos foram submetidos



novamente, no mesmo dia, a tantos testes quanto fossem necessários para alcançar o critério de permanecer 300 segundos no braço fechado (critério de esquiva).

Logo após o rato conseguir adquirir o critério de esquiva, era realizado o teste de fuga, onde o animal foi colocado no fim do braço aberto direito do labirinto para registrar a latência (tempo) que ele levava para sair com as quatro patas do braço aberto até sua entrada no braço fechado. Após esses procedimentos os ratos retornavam às suas gaiolas para serem testados no dia seguinte.

Após 24 horas do treinamento, foi realizado o teste de memória de longa duração, onde os animais foram posicionados no final do braço fechado e cronometrado o tempo de saída com as quatro patas para um dos braços abertos.

Depois 30 segundos, foi realizado um reteste para verificar a memória de curta duração, onde cada rato foi recolocado no braço fechado do LTE, adotando-se o mesmo procedimento anterior.

### 3. 6 COLETA DE SANGUE

Logo após a finalização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com éter e as amostras sanguíneas foram obtidas, através da punção do plexo retro orbital com capilares hematócrito heparinizado em tubos de *ependorf* com heparina.

Em seguida, para a obtenção do soro foi realizado uma centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos para realização de ensaios bioquímicos de estresse oxidativo e a determinação das concentrações de alumínio por análise direta em espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) (SILVA et al., 2005; SÁNCHEZ-IGLESIAS et al., 2007).

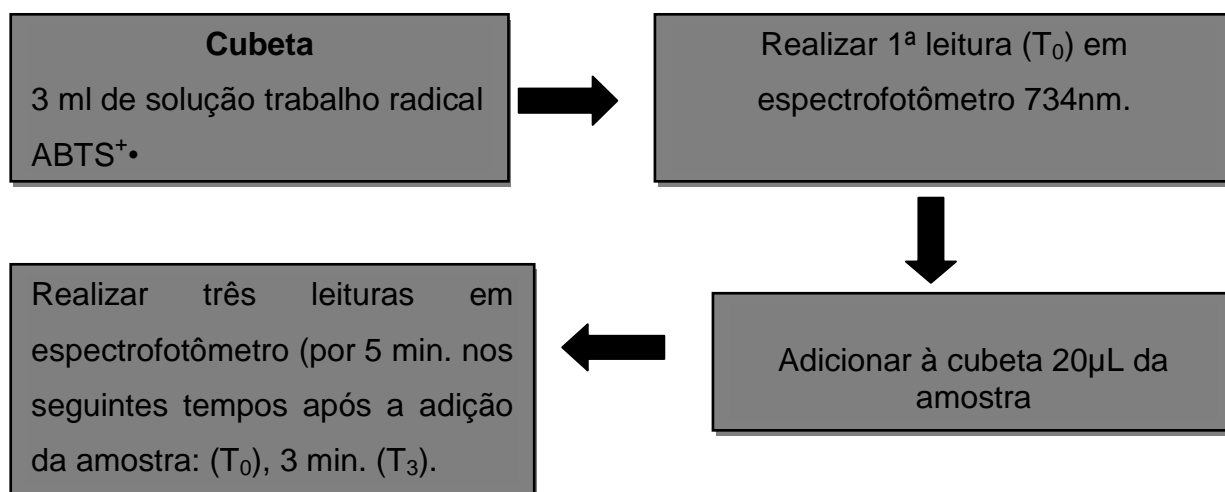
## 3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### 3.7.1 Avaliação da capacidade antioxidante total

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste TEAC (capacidade antioxidante Trolox equivalente), que consiste na inibição do cátion  $ABTS^{+\bullet}$  (radical 2,2-Azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), por antioxidantes presentes na amostra (VASCONCELOS et al. 2007).

Na metodologia utilizada (RUFINO et al. 2007), inicialmente são preparadas as seguintes soluções estoques: 7 mmol de ABTS e 2,45 mmol de persulfato de potássio. A partir da mistura destas duas soluções (88  $\mu$ L de solução ABTS e 5  $\mu$ L de persulfato de potássio) foi originada uma solução de radical  $ABTS^{+\bullet}$ , que ficou em repouso em ausência de luz por 12 horas, originando uma solução azul marinho.

Após este período, foi preparada uma solução trabalho, onde, 1 mL de solução de radical  $ABTS^{+\bullet}$  foi misturado com etanol (P.A.) até a absorbância chegar próximo a 0,7 em 734 nm. O percentual de inibição de  $ABTS^{+\bullet}$  foi determinado em função do tempo.

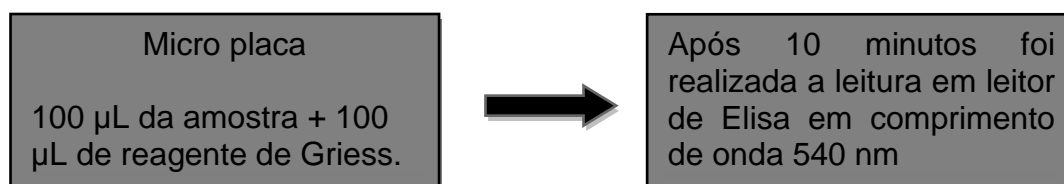


A avaliação da capacidade antioxidante total foi realizada pelo método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), que se baseia na exposição da amostra (na qual se encontram os antioxidantes) a um radical livre produzido em quantidades controladas. A incubação do  $ABTS^{\bullet+}$  com a enzima meta hemoglobina peroxidase produz o radical  $ABTS^{\bullet+}$ , o qual possui uma cor azul esverdeada estável, com leitura espectrofotométrica em 730 nm. A adição da amostra produz a inibição na produção de radical  $ABTS^{\bullet+}$ , levando à diminuição na absorvância em 730 nm.

Neste estudo, a leitura da absorvância (A1) foi realizada em 730 nm. Um volume de 20  $\mu$ L de substrato foi adicionado e disparado o cronômetro simultaneamente. A leitura da absorvância em 730 nm foi feita após exatamente três minutos (A3). As cubetas foram mantidas à 37°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro com fluxo contínuo.

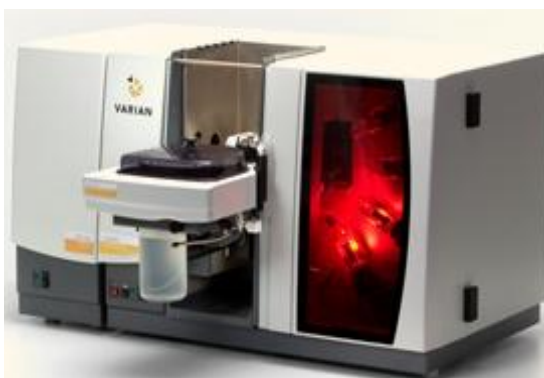
### 3.7.2 Dosagem de Nitratos e Nitritos

Para a dosagem de nitritos ( $NO_2^-$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ) foi adicionado o reagente de Griess na amostra (soro) em proporção 1:1 (v/v), ou seja, para cada 100  $\mu$ L de amostra, foi adicionado 100  $\mu$ L do reagente em placa de ELISA. Depois de adicionado o reagente, foi aguardado 10 minutos e realizado a leitura em leitor de ELISA no comprimento de ondas de 540 nm, conforme o esquema a seguir.



### 3.8 DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM AMOSTRAS DE SORO

A determinação de alumínio no soro foi realizada através da análise direta usando um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) (Spectr AA240Z, Varian, Austrália) (Figura 8) sem a digestão prévia da amostra.



**Figura 8.** Espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (Modelo AA240Z, Marca Varian, Mulgrave, Austrália).

Para a dosagem, o soro foi diluído com uma solução de Triton X - 100 0,1% em HNO<sub>3</sub> 0,2% (v/v), homogeneizado e 1000 µL foi colocado no copo do amostrador do GF AAS para a quantificação do metal. O volume de injeção no forno de grafite foi 20 µL. Cada amostra foi analisada em triplicata (n= 3).

A curva analítica utilizada neste estudo foi de 0, 30, 50, 80 e 100 µg/L Al. O limite de detecção e de quantificação do forno de grafite foi de 11, 7 e 38,9 µg/L Al. A exatidão do método foi avaliada usando o teste adição e recuperação.

A programação de temperatura do forno de grafite para análise de alumínio no soro é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Programa de temperatura do forno de grafite (volume injetado: 20 µL)

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (s) (Rampa, Patamar)	Vazão do gás (L min <sup>-1</sup> )	Leitura
1	95	5, 15	3,0	Não
2	120	10, 10	3,0	Não
3	1400	5, 5	3,0	Não
4	2500	0, 2,0	0	Sim
5	2600	1,3	3,0	Não

1: Secagem 1; 2: Secagem 2; 3: Pirólise; 4: Atomização; 5: Limpeza.

### 3.9 DECAPITAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM AMOSTRAS DE HIPOCAMPO

Duas horas depois da coleta de sangue, os animais foram sacrificados rapidamente por decapitação para realização da determinação de alumínio no hipocampo dos animais (n=3–4, por grupo). As normas utilizadas para o sacrifício dos animais estão de acordo com a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (CONSELHO, 2002).

Em seguida, os encéfalos foram retirados da caixa craniana e o hipocampo foi rapidamente dissecado em lugar frio e congelado a uma temperatura de – 40°C até o momento da análise do elemento traço.

Posteriormente, os hipocampos foram liofilizadas com 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 (HNO<sub>3</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em um forno microondas com cavidade (START E, Milestone) (Figura 9) a uma temperatura de 200 °C, durante 25 minutos, conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Programa de digestão do forno microondas (volume injetado: 20  $\mu\text{L}$ )

<b>Etapas</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
1	10	800	200
2	15	800	200
3	50	0	Ambiente

Esse forno de microondas de alta pressão possui 12 frascos de TFM, sistema para monitoramento da pressão no frasco de referência e controle de temperatura dos frascos durante o programa de aquecimento. Após o resfriamento no interior do forno microondas, as amostras foram retiradas e diluídas com água deionizada até a marca de 14 mL.



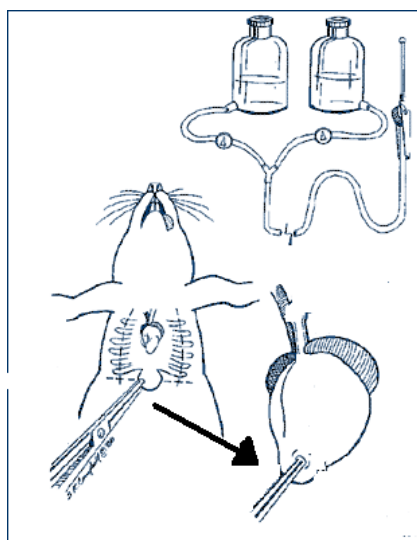
**Figura 9.** Forno microondas com cavidade (START E, Milestone)

Um volume de aproximadamente 20  $\mu\text{L}$  da amostra digerida foi introduzida no espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (Figura 8) 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.

### 3.10 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Logo após os testes comportamentais descritos anteriormente, os ratos (n= 5-6, por grupo) foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (72 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (9 mg/kg) (*i.p.*). Após a ausência dos reflexos corneanos e de retirada da pata, foi iniciada rapidamente a toracotomia para a visualização do coração. Em seguida, o clampeamento da aorta descendente e uma cânula foi introduzida no ventrículo esquerdo e direcionada até a porção inicial da aorta. Uma pequena incisão no ventrículo direito foi realizada para a eliminação do sangue do animal, conforme a Figura 10. O protocolo utilizado para esse procedimento foi baseado no trabalho de Gomes-Leal et al (2004) (Anexo 1).



Perfusion Setup Diagram

**Figura 10.** Procedimento de perfusão. Após a anestesia, cada animal foi perfundidotranscardiacamente com salina heparinizada, seguido de fixação, para posterior craniotomia. A seta indica o posicionamento que a agulha foi inserida no coração. Fonte: <http://www.neuroscienceassociates.com/images/Graphics/perfusion.gif>

A perfusão dos animais foi realizada com solução salina a 0,9% heparinizada seguida de paraformaldeído a 4% para a fixação. Após a pós-fixação, os encéfalos foram submetidos ao processo de crioproteção utilizando o seguinte protocolo: i) solução crioprotetora a 25% por um dia; solução crioprotetora a 50% por dois dias e; solução crioprotetora a 100% por sete dias. Depois da crioproteção, o tecido foi congelado em gel de imersão para criostato (TissueTek) a – 55 °C em criostato provido do efeito Peltier e secções coronais do encéfalo com espessura de 50 µm para violeta de cresila e 30 µm para imunistoquímica de GFAP foram obtidas. Os cortes de hipocampo foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas que ficaram mantidas a temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas e guardadas logo em seguida em freezer a -20 °C para a realização de análise histopatológica e imunistoquímica.

### 3.11 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICO

#### 3.11.1 Análise histopatológica geral

A análise histopatológica foi realizada com a coloração pela violeta de cresila. Esta coloração permite a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (GOMES-LEAL et al., 2004). Para tanto, foram coradas secções das diferentes regiões do hipocampo (Hilo, CA1 e CA3).

#### 3.11.2 Análise imunistoquímica

Para identificar as células gliais nas diferentes regiões do hipocampo (Hilo, CA1 e CA3) após a intoxicação crônica com Citrato de alumínio, foi realizado um estudo imunistoquímico para GFAP.



O anticorpo utilizado neste estudo foi a proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:1000, DAKO) para a identificação de astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004; SILVA JÚNIOR et al., 2012). O protocolo de imunohistoquímica adotado neste estudo foi baseado no trabalho de Gomes-Leal et al., (2002, 2004) e encontra-se em anexo.

### 3.12 ANÁLISE QUALITATIVA

Para avaliar a perda de corpos celulares e astrócitos nas regiões Hilo, CA1 e CA3 do hipocampo dos animais intoxicados e controle, todas as secções foram inspecionadas em microscópio óptico (Olympus BX41). Imagens de secções contendo os campos mais ilustrativos dos animais experimentais e animais controle foram obtidas com o uso de uma câmera digital acoplada ao microscópio utilizado (Olympus Evolt E-330).

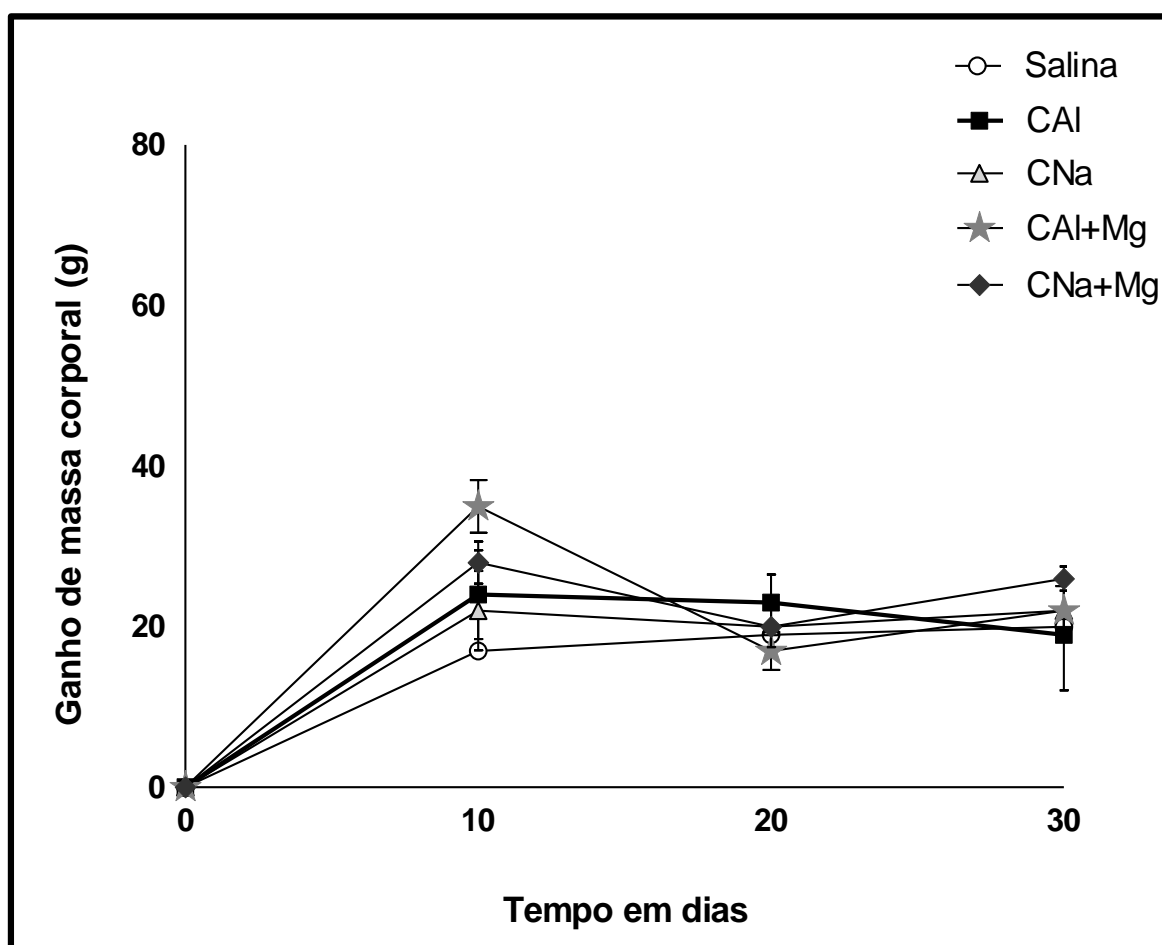
### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados comportamentais foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via com comparações múltiplas *post hoc* realizada através do teste de Tukey. O nível de significância adotado neste estudo foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO GANHO DE MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

O ganho de massa corporal dos ratos dos grupos controle, intoxicados com alumínio e tratados com magnésio é mostrado na Figura 11. Nenhum grupo apresentou de forma significativa ganho de massa corporal.

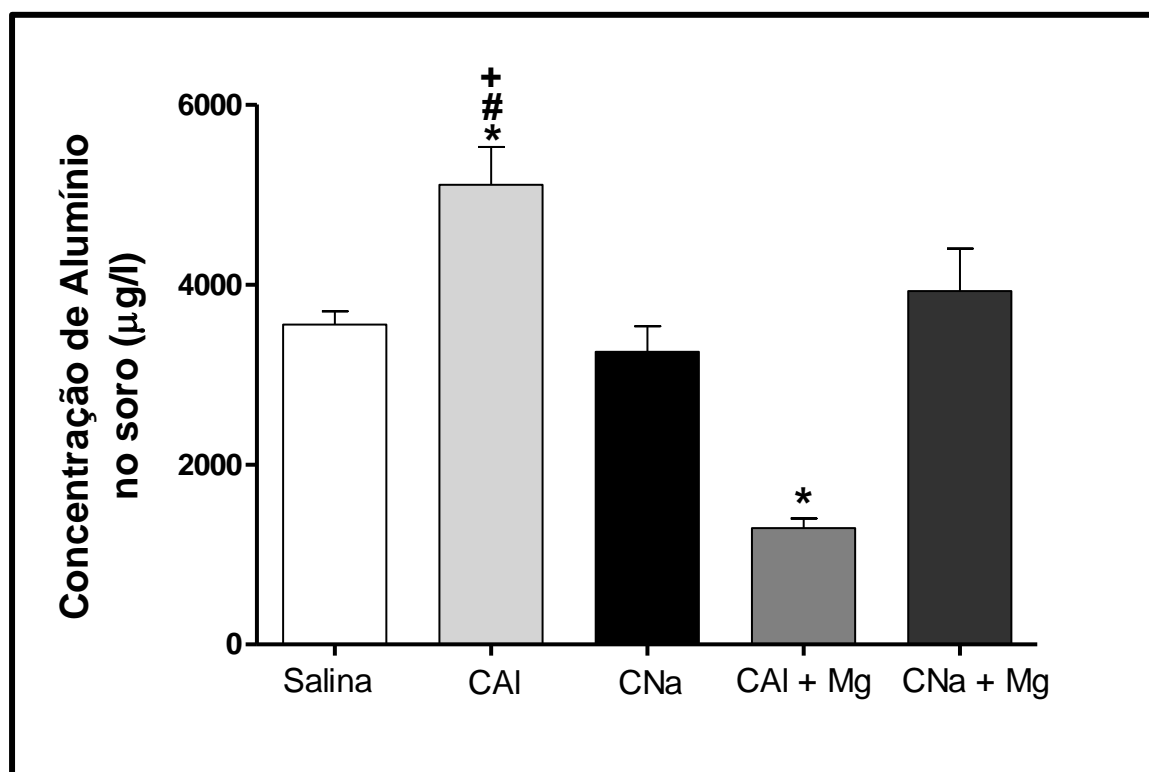


**Figura 11.** Efeitos da intoxicação crônica de citrato de alumínio, sobre o ganho de massa corporal em ratos Wistar adultos, administrado por via oral durante 30 dias consecutivos. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n=10/grupo).

## 4.2 DOSAGEM DE ALUMÍNIO NO SORO DE RATOS ADULTOS

Em relação à dosagem de alumínio no soro dos animais, observou-se que o grupo intoxicado com alumínio (CAI) apresentou a concentração média de  $5110 \pm 53$   $\mu\text{g/L}$  de alumínio após 30 dias de tratamento.

Os resultados de ANOVA, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas, revelam que houve diferença significativa entre os animais do grupo CAI e os demais grupos ( $p < 0,001$ ). No entanto, os animais CAI+Mg, apresentaram concentrações de alumínio significativamente menor em relação ao grupo controle (salina) ( $p < 0,001$ ). A média de concentração de alumínio no soro destes animais foi de  $1295 \pm 29$   $\mu\text{g/L}$ .



**Figura 12.** Efeitos da intoxicação crônica de citrato de alumínio, sobre a concentração de alumínio no plasma dos ratos Wistar adultos, após 30 dias consecutivos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais por grupo.  $p < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina) e  $\#p < 0,05$  representa diferença significativa em relação aos demais grupos CAI+Mg  $*p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI+Mg (ANOVA / Teste Tukey).

### 4.3 DOSAGEM DE ALUMÍNIO EM HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS

Os resultados das determinações de alumínio nas amostras de hipocampos de ratos *Wistar* são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Níveis de alumínio em hipocampo de ratos

Grupos	Nº de animais	Níveis de alumínio (µg/g)
Salina	3	< 11,7 <sup>*</sup>
CAI	4	132,0 ± 8,5
CNa	4	< 11,7 <sup>*</sup>
CAI+Mg	4	< 11,7 <sup>*</sup>
CNa+Mg	4	< 11,7 <sup>*</sup>

Nota: <sup>\*</sup> Abaixo do limite de detecção (LOD)

Não foram detectados valores significativos de alumínio nos grupos Salina, CNa, CAI+Mg e CNa+Mg nos hipocampos analisados, uma vez que os grupos apresentaram níveis abaixo do limite de detecção (LD<11,7) do método analítico utilizado na presente investigação.

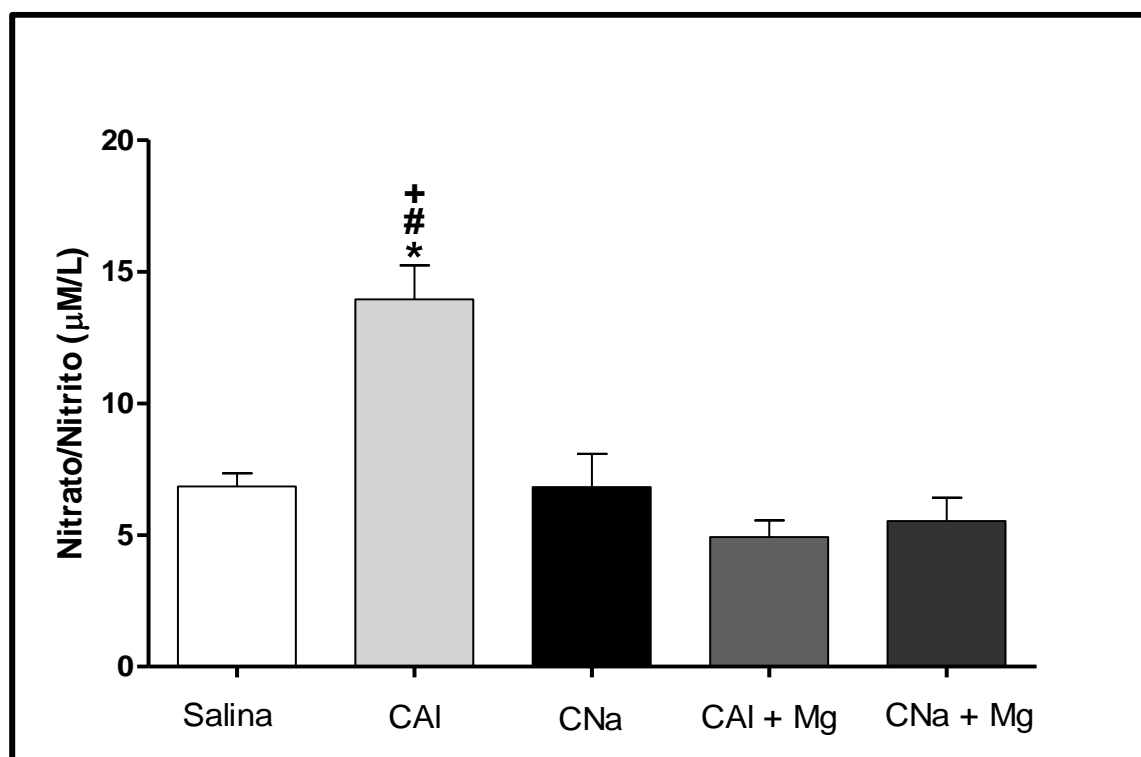
Contudo, observou-se que o grupo CAI apresentou a concentração média de 132,0 ± 8,5 µg/L de alumínio em hipocampo de animais tratados durante 30 dias com citrato de alumínio na dose de 100 mg/kg. No entanto, os animais que receberam a terapia de tratamento CAI+Mg durante o mesmo período, apresentaram níveis abaixo do limite de detecção de alumínio.

## 4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO DOS ANIMAIS APÓS A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO

### 4.4.1 Concentração de Nitrato e Nitrito

A concentração de nitrato e nitrito, metabólitos do óxido nítrico, em plasma de ratos Wistar, após 30 dias de intoxicação com alumínio é expressa na Figura 3.

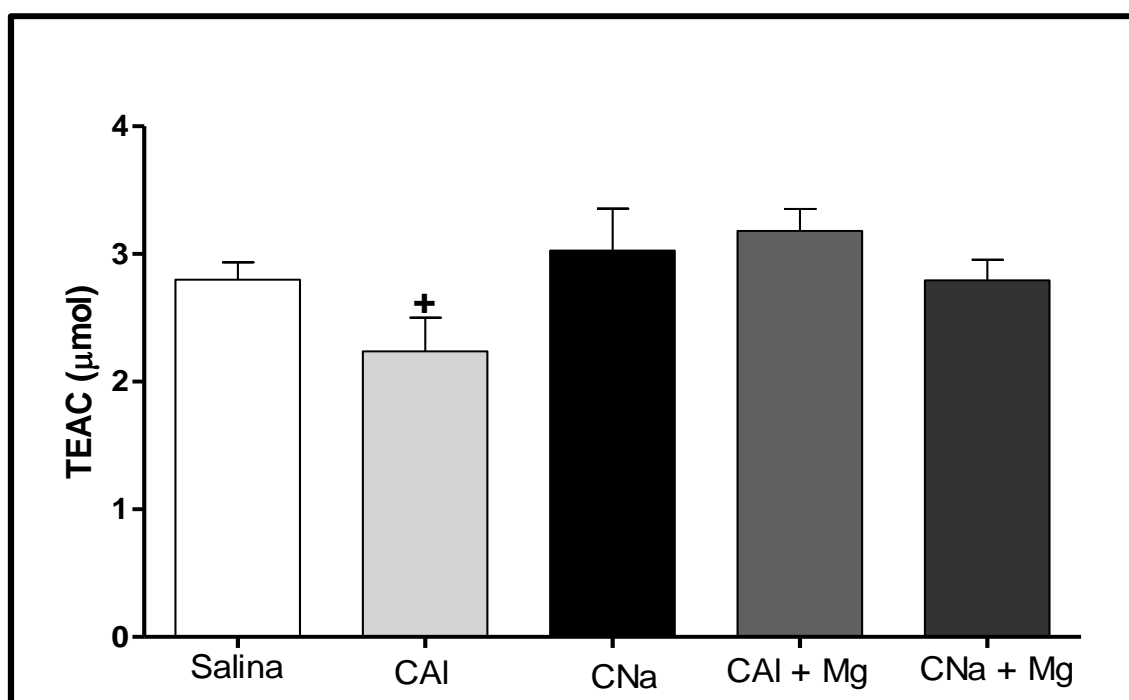
Pôde-se observar um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na concentração dos metabólitos de óxido nítrico no grupo CAI em comparação com os demais grupos. Os animais do grupo CAI+Mg, apresentaram respostas contrárias em relação ao grupo CAI, pois suas concentrações de metabólitos ficaram semelhantes ao do grupo controle.



**Figura 13.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio, sobre a concentração de Nitrato/Nitrito no plasma dos ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. de 9-10 animais por grupo.  $p < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina) e  $^{\#}p < 0,05$  representa diferença significativa em relação aos demais grupos  $^{*}p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI+Mg (ANOVA / Teste Tukey).

#### 4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total (TEAC)

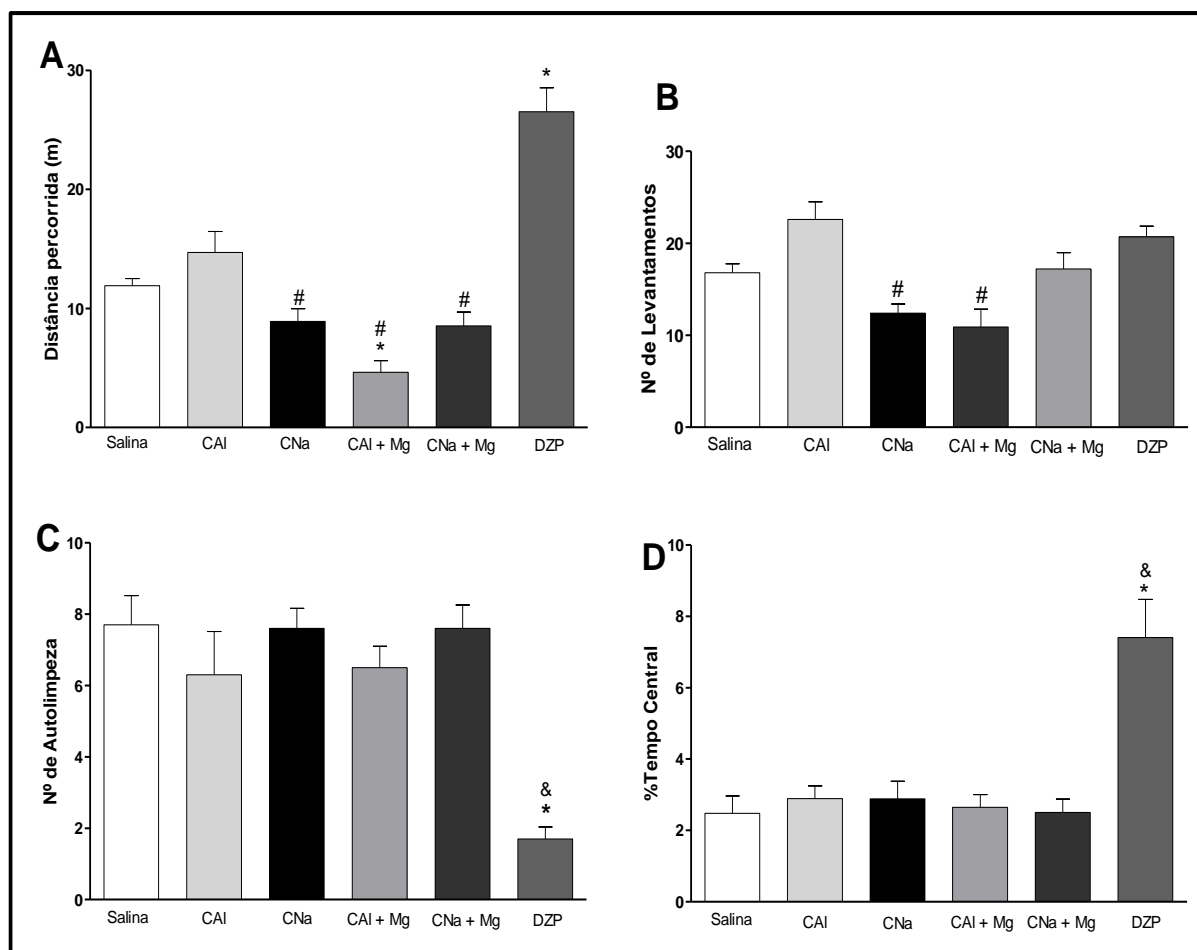
A Figura 14 apresenta os resultados referentes à capacidade antioxidante total (TEAC). Os resultados de ANOVA demonstraram que os animais do grupo CAI, apresentaram redução estatisticamente significativa na capacidade antioxidante total em relação ao grupo CAI+Mg ( $p < 0,05$ ). No entanto, quando comparado aos grupos Salina e CNa, não observou-se diferenças significativas.



**Figura 14.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio, com relação à dosagem da capacidade antioxidante total em ratos Wistar adultos, por 30 dias consecutivos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. de 6-7 animais por grupo. \* $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI +Mg (ANOVA / Teste Tukey).

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

No teste do campo aberto foram avaliados a distância percorrida, a somatória do número de levantamentos verticais dos animais, a frequência de autolimpeza e o tempo que os animais permaneceram na área central do aparato, conforme revela a Figura 15.



**Figura 15.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio avaliados durante 5 minutos no teste do campo aberto. Os resultados da distância percorrida (A), número de levantamentos (B), número de autolimpeza (C) e tempo central são expressos em média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina). # $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI e & $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação aos demais grupos (ANOVA / Teste Tukey).

Os resultados revelam que a combinação de citrato de alumínio e Sulfato de Magnésio (CAI+Mg) administrados nos animais resultou em diminuição na atividade locomotora, caracterizada pela diminuição da distância percorrida no teste do campo aberto em comparação aos demais grupos.

A ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, revelou uma diferença significativa na distância percorrida dos animais do grupo CAI+Mg em relação aos grupos CAI ( $F_{(5,59)} = 7,484; p < 0,001$ ), CNa ( $F_{(5,59)} = 4,318; p < 0,05$ ), CNa+Mg ( $F_{(5,59)} = 4,591; p < 0,05$ ) (Figura 15 A). Em relação ao número de levantamentos, ANOVA revelou diferenças significativas entre o grupo CAI, tanto em relação ao grupo CNa ( $F_{(5,59)} = 6,728; p < 0,001$ ), quanto em comparação ao grupo que recebeu o tratamento CAI+Mg ( $F_{(5,59)} = 7,718; p < 0,001$ ) (Figura 15 B).

Em relação aos episódios de autolimpeza, ANOVA não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 15 C). Contudo, os ratos que receberam a administração de diazepam - fármaco padrão-, apresentaram uma diminuição nos números de autolimpeza ( $F_{(5,59)}=8,028; p < 0,0001$ ) tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação aos grupos experimentais.

Quanto ao tempo de permanência dos animais no centro do campo aberto, ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas, revelou que o grupo diazepam (DZP) apresentou diferenças significativas entre os grupos salina ( $F_{(5,49)}=8,925; p < 0,0001$ ), CNa ( $F_{(5,49)}=7,974; p < 0,0001$ ), CAI ( $F_{(5,49)}=7,963; p < 0,0001$ ), CAI+Mg ( $F_{(5,49)}=8,393; p < 0,0001$ ) e CNa+Mg ( $F_{(5,49)}=9,074; p < 0,0001$ ) (Figura 15 D). O grupo DZP permaneceu mais tempo na área central do aparato, supostamente pelo efeito ansiolítico deste fármaco.



### 4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TESTE DO ROTA ROD

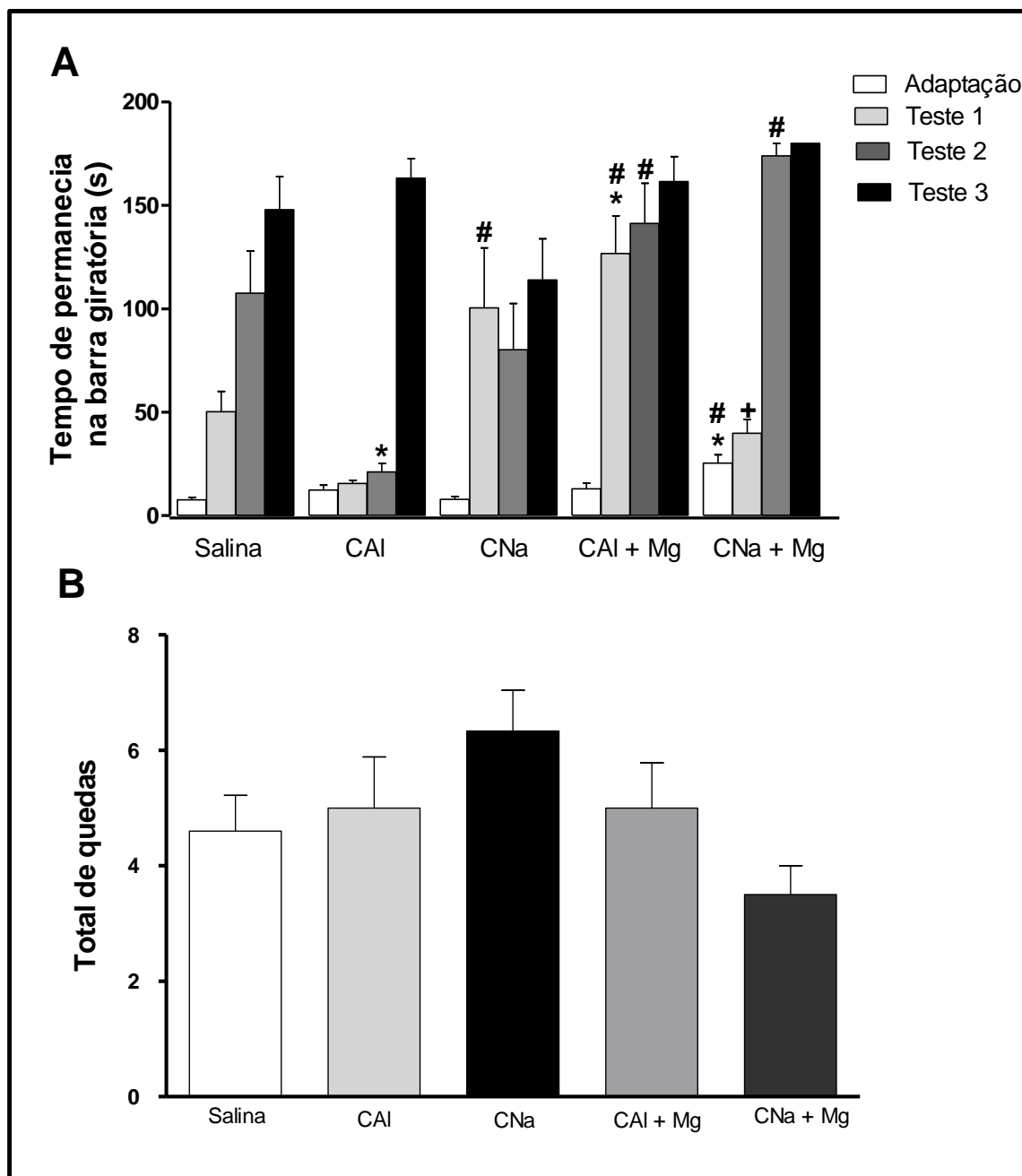
Para avaliar a capacidade de aprendizado de tarefas motoras, utilizamos o teste do rota rod. O teste requer coordenação motora, capacidade de aprendizado motor e resistência física do animal.

Neste estudo, avaliamos as primeiras quatro exposições dos animais no teste rota rod (Adaptação, Teste 1, Teste 2 e Teste 3) e o total de quedas. No período de treino (adaptação), ANOVA revelou diferenças significativas entre o grupo CNa+Mg, tanto em relação ao grupo salina ( $F_{(4,48)} = 7,167; p < 0,001$ ), quanto em comparação ao CAI ( $F_{(5,43)} = 5,280; p < 0,001$ ) (Figura 16 A).

Após 30 segundos do período de adaptação, os animais foram novamente colocados no rota rod para avaliação do teste 1. Observou-se nesta etapa do teste que todos os grupos permaneceram por mais tempo na barra giratória do rota rod, com exceção dos grupos CNa+Mg e CAI. A ANOVA seguida do teste de Tukey revelou uma diferença significativa entre o grupo CAI, tanto em relação ao grupo CNa ( $F_{(4,43)} = 4,893; p < 0,05$ ), quanto em comparação ao grupo CAI+Mg ( $F_{(4,43)} = 6,563; p < 0,001$ ), conforme mostra a Figura 16 A. Já o grupo CAI+Mg apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Na terceira exposição (teste 2), a ANOVA revelou que os grupos aumentaram o tempo de permanência na barra giratória, com exceção do grupo CAI que mais uma vez não conseguiu elevar a sua latência. Este grupo apresentou diferenças significativas em relação aos demais aos grupos: controle ( $F_{(4,43)} = 4,943; p < 0,01$ ), CAI+Mg ( $F_{(4,43)} = 6,521; p < 0,001$ ) e CNa+Mg ( $F_{(4,43)} = 8,293; p < 0,001$ ) No teste 3, os grupos não apresentaram diferenças significativas (Figura 16 A).

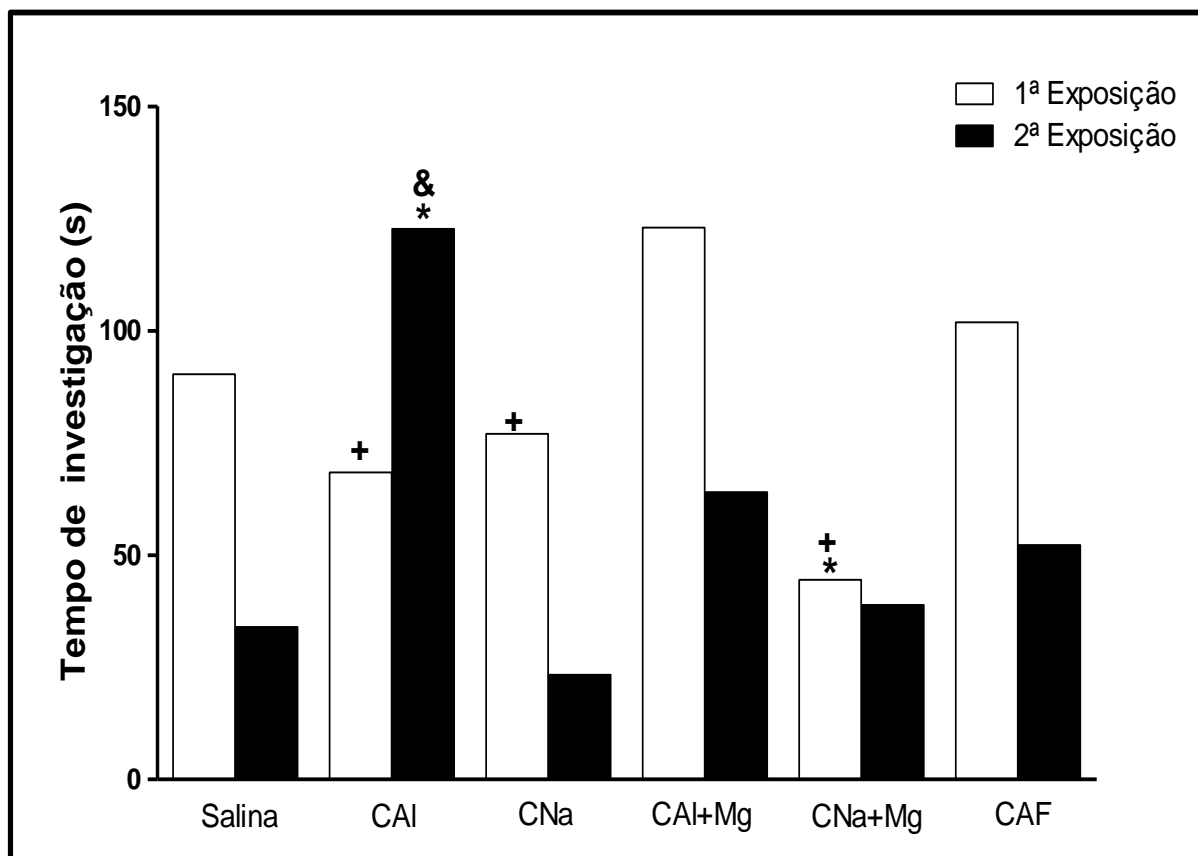
Em relação ao número total de quedas, ANOVA não revelou diferenças significativas entre os animais tratados com o neurotóxico e grupo controle no número total de quedas no aparato ( $F_{(4,46)} = 0,5745$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 16 B).



**Figura 16.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no Teste do Rota rod. O teste consistiu na avaliação de 4 exposições avaliados durante 180 segundos cada e mediu o tempo de permanência dos animais na barra giratória (**A**) e o número total de quedas (**B**) são expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo \* $p < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina); # $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI e + $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI+Mg (ANOVA / Teste de Tukey).

#### 4.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL

A Figura 17 mostra os resultados da administração crônica de citrato de alumínio e o tratamento com magnésio em ratos após 30 dias de intoxicação, na memória de reconhecimento social de ratos quando o mesmo rato jovem foi reexpostos após um período de 30 minutos da primeira exposição.



**Figura 17.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no tempo de investigação social de ratos adultos, quando o mesmo rato jovem foi exposto após um período de 30 minutos da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e na segunda (barras pretas) exposição. \* $p < 0,05$  difere significativamente do grupo salina. + $p < 0,05$  difere significativamente do grupo CAI+Mg. & $p < 0,05$  difere significativamente dos demais grupos (ANOVA / Teste Tukey).

Os resultados da primeira exposição do rato jovem aos animais adultos, revelaram que os animais dos grupos CAI, CNa e CNa+Mg apresentaram diferenças significativas no tempo de investigação do rato jovem na primeira exposição em relação ao grupo CAI+Mg. Os grupos CAI ( $F_{(5,56)} = 4,789; p < 0,05$ ) e CNa+Mg ( $F_{(5,56)} = 4,938; p < 0,05$ ) apresentaram diminuição no tempo de investigação do rato jovem quando comparados ao grupo CAI+Mg, conforme revela a Figura 17.

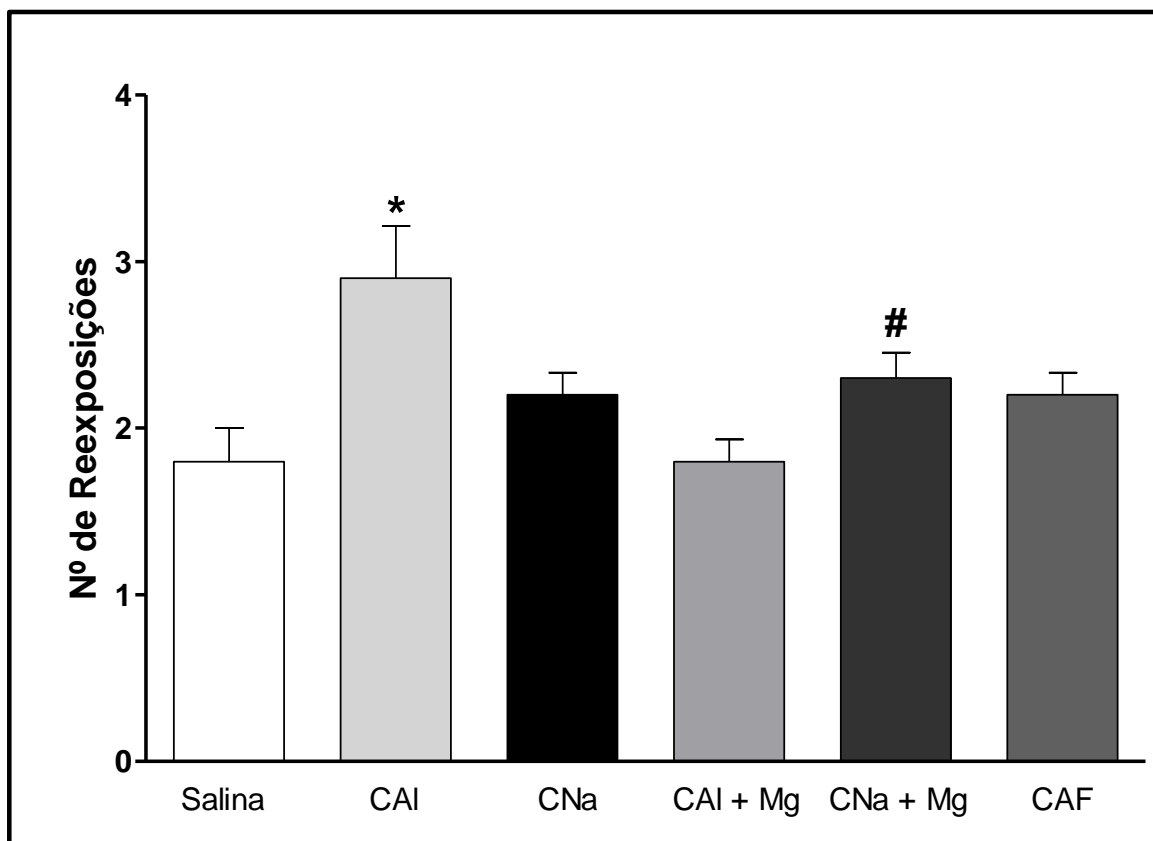
Na segunda apresentação do rato jovem (exposição após 30 minutos da primeira apresentação), ANOVA revelou diferenças significativas entre o grupo CAI em relação aos grupos Salina ( $F_{(5,48)} = 14,60; p < 0,001$ ), CNa ( $F_{(5,48)} = 15,73; p < 0,001$ ), CAI+Mg ( $F_{(5,48)} = 13,44; p < 0,001$ ), CNa+Mg ( $F_{(5,48)} = 12,82; p < 0,001$ ) e CAF ( $F_{(5,48)} = 11,94; p < 0,001$ ).

Usando o teste *post hoc* de Tukey para fazer uma comparação entre a primeira e a segunda exposição de acordo com o tratamento, os resultados revelaram um efeito deletério para o CAI ( $F_{(11,108)} = 77,55; p < 0,001$ ), no tempo de investigação, durante a segunda apresentação (exposição após 30 minutos da primeira apresentação) do mesmo rato jovem (Figura 17). Os animais deste grupo apresentaram um significativo déficit cognitivo na memória social, não sendo capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda exposição, por isso gastaram mais tempo explorando o mesmo animal. Ao contrário dos animais do grupo CAI+Mg que apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social. Esses resultados sugerem que a terapia com Magnésio pode melhorar a memória social de ratos adultos na dose de 250 mg/kg.

#### 4.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO

No teste do LTE, os parâmetros avaliados foram o número de tentativas de reexposição dos animais para a aquisição do critério de esquiva inibitória no braço fechado do aparato, o tempo de esquiva ao braço aberto nas três primeiras exposições, e o tempo de fuga dos braços abertos. Além do teste e reteste, realizado 24 horas, após a primeira exposição ao LTE para a verificação da retenção da memória para as respostas de esquiva, com um intervalo de 30 segundos.

No Figura 18, observa-se que os animais do grupo CAI foram mais reexposto ao LTE que os do grupo CAI+Mg ( $F_{(6,59)} = 5,803; P < 0,001$ ) e controle (Salina) ( $F_{(6,59)} = 5,803; P < 0,001$ ), sendo necessárias, aproximadamente, 3 exposições para que os animais deste grupo aprendessem o critério de esquiva, permanecendo 300 segundo no braço fechado do labirinto, evidenciando um possível déficit no aprendizado.



**Figura 18.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio em relação ao número de reexposições de ratos no Teste do LTE. Os resultados de reexposições são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo. \* $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina) e # $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI (ANOVA / Teste de Tukey).

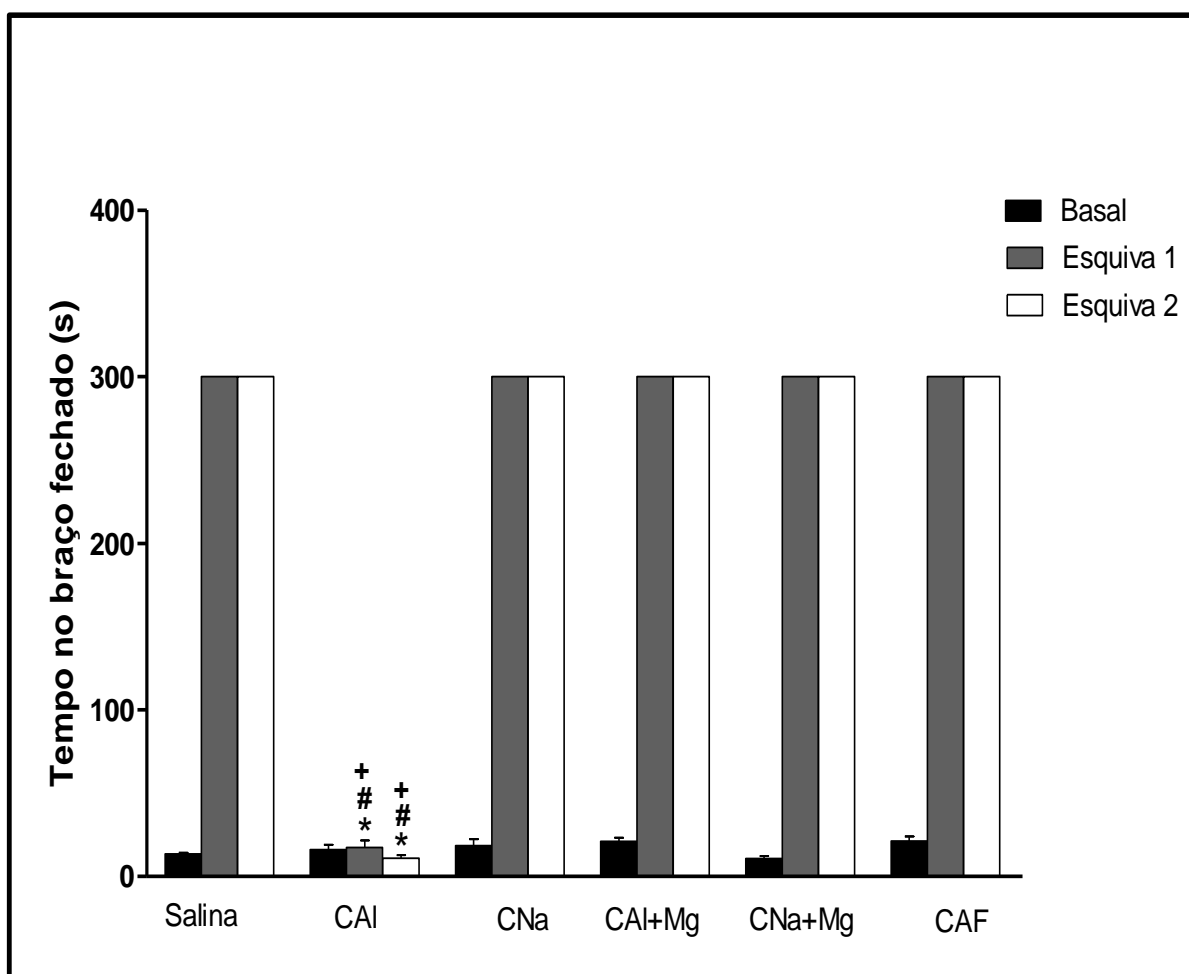
Os animais que receberam a terapia de tratamento CAI+Mg apresentaram um aprendizado similar aos animais do grupo salina. Os ratos do grupo CAI+Mg foram reexpostos apenas 2 vezes em média no braço fechado do labirinto, assim como os animais do grupo controle para a aquisição do critério de esquia.

Quando avaliamos as primeiras três exposições dos animais ao LTE, observamos que na primeira exposição ao LTE para avaliação da linha de base (Basal) do tempo de esquia, ANOVA não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figura 19).

Após 30 segundos do teste dos níveis basais, os animais foram novamente submetidos ao braço fechado do LTE para avaliação do tempo da esquia 1.

Observou-se nesta etapa do teste que todos os grupos elevaram a latência no braço fechado, ou seja, permaneceram por mais tempo em relação à primeira exposição, com exceção do grupo CAI que não conseguiu permanecer no braço fechado, pois apresentou o mesmo desempenho da primeira exposição (Basal). A ANOVA seguida do teste de Tukey revelou uma diferença significativa entre o grupo CAI, tanto em relação ao grupo controle ( $F_{(5,43)} = 183,1; p < 0,001$ ), quanto em comparação aos grupos CNa ( $F_{(5,43)} = 162,1; p < 0,001$ ), CAI+Mg ( $F_{(5,43)} = 174,3; p < 0,001$ ), CNa+Mg ( $F_{(5,43)} = 168,8; p < 0,001$ ) e CAF ( $F_{(5,43)} = 162,1; p < 0,001$ ).

Na terceira exposição (esquiva 2), após 30 segundos da obtenção do tempo de esquiva 1, a ANOVA revelou que os grupos aumentaram o tempo de permanência no braço fechado, com exceção do grupo CAI que mais uma vez não conseguiu elevar a sua latência. Usando o teste *post hoc* de Tukey para averiguar tal diferença, observou-se que o grupo CAI apresentou diminuição significativa do tempo de esquiva em relação aos demais aos grupos: controle ( $F_{(5,20)} = 353,0; p < 0,001$ ), CNa ( $F_{(5,20)} = 273,5; p < 0,001$ ), CAF ( $F_{(5,20)} = 273,5; p < 0,001$ ), CAI+Mg ( $F_{(5,20)} = 310,1; p < 0,001$ ) e CNa+Mg ( $F_{(5,20)} = 353,0; p < 0,001$ ) (Figura 19). Dessa forma, fica evidenciado que os animais do grupo CAI apresentam prejuízo na memória de curta duração.



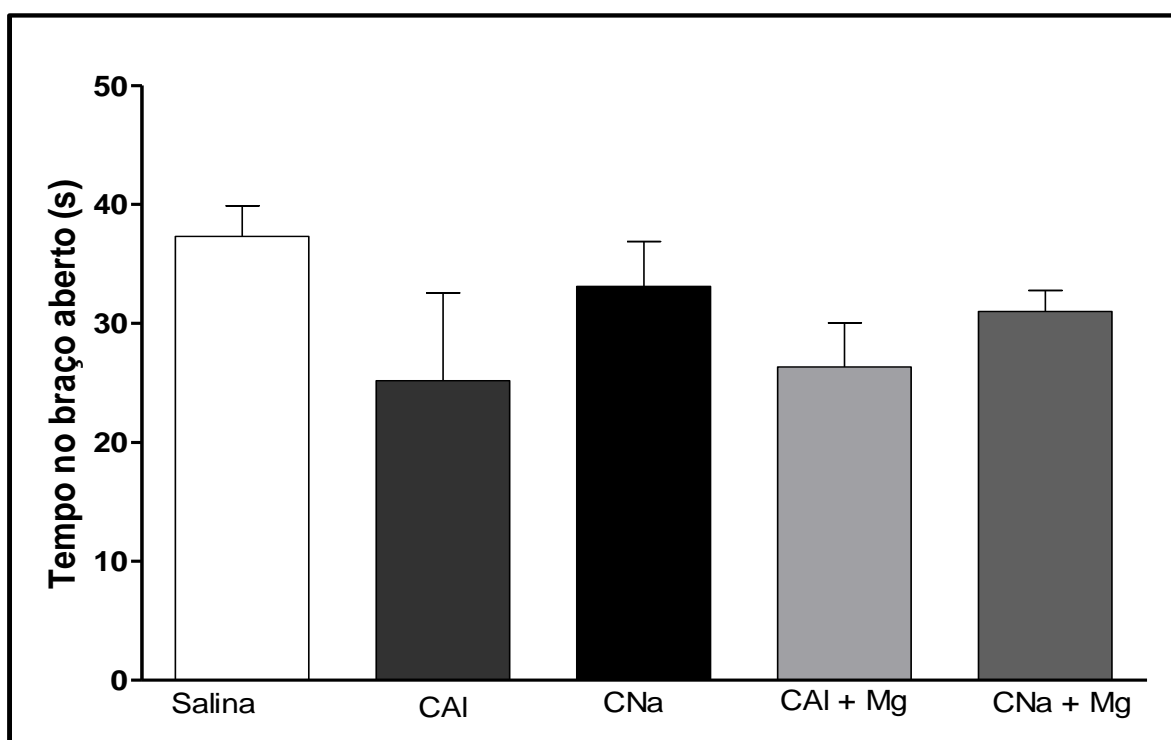
**Figura 19.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio na aquisição de esquiva no LTE. O teste consistiu na avaliação de 3 exposições, com intervalo de 30 segundos e mediu a latência no braço fechado. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo. \* $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina); # $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAF e + $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI+Mg (ANOVA / Teste de Tukey).

Fazendo uma análise comparativa intragrupo dos três períodos de teste de acordo com cada grupo tratado, a ANOVA revelou que todos os grupos apresentaram aumento significativo no tempo de permanência no braço fechado do labirinto nas esquiva 1 e 2 em relação aos seus tempos da esquiva basal, com exceção do grupo CAI que não conseguiu aumentar seu tempo de latência no braço fechado nas esquivas 1 e 2, caracterizando assim que o alumínio causou um déficit cognitivos nos animais.



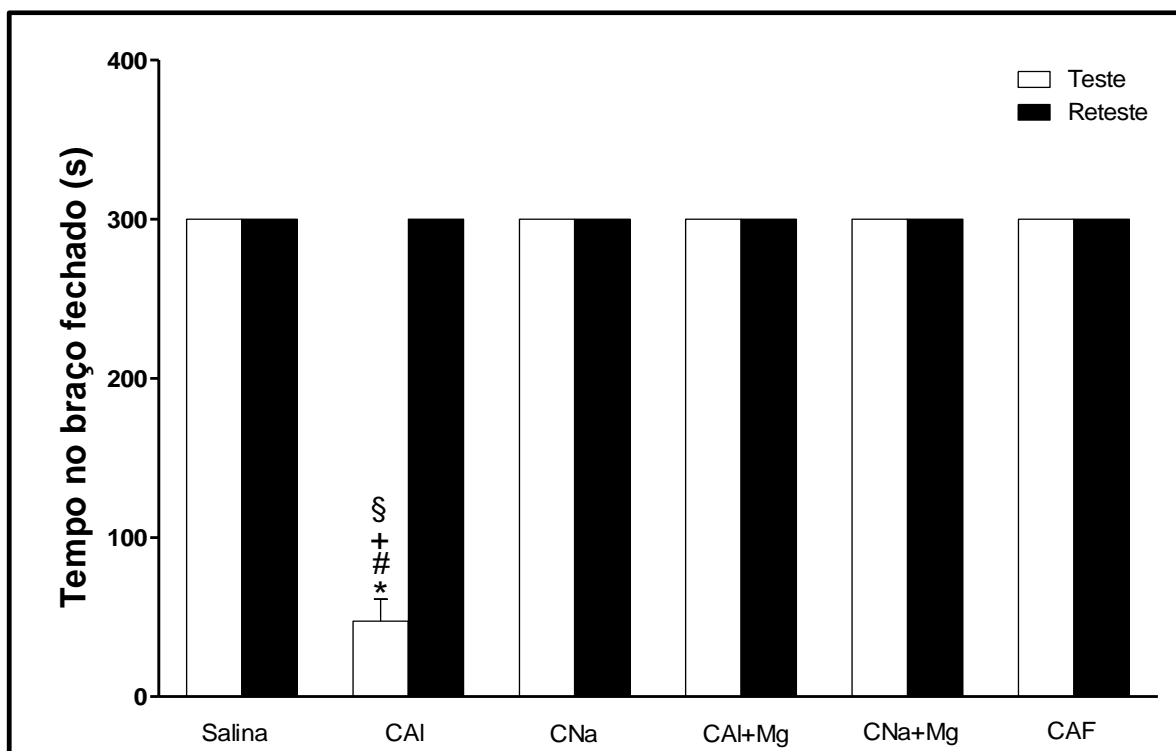
Para a latência de fuga a partir do braço aberto do LTE, utilizamos o teste de Tukey para verificar as diferenças amostrais entre os grupos, o qual não revelou nenhuma diferença significativa entre os grupos, conforme mostra Figura 20.

A latência de fuga do grupo intoxicado com citrato de alumínio em relação o grupo controle foram semelhantes, caracterizando que a resposta de fuga representada pelo medo inato não foi comprometida pela intoxicação.



**Figura 20.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no tempo de fuga do braço aberto do LTE. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo (ANOVA / Teste de Tukey).

A Figura 20 representa o teste e o reteste realizado 24 horas com objetivo de avaliar a memória de curta e longa duração dos animais. No teste, ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey, mostrou diferença significativa entre o grupo CAI, tanto em relação ao grupo salina ( $F_{(5,51)} = 54,70; p < 0,001$ ), quanto em relação aos grupos CNa ( $F_{(5,51)} = 53,49; p < 0,001$ ), CAI+Mg ( $F_{(5,51)} = 54,70; p < 0,001$ ) e CNa+Mg ( $F_{(5,51)} = 48,45; p < 0,001$ ).



**Figura 21.** Efeitos da administração crônica de citrato de alumínio no teste e reteste no LTE. O teste foi realizado 24 horas, após as exposições de esquiva, com intervalo de 30 segundos e mediu a latência do animal no braço fechado. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 7-10 animais por grupo. \* $P < 0,05$  representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (Salina); # $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAF (controle positivo); + $P < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo CAI+Mg; e § $P < 0,05$  representa diferença significativa intragrupo entre o teste e o reteste do grupo CAI (ANOVA / Teste Tukey).

Observa-se no teste que todos os grupos, com exceção do grupo CAI, permaneceram no braço fechado do LTE, sugerindo a retenção de memória para a tarefa realizada. O grupo CAI apresentou uma queda brusca no tempo de permanência no braço fechado do labirinto, sugerindo um déficit na memória de longa duração (Figura 21).

Após 30 segundos, os animais foram submetidos novamente ao braço fechado do LTE para a realização do reteste com os mesmos procedimentos usados no teste. Observamos na fase do reteste que todos os animais, incluindo o grupo CAI permaneceram no braço fechado do labirinto (Figura 21).

Fazendo uma análise intragrupo do teste e reteste de cada grupo, ANOVA revelou uma diferença significativa apenas para o teste e reteste realizado pelos animais do grupo CAI ( $F_{(11,108)} = 75,63; p < 0,001$ ). Os animais deste grupo elevaram sua latência no reteste, evidenciando assim, que a memória de priming, adquirida e evocada por meio de dicas está aparentemente preservada.

#### 4.6 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CITRATO ALUMÍNIO SOBRE A DENSIDADE CELULAR E REATIVIDADE ASTROCITÁRIA NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS

##### 4.6.1 Avaliação histopatológica

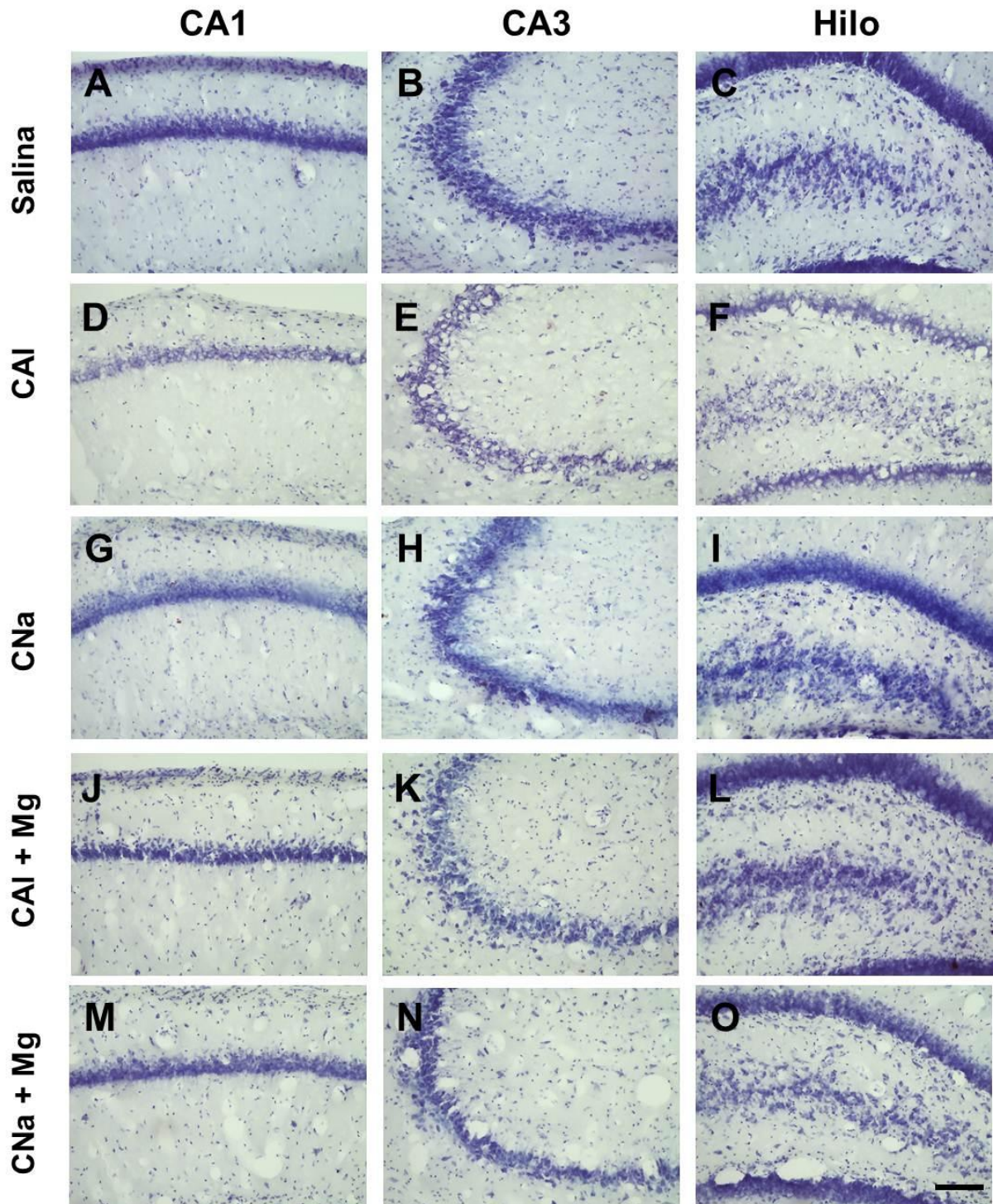
Para avaliarmos as alterações morfológicas nas regiões hipocampais, realizamos uma análise histopatológica com violeta de cresila para marcar neurônios e células gliais em todos os grupos experimentais.

A análise sugeriu diminuição da densidade celular (neurônios e glia) nos animais intoxicados com alumínio (CAI) (Figura 22 D, E e F), diferentemente dos animais controle, CNa e dos tratados com sulfato de magnésio (CAI+Mg e CNa+Mg).

A intoxicação crônica de alumínio após 30 dias induziu alterações em regiões hipocampais, incluindo hilo hipocampal e regiões CA1 e CA3. Nos animais CAI, podemos observar uma rarefação do número de células e uma desorganização celular nas camadas hipocampais em relação aos demais grupos que apresentaram uma morfologia normal nestas regiões.

Nos animais que receberam a terapia de CAI+Mg durante 30 dias, houve uma preservação celular nas regiões CA1, CA3 e hilo hipocampal (Figura 22 J, K e L). A

morfologia hipocampal destes animais ficou semelhante a dos animais do grupo controle (Figura 22 A, B e C).



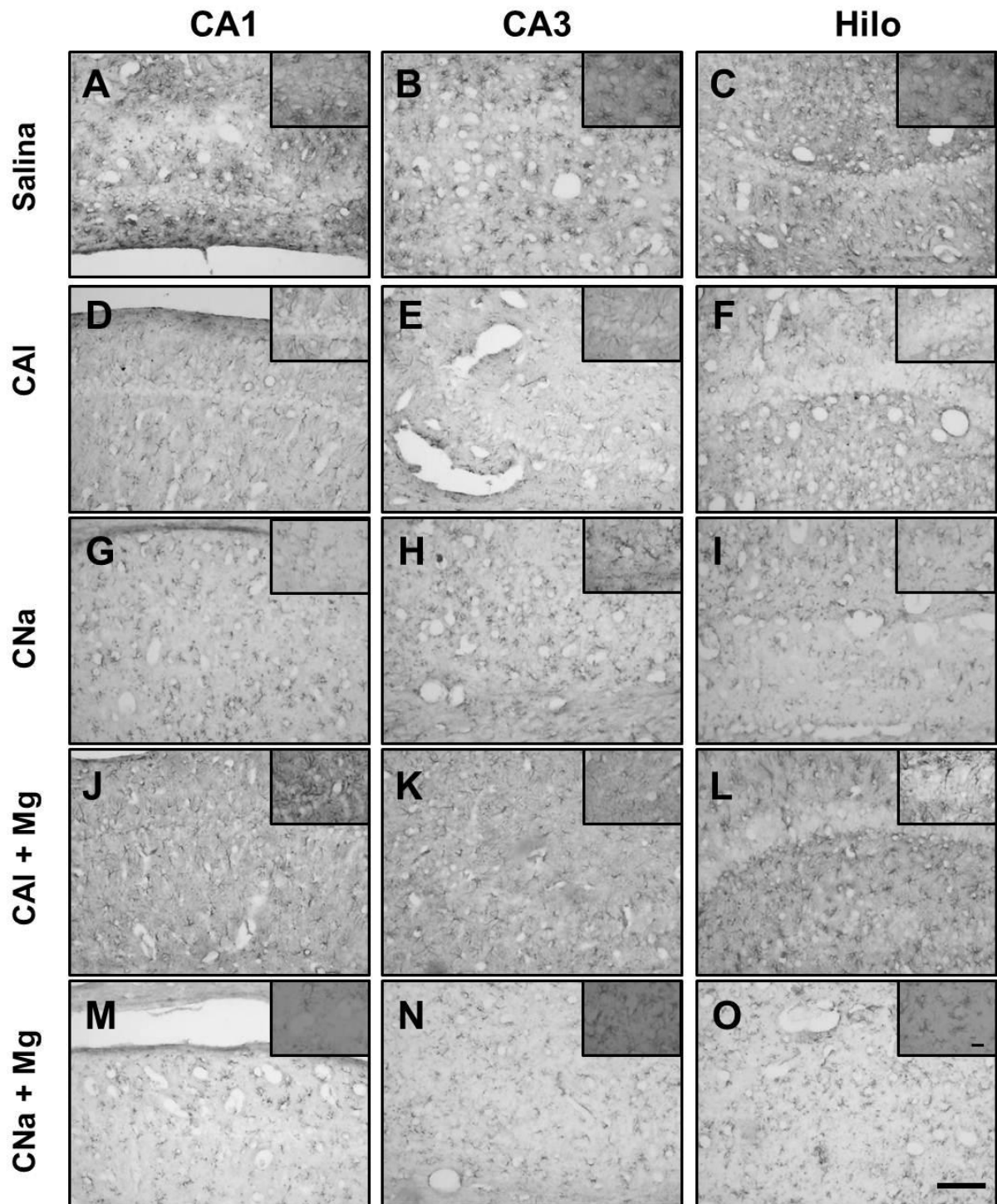
**Figura 22.** Micrografias de secções do hipocampo coradas com violeta de cresila em CA1, CA3 e Hilo hipocampal. Em Salina e CNa padrões semelhantes de integridade celular; CAI aparente diminuição do número de células nas três regiões; em CAI+Mg e CNa+Mg padrões semelhantes aos encontrados em Salina e CNa. Escala 100 micrometros.

#### **4.6.2 Ativação Astrocitária**

Para investigarmos os efeitos da administração de citrato de alumínio sobre os padrões de ativação de astrócitos, utilizamos a imunistoquímica para GFAP, um marcador clássico de astrócitos (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

A ativação de astrócitos foi observada nas regiões CA1, CA3 e hilo do hipocampo nos animais intoxicados com citrato de alumínio (Figura 23 D, E e F). No grupo controle, os astrócitos apresentaram-se menos reativos quando comparado aos intoxicados com CAI (Figura 23 A, B e C).

O grupo intoxicado com CAI e tratado com Magnésio apresentou um padrão de reatividade da imunistoquímica para GFAP semelhante aos encontrados nos grupos controle e CNa (Figura 23 J, K e L).



**Figura 23.** Micrografias de imunomarcção para GFAP nas regiões CA1, CA3 e Hilo do hipocampo nos diferentes grupos experimentais. Em Salina e CNa, padrão fisiológico dos astrócitos com corpo celular e prolongamentos delgados; em CAI, astrócitos mais volumosos e reativos; em CAI+Mg e CNa+Mg astrócitos exibindo novamente volume diminuto e intensa ramificação de prolongamentos. Alterações na reatividade para GFAP foi aparentemente maior apenas em CAI. Escala 100 micrometros nas imagens principais e nos detalhes 30 micrometros.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

O papel toxicológico do alumínio ainda não foi totalmente esclarecido, embora existam diversos trabalhos na literatura que utilizaram diferentes métodos de intoxicação, dose e compostos de alumínio para estudar os efeitos deste metal nas mais diferentes formas de vida (KISS, 1995; ZATTA et al., 1998; RODON-BARRAGÁN et al., 2007). Conhecimento sobre a ação toxicológica do alumínio no SNC já avançou bastante. No entanto, existem poucos trabalhos que tentam implementar uma terapia de tratamento para minimizar os danos neurodegenerativos causados por este metal neste sistema.

No presente estudo, utilizamos o Sulfato de Magnésio como uma possível terapia de tratamento para tentar reverter ou minimizar os danos neurodegenerativos causados nas estruturas hipocâmpais de ratos wistar após a intoxicação experimental com citrato de alumínio.

A escolha do composto citrato de alumínio como veículo de intoxicação se baseou nos estudos que relatam que é na forma de tal complexo que o alumínio ultrapassa a barreira gastrointestinal para o sangue (MARTIN, 1994; TAPARO et al, 1995; YOKEL et al, 1999; BARRETO e ARAÚJO, 2008; SILVA JÚNIOR et al., 2013). Já a escolha do sulfato de magnésio como terapia de tratamento foi baseada em estudos que apontam que concentrações elevadas de magnésio no cérebro podem aumentar a capacidade de aprendizado e memória em roedores (DITOR et al., 2007; SLUTSKY et al., 2010) e que este composto pode atuar como um agente neuroprotetor bloqueando a entrada de cálcio dentro dos neurônios através da modulação dos receptores NMDA (LIBEN et al., 2005; TRINDADE, 2006). Deste

modo, acredita-se que o protocolo utilizado neste estudo propiciou melhor penetração do alumínio e de sulfato de magnésio através da barreira hematoencefálica, com resultados conspícuos no SNC.

## 5.2 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO E A TERAPIA COM MAGNÉSIO NÃO ALTERAM O GANHO DE MASSA CORPORAL

Neste estudo, a intoxicação com citrato de alumínio e terapia com magnésio não alteraram o ganho de massa corporal dos animais, mesmo em doses diárias de 100 e 250 mg/kg, respectivamente. Em adição, a atividade geral dos animais não foi alterada. O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN e GÜNZEL, 1997).

## 5.3 A INTOXICAÇÃO CRÔNICA DE CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ AUMENTO NAS CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO NO SORO E NO HIPOCAMPO

No presente estudo, constatamos que a concentração de alumínio encontrada nas amostras de soro e hipocampo foi elevada, entretanto, o Ministério da Saúde não estabelece limites máximos de tolerância para este metal e a Organização Mundial da Saúde (OMS) também não possui limites biológicos bem estabelecidos para a população não exposta ao alumínio (JERONYMO e FUJIAMA, 1998; OMS, 1998). Por sua vez, a organização mundial da saúde preconiza o limite máximo tolerável na dieta de 6 mg/kg/semana (OMS, 1998). Dessa forma, não podemos comparar os valores encontrados neste estudo com os valores de referência para alumínio, mas podemos inferir que a elevada concentração deste



metal no soro e no hipocampo dos animais intoxicados possivelmente causou estresse oxidativo nas células, diminuição da densidade celular nas regiões hipocampais (CA1, CA3 e Hilo) e prejuízo de aprendizagem e memória destes roedores observados nos testes de reconhecimento social e LTE.

Stryus-Ponsar et al.(1997) ao realizar a quantificação de alumínio em espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite revelaram que a acumulação de alumínio no tecido cerebral foi maior no hipocampo, córtex temporal e no núcleo olfatório quando comparada com outras áreas do SNC e que este acúmulo causou prejuízo de aprendizagem e memória nos animais submetidos no teste do labirinto radial de 8 braços. Sánchez-Iglesias et al.(2007) relataram concentrações elevadas de alumínio em diversas regiões do SNC de ratos. As concentrações foram determinadas por espectrômetro de absorção atômica eletrotérmica e a mais elevada foram observadas no hipocampo de animais que receberam cloreto de alumínio por via intraperitoneal.

Por outro lado, evidenciamos também em nosso estudo, que a terapia com sulfato de magnésio foi capaz de aparentemente diminuir os níveis de alumínio encontrados no soro e no hipocampo dos animais intoxicados. Tal evidência foi verificada através da análise realizada com espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite.

#### 5.4 A INTOXICAÇÃO COM ALUMÍNIO INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres desempenham papel fundamental no desenvolvimento de diversos processos patológicos, tais como acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, entre outras doenças

degenerativas e também nas alterações verificadas durante o envelhecimento. Entretanto, o conceito no qual os radicais livres são elementos puramente danosos aos tecidos e sistemas dos organismos se apresenta de forma errônea (VASCONCELOS et al., 2007).

Os radicais livres de oxigênio, chamados também de espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidos naturalmente em nosso organismo através dos processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico, na desintoxicação de drogas, na sinalização celular e nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos em resposta a atividade do óxido nítrico (NO) (VASCONCELOS et al., 2007).

A produção de radicais livres e de outras substâncias altamente reativas em decorrência do metabolismo do oxigênio (EROs) é contrabalançado por muitos mecanismos de defesa antioxidante que tem o objetivo de limitar os níveis destas substâncias além de evitar os danos celulares.

O desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e a capacidade de inativação dos mecanismos antioxidantes, que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

Neste estudo, foi realizado uma avaliação do estresse oxidativo por meio dos testes de nitrato e nitrito e capacidade antioxidante total (TEAC) no plasma dos animais.

Os resultados da dosagem de nitratos e nitritos presentes no plasma, evidenciaram um aumento significativo dos níveis de NO nos animais do grupo CAI, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o grupo que recebeu magnésio reverteu esse aumento.

Em relação a avaliação da capacidade antioxidante total ou “*status*” antioxidante total, o presente estudo, evidenciou redução nos níveis de TEAC nos animais intoxicados com alumínio quando comparados aos animais do grupo tratados com magnésio que apresentaram atividade similar ao grupo controle. Com base nesse resultados, podemos sugerir que o magnésio teve potente capacidade antioxidante como sequestrador de radicais livres.

Estudos revelam que o magnésio pode atuar como agente antioxidante, uma vez que este elemento pode bloquear a entrada de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro da célula, que em excesso é prejudicial, evitando assim, a liberação de radicais livres e consequentemente, a lesão celular (WALLACE, 2003; DITOR et al. 2007).

Contudo, é importante ressaltar que o decréscimo em TEAC no grupo CAI não significa necessariamente que o dano oxidativo ocorreu, pode significar simplesmente que o mecanismo de defesa não cumpriu sua função habitual (VASCONCELOS et al. 2007).

A avaliação da capacidade antioxidante total tem se mostrado relevante para a análise de agentes antioxidantes em amostras biológicas, uma vez que esta avaliação pode fornecer informações biológicas gerais do sistema antioxidante total do organismo, visto que este método detecta a presença de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos ao invés da determinação das concentrações destes antioxidantes de forma individual (RE et al., 1999; GHISELLI et al. 2000).

## 5.5 A TERAPIA COM MAGNÉSIO REVERTEU AS ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS DA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO

Em relação aos testes comportamentais, primeiramente avaliamos os possíveis efeitos do citrato de alumínio e da terapia com magnésio nas atividades locomotoras e exploratórias em ratos Wistar através do teste do campo aberto.

No teste do campo aberto, quatro parâmetros foram avaliados: a distância percorrida pelos animais no aparato, que avalia a atividade exploratória do animal, que pode ser afetada por fármacos com ação no SNC ou relaxantes musculares; o número total de levantamento, número de autolimpeza e o tempo na área central do aparato, que avaliam o grau de sedação ou medo (ansiedade) e podem ser alterados por fármacos com atividade ansiolítica/ansiolítica.

Os resultados do campo aberto não revelaram diferenças significativas do grupo intoxicado com citrato de alumínio em relação ao grupo controle nos parâmetros de distância percorrida, episódios de levantamento, autolimpeza e tempo na área central, o que é corroborado por estudos prévios com nitrato de alumínio que sugerem que o mesmo não interfere nas atividades locomotoras de ratos submetidos ao teste do campo aberto (DOMINGOS et al., 1996).

Já os animais que receberam a terapia CA+Mg apresentaram uma diminuição nos parâmetros de distância percorrida e número de levantamentos quando comparados ao grupo intoxicado com alumínio, caracterizando que a terapia com magnésio causou um efeito depressor no sistema nervoso central dos animais tratados. Por outro lado, nos parâmetros de autolimpeza e tempo na área central do campo aberto, os animais tratados com magnésio não apresentaram diferenças

significativas tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação ao grupo intoxicado com citrato de alumínio.

Segundo Oliveira et al.(2008) o campo aberto é um excelente modelo comportamental para avaliar a atividade estimulante ou depressora do SNC de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação tipo ansiolítica. Em seu estudo com extrato etanólico de *S. Umbellatum*, os animais submetidos ao teste do campo aberto apresentaram diminuição no tempo da área central do aparato, o que para o autor, é sugestivo de uma atividade depressora mais específica no SNC, sugerindo uma ação ansiolítica sem comprometimento motor, que ainda deve ser melhor investigada através de outras metodologias, tais como o labirinto em cruz elevado ou caixa claro/escuro.

No teste do *rota-rod*, foi avaliado a capacidade de aprendizado motor através de quatro exposição ao eixo giratório do aparato e o número total de quedas. Observamos que os animais intoxicados com citrato de alumínio apresentaram prejuízo motor, diferentemente daqueles submetidos a terapia com magnésio que tiveram um bom desempenho durante o teste. Dessa forma, podemos sugerir que a intoxicação com alumínio talvez tenha prejudicado a memória procedural dos animais, uma vez que esta memória envolve o aprendizado de uma variedade de habilidades motoras e cognitivas (PINTO, 1998; GASBARRI et al., 2003; QUEVEDO et al., 2003).

A tarefa envolvida no teste do rota rod associa a coordenação motora, que está bastante associada com outras áreas do cérebro, como o cerebelo, com fatores cognitivos (GASBARRI et al., 2003). Embora alguns estudos não apontem o cerebelo como uma área de elevada concentração de alumínio (STRYUS-PONSAR et al., 1997; SÁNCHEZ-IGLESIAS et al., 2007), a dose administrada de 100 mg/kg

de citrato de alumínio aparentemente conseguiu danificar suas funções, sendo essa uma hipótese para explicar o prejuízo motor dos ratos intoxicados ao executar essa atividade.

No teste de memória social, os resultados mostram que ratos adultos intoxicados com alumínio (100 mg/kg, v.o.) apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando este foi reapresentado após um curto intervalo de tempo (30 minutos), sugerindo um prejuízo na memória social. Por outro lado, os animais que receberam terapia com magnésio conseguiram reconhecer o rato jovem, quando este foi reapresentado em uma segunda exposição.

O teste de reconhecimento social é um modelo de memória olfatória de curta duração que pode ser facilitada por drogas que melhoram os processos de aprendizado e memória (PREDIGER et al., 2005b; MOURA e XAVIER, 2010), e prejudicada por processos fisiopatológicos (como isquemia, envelhecimento, etc) que sabidamente interferem com os processos de aprendizado e memória (PREDIGER et al., 2005a).

Segundo Moura e Xavier (2010) uma das principais vantagens no uso deste tipo de testes comportamentais para investigar a memória relaciona-se ao fato de que a resposta dos animais independe de reforçadores ou punição imediatos do comportamento, dependendo apenas da tendência natural de ratos investigarem seus co-específicos.

Por fim, os animais foram submetidos ao modelo do labirinto em T elevado (LTE) para avaliações relacionadas à memória, observou-se que o número de reexposições ao braço fechado do labirinto, necessário para atingir o critério de esquiva foi relativamente maior no grupo CAI tanto em relação ao grupo controle,

quanto ao grupo tratado com a terapia de tratamento CA+Mg, caracterizando assim, prejuízo no aprendizado.

Sanson e Carobrez (1999) e Takahashi et al. (2005) afirmam que o aumento no número de reexposições para a permanência do animal ao braço fechado do LTE está diretamente relacionado com a capacidade de aprendizagem.

Quando avaliamos as primeiras três exposições dos animais ao LTE, observamos que na primeira exposição (Basal) não houve diferenças significativas entre os grupos. É importante esclarecer que estudos com drogas ansiolíticas, utilizando este mesmo modelo, demonstram que a primeira latência no braço fechado do Labirinto em T elevado é sempre menor que as subseqüentes tentativas, devido à primeira exposição ser novidade para o animal, o que o leva a uma maior exploração nos braços abertos, quando comparado com o braço fechado (VIANA et al., 1994; GRAEFF et al., 1998).

Na segunda exposição (esquiva 1), todos os grupos elevaram sua latência no braço fechado do LTE, pois apresentaram aversão aos braços abertos do aparato, com exceção do grupo CAI que não houve resposta aprendida após o estímulo aversivo. Esse fato está de acordo com a observação feita por Graeff et al.(1998), de que as tentativas posteriores à primeira sempre se observa esse aumento de tempo de permanência no braço fechado do labirinto.

Quando avaliada a terceira exposição ao braço fechado do LTE (esquiva 2), observa-se que o grupo CAI mais vez não elevou seu tempo de permanência no braço fechado, em relação aos demais grupos. Esse dado sugere um efeito tóxico do citrato de alumínio na chamada memória de curta duração.

Resultados similares foram verificados por estudos prévios, os quais revelaram que a administração periférica de cloreto e sulfato de alumínio causou

déficits de memória (STRYUS-PONSAR et al., 1997; KUMAR, 1998; SETHI et al., 2008). Estes resultados sugerem que a intoxicação com citrato de alumínio pode interferir nos mecanismos de aprendizado e memória de roedores submetidos a testes comportamentais de memória.

Quando analisado o parâmetro de fuga a partir do braço aberto do LTE, os resultados não apontaram diferenças significativas entre os grupos, isso significa que a resposta de fuga representada pelo medo inato não prejudicada pela intoxicação com alumínio.

Quando realizamos o teste para avaliação da memória de longa duração, realizada 24 horas após a esquia 2, observamos que os animais do grupo CAI apresentaram déficits de memória, caracterizado pelos valores reduzidos do tempo de permanência no braço fechado em relação aos demais grupos. Izquierdo et al.(1997) e Squire e Kandel (2003) afirmam que a consolidação da memória de longa duração ocorre em apenas algumas horas, através de modificações bioquímicas do processo de consolidação, podendo ser recuperada em dias ou até mesmo meses após o estímulo aversivo.

No reteste, realizado 30 segundos após o teste, nosso estudo evidenciou que todos os grupos, inclusive o CAI elevaram seu tempo de permanência no braço fechado do LTE. De acordo com Takahashi et al.(2005), o aumento nas latências na fase do reteste, é característico desse modelo experimental, onde após a fase de teste há um aumento nos tempos de permanência no braço fechado.

Os resultados encontrados neste trabalho são corroborados por outros estudos que utilizaram modelos de intoxicação experimental por metais pesados, incluindo alumínio (ROLOFF et al., 2002; KANECO et al., 2006) e metilmercúrio, além de outros neurotóxicos, como o etanol (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005;



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

Em um estudo realizado por Silva Júnior et al.(2013) com intoxicação aguda de citrato de alumínio dose de 320 mg/kg administrada por via oral em ratos wistar, observou-se prejuízos de aprendizagem e memória no LTE. Ainda neste estudo, também foram observados alterações na morfologia das camadas de CA1 e CA3 do hipocampo, principalmente nos animais com maior tempo de sobrevivência após a intoxicação.

## 5.6 A INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM CITRATO DE ALUMÍNIO INDUZ DIMINUIÇÃO DA DENSIDADE CELULAR E REATIVIDADE ASTROCITÁRIA NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS

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

nível histopatológico de uma estrutura anatômica considerada fundamental no processo de consolidação do aprendizado, o hipocampo. Para tal, utilizamos a técnica de violeta de cresila para a visualização dos corpos celulares e imunistoquímica para a marcação de astrócitos nas áreas CA1, CA3 e hilo dessa estrutura.

Os resultados dessa técnica revelaram que os animais intoxicados com citrato de alumínio apresentaram perda da densidade celular e desorganização das camadas CA1, CA3 e hilo do hipocampo diferentemente dos animais que receberam o tratamento com magnésio, pois os mesmos apresentaram uma boa preservação celular e organização nas referidas áreas estudadas.

As alterações morfológicas observadas no hipocampo dos animais intoxicados com alumínio podem estar influenciando o déficit de aprendizagem e memória observado neste estudo, uma vez que as áreas do hilo, CA1 e CA3 do hipocampo são reconhecidamente responsáveis pelos processos de consolidação da memória. Nossos resultados sugerem que as alterações morfológicas observadas podem ter prejudicado a capacidade de aprendizagem dos ratos intoxicados com citrato de alumínio e já o tratamento com magnésio tenha facilitado essa capacidade nos animais, uma vez que os animais deste grupo apresentaram um melhor desempenho nos testes de memória do LTE e Reconhecimento social. Este dado está de acordo com estudos prévios que mostram alterações morfológicas e perda celular em hipocampo de ratos intoxicados com alumínio tanto em modelos comportamentais quanto em trabalhos *in vitro* (LÉVESQUE et al., 2000; MESHITSUKA e AREMO, 2007; SETHI et al., 2008; SILVA JÚNIOR et al., 2013).

EI-Rahman (2003) também relatou em seus estudos com sulfato de alumínio, administrado durante 35 dias que esse metal causa desorganização

celular, perda neuronal e degeneração neurofibrilar no hipocampo, que, interessante, são semelhantes aos emaranhados neurofibrilares observado na doença de Alzheimer. Além disso, Sethi et al. (2008) relataram em seus estudos que a administração do alumínio afetou as áreas CA 1 e CA3 do hipocampo causando, também, enorme perda neuronal e desorganização celular.

Outros trabalhos relatam que além do hipocampo, outras as áreas do SNC podem ser afetadas pelo acúmulo de alumínio, entre as quais neocórtex, bulbo olfatório, hipotálamo, cerebelo e estriado (XU et al., 1992; STRYUS-PONSAR et al., 1997; KUMAR, 1998).

Além de perda e desorganização celular, nossos resultados mostraram astrócitos mais volumosos e reativos no grupo de animais intoxicados com citrato de alumínio. No entanto, o grupo que recebeu a terapia com magnésio apresentou astrócitos com pouca reatividade e volume, porém com uma intensa ramificação de prolongamento.

A alteração na ativação astrocítica é um fenômeno comumente observado em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo lesão cerebral, lesão na medula espinhal (GOMES-LEAL et al., 2004; SILVA JÚNIOR et al., 2013) e a doença de Alzheimer (MCGEER & MCGEER, 1998; MEDA et al., 2001).

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

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

Em outro estudo, Suarez-Fernández et al.(1999) encontraram acúmulo de alumínio em neurônios e astrócitos após exposições de 8 a 12 dias e de 15 a 18 dias. Nas exposições de 8 a 12 dias, esse metal causou fortes mudanças na morfologia dos astrócitos, bem como encolhimento dos corpos celulares. Já nas exposições de 15 a 18 dias, foi observada uma redução de 50% na viabilidade dos astrócitos.

No presente estudo, a alteração na reatividade astrocítica pode indicar comprometimento patológico desta população de células gliais. É possível que este fenômeno tenha sido desencadeado pelo acúmulo de alumínio no hipocampo e pelo aumento das concentrações de oxido nítrico e diminuição em TEAC observados neste grupo. Diversos estudos demonstram que o excesso de óxido nítrico pode estar envolvido na gênese e desenvolvimento de inúmeras patologias, como por exemplo, desordens neurodegenerativas (SAHA et al. 2006; YUAN et al. 2009)

O aumento na reatividade astrocítica deve ter contribuído para as alterações morfológicas, observadas no hilo e nas camadas de CA1 e CA3 do hipocampo dos animais intoxicados com alumínio, o que está de acordo com a hipótese anteriormente mencionada, qual seja, os astrócitos possuem uma função

neuroprotetora que é perdida durante a intoxicação com alumínio (AREMU e MESHITSUKA, 2006; MESHITSUKA e AREMO, 2007).

Um estudo realizado por Ahlemeyer et al. (2003) demonstrou que a ativação de astrócitos altera sua capacidade para proteger os neurônios depois de um dano de excitotoxicidade devido a diminuição na liberação de fatores solúveis termolábeis.

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

## 6 CONCLUSÕES

- A intoxicação experimental com citrato de alumínio resultou em acúmulo do metal no soro e no hipocampo dos animais intoxicados;
- O acúmulo de alumínio no soro e no hipocampo resultou em estresse oxidativo nos animais submetidos a intoxicação crônica com alumínio;
- O grupo intoxicado com alumínio apresentou prejuízo nos mecanismos de aprendizagem e memória nos testes comportamentais do LTE e reconhecimento social. Já a terapia de CAI+Mg facilitou este processo nos mesmos teste comportamentais;
- A terapia com magnésio (CAI+Mg) mostrou-se eficaz na reversão dos danos cognitivos e histopatológicos da intoxicação com alumínio no hipocampo. Contudo, novos estudos comportamentais, neuroquímicos e imunoistoquímicos devem ser realizados para o melhor entendimento do mecanismo de ação do magnésio na reversão dos danos causados pelo alumínio.

## REFERÊNCIAS

ABU-TAWEEL, G. M., AJAREM, J.S., AHMAD, M. Neurobehavioral toxic effects of perinatal oral exposure to aluminum on the developmental motor reflexes, learning, memory and brain neurotransmitters of mice offspring. **Pharmacol Biochem Behav.** v.101(1):49-56, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

BAST, C. B. **Toxicity Summary for Aluminum. Oak Ridge: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, 1993.** Disponível em: <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/aluminum.shtml>. Acesso em: 20 agos. 2010.

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

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

BONDY, S.C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **Neurotoxicology**. Sep;31(5):575-81, 2010

BURMAN, O. H., MENDEL, M. Short-term social memory in the laboratory rat: Its susceptibility to disturbance. **Applied Animal Behaviour Science**, 67, 241-254, 2000.

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

BHADOURIA, M. Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, 2012.

BLAYLOCK, R.L. Food additive excitotoxins and degenerative brain disorders. **Med Sentinel**, 4:212–5,1999

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria n. 2914/2011. [Publicado no Diário Oficial da União; 2011; Dezembro 12].

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

CHENG, D., ZHU, C., CAO, J., JIANG, W. The protective effects of polyphenols from jujube peel (*Ziziphus Jujube Mill*) on isoproterenol-induced myocardial ischemia and aluminum-induced oxidative damage in rats. **Brain Research**, v. 50(5):1302-8, 2012

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

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

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

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

COLINO, E. C. V.; PALHETA, D. da C.; SARAIVA, A. F.; CARDOSO, E. C. Níveis de metais pesados em piramutabas (*Brachyplatystoma vaillantii*) capturadas na Baía de Marajó e comercializadas no município de Belém/PA. **Veterinária em foco** Vol. 6, No. 2, p.149-153, Jan./Jun. 2009.

COLOMINA, M.T., ROIG, J.L., TORRENTE, M., VICENS, P., DOMINGO, J.L. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. **Neurotoxicol Teratol**, v. 27(4):565-74, 2005.



CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002.** Dispões sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União (DOU), 21 de junho de 2002. Disponível em URL: [http://www.cfmv.org.br/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.htm](http://www.cfmv.org.br/legislacao/resolucoes/resolucao_714.htm). [29 maio 2010].

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

DANTZER, R., BLUTHE, R. M., KOOB, G. F., LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, 91, 363-368, 1987.

DAVIS, F. C. The measurement of aggressive behavior in laboratory rats. **The Journal of Genetic Psychology**, 43, 213-217, 1933.

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

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

DIJKSTRA, C. D., DOPP, E. A., JOLING, P., KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Adv Exp Med Biol**, v.186, p. 409-419, 1985.

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

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

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

FERGUSON, J. N., ALDAG, J. M., INSEL, T. R., YOUNG, L. J. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. **Journal of Neuroscience**, 21, 8278-8285, 2001.

FERGUSON, J. N., YOUNG, L. J., HEARN, E. F., MATZUK, M. M., INSEL, T. R., WINSLOW, J. T. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. **Nature Genetics**, 25, 284-288, 2000.

FERGUSON, J. N., YOUNG, L. J., INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 23, 200-224, 2002.

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

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

GASBARRI, A.; POMPILI, A.; PACITTI, C.; CICIRATA F. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. **Neuroscience**, 116(4):1131-40, 2003.

GILLESSEN, T.; BUDD, S.L.; LIPTON, SA. Excitatory amino acid neurotoxicity. In: Alzheimer C, editor. Molecular and cellular biology of neuroprotection in the CNS series: **advances in experimental medicine and biology**, v. 513. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, Georgetown, TX: Landes Bioscience; p. 3–40, 2002.

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

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

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

GRANT, E. C. An analysis of the social behaviour of the male laboratory rat. **Behaviour**, 21, 260-281, 1963.

GRANT, E. C., MACHINTOSH, J. H. A description on the social postures of some laboratory rodents. **Animal Behavior**, 21, 246-253, 1963.

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

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

HALL, C. S., KLEIN, S. J. Individual differences in aggressiveness in rats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 33, p. 371-371, 1942.

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

ITO, D., IMAI, Y., OHSAWA, K., NAKAJIMA, K., FUKUUCHI, Y., KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 57, p.1-9, 1998.

JERONYMO, S., FUJIMURA, H. Y. Dosagem de alumínio no soro de indivíduos sadios e em pacientes com insuficiência renal crônica mantidos ou não em tratamento dialítico. **J. Bras. Nefrol.** v. 20(2): 144-150, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

KUMAR, V., BAL, A., GILL, K.D. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. **Toxicology**. v. 31;255(3):117-23, 2009.

KUMAR, A., PRAKASH, A., DOGRA, S. Neuroprotective effect of carvedilol against aluminium induced toxicity: possible behavioral and biochemical alterations in rats. **Pharmacol Rep**. v. 63(4):915-23, 2011.

LAZARD, E. M. A preliminary report on the intravenous use of magnesium sulfate in puerperal eclampsia. **Am J Obstet Gynecol**. v. 9: 178-88, 1925.

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

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

LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SETEM, J and MORATO, S.. Thigmotactic responses in an open-field. **Braz J Med Biol Res.** vol.41, n.2, pp. 135-140, 2008.

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

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

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

MARK, L.P; PROST, R.W.; ULMER, J.L. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. **AJNR Am J Neuroradiol.** v. 22: 1813–24, 2001.

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

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

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

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

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

MOURA, P. J.; XAVIER, G. F. Memória de reconhecimento social em ratos. **Psicologia UsP**, São Paulo, abril/junho, 21(2), 355-389, 2010.

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

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

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

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

NOREMBERG, S. M.S. **Influência da formação de hidroxialuminossilicatos na biodisponibilidade do alumínio**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2010.

OMS. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. São Paulo: EditoraRoca, 1998, p.316.

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

PRABHAKAR, P. V., REDDY, U. A., SINGH, S.P., BALASUBRAMANYAM, A., RAHMAN, M.F., INDU KUMARI, S., AGAWANE, S.B., MURTY, U.S., GROVER, P., MAHBOOB, M. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. **J Appl Toxicol**. v.32(6):436-45, 2012.

PICANCO-DINIZ, C. W., BOCHE, D., GOMES-LEAL, W., PERRY, V. H. and CUNNINGHAM, C. Neuropil and neuronal changes in hippocampal NADPH-diaphorase histochemistry in the ME7 model of murine prion disease. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 30, p.292-303, 2004.

PINTO, A. C. O impacto das emoções na memória: Alguns temas em análise. **Psicologia , Educação e Cultura**, v. 2(2), p. 215-240, 1998.

POPIK, P., VAN REE, J. M. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. **Progress in Brain Research**, 119, 415-436, 1998.

PREDIGER R. D.; DA CUNHA C.; TAKAHASHI R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpinetreated rats. **Behav Pharmacol** 16, 209-218, 2005.

PREDIGER R. D.; TAKAHASHI R. N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A2A receptors. **Neurosci Lett** 376, 160-165, 2005.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S. JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; FIGUEIREDO, C. P.; MATHEUS, F. C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; BEL, E. D.; MONGEAU. R.; HAMON. M.; LANFUMEY. L.; RAISMAN-VOZARI. R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in c57Bl/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res** 17, 114-129, 2010.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging** 26, 957-964, 2005.

PREDIGER, R. D.S.; Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms. **Journal of Alzheimer's Disease** 20 S205–S220, 2010.

QUEVEDO, J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; MARTINS, M. R.; ROESLER, R. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Rev Bras Psiquiatria**, v. 25 (Supl I): 25-30, 2003.

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

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

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

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

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

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

SANCHEZ-IGLESIAS, S., SOTO-OTERO, R., IGLESIAS-GONZALEZ, J., BARCIELA-ALONSO, M. C., BERMEJO-BARRERA, P., MENDEZ-ALVAREZ, E. Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 31–34, 2007.

SCORZA, F. A., ARIDA, R. M., CYSNEIROS, R. M., SCORZA, C. A., ALBUQUERQUE, M., CAVALHEIRO, E. A. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq Neuropsiquiatr**, 63(2-A):283-288, 2005.

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

SILVA JÚNIOR, A. F. **Efeitos neurocomportamentais da intoxicação experimental com citrato de alumínio em ratos adultos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém/PA, 2009.

SILVA JÚNIOR, A.F.; AGUIAR, M.S.S.; CARVALHO JUNIOR, O.S.; SANTANA, L.N.; FRANCO, E.C.S.; LIMA, R.R.; SIQUEIRA, N.V.M.; FEIO, R.A.; FARO, L.L.; GOMES-LEAL, W. SHippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. **Brain research**, v. 1491, p. 23–33, 2013.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula offi cinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15(2): 88-93, Abr./Jun. 2005.

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

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

SLUTSKY, I., ABUMARIA, N., WU, L.J., HUANG, C., ZHANG, L., LI, B., ZHAO, X., GOVINDARAJAN, A., ZHAO, M.G., ZHUO, M., TONEGAWA, S., LIU, G. Enhancement of Learning and Memory by Elevating Brain Magnesium. **Neuron**, v. 65, p. 165-177, 2010.

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

TAKAHASHI, R. N., PAMPLONA, F. A., FERNANDES, M. S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett**, V. 380, p.270–275, 2005.

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

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

VASCONCELOS, S. M.L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. S., KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007.

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

VIANA, M. B; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The Elevated T-Maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 49, p. 549-554, 1994.

WALLACE, C. Magnesium. **Emerg Med** (Fremantle) v.15: 92-6, 2003.

WALTON, J.R. Brain lesions comprised of aluminum-rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. **Neurotoxicology**. Nov;30(6):1059-69, 2009.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Drinking Water Quality\_ Problems and Solutions. **Published by John Wiley & Sons**. Ireland, Dublin, 1994.

WU, Z., DU, Y., XUE, H., WU, Y., ZHOU, B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. **Neurobiol Aging**. 2012 Jan;33(1):199.e1-12.

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

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

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

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

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

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



## ANEXO I – PROTOCOLO DE BANCADA

### 1. TAMPÕES

#### 1.1. Tampão Fosfato 0.4M (pH 7.2-7.4)

Para o preparo de 1l: Acrescentar 10.5g de fosfato de sódio monohidratado à 200 ml de água destilada (solução A). Acrescentar 114g fosfato de sódio dodecahidratado à 800ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (solução B). Misturar as duas soluções e ajustar o pH para 7.2-7.4, se necessário.

#### 1.2. Tampão Fosfato 0.1M

Para o preparo de 1l: Diluir 250 ml de tampão fosfato 0.4M em 750 ml de água destilada.

#### 1.3. Tampão Fosfato 0.05M

Para preparar 1l: Diluir 500 ml de tampão fosfato 0.1M em 500ml de água destilada.

#### 1.4. Tampão Fosfato Salina

Para o preparo de 1l: Acrescentar 9 g de cloreto de Sódio em 1L de tampão fosfato 0.1M.

#### 1.5. Tampão Fosfato Salina Tween

Para o preparo de 1l: Acrescentar 0,5 ml de tween 20% em 1l de tampão fosfato salina tween.

#### 1.6. Tampão Borato 0.2M (pH 9.0)

Adicionar 12.2g de ácido bórico à 1l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Corrigir o pH para 9.0 com hidróxido de sódio.

## 2. FIXADOR

### 2.1. Paraformaldeído 4%

Para o preparo de 1l: Diluir 40g de paraformaldeído com 500 ml de H<sub>2</sub>O previamente aquecida a 60°C. Misturar a solução de paraformaldeído (fria) com 500 ml de tampão fosfato 0.2M e corrigir o pH para 7.2-7.4 necessário. O paraformaldeído deve ser preparado no dia do experimento para melhores resultados.

## 3. SOLUÇÃO CRIOPROTETORA

### 3.1. Solução Crioprotetora I

Adicionar 50g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

### 3.2. Solução Crioprotetora II

Adicionar 100g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

### 3.3. Solução Crioprotetora III

Adicionar 150g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

Trocar de solução sempre que a espécime se apresentar flutuante.

## 4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

### Violeta de Cresila

Usada para corar secções espessas previamente a análise imunoistoquímica.

### 4.1. Preparo da Solução de Violeta de Cresila

Dissolver 0.25g de acetato de violeta de cresila em 100 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar o pH para 3.3 com ácido acético.

#### **4.2. Coloração Para Violeta de Cresila (seções de 50µm)**

Deixar seções de 50 µm nas seguintes soluções:

- a. solução H<sub>2</sub>Od /ácido acético – 7 min
- b. solução de violeta de cresila – 14 min
- c. álcoois 70%, 80% e 90% -1.5 min em cada
- d. álcool absoluto I – 1 min
- e. álcool absoluto II – 1 min
- f. xileno I – 1 min
- g. xileno II – 1 min
- h. montar as seções entre lâmina e lamínula com Entelan (Merck) ou outro meio de inclusão

### **5. IMUNOHISTOQUÍMICA**

#### **5.1. Pré Tratamento das Secções**

Com a finalidade de melhorar o padrão de reação antígeno-anticorpo, realizou-se pré tratamento das seções com tampão borato.

#### **5.2. Pré Tratamento com Tampão Borato**

As seções retiradas do freezer, após alcançarem temperatura ambiente, são imersas em tampão borato (pH 9.0) aquecido a 60 °C, em banho maria por 20 minutos. A temperatura é mantida constante neste período, sendo ao fim desse período retiradas do banho maria, resfriadas por 20 minutos, ainda dentro da solução de tampão borato, para se seguir o protocolo.

#### **5.3 Imunoistoquímica para GFAP**

- a. Secções de 20 µm, já montadas em lâminas, são submetidas ao pré tratamento com tampão borato;
- b. Lavagem em tampão fosfato salina por 3 min, sob agitação constante em agitador orbital (60 rpm);
- c. Imersão em metanol +peróxido de hidrogênio a 1% (100ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/250ml de metanol) por 20 minutos;

- d. Demarcação das secções com caneta hidrofóbica;
- e. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
- f. Bloqueio em soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário por 1 hora. No caso do anticorpo anti GFAP o soro normal de cabra a 10 % foi utilizado;
- g. Após o bloqueio em soro normal, retira-se o excesso de soro, e as secções são expostas ao anticorpo primário, diluído no mesmo soro usado por técnica, *overnight* . A diluição usada foi de GFAP (1:2000, Dako);
- h. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
- i. Exposição ao anticorpo secundário, por duas horas, na seguinte diluição: para o anticorpo anti GFAP, utilizou-se o anticorpo secundário biotinilado feito em cabra anti coelho (5:1000, Vector).
- j. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
- k. Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, vector) por 2h minutos (uma gota da solução A + uma gota da solução B em 5ml de tampão fosfato salina, preparado com 40 min de antecedência);
- l. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 4 vezes de 3 minutos;
- m. Reação em diaminobenzidina (DAB ) para revelação da peroxidase do antígeno. Aliquotas de DAB foram descongeladas e diluídas em 250 ml de tampão fosfato 0.1M em uma cubeta. Antes do início da reação, acrescentou-se à solução de DAB 130  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . As secções montadas em lâminas dispostas em uma cesta histológica foram imersas na solução de DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e monitoradas com auxílio de um microscópio até que o padrão da reação fosse satisfatório. Em seguida, as secções foram desidratadas e cobertas com lamínula com auxílio de Entelan (Merck).