

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**Avaliação do Efeito do Sulfato de Alumínio no Cérebro de Ratos utilizando
Modelos Neurofisiológicos, Comportamentais e Moleculares**

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

Recife

2018

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

**Avaliação do Efeito do Sulfato de Alumínio no Cérebro de Ratos utilizando
Modelos Neurofisiológicos, Comportamentais e Moleculares**

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração: Neurofisiologia.

Orientador: Profº. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Profº. Dr. Ricardo Abadie Guedes

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/ 1728)

Silva, Cleopatra Regina da

Avaliação do efeito do Sulfato de Alumínio no cérebro de ratos utilizando modelos neurofisiológicos, comportamentais e moleculares/ Cleopatra Regina da Silva- 2018.

94 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Ricardo Abadie Guedes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Depressão Alastrante Cortical 2. Alumínio 3. Enzimas I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Guedes, Ricardo Abadie (coorient.) III. Título

612.82

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-371

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

Avaliação do Efeito do Sulfato de Alumínio no Cérebro de Ratos utilizando Modelos Neurofisiológicos, Comportamentais e Moleculares

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração: Neurofisiologia.

Aprovada em: 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Belmira Lara Silveira Andrade da Costa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Renata Cristina da Penha França (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Diego de Souza Buarque (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Kaline Catiely Campos Silva (Examinador Externo)
Universidade do Estado da Bahia.

À minha família que com toda a paciência e amor esteve ao meu lado durante todos os momentos,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me mostrado o caminho certo quando tudo parecia perdido e com sua imensa misericórdia me fez conhecer verdadeiros anjos na terra.

Ao professor Dr. Ranilson pela confiança que depositou em meu trabalho mesmo sem me conhecer, durante esses quatro anos de convivência e pesquisas científicas enriqueceu tanto lado profissional como pessoal.

Ao professor Dr. Ricardo pela disponibilidade e ensinamentos, como bom profissional sempre exigente para obter um elevado padrão de qualidade nos experimentos, além de sempre ter sugestões pertinentes para o aperfeiçoamento do mesmo.

Ao professor Dr. Rubem que sempre se fez presente no desenvolvimento deste trabalho onde tive total apoio. Agradeço as palavras de estímulo e ânimo durante o período de realização do estudo.

A professora Dr^a. Jaqueline Azevedo pela disponibilidade e parceira junto ao laboratório de biologia molecular que tornou possível as análises genéticas.

A Jorge que forneceu suporte técnico e pessoal para o desenvolvimento do trabalho. A amizade iniciada na luta diária da pós-graduação que quero levar para toda vida.

A professora Dra. Vera, Djalma, Fernanda e Laysa pelo incansável apoio a nós doutorandos e mestrandos, sempre nos incentivando para o crescimento profissional.

Ao veterinário Edeones França pelo suporte técnico no fornecimento e ensino no manuseio dos animais.

A minha família que é a essência do que sou, meu caráter, compromisso, persistência, esse doutorado é fruto da dedicação de vocês. Obrigada por sempre estarem ao meu lado investindo na minha educação e suportando muitas vezes a

minha impaciência. Ao nosso amor Davi que chegou para unir ainda mais a nossa família, seu sorriso renova minhas energias.

A equipe do LAFINNT pelo apoio, ajuda e ensinamentos durante todo o trabalho dentro do laboratório.

A equipe LABENZ pelos momentos de descontração, crescimento acadêmico e apoio pessoal.

O estagiário Renato pela dedicação ao desenvolvimento desse estudo, mesmo com provas e trabalhos da graduação mostrou-se disponível.

Aos eternos mestrandos Amália, Amanda, Bruna, Carol, Laís e Thiago que a diferença de personalidades me fez reavaliar como vejo o mundo e tornaram essa caminhada mais leve.

Aos meus estimados Amigos agradeço a compreensão da minha ausência, obrigada pelas vibrações positivas e por acreditarem nos meus sonhos.

A igreja de Cristo uma família que me faz crescer espiritualmente com muito amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Comitê de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) e ao Fundo de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro durante o período do curso de Pós-Graduação.

RESUMO

O alumínio é encontrado em grandes quantidades na crosta da terrestre. Apesar de ser comum, não são conhecidos papéis biológicos e não constitui um elemento essencial para qualquer organismo. Levou-se a acreditar que o alumínio não causaria risco a saúde humana. Em vista disto, o mesmo passou a ser utilizado em alimentos, medicamentos e no tratamento da água aumentando a exposição humana a formas solúveis do alumínio. Com o passar do tempo foram encontradas alterações fisiológicas em sujeitos portadores ou não de doenças neurológicas, sendo ainda necessário ser elucidado como esse elemento não essencial atua no nosso organismo. Avaliamos o efeito do consumo do sulfato de alumínio nos modelos: eletrofisiológicos, comportamentais, enzimáticos, inflamatórios e ferramentas moleculares em ratos adultos. Utilizamos 50 animais com 45 dias de idade distribuídos nos grupos ingênuo (n=10), veículo (n=10) e tratados (n=30) com alumínio nas doses de Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg), por gavagem durante 7 dias. Em seguida foram realizados os testes de comportamento no aparelho de campo aberto (CA) e teste de reconhecimento de objetos (RO), no 11º dia os ratos foram submetidos ao registro da depressão alastrante cortical (DAC); ao término os animais foram sacrificados com dose extra de anestésico e foi coletado o cérebro. Os animais tratados Al-50 e Al-100 passaram mais tempo imóveis e menos tempo na área central do CA quando comparados aos grupos ingênuo e veículo e Al-10. Em relação ao teste de RO, os animais tratados com alumínio passaram menos tempo explorando o objeto com uma forma nova sugerindo diminuição da memória para reconhecer o objeto novo. Foi notado um aumento na velocidade de propagação da DAC nos grupos tratados com alumínio, ou seja, foi facilitada a propagação do fenômeno; sabe-se que um dos fatores que facilita a DAC é o stress oxidativo, e este encontrou aumentado nesses grupos experimentais. Na expressão gênica observamos que com o aumento da dose de sulfato de alumínio tivemos um aumento da expressão gênica mRNA do AChE (acetilcolinesterase) principal enzima que degrada a acetilcolina. E para os mesmos grupos a atividade enzimática da AChE aumentou em relação às doses. Concluimos que o alumínio modificou os parâmetros relacionados a depressão alastrante cortical, esse aumento pode estar associado ao alto estresse oxidativo e de cálcio que são alterados na administração do alumínio, além do aumento na ansiedade, perda de memória e uma diminuição da curiosidade que são relatados em pacientes portadores de doenças neurológicas. Na expressão atuou como um agente

modulador aumentando o nível da enzima AChE, assim como na atividade enzimática podendo de forma inicial o organismo aumentar sua expressão para suprir efeitos deletérios na cognição. Sulfato de alumínio induziu o stress oxidativo aumentando a formação de radicais livres e inibindo enzimas antioxidantes, assim como uma alta resposta inflamatória com o aumento de citocinas da resposta celular Th1. Este estudo revela a importância de se avaliar os efeitos tóxicos de substâncias que aparentemente não possuem efeitos deletérios afim de elucidar os cuidados necessários para o seu consumo.

Palavras-chave: Alumínio. Depressão alastrante cortical. Enzimas. Expressão gênica.

ABSTRACT

Aluminum found in large quantities in the earth's crust. Although it is common, its biological roles are not known and is not an essential element for any organism. This led to believe that aluminum would not cause risk to human health. Therefore, the same has been used in food, medicines and water treatment increasing human exposure to soluble forms of aluminum. Over time physiological changes were found in subjects with or without neurological diseases, and it is still necessary to elucidate how this non-essential element acts in our body. In this study we have evaluated the effect of increasing doses of aluminum sulfate on electrophysiological, behavioral, enzymatic, inflammatory and molecular tools in adult rats. We used 50 animals 45 years old distributed in the naïve ($n = 10$), vehicle ($n = 10$) and aluminum treated groups at Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) and Al-100 (100 mg/kg), by gavage for 7 days. Then behavior tests open field (OF) and object recognition memory (OR) were performed. On day 11 rats were subjected the recording of cortical spreading depression (CSD), after which the animals were sacrificed with an extra dose of anesthetic and the brain was collected. We observed that the treated animals spent more time immobile and less time in the central area when compared to the naïve, vehicle, Al-10 groups. In relation OR test, the animals treated with aluminum spent less time exploring the object with a novel shape, suggesting deficient memory for the new shape-object. An increase in the CSD speed was observed in the groups treated with aluminum. It is known that oxidative stress (OS) is one of the factors that facilitates CSD. We found an increased in the experimental groups. In the gene expression we observed that with the increase of the dose of aluminum sulfate we had an increase of the gene expression levels mRNA of the AChE (acetylcholinesterase) main enzyme that degrades the acetylcholine and for the same groups the enzymatic activity of acetylcholinesterase increased in relation to the doses. We conclude that aluminum modified the parameters related to cortical spreading depression, this increase may be associated with high oxidative stress and calcium that are altered in aluminum administration, besides the increase in anxiety, memory loss and a decrease in curiosity that are reported in patients with neurological diseases. In the expression acted as a modulating agent increasing the level of the AChE, as well as in the enzymatic activity, being able in an initial way the organism to increase its expression to decrease deleterious effects in the cognition. Aluminum sulfate induced oxidative

stress increasing the formation of free radicals and inhibiting antioxidant enzymes, as well as promote a high inflammatory response with the increase of cytokines of Th1 cell response. This study reveals the importance of evaluating the toxic effects of substances that appear to have no deleterious effects in order to elucidate the caution for its consumption.

Keywords: Aluminum. Cortical spreading depression. Enzymes. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 -	Esquema mostrando as etapas do tratamento da água até chegar às residências.....	20
Figura 2 -	Mecanismos de remoção da matéria orgânica natural durante o processo de coagulação.....	21
Figura 3 -	Circulação arterial do cérebro humano.....	25
Figura 4 -	Córtex frontal. Imagens de microscopia de luz (a) e fluorescência (b)	26
Figura 5 -	Esquema para o registro da DAC no hemisfério direito.....	27
Figura 6 -	Esquema mostrando a sequência da depressão alastrante cortical (DAC), numerados de 1 a 6.....	28
Figura 7 -	Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – forma.....	30
Figura 8 -	Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – espacial.....	30
Figura 9 -	Labirinto de cruz elevado. A- braços abertos; B- braços fechados.....	31
Figura 10 -	Reação de hidrólise da acetilcolina.....	33
Figura 11 -	Cinco sinais do processo inflamatório.....	36

Artigo 1

Figura 1 -	Peso corporal no primeiro (dia 1) e último (dia 7) dia de tratamento com alumínio nas doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). *a, b e c indicam diferenças significativas no último dia do tratamento. a (ingênuo e veículo) c (Al-50 e Al-100) não exibido diferença significativa. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste Holm-Sidak.....	45
Figura 2 -	Registros das mudanças potenciais lento (P) através de dois elétrodos posicionados no córtex parietal (pontos 1 e 2) durante	

a depressão de alastrante cortical (DAC), nos grupos controle (ingênuo e veículo) e nos grupos tratados com alumínio, doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Eléctrodo de referência (R) posicionado no osso nasal e o ponto de estimulação com KCL indicado pelas barras horizontais. As linhas das tracejadas verticais indicam a latência da onda passando pelos eléctrodos (pontos 1 e 2) e as barras sólidas verticais indicam a amplitude 10 mv.....

47

Figura 3 - Velocidade da DAC dos ratos adultos nos grupos controle (ingênuo e veículo) e nos grupos tratados com alumínio, doses de Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). * diferença significativa quando comparado aos grupos controle e ** diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com 10 mg/kg. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$; ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak).....

48

Artigo 2

Figura 1 - Análise da atividade enzimática da acetilcolinesterase sobre o a administração do sulfato de alumínio no cérebro de ratos. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0.05$ ANOVA seguido do pós-teste de Tukey). Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Ache – Acetilcolinesterase. Diferentes letras indicam diferença significativa.....

64

Figura 2 - Níveis de mRNA do gene da acetilcolinesterase após tratamento com diferentes dosagens de sulfato de alumínio. Dados expressos média $\pm$ desvio padrão ($p < 0.05$ ANOVA seguido do pós-teste de TUKEY). Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-

100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Ache – acetilcolinesterase. GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gene de referência). Diferentes letras indicam diferença significativa.....

65

Artigo 3

Figura 1 - Dosagem dos níveis de citocinas da resposta imune celular pró-inflamatória (TH1) e óxido nítrico no cérebro de ratos tratados com sulfato de alumínio. Dados expressos em pg/ml, n = 10 (por grupo experimental), p-value = 0,028, t-value = 2.568. Controle (animais não tratados), Al-10 mg (animais tratados com sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 mg (animais tratados com sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 mg (animais tratados com sulfato de alumínio 100 mg). IL-2 (interleucina 2), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IFN- γ (interferon gama) e no (óxido nítrico). b indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle a.....

78

Figura 2 - Dosagem de enzimas e radicais livres do estresse oxidativo no cérebro de ratos tratados com sulfato de alumínio. Dados expressos em ng/ml, n = 10 (por grupo experimental), p-value = 0,042, t-value = 2.331. Controle (animais não tratados), Al-10 mg (animais tratados com sulfato de alumínio em 10 mg/kg), Al-50 mg (animais tratados com sulfato de alumínio em 50 mg/kg) e Al-100 mg (animais tratados com com sulfato de alumínio em 100 mg/kg). IL-2 (interleucina 2), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IFN- γ (interferon gama) e NO (óxido nítrico). SOD (superóxido dismutase), TPTZ (radical 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazina), NO (óxido nítrico). Diferentes letras indicam diferença significativa.....

79

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Ingestão diária e semanal de alumínio em humanos.....	23
Tabela 2 - Classificação internacional das enzimas.....	32

Artigo 1

Tabela 1 - Efeito do sulfato de alumínio na viabilidade celular MTT.....	44
Tabela 2 - Análise do peso e do índice somático do cérebro e fígado nos diferentes tratamentos com sulfato de alumínio.....	46
Tabela 3 - Amplitude e duração dos potenciais lento da DAC em ratos adultos. Os grupos tratados com alumínio quando comparado aos grupos controle salina ou sem tratamento (ingênuo)	48
Tabela 4 - Análise do efeito do sulfato de alumínio no comportamento exploratório utilizando o teste de campo aberto.....	49
Tabela 5 - Tempo gasto durante a exploração do objeto familiar e novo nos testes de reconhecimento por forma e posição.....	50

Artigo 3

Tabela 1 - Inibição de enzimas antioxidantes no cérebro de ratos tratados com sulfato de alumínio nas doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Diferentes letras indicam diferença significativa.....	77
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	18
1.2	HIPÓTESE.....	18
1.3	OBJETIVOS.....	18
1.3.1	Objetivo Geral.....	18
1.3.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	TRATAMENTO DA ÁGUA.....	20
2.2	SAIS DE ALUMÍNIO.....	22
2.3	MODELO NEUROFISIOLÓGICO - DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL.....	26
2.4	MODELO COGNITIVO – COMPORTAMENTO.....	29
2.5	MODELOS ENZIMÁTICO, GENÉTICO E INFLAMATÓRIO.....	32
3	RESULTADOS.....	38
3.1	EFEITO DO SULFATO DE ALUMÍNIO NA ANSIEDADE, MEMÓRIA E DIVULGAÇÃO DE DEPRESSÃO EM RATOS WISTAR.....	38
3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBROS DE RATOS TRATADOS COM SULFATO DE ALUMÍNIO.....	59
3.3	ANÁLISE DO STRESS OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE RATOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DO SULFATO DE ALUMÍNIO.....	70
4	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	94

1 INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante na terra sendo liberado para o ambiente em grande parte por processos naturais, mas também devido a atividades antrópicas; possui número atômico 13 e massa atômica de 27 u; na forma iônica é um cátion com valência +3 (Al^{3+}) e em temperatura ambiente, o mesmo, se encontra em estado sólido. (LANTZY et al., 1979; BECARIA; CAMPBELL; BONDY, 2002).

O consumo do alumínio pela população ocorre principalmente através da ingestão de alimentos e água (HJORTSBERG et al., 1994; BECARIA; CAMPBELL; BONDY, 2002; RAWI; AL NASSR, 2012). O alumínio é artificialmente introduzido, nos alimentos, na forma de sais para atuar como agente antiaglomeração e regulador de acidez, sendo encontrado em queijos processados, fermentos em pó, misturas para bolos e panquecas, massas congeladas, além do alto teor do alumínio em produtos à base de leite de soja (IPCS International Programme on Chemical Safety, 2007).

No tratamento da água os sais de alumínio são largamente utilizados como agentes floculantes com a finalidade de reduzir os níveis de matéria orgânica, cor, turbidez e microrganismos (MATILAINEN et al., 2010; DONALDSON, 2013).

Devido à elevada exposição, diversas pesquisas foram desenvolvidas afim de avaliar seu potencial risco a saúde; com isso foi observado que o alumínio acelera o processo de envelhecimento no cérebro em ratos adultos (DELONCLE et al., 2001). Também foi relatado que o alto consumo do alumínio pode estar associado a patologias neurológicas, como esclerose múltipla, doença de Guam, a doença de Parkinson e de Alzheimer (NAYAK, 2002; ZHAO et. al., 2014; BONDY, 2016; BONDY & CAMPBELL, 2017).

O alumínio tem o potencial em atuar no órgão que é o centro do comando de todo o corpo, o cérebro, que através da atividade elétrica produzida nos torna capazes de realizar funções, das mais simples até as mais complexas. Assim, modelos que permitem observar alterações na atividade cerebral podem fornecer informações importantes para que se tenha um melhor entendimento de como esse órgão funciona, sob condições normais e experimentais (GUEDES, 2004).

A depressão alastrante cortical (DAC), fenômeno eletrofisiológico descoberto por Aristides Leão em 1944, é um fenômeno no qual ocorre uma queda acentuada na amplitude da atividade elétrica espontânea observada no eletrocorticograma (ECoG), após um estímulo artificial, seja ele químico, mecânico ou elétrico. Esse modelo é

utilizado, há muitos anos, pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), do Departamento de Nutrição da UFPE. Já foram testadas diversas substâncias; com a finalidade de observar quais alterações os distintos tratamentos podem provocar no fenômeno da DAC, e tentar traçar, dessa maneira, as possíveis relações entre as ações fisiológicas dos tratamentos e os respectivos impactos na atividade elétrica cortical. Entre os diferentes estudos observam-se substâncias que facilitam a propagação da DAC como o glutamato monossódico (LIMA et. al., 2017) a tianeptina (MAIA et. al., 2017) em outras que dificultam a propagação do fenômeno como a lecitina da *Canavalia ensiformis* (SOARES, et. al., 2014) e dieta hipercalórica (GERMANO et.al., 2013). Algumas substâncias possuem efeitos antagônicos de acordo com a concentração ou tempo de aplicação, como no caso da exposição ao etanol (ABADIE-GUEDES et. al., 2016), que de forma aguda dificulta a propagação e de forma crônica facilita a DAC, já no caso do ácido ascórbico (MENDES-DA-SILVA, et. al., 2014) doses mais baixas como a de 30 mg/kg/d atrapalham a DAC, enquanto que doses maiores 60 mg/kg/d e 120 mg/kg/d facilitam a propagação. Tais resultados chamam a atenção para a variação do impacto que uma mesma substância pode ter sobre a fisiologia, a depender das dosagens e períodos de exposição a que um indivíduo possa vir a ser submetido.

Apesar de ser uma metodologia bastante utilizada não foram encontrados relatos de como o sulfato de alumínio está relacionado ao ECoG, contudo existem dados na literatura utilizando eletromiografia em ratos tratados com sulfato de alumínio, nos quais foi realizada uma lesão na medula espinal, e após 10 dias da lesão a amplitude dos sinais elétricos dos grupos tratados com alumínio foi mais baixa quando comparado aos demais grupos (KHALAF AL MOUTAERY et.al., 2000).

Já com outros metais foi exposto na literatura que o zinco (Zn^{2+}) limita a propagação da depressão alastrante (AIBA et. al., 2012), magnésio (Mg^{2+}) inibe da DAC (SANTOS et. al., 2016).

Mesmo com os relatos sobre patologias neurológicas associadas ao composto em estudo, pouco se sabe sobre como o sulfato de alumínio atua nessas doenças degenerativas. Assim, modelos experimentais que visam avaliar parâmetros neurofisiológicos podem fornecer informações valiosas para a compreensão do fenômeno da DAC e as doenças a ele relacionadas. Tais conjuntos de experimentos podem e devem ser complementados com dados da avaliação comportamental que permite avaliar, de forma visual, alterações relacionadas à memória e disposição

exploratória (ansiedade). E com a avaliação da atividade enzimática para evidenciar o perfil do funcionamento biológico das enzimas neurotransmissoras e detoxificantes, junto ao acesso dos intermediários dos processos inflamatórios que permitirá mostrar o potencial de injúria que o sulfato de alumínio pode vir causar, finalizando com a expressão gênica que detecta o quanto a substância tem efeito sobre ao organismo.

Com isso neste estudo vamos avaliar o efeito do consumo, em crescentes doses, do sulfato de alumínio sobre parâmetros: eletrofisiológicos, comportamentais, enzimáticos, inflamatórios e ferramentas moleculares em ratos adultos.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar dos relatos na literatura sobre patologias neurológicas associadas ao composto em estudo, pouco se sabe como o sulfato de alumínio atua nessas doenças degenerativas e a utilização de modelos comportamentais, neurofisiológicos, enzimáticos, genéticos e inflamatórios podem fornecer informações valiosas para a compreensão dessas doenças.

1.2 HIPÓTESE

O sulfato de alumínio interfere em parâmetros neurofisiológicos dos ratos e esses efeitos podem ser detectados em modelos comportamentais, eletrofisiológicos, enzimáticos e ferramentas moleculares.

A propagação da DAC, bem como os níveis cerebrais e de expressão da acetilcolinesterase seriam aumentados pelo sulfato de alumínio de forma dose-depende.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Esse estudo tem como objetivo geral avaliar o efeito do sulfato de alumínio em doses crescente sobre o funcionamento do cérebro de ratos, utilizando modelos: comportamentais, eletrofisiológicos, enzimáticos e moleculares.

1.3.2 Objetivos Específicos

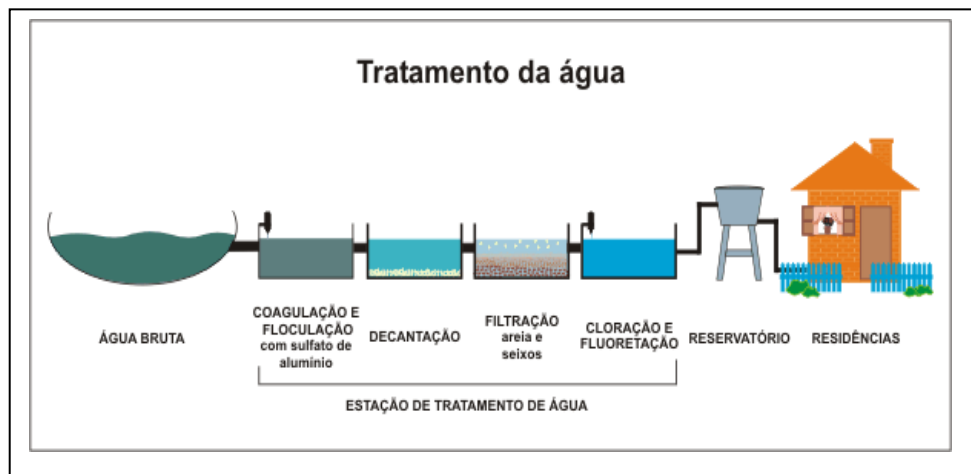
- Investigar as alterações na memória através do teste de reconhecimento de formas e espacial.
- Verificar a ansiedade através do teste campo aberto.
- Analisar as alterações na velocidade, amplitude e duração da propagação da depressão alastrante cortical causadas pelo sulfato de alumínio.
- Avaliar o efeito do sulfato de alumínio sobre a acetilcolinesterase utilizando o modelo de expressão gênica relativa (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$)
- Investigar o efeito do sulfato de alumínio no cérebro sobre a atividades de enzimas cerebrais e detoxificadoras.
- Correlacionar as ferramentas moleculares e enzimáticas.
- Avaliar o stress oxidativo em ratos tratados com o sulfato de alumínio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRATAMENTO DA ÁGUA

A água é um recurso essencial para os seres vivos e compõe mais de 70% do nosso corpo, atuando como componente bioquímico em diversas reações para a manutenção da homeostase corporal (NELSON; COX, 2011). Para o consumo apropriado a mesma deve ser tratada como mostra a figura 1.

Figura 1 - Esquema mostrando as etapas do tratamento da água até chegar às residências



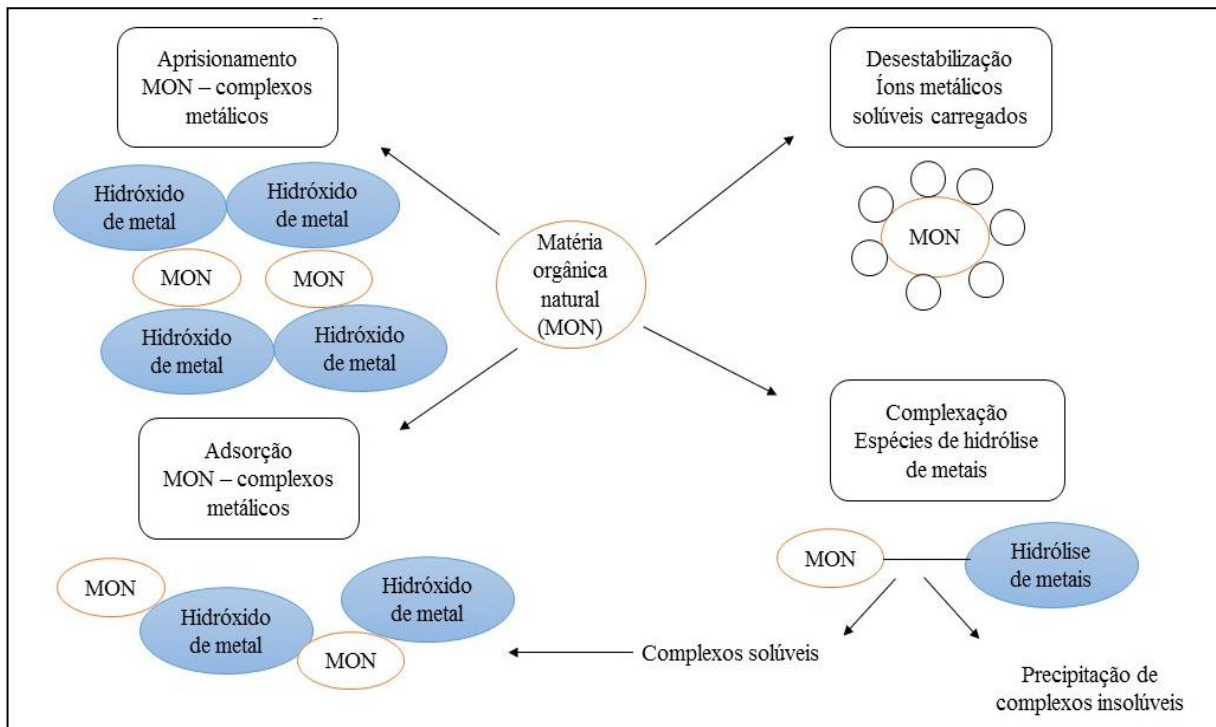
<http://www.pelotas.rs.gov.br/sanep/tratamento/>. Acessado em 06/03/17

Após a captação da água bruta o primeiro processo na remoção da matéria orgânica natural (MON) da água é a coagulação e floculação, o primeiro consiste na adição de agentes que diminuem a repulsão entre as cargas das partículas que após a agitação (floculação), as mesmas entram em contato formando partículas maiores, possibilitando assim a remoção dessas impurezas nos processos seguintes (MATILAINEN; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2010).

Os agentes coagulantes mais utilizados são os sais de alumínio (PISOI, 2011), sais férricos (ZOUBOULIS; MOUSSAS; VASILAKOU, 2008; ZHU, et. al., 2012) e polieletrólitos orgânicos (BOLTO; GREGORY, 2007); e os possíveis mecanismos de remoção podem ser por aprisionamento, adsorção, desestabilização ou complexação,

como mostra a figura 2. Com a formação dos flocos, os mesmos são decantados, filtrados e por fim cloro e flúor são adicionado à água, como mostra a figura 1.

Figura 2. Mecanismos de remoção da matéria orgânica natural durante o processo de coagulação.



Modificado MATILAINEN; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ (2010).

O alumínio é utilizado como agente coagulante nas formas de sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e cloreto de alumínio (AlCl_3) sendo o mais usado por ser de fácil manipulação e ter alta solubilidade. Quando comparado ao sulfato férrico remove a turbidez de maneira eficaz em menores concentrações; contudo, em baixas temperaturas e pH, depositam-se resíduos de alumínio na água tratada, o que pode causar, além da deposição no sistema de distribuição, um possível risco para a saúde (MATILAINEN; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2010; PISOI, 2011).

Os sais férricos, outro composto utilizado no tratamento da água, são usados nas formas de cloreto férrico (FeCl_3) e sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). Quando comparados ao alumínio são melhores na remoção da matéria orgânica natural e sua sensibilidade à variação de temperatura é menor, mas produzem contudo, água purificada com menor capacidade de tamponamento e requerem maior adição química para

estabilização e controle de corrosão (BELL-AJY et. al., 2000; ZOUBOULIS; MOUSSAS; VASILAKOU, 2008).

Os polieletrólitos são caracterizados pela sua carga, logo podem ser classificados polieletrólitos catiônicos (cloreto de polidialildimetil-amônio), aniônicos (poliacrilato de sódio), enquanto que os polímeros sem grupos ionizáveis são denominados não iônicos (poliacrilamida). São eficientes em remover a matéria orgânica natural de natureza hidrofóbica e quando comparado ao sulfato de alumínio produzem menos resíduos, contudo possuem um alto custo (BOLTO; GREGORY, 2007; MATILAINEN; VEPSÄLÄINEN; SILLANPÄÄ, 2010).

Apesar de essas substâncias serem utilizadas em larga escala pesquisadores vêm buscando alternativas no tratamento da água associados com compostos naturais, Freitas e colaboradores (2016) combinaram o sulfato de alumínio com lectina de sementes de Moringa e obtiveram uma redução de 96,8% da turbidez quando aplicados de forma sequencial o sulfato de alumínio e após a lectina, quando aplicado ao mesmo tempo a redução foi de 91,3%, além da redução da turbidez a concentração residual do alumínio ficou de 0,3 mg/L quando comparado ao tratamento utilizando apenas o sal que foi de 35,5 mg/L.

Estudo utilizando quitosana em comparação com o floculante convencional, a remoção de matéria orgânica e resíduos de Al^{3+} na água tratada aumentou em 1,8-23,7%, 1,2-85,5%, respectivamente, além de reduzir o custo de 7-34%; já em estudos onde a quitosana foi associada com o sulfato de alumínio promoveu uma melhor remoção na turbidez 97%. Mostrando assim que compostos naturais podem trazer benefícios ambientais e econômicos, além de reduzir a utilização desses compostos sintéticos em função de uma melhor qualidade de vida (ZENG; WU; KENNEDY, 2008; ZEMMOURIA et al., 2012; FREITAS, et. al., 2016).

2.2 SAIS DE ALUMÍNIO

Após o oxigênio e silício, o alumínio é o elemento mais predominante e entre os metais é o mais abundante da crosta terrestre. (ATWOOD; YEARWOOD, 2008; RAWI; AL NASSR, 2012; NURCHI et. al., 2012).

Profissionais como soldadores de alumínio e produtores de abrasivos estão frequentemente expostos a inalar partículas de poeira contendo alumínio, contudo de maneira geral, a exposição de alumínio pela população ocorre principalmente através

da ingestão de alimentos e água (SJOGREN et al., 1985; HJORTSBERG et al., 1994; YOKEL; MCNAMARA, 2001; WANG et. al., 2010).

A ingestão de alumínio é em média de 10 mg Al/dia, com intervalo 10-1000 mg Al/dia, seja através de água, alimentos, inalação e medicamentos como mostra a tabela 1. (BHATTACHARJEE et.al., 2013; SHAW; TOMLJENOVIC, 2013).

Tabela 1 - Ingestão diária e semanal de alumínio em humanos

Principais fontes de exposição ao Alumínio em seres humanos	Consumo diário (mg/dia)	Consumo semanal (mg/dia)	Quantidade que fica na circulação sistêmica
Comida natural	1 – 10	7 – 70	2.5–25 µg
Alimentos com aditivos Alumínio	1 – 20	7 – 140	2.5 – 50 µg (250 µg)
Água	0.08 – 0.224	0.56 - 1.56	0.2–0.56 µg
Produtos farmacêuticos (antiácidos, analgésicos tamponados, anti-ulcerativos, antidiarreicos)	126 – 5000	882–35,000	315–12,500 µg
Vacinas (HepB, Hib, Td, DTP)	0.51 – 4.56	-	510–4560 µg
Cosméticos, produtos para o cuidado da pele e antitranspirantes	70	490	8.4 µg
Utensílios de cozinha e embalagens de alimentos	0–2	0–14	0–5 µg

Modificado Shaw; Tomljenovic (2013).

Devido ao elevado consumo deste elemento, em formas de sais, passou-se a investigar seu potencial efeito deletério no corpo humano, entre os estudos, são relatadas alterações genéticas, hepáticas, hematológicas e doenças neurológicas, como Alzheimer, sejam esses estudos apresentados em condições experimentais ou após o óbito. Lankoff e colaboradores (2006), observaram em culturas de linfócitos humanos nas diferentes doses de $AlCl_3$ 1, 2, 5, 10 e 25 µg/ml induziram danos no DNA de forma dose dependente, sendo que a maior dose resultou em um elevado nível de

apoptose, mostrando uma diminuição na capacidade de reparação celular, quando exposto ao alumínio.

Outros danos relatados em estudos sobre os efeitos genotóxicos do AlCl_3 em culturas de linfócitos humanos, foram produção de danos ao DNA e o fato de que AlCl_3 mostrou-se citotóxico em todas as fases do ciclo celular, e o tratamento das células na fase G1 resultou em poliploidia e endoreduplicação (LIMA et. al., 2007).

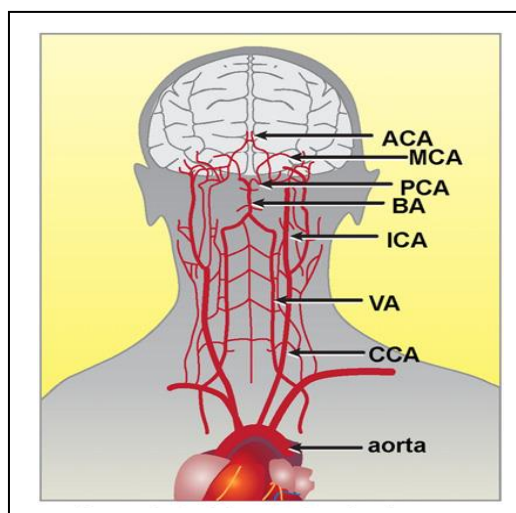
Em ensaios com o peixe *Rhamdia quelen* o teste de cometa confirmou a genotoxicidade do sulfato de alumínio, no tecido renal, sendo observadas quebras nas cromátides, descondensação na região telomérica e separação precoce de cromátides irmãs (KLINGELFUS et. al., 2015). Outros estudos revelaram, *in vivo*, um aumento significativo no número de micronúcleos em todas as concentrações de alumínio (49, 98 e 161 mg/kg), além do que, foram observadas também alterações no fígado, estômago e rins que apresentaram lesões irreversíveis, como a necrose (PAZ et.al., 2017). Esses mesmos dados foram confirmados no estudo *in vitro*, onde também houve um aumento significativo na quantidade de micronúcleos em todas as concentrações estudadas 5, 10 e 20 μM (PAZ et.al., 2017).

A ingestão prolongada do sulfato de alumínio acelerou características de envelhecimento no fígado de camundongos adultos. Os animais que foram tratados com sulfato de alumínio apresentaram um aumento na espessura endotelial e diminuição na porosidade; além disso, esses animais tiveram um aumento na deposição de colágeno e laminina, semelhante em camundongos senescentes não tratados com o composto (STACCHIOTTI et. al., 2008).

Sobre parâmetros hematológicos, ratos expostos ao sulfato de alumínio reduziram o número de glóbulos vermelhos e a concentração de hemoglobina no sangue, além da redução nos níveis plasmáticos do ferro em relação ao grupo controle (FARINA et.al., 2005). Já em estudos com ratos tratados oralmente com cloreto de alumínio (AlCl_3) utilizando água deionizada, os resultados das amostras de sangue exibiram que o AlCl_3 levou a um aumento significativo nas enzimas hepáticas (Aspartato Transaminase e Alanina Aminotransferase) e na creatinina renal. Além disso, a análise histopatológica, do fígado de ratos nas maiores doses, foi visualizado vacuolização citoplasmática dos hepatócitos centrilobulares e necrose grave. Para os rins, foi observada dilatação de túbulos renais e degeneração, quando comparados ao grupo controle (SALAH, et. al., 2015).

Bhattacharjee e colaboradores (2013), analisaram comparativamente a quantidade de alumínio nas artérias, que irrigam o sangue para o hipocampo (Figura 3), de pacientes que não tinham a doença de Alzheimer com pacientes portadoras da mesma, e foi observado um aumento da concentração do alumínio nos pacientes portadores da doença. Em culturas de células endoteliais desses vasos, as mesmas, possuíam uma alta afinidade para o alumínio quando comparadas com outros tipos de células endoteliais como, por exemplo, das artérias celíacas e mesentéricas que estão em contato direto na absorção dos nutrientes. Sugerindo que as células endoteliais dos vasos cerebrais possuem características bioquímicas que facilitam a ligação do alumínio a regiões específicas do cérebro, como o hipocampo, podendo causar patologias.

Figura 3 - Circulação arterial do cérebro humano.



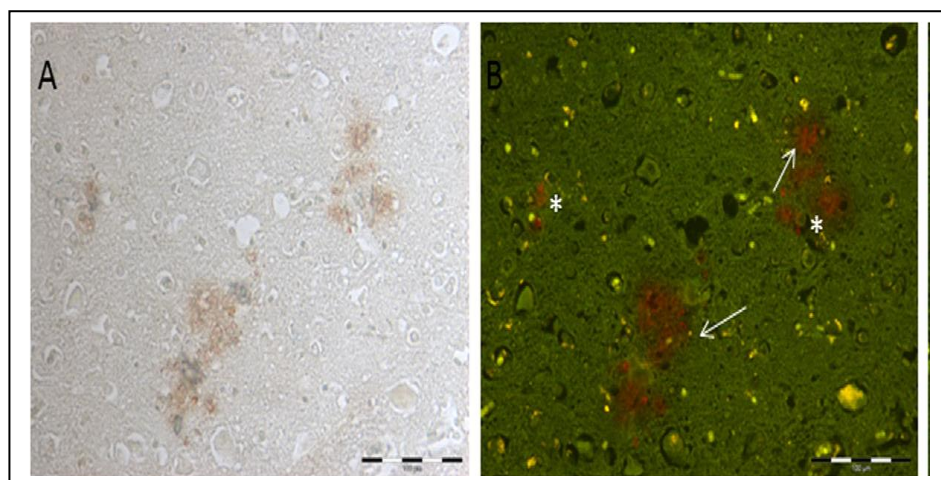
As artérias cerebrais principais incluem artéria aorta, artéria carótida comum (CCA), artéria vertebral (VA), artéria cerebral interna (ICA), artéria basilar (BA), artéria cerebral posterior (PCA) que irriga o hipocampo, artéria cerebral média (ACM) e a artéria cerebral anterior. Modificado Bhattacharjee et.al. (2013).

Swegert e colaboradores (1999) compararam o perfil do metabolismo energético oxidativo de pacientes portadores da doença de Alzheimer com o modelo de ratos que consumiram o alumínio no período de 90-100 dias. Em pacientes com a doença foi observada uma alteração na citocromo oxidase e no modelo utilizado ratos que consumiram alumínio houve alteração nas taxas de respiração em relação ao ascorbato/TMPD, além da razão ADP/O estar comprometida nas mitocôndrias do fígado e do cérebro. Esses dados podem fornecer informações importantes sobre os

mecanismos bioquímicos envolvidos com o processo de envelhecimento podendo existir a possibilidade do desenvolvimento da doença de Alzheimer com a ingestão prolongada do alumínio.

Em estudos envolvendo microscopia de fluorescência seletiva de alumínio utilizados no tecido cerebral de 12 doadores diagnosticados com doença de Alzheimer familiar foi possível visualizar o elemento nos lobos do cérebro como mostra a figura 4 (Mirza et. al., 2017).

Figura 4 - Córtex frontal. Imagens de microscopia de luz (A) e fluorescência (B).



Asteriscos indicam um possível depósito de alumínio intracelular e as setas mostram depósitos de alumínio difusos. (---) escala 100µM. Mirza et. al. (2017)

Em 5 dos 12 indivíduos, as concentrações do alumínio foram de 10 µg/g de peso seco do tecido, o que é considerado bastante elevado, reforçando a provável atuação desse elemento no desenvolvimento da doença (Mirza et. al., 2017).

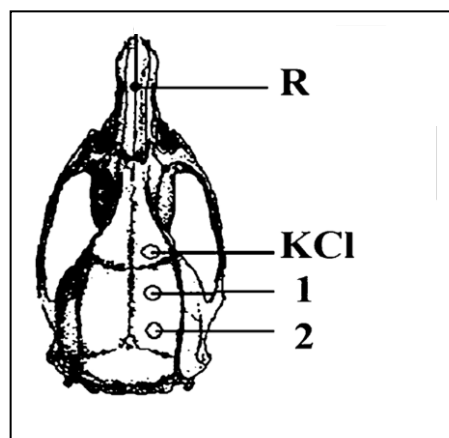
O alumínio mostrou ser um potencial causador de danos em diversos órgãos, entre ele o cérebro, fazendo necessária a avaliação de como é a interação desse composto com parâmetros neurofisiológicos.

2.3 MODELO NEUROFISIOLÓGICO - DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A depressão alastrante cortical (DAC), fenômeno neurofisiológico descoberto por Aristides Leão, é um fenômeno reversível no qual ocorre uma redução espontânea da atividade elétrica cerebral em resposta a estimulação de um ponto do tecido (LEÃO, 1944).

A diminuição da atividade elétrica cortical na DAC propaga-se concentricamente sendo recuperada 10 a 15 minutos após a estimulação que pode ser elétrica, mecânica ou química (BORBA et al., 2010; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Os registros eletrofisiológicos da DAC podem ser realizados no córtex cerebral onde através de dois orifícios trepanados na região parietal, ocorrendo a estimulação no orifício trepanado na região frontal, como mostra a figura 5.

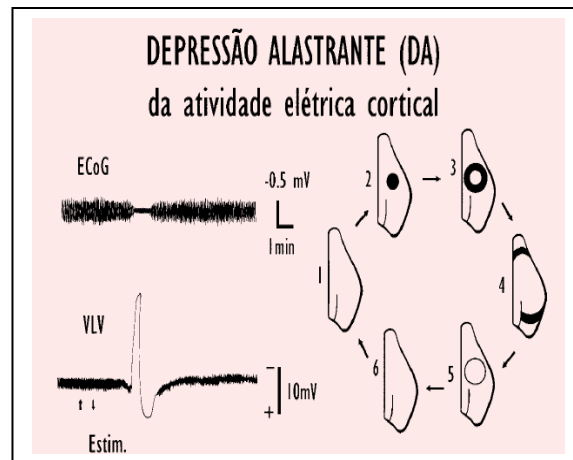
Figura 5 - Esquema para o registro da DAC no hemisfério direito.



O primeiro orifício trepanado na região frontal é o ponto para a estimulação e deflagração da DAC. Os números 1 e 2 representam os orifícios trepanados na região parietal onde serão posicionados os eletrodos para o registro da DAC. Estimulo realizado com KCl (Cloreto de potássio; 270 mM/L) no orifício localizado na região frontal. O ponto marcado com "R" representa o eletrodo de referência localizado no osso nasal. Guedes (2005).

Simultaneamente à propagação da onda ocorre a uma variação lenta de voltagem (VLV) que se alastra concentricamente a partir do ponto estimulado, atinge regiões corticais mais distantes, enquanto a área originalmente deprimida começa a se recuperar como mostra a figura 6. Através da VLV é possível calcular a velocidade, amplitude e duração com que o fenômeno se propaga pelo tecido nervoso (LEÃO, 1944; GUEDES, 2005).

Figura 6 - Esquema mostrando a sequência da depressão alastrante cortical (DAC), numerados de 1 a 6.



No momento 1, um ponto cortical foi estimulado, iniciando a DAC. A sua propagação, concêntrica, está ilustrada nas etapas de 2 a 4 (áreas escuras). Nas etapas 5 e 6 observa-se a recuperação do tecido, sendo o ponto onde a DAC se originou primeiro a se recuperar totalmente (áreas claras). Por fim, todo o tecido se recupera, retornando à condição inicial (etapa 1). Eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV). Quando a amplitude é reduzida no ECoG é o momento em que ocorre a VLV, característica da DA. Modificado Guedes (2004).

Esse fenômeno tem sido estudado, *in vivo*, em várias espécies de animais como peixes (YOUNG, 1980), reptéis (LAURITZEN et. al., 1988), anfíbios (TASAKI; BYRNE, 1991), mamíferos (YOKOTA et. al., 2002) e insetos (RODGERS et. al., 2007) mostrando não ser um evento restrito aos seres humanos.

Em estudos com metais foi observada alteração em parâmetros eletrofisiológicos do sistema nervoso, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, Aiba e colaboradores (2012) observaram que a acúmulo de Zn^{2+} no meio extracelular pode limitar a propagação da depressão alastrante e ter um efeito na redução de danos neurotóxicos causado pela acumulação intracelular de Zn^{2+} .

Foi observado, em suínos, que o sulfato de magnésio quando introduzido de forma intravenosa o fenômeno ocorreu normalmente, porém na aplicação tópica antes da estimulação, o sulfato de magnésio inibe a propagação depressão alastrante, fazendo do Mg^{2+} , através da aplicação tópica, uma opção terapêutica para inibir a depressão alastrante em pacientes com aneurisma e derrame; contudo, estudos

relacionados às concentrações adequadas necessitam ser confirmadas (SANTOS et. al., 2016).

Mesmo com a alta exposição do alumínio não foram encontrados estudos referentes ao seu efeito sobre a depressão alastrante. Considerando as evidências da possível relação com alterações neurológicas que também guardam relação com DAC sugeriu-se necessária a avaliação da interação deste metal com a dinâmica de propagação da depressão alastrante cortical.

O modelo eletrofisiológico nos permite acessar como está a propagação da DAC para os regimes de tratamento e, com o complemento dos testes de comportamento, temos a possibilidade de correlacionar as alterações de excitabilidade, com as alterações visíveis, para tentar entender melhor como o composto influencia na memória

2.4 MODELO COGNITIVO - COMPORTAMENTO

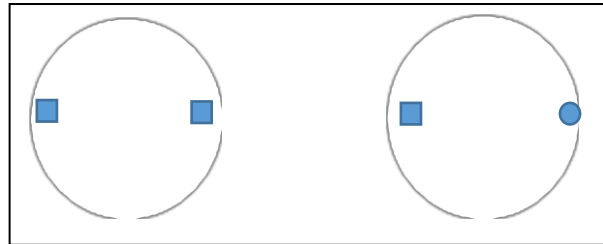
A necessidade de compreender as interações entre o homem e o meio onde está inserido fez surgir o estudo sobre o comportamento. O ato exploratório é fundamental para a sobrevivência da maior parte dos animais. Estas análises permitem, entre outros fatores, a resposta à novidade, os mecanismos neurais subjacentes a determinados comportamentos, as vias envolvidas, bem como o efeito sobre comportamento em diferentes tratamentos (ALVES, 2009; GUILHERMITTI, 2011).

Hall (1934) desenvolveu o teste do campo aberto com o a finalidade de avaliar aspectos emocionais e motores em roedores. Este teste consiste em uma arena circular fechada lateralmente. E o teste se baseia em inserir o animal com um ambiente diferente analisando algumas condições comportamentais, como: locomoção, ficar de pé sobre as patas traseiras, autolimpeza, tempo gasto na área central da arena, urinar e defecar.

Através da análise comportamental pode ser avaliada também a memória para reconhecimento de objetos (TRO), por meio da forma, (figura 7) ou por localização espacial do objeto (figura 8) (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; DERE et al., 2005; MELLO et al., 2008; AKKERMAN et al., 2012). O primeiro TRO consiste colocar dois objetos da mesma forma posicionados na arena para a primeira exploração do animal durante 5 minutos, após 50 minutos, um dos objetos é trocado por outro de forma

diferente; tendo a finalidade de avaliar o tempo gasto do animal nesse novo objeto. (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; DERE et al., 2005; MELLO et al., 2008; AKKERMAN et al., 2012).

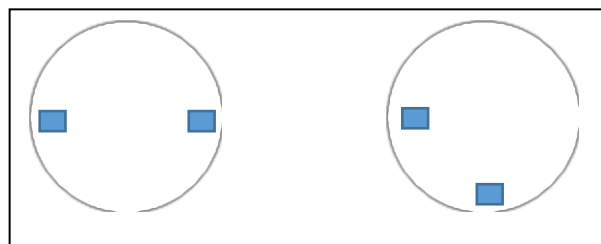
Figura 7 - Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – Forma.



Silva (2017).

Já o teste de reconhecimento do objeto em diferente localização espacial: dois objetos idênticos são colocados em determinadas posições no campo aberto, onde o rato explora por 5 minutos. Após 50 minutos, o animal é colocado novamente na arena com os mesmos objetos, no entanto um deles é trocado de lugar. Com o objetivo de analisar se o animal gastou mais tempo explorando o objeto na nova posição (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; DERE et al., 2005; MELLO et al., 2008; AKKERMAN et al., 2012).

Figura 8 - Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – Espacial.



Silva (2017).

Além da memória, pode também ser avaliada a ansiedade através de teste de comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE). O teste avalia o tempo de exploração do animal em um labirinto no formato de cruz, elevado ao solo, com dois braços abertos e dois braços fechados (figura 9). Outro modelo comportamental utilizado para avaliar a ansiedade do animal é o teste do campo aberto (TCA) onde é

avaliada a exploração do animal durante 5 min na arena semelhante à figura 7 e 8, porém sem os objetos (PIRES;TUFIK;ANDERSEN, 2012).

Figura 9 - Labirinto de cruz elevado. A- Braços abertos; B- Braços fechados.



Modificado: PIRES; TUFIK; ANDERSEN (2012).

Em estudo analisando ratos sedentários mantidos em grandes ninhadas (12 filhotes para amamentar) uma fêmea e pequenas ninhadas (6 filhotes para uma fêmea), todos os animais da ninhada maior mostraram desempenho reduzido no teste de reconhecimento espacial e formas (VIANA et. al., 2013). Alves; Carvalho; Benedito (2005), observaram que alterações na atividade da Na^+/K^+ -ATPase no hipocampo modifica o rearing (ficar de pé sobre as patas traseiras). Modelos de comportamento são utilizados a fim de complementar estudos de experimentação bioquímica e/ou eletrofisiológica, pelo fato dos animais exibirem um mesmo padrão de ocupação, modificações nesse modelo podem enriquecer dados.

Em estudos com trabalhadores que foram expostos ao alumínio submetidos a testes comportamentais foi observada uma diminuição na resposta cognitiva em relação a memória e com a análise do sangue foram encontradas elevadas concentrações de alumínio (Polizzi et. al., 2002; Giorgianni et. al., 2014). Com isso, alterações comportamentais podem representar mudanças relacionadas à fisiologia.

2.5 MODELOS ENZIMÁTICO, GENÉTICO E INFLAMATÓRIO

As enzimas são proteínas, com exceção das ribozimas, que tem a finalidade de acelerar as reações biológicas para a manutenção das atividades do organismo. Para executar sua função de modo eficaz necessitam de pH, temperatura, cofatores e substratos específicos. De acordo com a classificação internacional podem ser divididas em 6 classes, como mostra a tabela 1; a reação biológica ocorre dentro de uma região chamada sítio ativo, que fica localizado no interior da enzima onde o substrato liga-se a cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos acontecendo assim a transformação química (NELSON; COX, 2004).

Tabela 2 - Classificação internacional das enzimas.

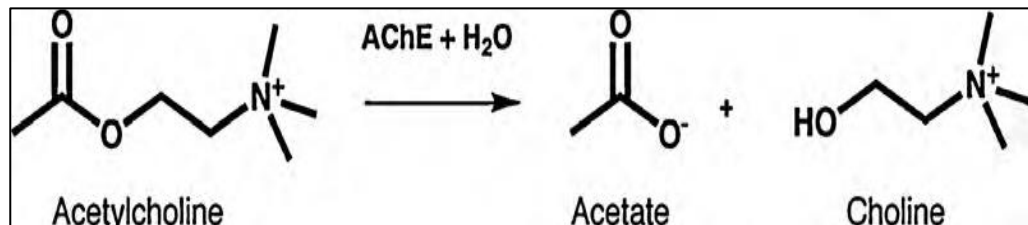
Classes	Reação	Exemplo
Oxidoredutases	Transferência de elétrons.	Lactato desidrogenase
Transferases	Transferem grupos entre moléculas.	Alanina Aminotransferase
Hidrolases	Reações de hidrólise.	Acetilcolinesterase
Liases	Catalisam a quebra ou a formação de ligações dupla.	Piruvato descarboxilase
Isomerases	Transferem grupos dentro de uma mesma molécula formando assim isômeros.	Alanina racemase
Ligases	Formação de ligações acoplados a quebra de ATP ou cofatores similares.	Glutamina sintetase

NELSON; COX (2004).

As colinesterases são hidrolases que podem ser classificadas em dois tipos: a colinesterase verdadeira ou acetilcolinesterase que atua na hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, como mostra a figura 10 e a pseudo-colinesterase ou butirilcolinesterase, pois não é específica atuando principalmente na hidrólise da bultirilcolina em menor frequência que a acetilcolina. Estas estão presentes em invertebrados e vertebrados, podemos encontrar a acetilcolinesterase no cérebro, sangue, músculo esquelético, já a butirilcolinesterase encontramos no fígado, plasma,

músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (SILMAN; SUSSMAN, 2005, SANTOS et.al., 2007, DVIR et. al., 2010; POHANKA, 2012).

Figura 10 - Reação de hidrólise da acetilcolina.



Modificado Dvir et. al. (2010).

A análise do metabolismo das enzimas presente nos tecidos pode servir de ferramenta de monitoramento a exposição de metais, estudos recentes com peixes tratados com diferentes concentrações de alumínio na água demonstrou, nas análises *in vivo* e *in vitro*, um aumento na atividade da acetilcolinesterase do cérebro em relação ao grupo controle e uma diminuição das enzimas digestivas como pepsina, tripsina e quimiotripsina alterando o metabolismo do peixe o que alerta sobre a concentração do alumínio na água doce (OLIVEIRA, et.al., 2017). Já em ratos, em estudo crônico, a administração do sulfato de alumínio diminuiu a atividade da acetilcolinesterase (MARTINEZ et. al., 2017).

García-Ayllón e colaboradores (2010), avaliaram a atividade da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase no plasma humano de portadores de doença de Alzheimer. Foi observado uma redução da atividade da acetilcolinesterase que foi muito maior em relação a butirilcolinesterase, na análise de Western blot do plasma foi exibida uma banda proteica imunorreativa aumentada de subunidades da acetilcolinesterase sugerindo uma possível semelhança as subunidades presentes no cérebro. Em pacientes que foram a óbito por causa da doença de Alzheimer comparados a pessoas saudáveis a análise da acetilcolinesterase também se apresentou diminuída como no estudo anterior (SCHEGG et.al., 2012), mostrando assim que alterações em enzimas presentes no cérebro pode fornecer dados relevantes para diagnósticos e prevenção de doenças neurodegenerativas. Além do

seu funcionamento a nível de atividade enzimática, os ensaios de expressão gênica, em específico das enzimas, podem revelar dados complementares ao estudo.

A expressão gênica vem sendo utilizada com o propósito de avaliar de forma primária como está o funcionamento do organismo, pois através dos estímulos o material genético por gerar uma inibição ou uma alta estimulação na produção de uma molécula para retornar a homeostase.

O alumínio tem sido demonstrado ser um agente que modifica a expressão gênica em condições experimentais em células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y que foram expostas a diferentes condições: células só com agregação β -amilóide, células com agregação β -amilóide mais alumínio ($A\beta$ -Al) e células unicamente expostas ao alumínio. Foi observado que as células tratadas com $A\beta$ -Al modificaram a expressão de genes que estão relacionados a danos neurológicos como inflamação, transmissão glutamatérgica, homeostasia do Ca^{2+} , estresse oxidativo e apoptose neural (GATTA et. al., 2011).

Foi observado que em ratos expostos por inalação ao alumínio aumentou a presença deste elemento no bulbo olfativo e no cérebro, além de elevar o nível de expressão da proteína quinases ativada por mitógenos (MAPK) que regula funções celulares como mitose, diferenciação e apoptose. Já foi relatado que a expressão da MAPK é ativada em doenças neurológicas por mecanismos que envolvem estresse oxidativo e apoptose (KWON et. al., 2013)

Quando comparados níveis de CRP (proteína C-reativa), envolvida no processo inflamatório, no soro humano de pacientes em estágios diferentes da doença de Alzheimer e pacientes sem a doença na mesma faixa etária foi verificado um aumento na sua expressão e quanto mais avançado o estágio da doença maior é sua expressão, após isso foi analisado o efeito do sulfato de alumínio em células endoteliais de microvasos do cérebro humano (hBMECs) que exibiu um aumento na expressão da CRP pode contribuir para a uma inflamação do sistema vascular humano (ALEXANDROV, KRUCK, LUKIW, 2015).

Em estudos com células do intestino HT-29 foi observada *up-regulations* em FOSB, HMOX1, ANKRD30BP2, GDF15 e IL8. Os genes que exibiram *down-regulations* foram RBM43, HDC, PLXND1 e DES; com esses resultados dos níveis de expressão fizeram associações com doenças humanas o que demonstrou alterar fatores que parecem favorecer a formação de tumor e o processo inflamatório. Este estudo também mostrou ao analisar o ciclo celular que o alumínio levou a acumulação

de células na fase G0/G1, associada com uma diminuição das células nas fases S e G2/M. O alumínio levou à apoptose, como também mudanças na morfologia nuclear e alterações na membrana mitocondrial, além da geração de espécies reativas de oxigênio induzidas (DJOUINA et. al., 2016).

Em estudos com a expressão da enzima acetilcolinesterase no tratamento com o alumínio em camundongos que apresentavam deficiência motora e comportamental apresentaram uma baixa na expressão da enzima, já existem relatos que a atividade da enzima no autismo é alterada e que esta alteração está relacionada com os déficits no funcionamento social e com a aplicação do alumínio esta expressão reduziu (LI et. al., 2017).

Quando estuda no cérebro a expressão do receptor da acetilcolina em camundongos tratados com alumínio a expressão do gene foi reduzida significativa quando comparado ao grupo controle, confirmando possíveis alterações comportamentais, pois foi observado uma diminuição da extinção do medo, como o sistema colinérgico é conhecido por desempenhar um papel muito importante na extinção do medo pelo seu déficit na expressão do gene do receptor da acetilcolina o grupo tratado com o alumínio passou mais tempo para perceber o congelamento quando comparado ao grupo controle (FARHAT, MAHBOOB, AHMED, 2017).

Para outro mental o cádmio foi observado que após a administração aguda por sete dias a atividade da acetilcolinesterase aumentou, assim como os níveis de expressão mRNA no córtex cerebral inteiro quando comparado ao grupo controle (AKINYEMI et. al., 2017) revelando a importância de estudar a exposição de metais aos seres vivos.

As alterações na expressão gênica estão relacionadas a exposição à agentes agressores que podem induzir ou inibir a produção de moléculas necessárias para a manutenção da homeostase do organismo, por isso a necessidade de estudar como o agente causador de danos atua no processo da inflamação, este, que é o processo inicial ao combate da agressão.

A inflamação é uma resposta do organismo na tentativa de eliminar o agente causador da lesão celular; quando o agente é reconhecido o sistema imunológico é acionando promovendo a liberação de diversos mediadores e ativação de células responsáveis pela resposta inflamatória (AKIYAMA, et. al., 2000, RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012). As características do processo inflamatório são calor, rubor, inchaço, dor e perda de função, como mostra a figura 11.

Figura 11. Cinco sinais do processo inflamatório.



Fonte: <http://www.biomaterial.com.br/inflama/sinais.html>. Acesso em 28/11/17 às 10:58.

Caso a saúde dos tecidos não seja restaurada, a inflamação eleva-se para uma condição crônica atingindo cada vez mais os tecidos no entorno da lesão inicial. No entanto, as características inflamatórias agudas não estão presentes no cérebro, o que leva a uma inflamação crônica. Uma característica da inflamação crônica nos tecidos são a presença de um número aumentado de monócitos e macrófagos (AKIYAMA, et. al., 2000, HENEKA; O'BANION, 2007, RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012).

Em estudos sobre o processo inflamatório utilizando modelos de camundongos 5xFAD (modelos transgênicos para doença de Alzheimer) tratados com o sulfato de alumínio foi mostrado, semelhante a outros modelos de para doença de Alzheimer, um aumento na formação da A β 42 (*peptídeo beta amiloide*) quando comparados aos grupos controle, além do aumento dos marcadores que indicam patologia inflamatória como a enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e proteína C-reativa (CRP), esses resultados apareceram tanto no cérebro como na retina (POGUE et. al., 2015).

Em camundongos tratados com AlCl₃ foram encontrados níveis elevados de nitrito no hipocampo e citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (interleucina 1 *beta*); TNF- α (fator de necrose tumoral *alfa*). Existem relatos na literatura que a liberação dessas citocinas pode ativar a óxido nítrico sintase levando à produção de grande quantidade de óxido nítrico, que por sua vez reage com espécies reativas de oxigênio formando

espécies de nitrogênio que são mais tóxicas ao organismo (KASBEA; JANGRA; LAHKAR, 2015).

Em análise pela técnica de Western blot foi observado um aumento de citocinas pró-inflamatórias iNOS (óxido nítrico sintase), NF- κ B (fator nuclear *kappa* B), TNF- α , IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e COX-2 em ratos tratados com AlCl₃ (PREMA et. al., 2017).

Vários relatos têm mostrado que o alumínio atua como um possível agente tóxico tanto em condições experimentais em laboratório como em seres humanos vivos ou *post-mortem*. Contudo, existe a necessidade de novas análises para compreender melhor a interação desse elemento com o nosso organismo a fim de mostrar a sua toxicidade e uma possível intervenção na diminuição da exposição a esse metal aos seres vivos.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DO SULFATO DE ALUMÍNIO NA ANSIEDADE, MEMÓRIA E DIVULGAÇÃO DE DEPRESSÃO EM RATOS WISTAR

Silva C. R.¹, Abadie-Guedes, R.², Guedes, R. C. A³, Bezerra, R. S.¹

1 Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

2 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

3 Departamento de Nutrição, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

* Autor Correspondente

Ricardo Abadie Guedes

Laboratório de Fisiologia Comparada, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: ricardo.guedes@ufpe.br

RESUMO

Vários estudos relatam que a toxicidade do alumínio, no entanto, a exposição a este elemento por seres humanos aumentou pode ser encontrada em alimentos, água e medicamentos outro fator que potencializa a exposição é a inalação. Grandes quantidades de alumínio foram encontradas nos cérebros de pacientes com Alzheimer, bem como relatos de danos neuropsicológicos, tornando este elemento um possível agente que acelera o desenvolvimento da doença. Apesar de agir sobre o comando central do corpo, pouco se sabe sobre como o alumínio interage com a eletrofisiologia, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do sulfato de alumínio na depressão alastrante cortical (DAC) e nos comportamentos. Diminuição do ganho de peso corporal, cérebro, fígado e seu índice somático foi observado mostrando o potencial tóxico deste elemento. Nos testes comportamentais, observou-se um aumento da ansiedade e uma perda de curiosidade sobre o novo objeto. Para os parâmetros de DAC foi observado um aumento na velocidade nos grupos tratados com alumínio onde fatores que facilitam a propagação são o aumento do estresse oxidativo e acúmulo de cálcio já relatado pelo tratamento com alumínio. Os resultados permitem concluir que o alumínio altera o peso corporal e os órgãos, a eletrofisiologia e o comportamento. Novos estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos nessas alterações, dados como aumento do estresse oxidativo e do cálcio, perda de memória e redução da curiosidade já são relatados em pacientes expostos ao alumínio com ou sem doenças neurológicas.

Palavras-chave: sulfato de alumínio, depressão alastrante cortical, comportamental.

1. Introdução

A população humana é constantemente submetida à exposição a substâncias nocivas, como compostos de alumínio. Várias evidências sugerem a neurotoxicidade induzida pelo alumínio (Bhattacharjee et al., 2013; Mirza et al., 2017), ações hepatotóxicas e embriotóxicas (Ibraheemamin et al., 2016; Stacchiotti et al., 2008; Hussein e Mahmoud, 2013; Walker et al., 2015), mudanças comportamentais (Polizzi et al., 2002; Kiesswetter et al., 2009; Giorgianni et al., 2014) e genotoxicidade (Lima et al., 2007; Masanori e Imazato, 2015; Paz et al., 2017).

A ingestão de alumínio é em média 10mg/dia; no entanto, pode, em alguns casos, atingir um valor tão alto quanto 5000mg/dia (Who, 1997). A exposição ao alumínio ocorre em geral, principalmente pela ingestão de alimentos e água, sendo aumentada por inalação e medicamentos (Cuciureanu et al., 2000; Wang et al., 2010; Rawi e Al Nassr, 2012; Bhattacharjee et al., 2013).

Dados do IPCS relatam que os sais de alumínio são artificialmente adicionados a produtos alimentícios que atuam como reguladores de acidez, agentes anti-aglomeração, bem como são usados no processamento, embalagem e armazenamento de alimentos, sendo um fator significativo no aumento dos níveis de alumínio nos alimentos. No tratamento da água, os sais de alumínio são amplamente utilizados como agentes floculantes, reduzindo os níveis de matéria orgânica, cor, turbidez e microrganismos (Matilainen et al., 2010; Donaldson, 2013).

Estudos envolvendo microscopia de fluorescência seletiva de alumínio no tecido cerebral de 12 doadores, diagnosticados com doença de Alzheimer familiar, mostraram o metal nas amostras do cérebro, e 5 das 12 pessoas tinham concentrações de alumínio de 10µg/g do tecido, o que é considerado bastante alto. Isso sugere o envolvimento desse elemento na patogênese da doença (Mirza et al., 2017). A alta exposição ao alumínio tem sido associada a anormalidades comportamentais em pacientes nos quais testes neuropsicológicos revelaram perda de controle muscular, tremor, déficit de memória e degeneração neuronal, bem como elevadas concentrações de alumínio plasmático quando comparados a grupos controle (Polizzi et al., 2002 Giorgianni et al., 2014).

A compreensão da ação do alumínio em um órgão como o cérebro pode ser analisada através da atividade elétrica cerebral e os fenômenos dependentes de atividade, como a depressão alastrante cortical (DAC). O estudo experimental da

função cerebral usando a abordagem baseada na DAC pode fornecer informações essenciais para um melhor entendimento de como este órgão funciona sob condições normais e experimentais (Guedes, 2011).

DAC, descrita pela primeira vez no córtex de coelhos por Aristides Leão (1944), é um fenômeno caracterizado por uma queda acentuada na amplitude da atividade elétrica espontânea observada no eletrocorticograma (ECoG) após estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto do tecido (Leão, 1944; Sawant-Pokam et al., 2017).

Embora os relatos na literatura sobre patologias neurológicas associadas ao alumínio sejam relativamente numerosos, pouco se sabe sobre como o sulfato de alumínio afeta os aspectos eletrofisiológicos da função cerebral. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do alumínio em parâmetros eletrofisiológicos, usando DAC, e comportamento de campo aberto e de reconhecimento de objetos como ferramentas investigativas.

4. Materiais e Método

4.1 Ensaio de citotoxicidade celular

Para a escolha das doses de sulfato de alumínio foi realizado o ensaio de citotoxicidade de acordo com o método de Mosmann (1983), onde as células mononucleares do sangue periférico foram obtidas usando o método de Ficoll-quantum.

As células foram semeadas a uma densidade de 5.10^6 células/poço em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura Dulbecco MEM (DMEM) suplementado com tampão fosfato a 10%. As culturas foram estimuladas com sulfato de alumínio em 6 diferentes concentrações: 1, 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas durante 24 e 48 horas a 37 com CO_2 a 5%.

Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de DMEM fresco, juntamente com 10 μL de solução de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg.mL^{-1} em fosfato tampão) por poço, procedendo a incubação no escuro por 4 horas.

Como controle negativo foi utilizado: células não tratadas, MTT e fosfato-tampão. Para o controle positivo foi utilizado o meio sem células, MTT e fosfato-tampão. Para células brancas, mortas (0,1-1% Triton-X), foram utilizados MTT e

fosfato-tampão. Finalmente, a absorbância (a 570 nm) foi registrada através de um leitor de microplacas.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (n = 50) fornecidos pelo biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pesando cerca de 215g com 45 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas forradas com ar-condicionado em fotoperíodo (12h de luz / 12h de escuro) a uma temperatura controlada de 26 ± 2 ° C com exaustão de ar e livre acesso a alimentos e água. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo número 23076.050889/2014-00)

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos ingênuo (n = 10), veículo (n = 10) e tratado (n = 30). O grupo ingênuo não recebeu nenhum tipo de tratamento, o grupo controle recebeu água destilada e os grupos tratados receberam o sulfato de alumínio em doses, de acordo com o peso, Al-10 (10 mg/kg); Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg); As doses foram escolhidas após o ensaio de viabilidade celular (MTT), o sulfato de alumínio foi administrado por gavagem de acordo com o peso corporal durante 7 dias.

Para a análise do ganho de peso corporal os animais foram pesados no início e ao final do tratamento.

4.3 Análise Comportamental

Após o término do período de tratamento por gavagem, foi realizado o teste do campo aberto. O aparato consisti em uma arena circular onde cada animal foi colocado por 5 minutos para explorar o ambiente, permitindo a análise da ansiedade por tempo de mobilidade, tempo de imobilidade e rearing (quando o rato fica apoiado sobre as patas) (Pires; Tufik e Andersen, 2012).

Nos dias 9º e 10º os animais foram submetidos aos testes de memória espacial e reconhecimento de objetos. No teste de memória espacial, os animais exploraram durante 5 minutos o ambiente com dois béqueres opostos de 2 litros após 50 minutos, um desses objetos foi movido para uma posição diferente no campo (de lugar) e o rato

foi colocado na arena para novo período de exploração, também por 5 minutos (Platel, 1982; Rachetti, 2013; Viana et al., 2013).

Para o teste de reconhecimento de objeto, os animais foram colocados para explorar o ambiente por 5 minutos com dois béqueres opostos de 2 litros, após 50 minutos um desses objetos foi removido e substituído por um objeto em uma forma diferente, sem mudança de posição, então o rato foi colocado na arena para uma nova sessão de exploração por mais 5 minutos (Platel, 1982; Akkerman et al., 2012; Rachetti, 2013; Viana et al., 2013).

Entre cada sessão de exploração, a arena e os objetos foram limpos com álcool a 70% para eliminar quaisquer pistas olfativas que pudessem influenciar o teste subsequente. O critério para definir exploração baseia-se na "exploração ativa", isto é, quando o rato está em contato com objetos (O'Callaghan et al., 2007; Mello et al., 2008).

O teste consistiu em avaliar se após 50 minutos frente a dois objetos, um conhecido (objeto "familiar") e outro "novo" (objeto de forma ou localização diferente), o animal reconheceria o novo objeto passando mais tempo explorando o objeto novo.

4.4 Registro da Depressão Alastrante Cortical

Após o teste de reconhecimento de objeto, foi registrada a depressão alastrante cortical (DAC). Os animais foram anestesiados com 1g/kg de uretana mais 40 mg/kg de cloralose injetados por via intraperitoneal. (Maia et al., 2017).

A temperatura retal foi mantida a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, em seguida, a cabeça do animal foi fixada em um estereotáxico, de modo que três orifícios foram feitos no hemisfério direito por meio de trepano. Foram feitos dois orifícios na região parietal onde foi realizado o registro do DAC, posicionando dois eletrodos Ag-AgCl no córtex e um orifício na região frontal para estimulação química com 2% de KCl. Um terceiro eletrodo foi posicionado na região do osso nasal, servindo de referência para os dois eletrodos localizados na região parietal. Ao final dos registros eletrofisiológicos, os animais, ainda anestesiados, foram submetidos à eutanásia pela introdução de uma agulha fina na cisterna magna, com posterior parada cardiorrespiratória sendo coletada e ponderada após esse procedimento o cérebro e o fígado. (Medeiros et al., 2016; Lima et al., 2017). Para o cérebro e fígado foi calculado o índice somático que avalia a relação de órgão (peso/peso corporal)*100.

A velocidade de propagação do DAC foi calculada dividindo-se a distância entre os eletrodos, pelo tempo gasto para o fenômeno se espalhar entre esses dois pontos de registro, a amplitude e a duração das ondas também foram calculadas (Accioly and Guedes, 2017).

4.5 Estatística

Os resultados em todos os grupos são expressos como média $\pm$ desvio padrão usando o software Sigmapstat (versão 3.5). Os dados foram analisados usando ANOVA. Consideramos valores p menores que 0,05 como significativos.

2. Resultados

Para determinação da dose, foi realizado o ensaio MTT e, de acordo com os resultados, foi escolhida a dose não tóxica de 10 $\mu\text{g/mL}$, pois apresentou viabilidade celular acima de 50% e duas doses tóxicas de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, em termos de viabilidade de 30,66% e 9,80%, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 1. Estes foram ajustados para administração para administração por gavagem em ratos Wistar.

Tabela 1. Efeito do sulfato de alumínio na viabilidade celular MTT.

Ensaio	Doses ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade ($10^4/\text{mL}^3$)	Viabilidade (%)
Controle Negativo	-	$10,5 \pm 1,36$	100
Sulfato de Alumínio	1	$9,38 \pm 0,60$	89,33
Sulfato de Alumínio	5	$8,02 \pm 0,34$	76,38
Sulfato de Alumínio	10	$5,96 \pm 0,82$	56,76
Sulfato de Alumínio	25	$3,54 \pm 0,86$	33,71*
Sulfato de Alumínio	50	$3,22 \pm 0,63$	30,66*
Sulfato de Alumínio	100	$1,03 \pm 0,72$	9,80*
Controle Positivo	-	-	-

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguido do teste de Holm - Sidak. $p < 0,001$ comparado ao grupo controle. O asterisco indica diferenças significativas quando comparado ao grupo controle.

No peso corporal, em gramas, durante o período de administração do sulfato de alumínio, os animais apresentaram redução significativa ao final do tratamento quando comparados aos grupos controle que apresentaram peso de $264 \pm 4,2$; $252,6 \pm 5,2$, respectivamente para veículo e ingênuo, enquanto os grupos tratados exibiram pesos de $235,1 \pm 5,3$; $218,9 \pm 3,0$; $216,1 \pm 4,6$; respectivamente para os grupos de 10 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg. Os tratamentos de 50 mg/kg e 100 mg/kg com sulfato de alumínio quando comparado ao grupo tratado com 10 mg/kg apresentaram diferença significativa, conforme demonstrado na figura 1.

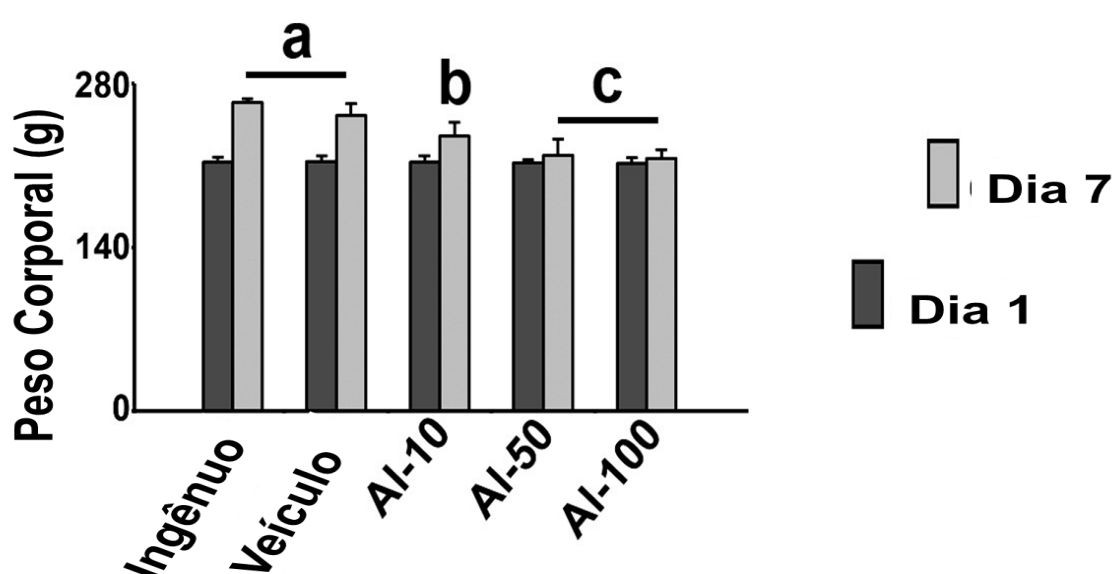


Figura 1. Peso corporal no primeiro (dia 1) e último (dia 7) dia de tratamento com alumínio nas doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). *a, b e c indicam diferenças significativas no último dia do tratamento. a (ingênuo e veículo) c (Al-50 e Al-100) não exibido diferença significativa. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste Holm-Sidak).

A Tabela 2 contém medidas do peso do encéfalo e do fígado e seus respectivos índices somáticos, os animais tratados com sulfato de alumínio não apresentaram redução significativa quando comparados aos grupos controle (ingênuos e veículo) no peso e índice cérebro-somático. Na análise do peso e índice somático do fígado, as

doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg de sulfato de alumínio foram significativamente diferentes quando comparadas aos grupos controle e 10 mg/kg.

Tabela 2. Análise do peso e do índice somático do cérebro e fígado nos diferentes tratamentos com sulfato de alumínio.

Grupos	Cérebro (g)	Índice Somático Cérebro (%)	Fígado (g)	Índice Somático Fígado (%)
Ingênuo	1,39 ± 0,03 ^a	0,55 ^a	11,23 ± 1,39 ^{ab}	4,31 ^{ab}
Veículo	1,35 ± 0,06 ^a	0,54 ^a	10,84 ± 0,27 ^{ab}	4,18 ^{ab}
Al-10	1,25 ± 0,06 ^a	0,54 ^a	9,76 ± 1,90 ^{ab}	4,03 ^{ab}
Al-50	1,23 ± 0,12 ^a	0,52 ^a	6,77 ± 1,02 ^c	3,09 ^c
Al-100	1,2 ± 0,19 ^a	0,52 ^a	6,33 ± 0,93 ^c	2,93 ^c

Dados expressos como média ± desvio padrão ($p < 0,05$; one-way ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa. Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg).

Todos os grupos foram estimulados com 2% de KCl no orifício localizado na região do córtex frontal direito por um minuto, a onda propagada sem interrupção foi registrada na região do córtex parietal, como mostra a figura 2.

Na análise do DAC (média ± desvio padrão, em mm/min), observou-se aumento significativo da velocidade nos grupos experimentais tratados em diferentes doses de sulfato de alumínio, como mostra a figura 3.

Para o grupo ingênuo, no qual não foi realizada a gavagem, a velocidade foi de $3,44 \pm 0,21$, dado semelhante ao grupo de veículos em que a água destilada foi administrada, a velocidade foi de $3,34 \pm 0,09$; para os grupos tratados, observou-se aumento na velocidade quando comparado aos grupos controle (ingênuo e veículo).

Na dose de 10 mg / kg foi mostrada uma velocidade de $4,25 \pm 0,32$, para a dose 50 mg / kg a velocidade foi de $4,47 \pm 0,31$ e na dose de 100mg a velocidade foi de $4,67 \pm 0,17$. A velocidade do DSC para o grupo de 100 mg/kg quando comparado com os grupos de controle (ingênuo e veículo) e para o grupo de 10 mg/kg mostrou uma diferença significativa.

As doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg foram significativamente maiores quando comparadas aos grupos controle, não mostrando significância quando comparadas entre si.

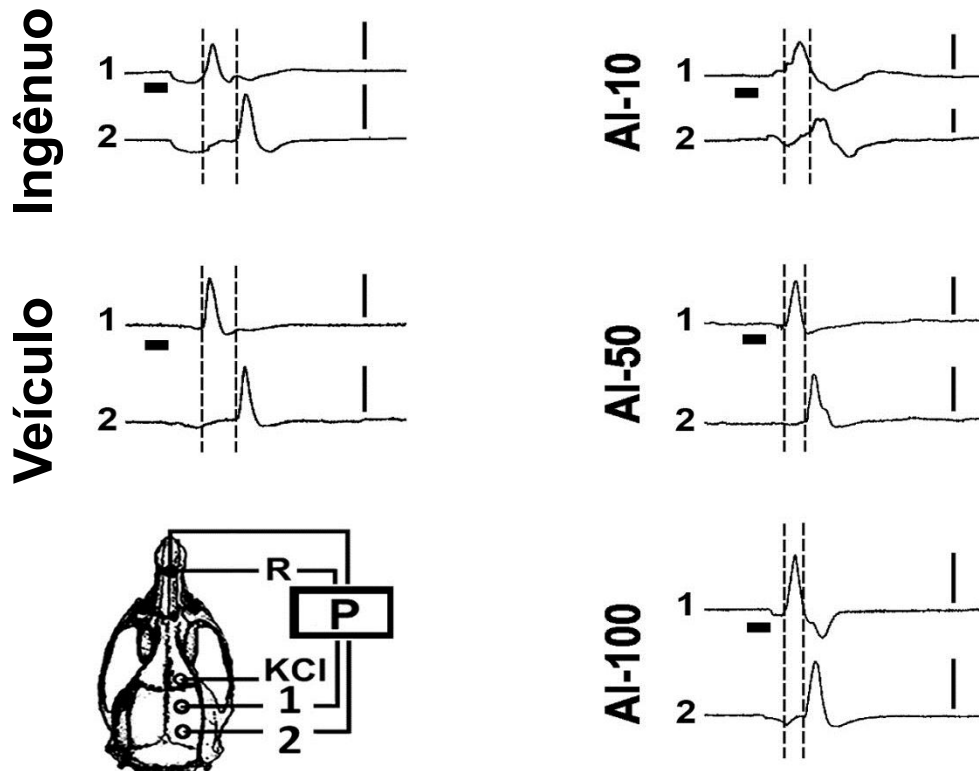


Figura 2. Registros das mudanças potenciais lento (P) através de dois elétrodos posicionados no córtex parietal (pontos 1 e 2) durante a depressão de alastrante cortical (DAC), nos grupos controle (ingênuo e veículo) e nos grupos tratados com alumínio, doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Elétrodo de referência (R) posicionado no osso nasal e o ponto de estimulação com KCL indicado pelas barras horizontais. As linhas das tracejadas verticais indicam a latência da onda passando pelos elétrodos (pontos 1 e 2) e as barras sólidas verticais indicam a amplitude 10 mv

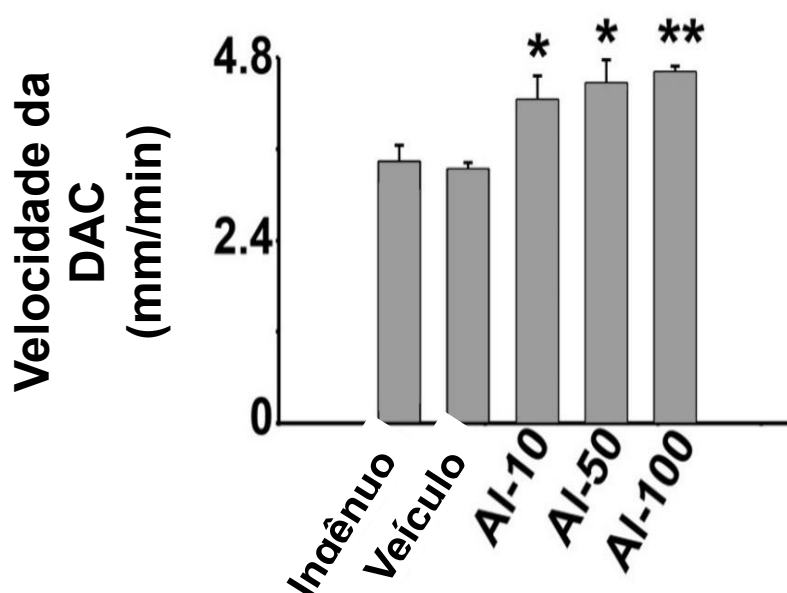


Figura 3. Velocidade da DAC dos ratos adultos nos grupos controle (ingênuo e veículo) e nos grupos tratados com alumínio, doses de Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). * diferença significativa quando comparado aos grupos controle e ** diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com 10 mg/kg. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$; ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak).

A amplitude apresentou diferença significativa para a dose de 100 mg/kg quando comparada aos grupos controle. Para a duração das ondas, os grupos tratados com 50 mg/kg e 100 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos grupos controle.

Tabela 3. Amplitude e duração dos potenciais lento da DAC em ratos adultos. Os grupos tratados com alumínio quando comparado aos grupos controle salina ou sem tratamento (ingênuo).

Grupos	Amplitude DAC (mV)	Duration DAC (s)
Ingênuo	8,04 $\pm$ 1,52 ^a	66,85 $\pm$ 6,85 ^a
Veículo	7,64 $\pm$ 1,83 ^a	68,87 $\pm$ 4,30 ^a
Al-10	9,46 $\pm$ 3,28 ^a	61,38 $\pm$ 7,11 ^{ab}
Al-50	11,14 $\pm$ 2,60 ^a	56,72 $\pm$ 5,92 ^b
Al-100	13,33 $\pm$ 3,80 ^b	54,72 $\pm$ 6,74 ^b

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$; ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa. Al-10 (sulfato de alumínio

10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg).

No campo aberto a análise foi observada que o tempo de mobilidade foi reduzido para os grupos tratados com 50 mg/kg e 100 mg/kg em relação aos grupos controle e tratados com 10 mg/kg, conseqüentemente os grupos controle e 10 mg/kg tiveram o tempo de imobilidade menor quando comparado os grupos tratados com sulfato de alumínio nas doses de 50 e 100 mg/kg. Não houve diferença significativa no tempo gasto na área periférica, porém o tempo na área central para os grupos tratados com 50 mg/kg e 100 mg/kg foi reduzido quando comparado aos grupos controle e 10 mg/kg.

Tabela 4. Análise do efeito do sulfato de alumínio no comportamento exploratório utilizando o teste de campo aberto

Grupos	Tempo Mobilidade (s)	Tempo imobilidade time (s)	Tempo Centro (s)	Tempo Periferia (s)
Ingênuo	262,5 ± 11,3 ^a	28,8 ± 3,3 ^a	37 ± 3,7 ^a	274,3 ± 14,6 ^a
Veículo	260,5 ± 13,3 ^a	30,3 ± 3,3 ^a	34,5 ± 2,6 ^a	267,6 ± 14 ^a
Al-10	257,2 ± 27,1 ^a	34,3 ± 6,3 ^a	20,3 ± 2,1 ^{ab}	280,7 ± 8,3 ^a
Al- 50	200,7 ± 17,2 ^b	106,2 ± 9,8 ^b	11,7 ± 2,5 ^b	288,6 ± 3,4 ^a
Al- 100	169,5 ± 20,8 ^b	130,5 ± 10,8 ^b	11,8 ± 2,6 ^b	288,2 ± 1,3 ^a

Dados expressos como média ± desvio padrão (p <0,05; one-way ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa. Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg).

No teste de reconhecimento do objeto em diferente localização espacial, em relação à exploração para o objeto novo ou familiar, os tratamentos com sulfato de alumínio não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos grupos controle, conforme apresentado na tabela 5.

No teste de reconhecimento de objetos, os animais tratados com sulfato de alumínio na dose de 100 mg/kg passaram menos tempo explorando o novo objeto quando comparados aos grupos controle, não apresentando diferenças significativas quando comparados entre os tratamentos, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Tempo gasto durante a exploração do objeto familiar e novo nos testes de reconhecimento por forma e posição.

Teste	Grupos				
	Ingênuo	Veículo	Al-10	Al- 50	Al-100
Espacial					
Familiar	28,4 ± 1,3 ^a	28,5 ± 1,7 ^a	30,7 ± 2,6 ^a	33,9 ± 2,9 ^a	38,9 ± 4,6 ^a
Novo	25,3 ± 1,2 ^a	23 ± 1,5 ^a	21,3 ± 1,3 ^a	19,8 ± 1,4 ^a	19,3 ± 2,6 ^a
Forma					
Familiar	24,7 ± 1,8 ^a	24,8 ± 1,9 ^a	22,5 ± 1,7 ^a	22,6 ± 2,7 ^a	23,8 ± 1,6 ^a
Novo	63,5 ± 1,6 ^a	59,8 ± 1,5 ^a	56,5 ± 1,9 ^{ab}	56,1 ± 1,7 ^{ab}	32,3 ± 1,3 ^b

Dados expressos como média ± desvio padrão (p <0,05; ANOVA seguido do teste de Holm-Sidak). Letras diferentes indicam diferença significativa. Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg / kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg / kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg / kg).

3. Discussão

Dados da literatura mostram que a exposição a metais aumenta o estresse oxidativo, essas substâncias essenciais ou não podem levar a uma instabilidade no processo de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Jomova et al., 2010; Jomova e Valko, 2011; Cobbina et al., 2015).

Em alguns estudos foram observados a capacidade que o alumínio apresenta em aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Yu et al., 2014; Yang et al., 2016). Para parâmetros eletrofisiológicos esse fator facilita a propagação da depressão alastrante cortical, aumentando a velocidade do fenômeno (Mendes-da-silva et al., 2014; Abadie-guedes et al., 2016), o que foi observado em nossos resultados para os grupos tratados com sulfato de alumínio nas diferentes doses quando comparados aos grupos controle (ingênuo e veículo).

Observou-se que o alumínio, quando administrado por via oral, modifica os

níveis de cálcio de forma semelhante à doença neurológica, como Alzheimer, aumentando sua concentração (Kaur e Gill, 2005; Kandimalla et al., 2015). Na propagação da DAC, os altos níveis de cálcio aceleram a velocidade, sugerindo que o alumínio possivelmente altera os níveis de cálcio, facilitando a propagação da DAC, bem como o estresse oxidativo (Torrente et al., 2014).

Para a dose de 100 mg / kg, a velocidade de propagação foi maior quando comparada ao grupo de 10 mg / kg, mostrando um resultado semelhante a uma situação em que o estresse oxidativo e os níveis de cálcio foram aumentados, o que provavelmente é causado pelo alumínio em doses mais altas.

Ratos tratados com sulfato de alumínio seguido de lesão na medula espinal mostraram um aumento na latência e uma diminuição na amplitude, no entanto, nossos resultados mostraram uma diminuição na latência e um aumento na amplitude na propagação da CSD (Khalaf Al Moutaery et al., 2000). Essa diferença pode ser devida ao fato de que no trauma espinal pode ocorrer o aumento de componentes inibitórios ou a redução dos fatores tróficos Kopper e Gensel, (2017) nossos resultados mostram como o alumínio atua no córtex cerebral sob condições sem neurotoxicidade associada ao trauma e elementos neuroimunes. A escassa literatura sobre as consequências do alumínio na eletrofisiologia do cérebro aponta para a importância da atualização dos dados.

Em outros estudos neurais com magnésio intravenoso, nenhuma alteração na CSD foi mostrada, entretanto a aplicação tópica inibiu a depressão alastrante cortical, e o zinco limitou a propagação da CSD. O alumínio atuou de forma antagônica a esses metais facilitando o DSC (Aiba et al., 2012, Santos et al., 2016).

Cadeia de transporte de elétrons de ruptura, complexo com A β 42, reduzida atividade da RNA polimerase, proteína Tau entre outros fatores em condições experimentais com mudança de alumínio, sua função ainda não foi estudada para a depressão alastrante cortical, poderia fornecer informações valiosas para uma compreensão da CSD (Kandimalla et al., 2015).

Um estudo recente usando tratamento crônico com alumínio relatou redução no peso corporal (Al-amoudi, 2017). Nossos resultados com tratamento agudo observaram que os grupos tratados com alumínio reduziram o peso e essa redução foi proporcional à dose.

Relatos na literatura sobre desnutrição favorecem o aumento da velocidade (De Luca, Cioffi and Bureš, 1977; Guedes, 2011; Guedes et al., 2013; Lima et al., 2017).

Nossos resultados mostraram que ocorreu uma redução no peso corporal e no cérebro, porém, analisando-se o índice somático do cérebro não foram observadas alterações significativas sugerindo que o cérebro estivesse preservado em relação ao corpo. Para o índice de fígado somático, a diferença significativa foi mostrada e confirmou a hepatotoxicidade anteriormente demonstrada (Saleh et al., 2017, Cheng et al., 2017).

Quanto aos testes comportamentais, no campo aberto, o tempo de mobilidade foi reduzido para os grupos tratados com 50 mg/kg e 100 mg/kg e pode estar associado à ansiedade, os animais passaram mais tempo imóveis. Outro fator que indica ansiedade é o tempo que o animal passa na zona central, os grupos tratados com 50 mg/kg e 100 mg/kg passaram menos tempo na zona central, quando comparados aos grupos controle e 10 mg/kg como mostrado na tabela 5, quanto menor o tempo que o animal passa na área central, mais ele pode ser associado como uma característica de aumento da ansiedade (Prut e Belzung, 2003, Heredia et al., 2014, Lanza et al., 2014).

Indivíduos que manipularam o alumínio por mais de 20 anos apresentaram danos neuropsicológicos como perda de memória e curiosidade. Estes efeitos foram encontrados em nossos resultados mostrados pelo grupo tratado com a dose de 100 mg/kg, gastando menos tempo explorando o novo objeto no teste de memória de reconhecimento de objeto, como mostrado na tabela 5. Outros efeitos como tremor, movimentos bruscos, coordenação prejudicada, não foram observados em nossos experimentos comportamentais (Nayak, 2002, Polizzi et al., 2002, Giorgianni et al., 2014, Bondy, 2016).

Em conclusão, nossos achados evidenciaram alterações do peso corporal, comportamental (ansiedade e reconhecimento de formas) e eletrofisiológicas (DSC). A administração de sulfato de alumínio acelera a propagação da CSD, a velocidade aumenta com a dose de sulfato de alumínio. Esse aumento pode estar associado a alto estresse oxidativo e aumento de cálcio, fatores que facilitam a propagação da depressão alastrante cortical. Já foi demonstrado que o estresse oxidativo neuronal reduzido pela astaxantina, um potente antioxidante, melhora o comprometimento da memória espacial causada pelo alumínio (Al-amin et al., 2016). A astaxantina também foi evidenciada para atenuar as velocidades aumentadas da CSD em um modelo crônico de administração de etanol, um regime de tratamento que está altamente relacionado com a produção de espécies reativas (Abadie-Guedes et al., 2008; Yang

et al., 2018). O tratamento com alumínio causou perda de memória e curiosidade, como evidenciado pelo baixo tempo de exploração do novo objeto, bem como pelo aumento do estado semelhante à ansiedade, sugerido pelo menor tempo na área central do campo aberto. Novos experimentos são necessários para entender melhor os mecanismos envolvidos na alteração do DSC e do comportamento.

Referências

Abadie-Guedes, R., Santos, S.D., Cahú, T.B., Guedes, R.C., Bezerra R.S. Dose-Dependent Effects of Astaxanthin on Cortical Spreading Depression in Chronically Ethanol-Treated Adult Rats. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 32, 1417-1421, 2008.

Abadie-Guedes, R., Bezerra, R.S., Guedes, R.C.A. Alpha-Tocopherol Counteracts the Effect of Ethanol on Cortical Spreading Depression in Rats of Various Ages, With and Without Ethanol Abstinence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 40, 728–733, 2016.

Accioly N.E., Guedes, R.C.A. Neonatal treatment with ovarian hormones and suckling among distinct litter sizes: Differential effects on recognition memory and spreading depression at adulthood. *Nutritional Neuroscience*. 20, 1-11, 2017.

Aiba, I., Carlson A.P., Sheline, C.T., Shuttleworth, C.W. Synaptic release and extracellular actions of Zn^{+2} limit propagation of spreading depression and related events in vitro and in vivo. *Journal Neurophysiology*. 107, 1032–1041, 2012.

Al-Amin, M.M., Reza, H.M., Saadi, H.M., Mahmud, W., Ibrahim, A.A., Alam M. M., Kabir N., Saifullah, A.R.M., Tropa S.T., Quddus A.H.M.R. Astaxanthin ameliorates aluminum chloride-induced spatial memory impairment and neuronal oxidative stress in mice. *European Journal of Pharmacology*, 777, 60-69, 2016.

Al-Amoudi, W.M. Effect of Grapefruit Juice on Aluminum-Induced Hepatotoxicity in Albino Rats: Histological, Ultrastructural and Histochemical Assessment. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 8, 463-477, 2017.

Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Hill, J. M., Culicchia, F., Kruck, T.P.A., Percy, M.E., Pogue A.I. Walton, J.R., Lukiw, W.J. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 126, 35–37, 2013.

Bondy, S.C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration.

Neurotoxicology. 42, 1-20, 2016.

Cheng, D., Zhang, X., Xu, L., Li, X., Hou, L., Wang, C. Protective and prophylactic effects of chlorogenic acid on aluminum-induced acute hepatotoxicity and hematotoxicity in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 273, 125-132, 2017.

Cobbina, S.J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Zhao, T., Zhang, Z., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Wu, X., Yang, L. Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals. *J. Hazard Mater.* 294, 109–120, 2015.

Cuciureanu, R., Urzică, A., Voitcu, M., Antoniu, A. Assessment of daily aluminum intake by food consumption. *Revista Medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 104, 107-112, 2000.

De Luca, B., Cioffi, L.A., Bureš, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior*. 19, 130–131, 1977.

Donaldson, L. The manufacture of aluminium sulfate. New Zealand Institute of Chemistry Website. Available at: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/production/1F.pdf> [accessed 21.10.16], 2013.

Giorgianni C. M., D'arrigo, G., Brecciaroli, R., Abbate, A., Spatari, G., Tringali, M.A., Gangemi, S., Luca, A. Neurocognitive effects in welders exposed to aluminium *Toxicol. Industrial Health*. 30, 347-356, 2014.

Giorgianni, C. M., D'arrigo, G., Brecciaroli, R., Abbate, A., Spatari, G., Tringali, M.A., Gangemi, S., Luca, A. Neurocognitive effects in welders exposed to aluminium. *Toxicology and Industrial Health*. 30, 347–356, 2014.

Guedes, R., Rocha-de-melo, A.P., Lima, K.R., Albuquerque, J.M.S., Francisco, E.S. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. *Nutritional Neuroscience*. 16, 142-146, 2013.

Guedes, R.C.A. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. In: Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. 32, 2343-2355, 2011.

Hashimoto, M., Satoshi, I. Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages. *Dental Materials*. 31, 556-564, 2015.

Heredia, L., Torrente, M., Colomina, M.T., José, L. Domingo. Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 69, 108–114, 2014.

Hussein H.H., Mahmoud O.M. Effects of maternal administration of aluminum chloride on the development of the skeletal system of albino rat fetuses - protective role of saffron. *European Journal of Anatomy*. 17, 63-71, 2013.

Ibraheem, A.S., Seleem, A.A., El-sayed, M.F., Hamad B.H. Single or combined cadmium and aluminum intoxication of mice liver and kidney with possible effect of zinc. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 77, 91-101, 2016.

Jomova, K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283, 65–87, 2011.

Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., Valko, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 345, 91–104, 2010.

Kandimalla, R., Vallamkondu, J., Corgiat, E. B., Gill, K.D. Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development. *Brain Pathology*. 26, 139–154, 2015.

Kaur, A., Gill, K.D. Disruption of Neuronal Calcium Homeostasis after Chronic Aluminium Toxicity in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 96, 118–122, 2005.

Khalaf Al Moutaery, F.R.C.S., Saleh, Al Deeb, F.R.C.P., Nabil, M.D., Christudas, M.M., Haseeb, A. K., Mohammad, F.R.C.P. Effect of aluminum on neurological recovery in rats following spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*. 93, 276–282, 2000.

Kiesswetter, E., Schäper, M., Buchta, M., Schaller, K.H., Rossbach, B., Kraus, T., Letzel, S. Longitudinal study on potential neurotoxic effects of aluminium: II, Assessment of exposure and neurobehavioral performance of Al welders in the automobile industry over 4 years. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 82, 1191-1210, 2009.

Kopper, T. J., Gensel, J. C., Myelin as an inflammatory mediator: Myelin interactions with complement, macrophages, and microglia in spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 17, 1-9, 2017.

Lalanza, J. F., Caimari, A., Del Bas, J. M., Torregrosa, D., Cigarroa, I., Pallàs, M., Capdevila, L., Arola, L., Escorihuela, R. M. Effects of a Post-Weaning Cafeteria Diet in Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity and Low Anxiety-Like Behaviour. *Plos one*. 9, 1-9, 2014.

Leão, A.A.P., Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *Journal Neurophysiology*. 1, 359-390, 1944.

Lima, D.S.C., Francisco, E.S., Lima, C.B., Guedes, R.C.A. Neonatal l-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters. *Amino Acids*. 49, 337–346, 2017.

Lima, P.D.L., Leite, D.S., Vasconcellos, M.C., Cavalcanti, B.C., Santos, R.A., Costa-Lotufo L.V., Pessoa C., Moraes M.O., Burbano R.R. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1154–1159, 2007.

Lima, S.M.V., Medeiros, L.B., Benevides, R.D.L., Santos, C.N., Lima-da-Silva, N.O., Guedes, R.C.A. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. *Nutritional Neuroscience*, 21, 1-9, 2017.

Maia, L.M.S.S., Amancio-dos-Santos, A., Germano, P.C.P.S., Falcão, A.C.S.M., Duda-de-Oliveira, D., Guedes, R.C.A. Do the accelerating actions of tianeptine and L-arginine on cortical spreading depression interact? An electrophysiological analysis in young and adult rats. *Neuroscience Letters*. 650, 134-138, 2017.

Matilainen, A., Vepsäläinen, M., Sillanpää, M. Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 159, 189–197, 2010.

Medeiros, L. B., Vitor-de-Lima, S. M., Benevides, R.D L., Queiroga, R.C.R.E., Guedes, R.C.A. Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid. *Nutritional Neuroscience*. 19, 1-8, 2016.

Mello, P.B. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais Academia Brasileira de Ciências*. 80, 301-309, 2008.

Mendes-da-Silva, R.F., Lopes, A.A.C., Bandim-da-Silva, M.E., Cavalcanti, G. A., Rodrigues, A.R.O., Andrade-da-Costa, B.L.S., Guedes, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. *Neuropharmacology*, 86, 155-160, 2014.

Mirza, A., King, A., Troakes, C., Exley, C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 40, 30–36, 2017.

Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63,

1983.

Nayak, P., Aluminum: impacts and disease. *Environmental Research*. v. 89, p.101–115, 2002.

O'callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioral Brain Research*. 176, 362-366, 2007.

Paz, L.N.F., Moura, L.M., Feio, D.C.A., Cardoso, M.S.G, Ximenes, W.L.O., Montenegro, R.C., Alves, A. P. N., Burbano, R. R., Lima, P. D. L. Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride. *Chemosphere*. 175, 130-137, 2017.

Pires, G.N., Tufik, S., Andersen M.L. Relationship between sleep deprivation and anxiety – experimental research perspective. *Einstein*. 10, 519-523, 2012.

Platel, A.P., Porsolt R.D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology*. 78, 346–352, 1982.

Polizzi, S., Pira, E., Ferrara, M., Bugiani, M., Papaleo, A., Albera, R., Palmi, S. Neurotoxic Effects of Aluminium Among Foundry Workers and Alzheimer's Disease. *NeuroToxicology*. 23, 761–774, 2002.

Prut, L., Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 463, 3-33, 2003.

RACHetti, A.L., Arida R.M, Patti C.L., Zanin K. A., Fernades-Santos L., Frussa-Filho R., Silva S.G, Scorza F.A., CYSNEIROS R.M. Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behavioural Brain Research*. 237, 283-289, 2013.

Rawi, S.M., Al Nassr, F.M.S. Zinc sulfate and vitamin E alleviate reproductive toxicity caused by aluminium sulfate in male albino rats. *Toxicology and Industrial Health*. 31, 221–234, 2012.

Saleh, S.I., Youssef, A.R., Saad, S.A., Mohamed, M.N. Influence of Age on Aluminum-Induced Hepatotoxicity in the Male Albino Rat. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 69, 2754-2770, 2017.

Santos, E., Leon, F., Silos, H., Sanchez-Porras, R., Shuttleworth, C.W., Unterberg A., Sakowitz O.W. Incidence, hemodynamic, and electrical characteristics of spreading depolarization in a swine model are affected by local but not by intravenous application of magnesium. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 36, 1–7, 2016.

Sawant-Pokam, P.M., Suryavanshi, P., Mendez, J. M., Dudek, F.E., BRENNAN K. C. Mechanisms of Neuronal Silencing After Cortical Spreading Depression. *Cerebral Cortex*, 27, 1311–1325, 2017.

Stacchiotti A., Lavazza A., Ferroni M., Sberveglieri G., Bianchi R., Rezzani R., Rodella L.F. Effects of aluminium sulfate in the mouse liver: Similarities to the aging process. *Experimental Gerontology*. 43, 330–338, 2008.

Torrente D., Mendes-da-Silva R.F., Lopes A.A.C., González J., Barreto G.E., GUEDES R.C.A. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. *Neuroscience Letters*. 58, 87– 90, 2014.

Viana, L.C., Lima, C.M., Oliveira, M.A., Borges, R.P. Cardoso, T.T., Almeida, I.N.F., Diniz, D.G., Bento-Torres, J., Pereira, A., Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A.C., Silva, R.F.M., Abadie-Guedes, R., Santos, A.A., Lima, D.S.C., Vasconcelos, P.F.C., Cunningham, C., Guedes, R.C.A., Picanço-Diniz, C.W. Litter Size, Age-Related Memory Impairments, and Microglial Changes in Rat Dentate Gyrus: Stereological Analysis and Three Dimensional Morphometry. *Neuroscience*. 238, 280–296, 2013.

Walker, L., Baumgartner, L., Keller, K.C., Ast, J., Trettner, S., Nieden, N.I.Z. Non-human primate and rodent embryonic stem cells are differentially sensitive to embryotoxic compounds. *Toxicology Reports*. 2, 165-174, 2015.

Wang, B., Xing, W., Zhao, Y., Deng, X. Effect of chronic aluminium exposure on memory through multiple signal transduction pathways. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 29, 308–313, 2010.

Who. Aluminium. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 194), 1997.

Yang, C.F., Zhong, YJ., Ma, Z., Li, L., Shi, L., Chen, L., Li, C., Wu, D., Chen, Q., Li, YW. NOX4/ROS mediate ethanol-induced apoptosis via MAPK signal pathway in L-02 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 68, 24-31, 2018.

Yang, Y., Wang, H., Guo, Y., Lei, W., Wang, J., Hu, X., Yang, J., He, Q. Metal Ion Imbalance-Related Oxidative Stress Is Involved in the Mechanisms of Liver Injury in a Rat Model of Chronic Aluminum Exposure. *Biological Trace Element Research*. 173, 126–131, 2016.

Yu, L., Jiang R., Su Q., Yu, H., Yang, J. Hippocampal neuronal metal ion imbalance related oxidative stress in a rat model of chronic aluminum exposure and neuroprotection of meloxicam. *Behavioral and Brain Functions*. 6, 1-10, 2014.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBROS DE RATOS TRATADOS COM SULFATO DE ALUMÍNIO

Silva C. R.¹, Abadie-Guedes, R.², de Souza Pereira J.J.^{4,5}, Guedes, R. C. A³, de
Azevêdo-Silva J.^{4,5}, Bezerra, R. S.¹

1. Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Departamento de Nutrição, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
4. Departamento de Genética, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil
5. Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente

Ricardo Abadie Guedes

Laboratório de Fisiologia Comparada, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-
Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: ricardo.guedes@ufpe.br

Resumo

A acetilcolinesterase (AChE) é responsável por hidrolisar a acetilcolina, neurotransmissor nas sinapses colinérgicas. Inibidores dessa enzima tem mostrado ser eficaz no tratamento de doenças neurológicas, como Alzheimer. Devido a exposição a agentes neurotóxicos entre eles, o alumínio, é observado aumento nos danos neurológicos, com isso o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade enzimática da acetilcolinesterase assim como sua expressão em ratos tratados com o sulfato de alumínio. Foram utilizados 40 animais distribuídos nos grupos controle e tratados com sulfato de alumínio nas doses de Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg) com n=10 animais em cada grupo, tratado por gavagem durante 7 dias ao término os animais eram sacrificados com dose extra de anestésico para coleta do cérebro. Em seguida foram realizados os ensaios enzimáticos e de expressão gênica da acetilcolinesterase. Nossos resultados exibiram um aumento na atividade e expressão gênica da acetilcolinesterase mostrando possível mecanismo de defesa a danos neurológicos como déficit cognitivo causados pelo alumínio e uma possível inibição da via anti-inflamatória por baixa concentrações de acetilcolina. Concluímos que o sulfato de alumínio possui um papel modulador na expressão da AChE, o que faz refletir sobre sua relação aos níveis de acetilcolina no cérebro de ratos atuando em possíveis vias anti-inflamatórias.

Palavras-Chaves: Acetilcolinesterase, Sulfato de alumínio, Atividade enzimática, Expressão gênica.

Introdução

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que atua catalisando a hidrólise da acetilcolina (ACh) do sistema colinérgico, na fenda sináptica, finalizando a transmissão do impulso nervoso (Sunita, Min e Hui, 2017).

Apesar da causa do desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) não está completamente esclarecido tem observado que a sua atividade potencializa os efeitos deletérios da DA e que a utilização de inibidores tem mostrado alternativas não só para o tratamento da DA como também para outros danos neurológicos causados pela ataxia, demência senil, miastenia grave, Parkinson e traumatismo craniano (Howes, Perry, Houghton 2003; Bengtsson e Godbolt, 2016; Han, Li e Hao, 2017; Ranjan e Kumari, 2017).

Entre os possíveis agentes neurotóxicos que tem um potencial em agir sobre o desenvolvimento de doenças neurológicas está o alumínio que é exposto aos seres vivos através de alimentos, água, medicamentos, itens de higiene pessoal e inalação (Bhattacharjee et. al., 2013; Klotz et. al., 2017).

Em estudos com camundongos tratados com o alumínio foi observado uma diminuição da expressão do gene receptor da acetilcolina (Farhat, Mahboob e Ahmed, 2017), já em outro relato analisando a expressão da enzima que catalisa a síntese da acetilcolina (colina acetiltransferase) no hipocampo em animais tratados com alumínio, foi observado uma diminuição na sua expressão, nesses estudos são relatados que houve um aumento na ansiedade e uma diminuição na memória e sociabilidade, possivelmente devido a disfunção colinérgica (Farhat et. al., 2016).

Nas análises da atividade enzimática da acetilcolinesterase em animais tratados com o alumínio foi observado uma diminuição na sua atividade (Prakash e Kumar, 2013; Lakshmi, Sudhakar, Prakash, 2015; Noremborg et.al., 2016; Akinyemi et. al., 2017). Sobre a análise da expressão da enzima em animais tratados com o metal cádmio aumentou os níveis de expressão mRNA no córtex cerebral (Akinyemi et. al., 2017) e em modelo de autismo apresentaram uma baixa na expressão da enzima (Li et. al., 2017).

São necessários novos estudos em relação a atuação do alumínio na expressão e atividade de enzimas envolvidas no desenvolvimento de doenças neurológicas, com isso o objetivo desse estudo é avaliar a atividade enzimática da

acetilcolinesterase assim como sua expressão em ratos tratados com o sulfato de alumínio em diferentes doses.

Metodologia

1. Tratamento

Foram utilizados 40 animais fornecidos pelo biotério do Departamento de Nutrição UFPE com idade de 45 dias, distribuídos nos grupos controle (n=10) e tratados com sulfato de alumínio nas doses de Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg) com n=10 animais em cada grupo, por gavagem durante 7 dias ao término os animais eram sacrificados com dose extra de anestésico para coleta do cérebro. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco com o processo nº 23076.050889/2014-00

2. Ensaio da Atividade Enzimática da Acetilcolinesterase (AChE)

Para a avaliação da atividade enzimática da acetilcolinesterase foram utilizados 20 µL do extrato bruto do cérebro, em seguida foram adicionados a 20µL de ácido 5,5'-ditio (2-nitrobenzóico) 0,25 mM (DTNB) a reação foi iniciada pela adição de 20 µL do substrato Iodeto de acetiltiocolina 62 mM, de acordo com Silva et al. (2013). Os ensaios foram realizados em quadruplicada e a atividade enzimática foi determinada após a absorção de aumento em 405 nm por 180 s usando um espectrofotômetro de microplacas (Bio-Rad xMark™, Hercules, CA, EUA). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 mmol de substrato por minuto. A concentração de proteína foi determinada de acordo com Sedmak e Grossberg, (1977) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A partir dos valores obtidos foi produzido um gráfico que foi normalizado para o controle, sendo o controle igual a 100%.

3. Expressão Gênica Acetilcolinesterase (*AChE*)

3.1 Isolamento de ácido ribonucleico (RNA)

Para o isolamento do RNA total foi utilizado o protocolo de extração de RNA pelo método do TRIzol® seguindo as instruções indicada pelo fabricante (Thermo Fisher, USA). Após o isolamento do RNA total, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro - NanoDrop® 2000 e seguiram para eletroforese em gel de agarose

para avaliação de integridade. Por fim, as amostras foram acondicionadas à temperatura de -80°C até o momento de uso.

3.2 Síntese de DNA Complementar (cDNA)

A concentração padrão de RNA total para síntese de DNA complementar (cDNA) considerada nestes ensaios foi de 500 ng. O cDNA foi sintetizado utilizando-se do kit comercial RT M-MLV, da Invitrogen (USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a síntese, às amostras foram adicionados 80 μL de água ultrapura e armazenadas em freezer a -20°C .

3.3 Ensaio de Expressão Gênica Relativa

Os ensaios de expressão gênica foram realizados usando o Master Mix[®], reagente que contém todos os reagentes necessários para a reação de PCR em tempo real, incluindo o controle de fluorescência interno da reação ROX. Nos ensaios foram usadas sondas fluorogênicas Taqman para os genes alvo deste trabalho. Para análise de expressão gênica relativa foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método relaciona a expressão dos genes-alvo (*AChE*) com a de um gene de referência (*GAPDH*), em diferentes condições.

4. Estatística

Os resultados em todos os grupos são expressos em médias $\pm$ desvios padrão utilizando software Prisma (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 5,01). Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA, seguido, pelo pós-teste de Tukey. Consideramos valores de p menores que 0,05 como significativos.

Resultados

Sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase os grupos tratados com alumínio nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg apresentaram um aumento significativo de 129,57% e 310,94% que corresponde em mU/mg de $59,97 \pm 5,52$ e $143,91 \pm 3,27$, respectivamente quando comparado ao grupo controle, já para o grupo tratado com o sulfato de alumino na dose de 10 mg/kg mostrou um aumento de 102,13% que

corresponde em mU/mg de $47,27 \pm 5,90$ não sendo significativo quando comparado ao grupo controle que exibiu a atividade em mU/mg no valor de $46,28 \pm 4,16$.

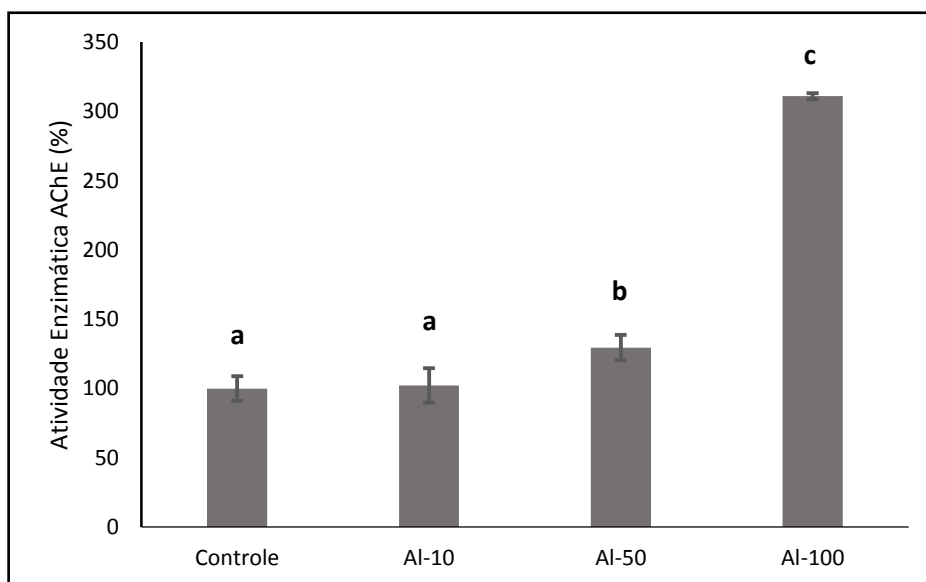


Figura 1. Análise da atividade enzimática da acetilcolinesterase sobre o a administração do sulfato de alumínio no cérebro de ratos. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0.05$ ANOVA seguido do pós-teste de Tukey). Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Ache – Acetilcolinesterase. Diferentes letras indicam diferença significativa.

A figura 2 revela o perfil de expressão gênica para o gene da acetilcolinesterase, *AChE*, no tecido cerebral dos ratos estimulados com sulfato de alumínio, revelando uma maior expressão desse gene no cérebro para os animais tratados com a dose de 100 mg/kg de sulfato de alumínio, sendo 3,73 vezes mais expresso quando comparado com o *GAPDH*, gene de referência. O perfil de aumento de expressão foi observado em todos os tratamentos, sendo de 1,198 e 1,3851 vezes mais expresso nos animais tratados com 10 e 50 mg/kg de sulfato de alumínio, p -valor = 0,014.

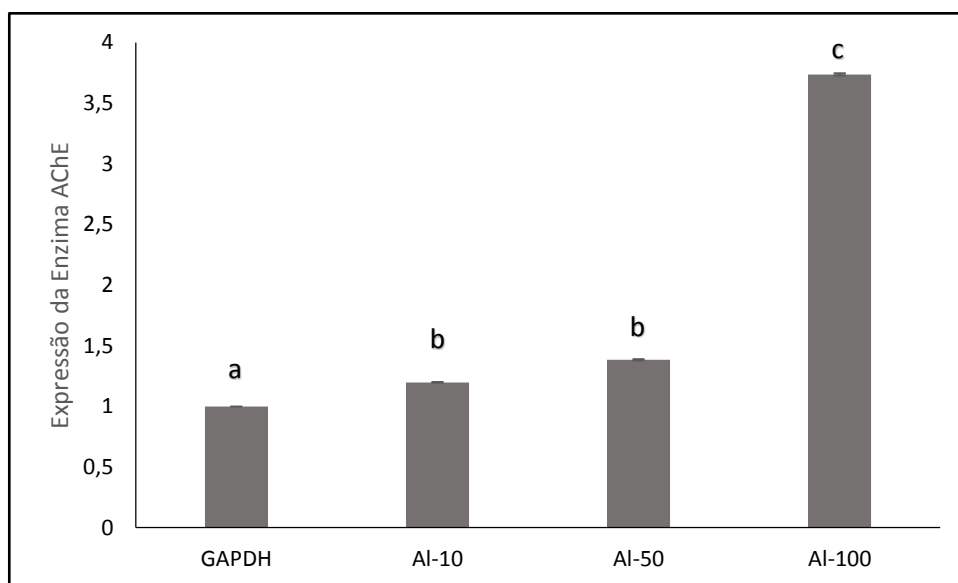


Figura 2. Níveis de mRNA do gene da acetilcolinesterase após tratamento com diferentes dosagens de sulfato de alumínio. Dados expressos média $\pm$ desvio padrão ($p < 0.05$ ANOVA seguido do pós-teste de TUKEY). Doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Ache – acetilcolinesterase. GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gene de referência). Diferentes letras indicam diferença significativa.

Discussão

Em nossos achados, a análise de expressão gênica realizada com as amostras do cérebro de ratos (*ex vivo*) pré-tratados com sulfato de alumínio, em comparação com o grupo controle, indicou maior expressão dos níveis de mRNA da *AChE*, como mostrado na figura 2. Na literatura não encontramos relatos sobre a expressão do gene da acetilcolinesterase em relação a atuação do sulfato de alumínio, o que demonstra a importância da atualização desses dados, visto que a utilização de inibidores para essa enzima tem sido uma alternativa de tratamento para danos neurológicos (Ranjan e Kumari, 2017).

Estudos anteriores com a ação de outro metal, o cádmio, evidenciou a ação desse agente no aumento da produção enzimática e do gene da *AChE* sugerindo que pode levar a uma redução da eficiência na neurotransmissão colinérgica devido a uma

diminuição nos níveis de acetilcolina na fenda sináptica, o que explica primariamente as disfunções neurológicas observadas em pacientes afetados pela exposição ao cádmio, esse potencial pode ser também sugerido para o alumínio por serem observadas alterações neurológicas devido a sua exposição (Giorgianni et. al., 2014; Akinyemi et. al., 2017). Contudo, novos estudos são necessários afim de esclarecer como é a expressão da *AChE* em tratamentos crônicos com o alumínio, pois é observado uma redução da atividade enzimática e aumento da concentração de acetilcolina (Khafaga, 2017).

Relatos na literatura revelam que a acetilcolina pode ativar vias anti-inflamatórias em células neuronais ou não, estimulando a liberação de fatores relacionados a defesa como interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Han, Li e Hao, 2017). A acetilcolina atua no $\alpha 7$ nAChR (receptores nicotínicos da acetilcolina) presentes na micróglia e astrócitos diminuindo a neuroinflamação (Revathikumar et. al., 2016).

A exposição aguda desse metal em nossos estudos levou a uma alta atividade da enzima juntamente com sua expressão, possivelmente diminuindo a disponibilidade de acetilcolina não ativando possíveis vias anti-inflamatórias que auxiliam no combate a danos neurodegenerativos causado pelo alumínio, como aumento da ansiedade e diminuição na exploração de objetos observados em testes comportamentais (dados não mostrados).

O que podemos sugerir além do que é relatado na literatura que a diminuição da atividade de *AChE* é devida alterações na estrutura Campanari, 2016 é que pode ser gerado um possível mecanismo de defesa do organismo a exposição crônica do alumínio levando a diminuição da atividade enzimática da acetilcolinesterase, aumentando os níveis de acetilcolina promovendo a ativação de vias anti-inflamatórias. Nos estudos de Pohanka (2011, 2012) mostra a ação de fármacos nas doenças neurológicas como Alzheimer, esses medicamentos têm impacto no sistema colinérgico onde a maioria de seus inibidores seletivos são para a *AChE*. Mostrando que o organismo pode em defesa diminuir sua atividade para evitar danos neurológicos mais extensos.

Foram analisados a expressão de variantes da enzima acetilcolinesterase em pacientes com Alzheimer, os resultados exibiram uma maior expressão desses variantes em pacientes portadores de Alzheimer quando comparados a pacientes saudáveis e uma diminuição da atividade enzimática, os autores sugeriram que a

expressão diferencial dos variantes de AChE nos portadores de Alzheimer pode refletir mudanças no papel fisiopatológico da doença induzindo seu avanço, pelo fato das variantes de ACh-T aumentarem a neurotoxicidade facilitando a formação de placas β -amiloides ou variantes N-AChE-T que está relacionado com a ativação de uma via apoptótica, mostrando uma possível reavaliação da utilização de inibidores de acetilcolinesterase no tratamento dessa doença (Campanari et. al., 2016). Contudo, nesse estudo não é mensurado o nível de acetilcolina que tem sido revelado em participar da ativação de vias anti-inflamatórias possivelmente melhorando os danos neurológicos e não faz associação com o alumínio que pode induzir alterações na expressão desses variantes, como altera a expressão de outros genes relacionados aos desenvolvimento de doenças neurológicas (Farhat et. al., 2016; Revathikumar et. al., 2016; Han, Li e Hao, 2017; Farhat, Mahboob e Ahmed, 2017).

Com isso a necessidade de novos experimentos sobre a expressão da acetilcolinesterase em tratamentos crônicos com o alumínio para avaliar sua modulação nessa enzima, assim como é necessário a mensuração dos níveis e expressão da acetilcolina nesse tratamento, pois a exposição prolongada do alumínio pode chegar ao ponto que interfere em outras vias que envolvem a acetilcolina, como em genes relacionados a sua captação (gene receptor de acetilcolina) ou na sua produção (colina acetiltransferase) reduzindo a ativação de vias anti-inflamatórias aumentando assim os danos neurológicos (Farhat et. al., 2016; Farhat, Mahboob e Ahmed, 2017).

Em conclusão no presente estudo foi observado que o sulfato de alumínio influencia no perfil de expressão gênica do *AChE* bem como da sua atividade enzimática. Através deste estudo relatou-se também pela primeira vez o papel modulador do sulfato de alumínio na expressão mRNA da *AChE*, o que faz refletir sobre sua relação aos níveis de acetilcolina no cérebro de ratos atuando em possíveis vias anti-inflamatórias. Novos ensaios sobre a expressão da acetilcolinesterase são necessários para melhor compreensão da atuação do alumínio na modulação da expressão dessa enzima.

Referências Bibliográficas

Akinyemi, A.J., Oboh, G., Fadaka, A. O., Olatunji, B. P., Akomolafe S., 2017. Curcumin administration suppress acetylcholinesterase gene expression in cadmium treated rats. *Neurotoxicology*. 30, 1-21.

- Bengtsson, M., Godbolt, A.K., 2016. Effects of acetylcholinesterase inhibitors on cognitive Function in patients with chronic traumatic brain injury: A systematic review. *Journal of Rehabilitation Medicine*. 48, 1–5.
- Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Hill, J. M., Culicchia, F., Kruck, T.P.A., Percy, M.E., Pogue, A.I. Walton, J.R., Lukiw, W.J. 2013. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 126, 35–37.
- Campanari, ML., Navarrete F., Ginsberg, S.D., Manzanares, J., Valero, J. S., García-Ayllón, MS. Increased expression of readthrough acetylcholinesterase variants in the brains of Alzheimer's disease patients *Journal of Alzheimer's Disease*. 53, 831–841, 2016.
- Farhat, S.M., Mahboob, A., Iqbal, G., Ahmed, T. 2016. Aluminum-Induced Cholinergic Deficits in Different Brain Parts and Its Implications on Sociability and Cognitive Functions in Mouse. *Biological Trace Element Research*. 177, 115–121.
- Farhat, S.M., Mahboob, A., Ahmed, T., 2017. Cortex- and Amygdala-Dependent Learning and Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Expression is Severely Impaired in Mice Orally Treated with AlCl₃. *Biological Trace Element Research*. 197, 91-101.
- Giorgianni, C. M., D'arrigo, G., Brecciaroli, R., Abbate, A., Spatari, G., Tringali, M. A., Gangemi, S., Luca, A., 2014. Neurocognitive effects in welders exposed to aluminium *Toxicol. Industrial Health*. 30, 347-356.
- Han, B., Li, X., Hao, J., 2017. The cholinergic anti-inflammatory pathway: an innovative treatment strategy for neurological diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 77, 358-368.
- Howes, MJ.R., Perry, N.S.L., Houghton, P. J., 2003. Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders. *Phytotherapy Research*. 17, 1–18.
- Khafaga, A.F., 2017. Exogenous phosphatidylcholine supplementation retrieve aluminum-induced toxicity in male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 15589–15598.
- Klotz, K., Weistenhöfer, W., Neff, F., Hartwig, A., Thiel, C. V., Drexler, H., 2017. The Health Effects of Aluminum Exposure. *Deutsches Ärzteblatt International*. 114: 653–9
- Lakshmi, B.S., Sudhakar, M., Prakash, K.S., 2015. Protective Effect of Selenium Against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Alterations in Rats. *Biological Trace Element Research*. 165, 67–74

Li, D., Tomljenovic, L., Li, Y., Shaw, C. A., 2017. Subcutaneous injections of aluminum at vaccine adjuvant levels activate innate immune genes in mouse brain that are homologous with biomarkers of autism. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 34, p. 1-46.

Noremborg, S., Bohrer, D., Schetinger, M.R.C., Bairros A.V., Gutierrez J., Gonçalves J.F., Veiga M., Santos F.W., 2016. Silicon Reverses Lipid Peroxidation but not Acetylcholinesterase Activity Induced by Long-Term Exposure to Low Aluminum Levels in Rat Brain Regions. *Biological Trace Element Research*. 169, 77–85.

Pohanka, M., 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*. 155, 219-223.

Pohanka, M., 2012. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 54, 1-16.

Prakash, A., Kumar, A., 2013. Mitoprotective effect of *Centella asiatica* against aluminum-induced neurotoxicity in rats: possible relevance to its anti-oxidant and anti-apoptosis mechanism. *Neurological Sciences*. 34, 1403–1409.

Ranjan, N., Kumari, M., 2017. Acetylcholinesterase inhibition by medicinal plants: A Review. *Annals of Plant Sciences*. 6, 1640-1644.

Revathikumar, P., Bergqvist, F., Gopalakrishnan, S., Korotkova, M., Jakobsson, P.J., Lampa, J., Le Maitre, E., 2016. Immunomodulatory effects of nicotine on interleukin 1beta activated human astrocytes and the role of cyclooxygenase 2 in the underlying mechanism. *Journal of neuroinflammation*. 13, 25-36.

Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem*. 79 (1–2), 544–552.

Silva, K.C.C., Assis, C.R.D., Oliveira, V.M., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2013. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquat. Toxicol*. 126, 191–197.

Sunita, T., Min Lv., Hui X., 2017. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. 17, 1665–1676.

3.3 ANÁLISE DO STRESS OXIDATIVO NOS CÉREBROS DE RATOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DO SULFATO DE ALUMÍNIO

Silva C. R.¹, Abadie-Guedes, R.², de Souza Pereira J.J.^{4,5}, Guedes, R. C. A³, de
Azevêdo-Silva J.^{4,5}, Bezerra, R. S.¹

1. Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Departamento de Nutrição, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
4. Departamento de Genética, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil
5. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente

Ricardo Abadie Guedes

Laboratório de Fisiologia Comparada, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-
Pernambuco, Brasil. Telefone: (55) 81 2126-8936, e-mail: ricardo.guedes@ufpe.br

Resumo

Danos ao sistema de proteção pode causar injúrias ao organismo, o alumínio elemento não essencial tem sido utilizado em larga escala pelas indústrias, contudo tem associado esse elemento com o desenvolvimento de doenças neurológicas, com isso o objetivo desse estudo é avaliar o stress oxidativo e produção de radicais livres em ratos tratados com o sulfato de alumínio. Foram utilizados 40 animais distribuídos nos grupos controle e tratados com sulfato de alumínio nas doses de Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg) com n=10 animais em cada grupo, o tratamento foi realizado por gavagem com duração de 7 dias, ao término os animais eram sacrificados com dose extra de anestésico para coleta do cérebro. Para análise do stress oxidativo foram realizados ensaios de inibição do radical superóxido, captura do radical de peróxido de hidrogênio, eliminação do radical de óxido nítrico, poder de redução do ferro, catalase e dosagem de citocinas das respostas Th1 e óxido nítrico. Nossos resultados mostram que o sulfato de alumínio causa estresse oxidativo no tecido cerebral, este revelado pelo aumento exponencial entre todas as enzimas e radicais avaliados além de ter caracterizado uma resposta celular pró-inflamatória pelo elevado nível de citocinas e óxido nítrico. Concluímos no presente estudo que o sulfato de alumínio atua na formação de radicais livres e na concomitante inibição de enzimas antioxidantes no tecido cerebral de ratos foi mostrado também o papel do sulfato de alumínio no aumento de citocinas da resposta celular Th1 nesses animais, caracterizando uma ação inflamatória e de manutenção do estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Alumínio, Estresse oxidativo, Radicais livres, Citocinas.

Introdução

O stress oxidativo é caracterizado pela geração de radicais livres e espécies reativas sejam elas de oxigênio ou nitrogênio (ROS/RNS), quando é ocasionado falha no sistema de proteção realizado por moléculas antioxidante leva ao desequilíbrio homeostático causando injúria ao organismo (Pisoschi e Pop, 2015). Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio possuem em sua constituição estrutural a característica de conter um ou mais elétrons desemparelhados (Pisoschi e Pop, 2015; Sies, 2015, 2018).

Doenças cardiovasculares, catarata, aterosclerose, diabetes, inflamação trato gastrointestinal, envelhecimento da pele, asma e doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica são encontrados um aumento na geração de radicais livres e ROS/RNS, que surgem durante stress oxidativo, potencializado o avanço dessas doenças (Abdollahi et. al., 2004; Feng et. al., 2015; Lei et. al., 2016).

Para combater esses danos o organismo possui mecanismos especializados em catalisar reações afim de neutralizar radicais livres e ROS/RNS para retornar a homeostase corporal são elas: vitamina C, vitamina E, catalase (CAT), glutational peroxidase (GSH-Px), peroxirredoxinas, superóxido dismutase (SOD) entre outras (Kohen e Nyska, 2002; Uttara et. al., 2009; Lei et. al., 2016). Outra forma que o organismo tem para combater injurias são as citocinas, grupo de baixo peso molecular envolvidas liberação de sinais entre as células durante a resposta imune (Rubio-Perez e Morillas-Ruiz, 2012; Stenken e Poschenrieder, 2015; Boshtam et. al., 2016).

Estudos têm relatado a interação de diferentes substâncias em condições experimentais na produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e citocinas afim de elucidar sua atuação no organismo e possíveis ações tóxicas (Zheltova et. al., 2016; Sies, 2015, Rosenkranz et. al., 2016; Sies, 2018). O alumínio metal não é essencial aos humanos e não participa de nenhuma via metabólica, sendo assim utilizado em larga escala por indústrias de tratamento de água, além de ser introduzido nos alimentos, utensílios de cozinha, medicamentos e cosméticos, contudo esse elemento tem mostrado relação no desenvolvimento de doenças neurológicas (Donaldson, 2013; Stahl, et. al., 2017; Linhart et. al., 2017; Bondy, Campbell, 2017)

Comparativo entre o óxido de cobalto, óxido de ferro, dióxido de silício e óxido de alumínio expostos durante 24 horas em cultura de células de linfócitos humanas

as substâncias estudadas exibiram aumento ROS e foi dose dependente, o alumínio quando comparado aos outros elementos mostrou uma menor produção de ROS e em relação a atividade da catalase e glutathione reduzida foram diminuídas quando comparados ao grupo controle (Rajiv et. al., 2015).

Na análise da superóxido dismutase (SOD) e GSH-Px no córtex cerebral foi observado uma diminuição das atividades em ratos tratados com o alumínio (Feng et. al., 2015). Em camundongos tratados com alumínio houve uma diminuição significativa nas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase não só no cérebro como fígado e rim (Mahitha et. al., 2015).

É necessário compreender como o alumínio interage com o sistema de defesa do organismo visto que estudos demonstram sua possível relação com doenças neurológicas (Cheng et. al., 2018) e esses radicais potencializam a evolução da doença (Lei et. al., 2016), com isso objetivo desse estudo é avaliar o stress oxidativo e produção de radicais livres em ratos tratados com o sulfato de alumínio.

Metodologia

1. Tratamento

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco com o processo nº 23076.050889/2014-00. Para os experimentos foram utilizados 40 animais com idade de 45 dias, distribuídos nos grupos controle (n=10) e tratados com alumínio nas doses de Al-10 (10 mg/kg), Al-50 (50 mg/kg) e Al-100 (100 mg/kg) essas doses calculadas de acordo com o peso corporal, onde o n de cada grupo foi composto por 10 animais, o tratamento foi realizado por gavagem com duração de 7 dias ao término os animais eram sacrificados com dose extra de anestésico para coleta do cérebro.

2. Ensaio de inibição do radical Superóxido (SOD)

A atividade das SOD foi mensurada com base na capacidade dessas enzimas em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido gerado a partir da auto-oxidação da hidroxilamina em pH alcalino (Crouch et al., 1981). Para os ensaios, 20 µl do sobrenadante das amostras e 35 µl de solução contendo cloreto de NBT a 572 µM e EDTA a 100 µM foram adicionados a uma microplaca. A reação foi iniciada através da adição rápida de 145 µl de solução de carbonato de sódio a 500

mM (pH 10,2) contendo 51 mM de cloreto de hidroxilamina. A redução do NBT pelo ânion superóxido a formazan azul foi medida espectrofotometricamente como um aumento constante de absorbância a 560 nm ($r^2 > 0,98$) durante 30 min em intervalos de 5 min. A taxa de redução do NBT na ausência de extrato foi utilizada como referência. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade enzimática capaz de inibir a redução do NBT em 50% do valor da referência.

3. Ensaio de captura do radical de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Diferentes concentrações do extrato foram dissolvidas em 3,4 ml de tampão fosfato (pH 7,4, a 0,1 M) e misturado com 600 µl do reagente de peróxido de hidrogênio (43 mM). O valor de absorbância (a 230 nm) da mistura de reação foi registrado depois de 10 minutos para cada concentração (Ruch *et al.*, 1989). O ácido gálico foi utilizado como componente de referência. A atividade de limpeza foi medida pela seguinte fórmula: % de Eliminação [H_2O_2] = $(Ac - As) / Ac \times 100$ onde: Ac = absorbância do controle de, As = absorbância da amostra.

4. Ensaio de eliminação do radical de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico foi gerado a partir de nitroprussiato de sódio e medido pela reação Greiss. O nitroprussiato de sódio em solução aquosa em um pH fisiológico gera espontaneamente óxido nítrico que interage com o oxigênio para produzir íons nítricos que podem ser estimados usando reagente Greiss. Os eliminadores de óxido nítrico competem com o oxigênio e conduzem a uma reação de redução na produção de óxido nítrico. Várias concentrações de extrato foram testadas em ensaios com nitroprussiato de sódio 10 mM em tampão fosfato (PBS) pH 7.4; onde um volume final de 200 µL da reação foi incubado a 25 °C por 150 min. Posteriormente, foram adicionadas às amostras o reagente de Greiss (1% sulfanilamida, 2% H_3PO_4 e 0.1% de n-(1-Naftil) Etilenodiamina Dicloridrato) e as absorbâncias foram mensuradas a 540 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo dos testes. A porcentagem de inibição foi determinada a partir da seguinte formula: % inibição = $(Ac - As) / Ac \times 100$, onde Ac = absorbância do controle, As = absorbância da amostra.

5. Avaliação da resposta imune celular por dosagem de citocinas das respostas Th1 e Óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) celular e a avaliação das citocinas relacionadas com a resposta imune e foram realizadas pela técnica do ensaio de imunoabsorção enzimática, o ELISA a partir do sobrenadante obtido dos homogenatos do cérebro pelo uso do Kit ELISA Kit (Sigma Aldrich, USA) e com kits comerciais BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences USA), respectivamente. A avaliação das citocinas do perfil Th1 e NO foi realizada a partir do lisado das células cerebrais.

6. Poder de Redução do Ferro (FRAP/TPTZ)

Pulido et al. (2000) descrevem o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos. Thaipong et al. (2006). A partir dos sobrenadantes obtidos do lisado cerebral, foi transferida para tubos de ensaio em um sistema de triplicatas uma alíquota de 90 µL de cada diluição do sobrenadante, acrescentado 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). O sistema foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 37°C. Após 30 min foi realizada a leitura das absorbâncias a 595 nm; o reagente FRAP foi utilizado como branco do experimento.

7. Catalase

A atividade da catalase foi medida a partir do método de Beers and Sizer (1952) que mede a atividade da enzima em um ensaio espectrofotométrico pela inibição da formação do peróxido de hidrogênio. Diferentes concentrações do sobrenadante foram dissolvidas em 3,4 ml de tampão fosfato (pH 7,4, a 0,1 M) e misturado com 600 ml do reagente de peróxido de hidrogênio (43 mM). A taxa de remoção de peróxido por catalases é mensurada adicionando-se a enzima em duas diferentes concentrações I e II ($1,7 \times 10^{-7}$ e $2,6 \times 10^{-7}$, respectivamente) para saturação do sistema. A catalase vai começar a ser inativada pela presença do H₂O₂ em níveis superiores a 0,1 M, quando composto I é convertido para composto II na presença do ferrocianeto de potássio que reage com cloreto férrico para formar um precipitado azul

que é dosado espectrofotometricamente. No final do ensaio, H_2O_2 é consumido e a catalase é inativada. O valor de absorbância (a 230 nm) da mistura de reação foi registrado depois de 10 minutos para cada concentração (Ruch et al., 1989). Como controle positivo do teste foi usado a quantidade de catalase necessária para decompor 1,0 μM de H_2O_2 por minuto a um pH 7,0 a 25 °C enquanto a concentração H_2O_2 caía de $\approx 10,3 \text{ mM}$ a 9,2 mM.

8. Estatística

Os dados são expressos em médias $\pm$ desvios padrão, para o processamento foi utilizando o software Prisma (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 5,01) onde foi utilizado o ANOVA, seguido, pelo pós-teste de Tukey. Consideramos valores de p menores que 0,05 como significativos.

Resultados

Para a determinação do estresse oxidativo no cérebro dos ratos tratados com sulfato de alumínio foi avaliado o perfil de enzimas e radicais livres. Observou-se um padrão de aumento exponencial entre todas as enzimas e radicais avaliados em relação ao aumento da dosagem. Destaque para os níveis desses radicais nos animais tratados com 100 mg/kg de sulfato de alumínio que variaram entre 32.417 e 36.445 ng/mL para catalase e NO, respectivamente. Para os animais tratados com 50 mg/kg de Sulfato de alumínio foram observados aumentos importantes de SOD e do radical TPTZ com 27.068 e 26.895 ng/mL, respectivamente. Já para os animais tratados com 10 mg/kg de Sulfato de alumínio observou-se níveis elevados de radical TPTZ e NO, com 18.069 e 16.057 ng/mL, respectivamente como mostrado na figura 2.

Para algumas dessas mesmas enzimas, avaliadas em relação a determinados padrões antioxidantes, como o Trolox, SOD e ácido ascórbico, verificou-se uma quantidade importante de radicais do estresse oxidativo por íons férricos (FRAP) com valor de $507.20 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ equivalentes de TEAC para os animais tratados com 100 mg/kg de Sulfato de alumínio. O mesmo foi observado para o SOD com 145.70 ± 1.95 e peróxido de hidrogênio, com $224.08 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$. Para todos os sistemas avaliados, os valores de atividade enzimática e oxidação foram altos quando

comparados aos padrões utilizados de Trolox, AA e SOD, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Inibição de enzimas antioxidantes no cérebro de ratos tratados com sulfato de alumínio nas doses Al-10 (sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 (sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 (sulfato de alumínio 100 mg/kg). Diferentes letras indicam diferença significativa.

Tratamentos	Ensaio FRAP (TEAC)	Ensaio da supeóxido dismutase	Radical Peróxido de Hidrogênio	Ensaio do óxido nítrico
Al-10 mg	56.32 ± 1.48 ^a	45.12 ± 1.04 ^a	77.02 ± 0.55 ^a	40.12 ± 0.02 ^a
Al-50 mg	224.36 ± 0.82 ^a	70.67 ± 0.92 ^a	145.03 ± 0.18 ^a	76.50 ± 1.50 ^a
Al-100 mg	507.20 ± 0.05 ^a	145.70 ± 1.95 ^a	224.08 ± 0.02 ^a	120.02 ± 0.06 ^a
TRO	1.80 ± 0.01 ^b	-	23.29 ± 1.22 ^b	-
AA	0.50 ± 0.04 ^b	-	-	6.40 ± 10.2 ^b
SOD	-	1.65 ± 0.05 ^b	-	-

Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata (n = 9) expressos com média ± desvio padrão com p-valor <0,05. TEAC expresso em µg/mL TRO. Ensaio da superoxide dismutase são expressos em µg/mL of SOD. Ensaio do radical de peróxido de hidrogênio são expressos in % H₂O₂. Ensaio do óxido nítrico são expressos em % AA. TRO (trolox). AA (ácido ascórbico), SOD (enzima superóxido dismutase). FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro). TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox). Diferentes letras indicam diferença significativa.

O perfil de citocinas da resposta imune celular do tipo Th1 para os animais tratados com 10 mg de Sulfato de alumínio mostrou cerca de 15.121 pg/mL de IL-2, 21.452 pg/mL de TNF-α, 24.780 de IFN-γ e produção de NO de 11.658 pg/mL, maiores do que o observado para o grupo não-tratado, que manteve os níveis basais de citocinas Th1. Caracterizando uma resposta celular predominantemente pró-inflamatória após estímulos com sulfato de alumínio, observou-se um aumento dos níveis de TNF-α e NO para os animais tratados com 100 mg/kg com valores que variam entre 39.911 e 35.482 pg/mL, respectivamente. Um perfil de aumento dos níveis de IFN-γ foi observado entre os animais tratados com 50 e 100 mg/kg de sulfato de alumínio, com 28.859 e 31.358 pg/mL, respectivamente (Figura 1).

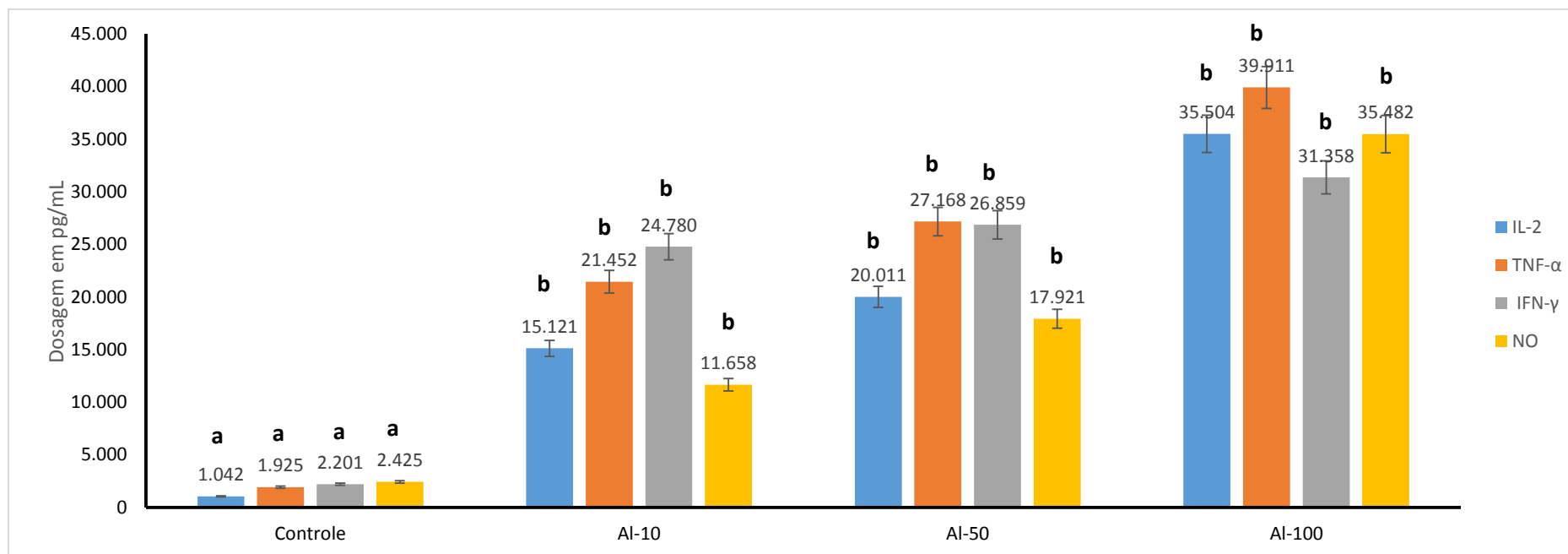


Figura 1. Dosagem dos níveis de citocinas da resposta imune celular pró-inflamatória (Th1) e Óxido Nítrico no cérebro de ratos tratados com Sulfato de Alumínio. Dados expressos em pg/mL, N = 10 (por grupo experimental), p-value = 0,028, t-value = 2.568. Controle (Animais não tratados), Al-10 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio 10 mg/kg), Al-50 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio 50 mg/kg) e Al-100 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio 100 mg). IL-2 (Interleucina 2), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IFN- γ (Interferon gama) e NO (Óxido Nítrico). b indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle a.

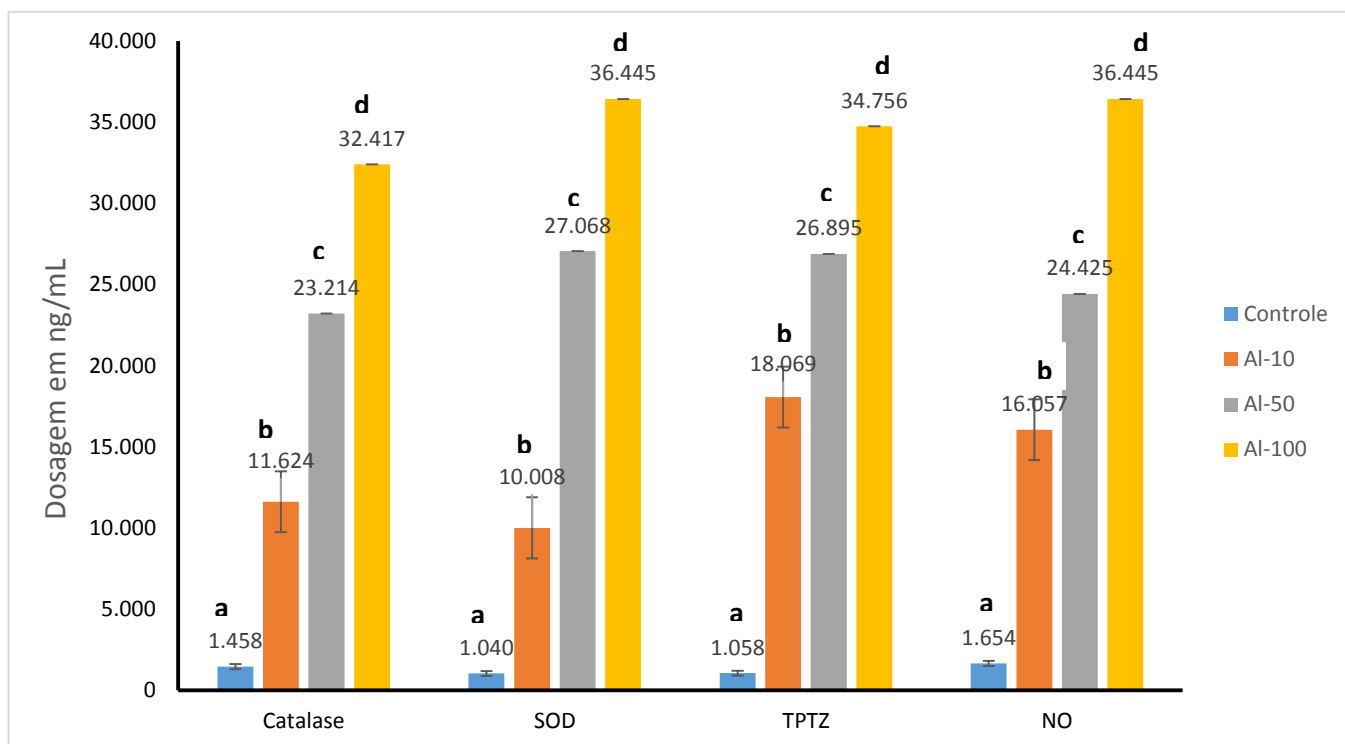


Figura 2. Dosagem de enzimas e radicais livres do estresse oxidativo no cérebro de ratos tratados com Sulfato de Alumínio. Dados expressos em ng/mL, N = 10 (por grupo experimental), p-value = 0,042, t-value = 2.331. Controle (Animais não tratados), Al-10 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio em 10 mg/kg), Al-50 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio em 50 mg/kg) e Al-100 mg (Animais tratados com sulfato de alumínio em 100 mg/kg). IL-2 (Interleucina 2), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IFN- γ (Interferon gama) e NO (Óxido Nítrico). SOD (Superóxido dismutase), TPTZ (Radical 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazina), NO (Óxido Nítrico). Diferentes letras indicam diferença significativa.

Discussão

No presente estudo avaliou-se o potencial oxidante do sulfato de alumínio em ratos, evidenciando o papel desse metal no aumento da produção, formação de radicais livres e a ação inflamatória no tecido cerebral desses animais.

O NO é um importante mediador químico, permeável a membranas e capaz de interagir rapidamente com vários compostos, principalmente espécies reativas contendo elétrons desemparelhados, como os metais e o oxigênio molecular (Mayer; Hemmens, 1997; Nussler; Billiar, 1993; Brucdorfer, 2015). Quando em excesso, os radicais formados pela reação do NO com o oxigênio podem causar danos oxidativos, sendo associado a várias doenças, incluindo desordens neurodegenerativas (Belkhelfa, 2014; Asimwe et. al., 2016). Em nossos ensaios, para os animais tratados com diferentes doses de sulfato de alumínio foi observado um aumento da produção de NO em todos os grupos avaliados,

evidenciando uma menor capacidade desses animais, na presença do sulfato de alumínio, em sequestrar esses radicais de óxido nítrico.

As atividades de estresse oxidativo, frente à formação de outros radicais como íons férricos e peróxido de hidrogênio também evidenciaram um maior potencial oxidativo e de formação de radicais livres no cérebro dos animais tratados com sulfato de alumínio, uma vez que esses compostos têm a sua síntese estimulada pela ação inflamatória do sulfato de alumínio, aumentando seus efeitos danosos ao organismo (Kanti Das, Wati, Fatima-Shad, 2015).

No presente estudo as atividades oxidantes do sulfato de alumínio também foram determinadas a partir da avaliação de inibição de enzimas como catalase e superóxido dismutase (SOD) – antioxidantes enzimáticos. Esses ensaios nos serviram para avaliar os sistemas eliminadores de radicais livres que degradam o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido, como a catalase dos peroxissomos que decompõem o H_2O_2 , as superóxidos dismutases mitocondriais, as dismutases cobre-zinco citosólicas, ou mesmo a glutatíon peroxidase, que refletem o estado de oxidação celular cerebral e são um aspecto importante da habilidade em detoxificar espécies reativas de oxigênio, nossos resultados exibiram um aumento na inibição dessas enzimas produzindo assim mais radicais livres (Sofic et. al., 2015).

Estudos evidenciam que a produção excessiva de radicais livres leva a produção de outros radicais reativos e que podem suprimir os sistemas antioxidantes levando ao estresse oxidativo celular, causando ou exacerbando doenças degenerativas e diversas patologias como Alzheimer e Parkinson (Wojtunik-Kulesza et. al., 2016, Poprac et al., 2017). O que corrobora os achados de nossa pesquisa que evidenciam um aumento concomitante desses radicais oxidativos e citocinas no tecido cerebral desses ratos tratados com sulfato de alumínio durante o período de 7 dias de tratamento fase aguda/inicial (Kasbea; Jangra e Lahkar, 2015; Prema et. al., 2017).

Para avaliar o papel do sulfato de alumínio na manutenção do estresse oxidativo celular no cérebro dos ratos, mensurou-se os níveis de citocinas da resposta imune celular para o perfil Th1 (inflamatório), onde foi observada uma dinâmica de aumento da produção de citocinas e fatores como $TNF\alpha$ e $INF\gamma$. Nos estudos de Kasbea; Jangra; Lahkar, (2015) e Prema et. al., (2017) exibem um aumento de citocinas que colaboraram para o desencadeamento da resposta inflamatória induzida pelo alumínio.

Observa-se uma dinâmica de modulação entre a porcentagem de inibição das enzimas antioxidantes como SOD e Catalase e um aumento dos radicais livres na presença

de doses aumentadas de sulfato de alumínio. A mesma inter-relação entre o padrão de citocinas Th1 e o tratamento com alumínio foi observada nos estudos de, onde é notável a diminuição dos níveis não apenas de enzimas antioxidantes, como o aumento do estresse oxidativo por produção exacerbada de IL-2 (35.504 pg/mL), TNF-alfa (39.911 pg/mL), IFN-gama (31.358 pg/mL) e NO (35.482 pg/mL) nos animais estimulados com 100 mg/kg de sulfato de alumínio, como mostrado na figura 2 o que é encontrado em portadores de doenças neurológicas (Tramutola et. al., 2017).

A partir desses achados, abrem-se diversas reflexões sobre os mecanismos efetores responsáveis pela neurodegeneração quando existe a exposição ao alumínio, evidenciando a ação desse metal no processo de dano cerebral por aumento da produção da enzima AChE inibindo uma possível rota anti-inflamatória pela redução de acetilcolina (dados não mostrados) e por estimular uma maior acidificação do meio celular.

Concluimos no presente estudo que o sulfato de alumínio atua na formação de radicais livres e na concomitante inibição de enzimas antioxidantes no tecido cerebral de ratos. Através deste estudo relatou-se também o papel do sulfato de alumínio no aumento de citocinas da resposta celular Th1 nesses animais, caracterizando uma ação inflamatória e de manutenção do estresse oxidativo.

Referências Bibliográficas

Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 10, 141-147, 2004.

Asiimwe N., Yeo S. G., Kim MS., Jung J., Jeong N. Y. Nitric Oxide: Exploring the Contextual Link with Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 1-10, 2016.

Belkhelfa M., Rafa H., Medjeber O., Arroul-Lammali A., Behairi N., Abada-Bendib M., Makrelouf M., Belarbi S., Masmoudi A. N., Tazir M., and Touil-Boukoffa C. IFN-g and TNF- α Are Involved During Alzheimer Disease Progression and Correlate with Nitric Oxide Production: A Study in Algerian Patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 34, 2014

Bondy S. C., Campbell A. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. *Advances in Neurotoxicology.* v. 1, p. 131-156, 2017.

Boshtam M., Asgary S., Kouhpayeh S., Shariat L., Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation,* 2016.

Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine*. 26, 3-31, 2015.

Cheng D., Wang X., Xi Y., Cao J., Jiang W. Identification of the Al-binding proteins that account for aluminum neurotoxicity and transport in vivo. *Toxicology Research*. 7, 127-135, 2018.

Crouch R.K., Gandy S.E., Kimsey G., Galbraith R.A., Galbraith G.M., Buse M.G., The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 30, 235-241, 1981.

Donaldson, L. The manufacture of aluminium sulfate. New Zealand Institute of Chemistry Website. Available at: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/production/1F.pdf> [accessed 21.10.16], 2013.

Feng T., Liu P., Zhang Z., Hu J., Kong Z. Combination of DFP and Taurine Counteracts the Aluminum-Induced Alterations in Oxidative Stress and ATPase in Cortex and Blood of Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2015.

Kanti Das T, Wati M R, Fatima-Shad K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease, *Arch Neurosci*. 2, 2015.

Kasbea P., Jangra A., Lahkar M. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 31, 107-112, 2015.

Kohen R., Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. 30, 620–650, 2002

Lei X. G., Zhu JH., Cheng WH., Bao Y., Ho YS., Reddi A. R., Holmgren A., Arnér E. S. J. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev* 96: 307–364, 2016.

Linhart C., Talasz H., Morandi E. M., Exley C., Lindner H. H., Taucher S., Egle D., Hubalek M., Concin N., Ulmer H. Use of Underarm Cosmetic Products in Relation to Risk of Breast Cancer: A Case-Control Study. *EBioMedicine*. 21, 79–85, 2017.

Mahitha B., B. Raju Deva Prasad, Mallikarjuna K. 3, Mahalakshmi Ch. N. Durga, Sushma N. John. *Bacopa monniera* Stabilized Silver Nanoparticles Attenuates Oxidative Stress Induced by Aluminum in Albino Mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14, 1–9, 2014

Mayer, Bernd; Hemmens, Benjamin. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*. 22, 477-481, 1997.

Nussler, Andreas K.; Billiar, Timothy R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*. 54, p. 171-178, 1993.

Pisoschi A. M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. 2015.

Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C. J., Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38, 592-607, 2017.

Prema A., Thenmozhi A. J., Manivasagam T., Essa M. M., Guillemin G. J. Fenugreek Seed Powder Attenuated Aluminum Chloride-Induced Tau Pathology, Oxidative Stress, and Inflammation in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 60, S209-S220, 2017.

Rajiv S, Jerobin J, Saranya V, Nainawat M, Sharma A, Makwana P, Gayathri C, Bharath L, Singh M, Kumar M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Human and Experimental Toxicology*. 1–14, 2015.

Rosenkranz E., Metz C. H. D., Maywald M., Hilgers RD., Weßels I., Senff T., Haase H., Jager M., Ott M., Aspinall R., Pluma B. K., Rink L. Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures. *Molecular Nutrition & Food Research*. 60, 661–671, 2016.

Rubio-Perez J. M., Morillas-Ruiz J. M. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The ScientificWorld Journal*. 1-15, 2012

Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10, 1003-1008, 1989.

Sies H. On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development. *Current Opinion in Toxicology*. 2018

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 4, 180–183, 2015

Sofic E., Salkovic-Petrisic M., Tahirovic I., Sapcanin A., Mandel S., Youdim M. , Riederer P. .Brain catalase in the streptozotocin-rat model of sporadic Alzheimer's disease treated with the iron chelator–monoamine oxidase inhibitor, M30. *Journal of Neural Transmission*. 122, 559–564, 2015.

Stahl T., Falk S., Rohrbeck A., Georgii S., Herzog C., Wiegand A., Hotz S., Boschek B., Zorn H., Brunn H. Migration of aluminum from food contact materials to food—a health risk for consumers? Part I of III: exposure to aluminum, release of aluminum, tolerable weekly intake (TWI), toxicological effects of aluminum, study design, and methods. *Environmental Sciences Europe*. 29, 1-8, 2017.

Stenken J. A., Poschenrieder A. J. Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Anal Chim Acta*. 853, 95–115, 2015.

Tramutola A. , Lanzillotta C., Perluigi M., Butterfield D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*. 133, 88-96, 2017.

Uttara B., Singh A. V., Zamboni P., Mahajan R.T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*. 7, 65-74, 2009

Wojtunik-Kulesza K. A., Oniszczyk A., Oniszczyk T., Waksmundzka-Hajnos M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 78, 39–49, 2016.

Zheltova A. A., Kharitonova M. V., Iezhitsa I. N., Spasov A. A.. Magnesium deficiency and oxidative stress: an update. *BioMedicine*. 6, 8-14, 2016.

4 CONCLUSÃO

A administração, por gavagem, do sulfato de alumínio promoveu alteração na DAC, aumentando a sua velocidade, amplitude e duração da onda sugerindo que o alumínio modificou os parâmetros relacionados à depressão alastrante cortical; esse aumento pode estar associado ao alto estresse oxidativo e de cálcio que são alterados na administração do alumínio. Acerca dos aspectos comportamentais foi observado um aumento em comportamento sugestivo de ansiedade e deficiência de memória para reconhecimento de objetos. Relatos semelhantes são observados em pacientes portadores de doenças neurológicas onde são encontradas altas concentrações de alumínio.

Através da análise feita pelo modelo de expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nas diferentes doses do sulfato de alumínio, a substância atuou como um agente modulador aumentando o nível de expressão da enzima acetilcolinesterase, assim como na atividade enzimática podendo de forma inicial o organismo aumentar sua expressão para suprir efeitos deletérios na cognição.

Foi observado em pacientes portadores de Alzheimer um aumento nessa expressão e uma diminuição da atividade enzimática. Sugerimos que esse aumento tenha relação com os danos neurológicos e essa diminuição de atividade pode estar relacionado ao aumento da acetilcolina que tem mostrado atuação em vias anti-inflamatórias, sendo necessários novos estudos da sua expressão em tratamentos crônicos com o alumínio para elucidar sua atuação na modulação da expressão da enzima tendo em vista que o alumínio é um potencial agente neurotóxico que pode modificar a expressão dessa enzima, como é relatado para os receptores de acetilcolina e para a enzima colina acetiltransferase.

Concluimos também que sulfato de alumínio induziu o stress oxidativo aumentando a formação de radicais livres e por inibir enzimas antioxidantes, os grupos tratados com alumínio mostraram uma alta resposta inflamatória com o aumento de citocinas da resposta celular Th1. Isso revela a importância da avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias que não são essenciais ao organismo por não participarem de vias metabólicas e que aparentemente não possuem efeitos deletérios afim de elucidar os cuidados na exposição para a população.

REFERÊNCIAS

- AKINYEMI, A. J.; OBOH, G.; FADAKA, A. O.; OLATUNJI, B. P.; AKOMOLAFE S. Curcumin administration suppress acetylcholinesterase gene expression in cadmium treated rats. **Neurotoxicology**. v.30, p. 1-21, 2017.
- AKIYAMA, H.; BARGER S.; BARNUM, S.; BONNIE, B.; BAUER J.; COLE, G. M.; COOPER, N. R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.L., et al., Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. v. 21, p. 383–421, 2000.
- ALEXANDROV, P. N.; KRUCK, T. P. A.; LUKIW, W. J. Nanomolar aluminum induces expression of the inflammatory systemic biomarker C-reactive protein (CRP) in human brain microvessel endothelial cells (hBMECs). **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 32, p. 1-4, 2015.
- ALVES, R. Estudo comportamental, farmacológico, bioquímico e hormonal em subgrupos de ratos selecionados pelo comportamento de empinar no teste do campo aberto. [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-graduação em Psicobiologia Universidade Federal de São Paulo, 2009
- ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. S.; GUEDES, R. C. A. Alpha-Tocopherol Counteracts the Effect of Ethanol on Cortical Spreading Depression in Rats of Various Ages, With and Without Ethanol Abstinence. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 40, p. 728–733, 2016.
- AIBA, I.; CARLSON, A. P.; SHELIN, C. T.; SHUTTLEWORTH, C. W. Synaptic release and extracellular actions of Zn^{+2} limit propagation of spreading depression and related events in vitro and in vivo. **Journal Neurophysiology**. v. 107, p. 1032–1041, 2012.
- AKKERMAN, S.; PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. M.; BLOKLAND, A. Object recognition testing: statistical considerations. **Behavioral Brain Research**, v. 232, p. 317-322, 2012.
- ALVES, R; CARVALHO, J. G. B.; BENEDITO, M. High and low rearing subgroups of rats selected in the open field differ in the activity of K^{+} -stimulated p-nitrophenylphosphatase in the hippocampus. **Brain Research**. v.1058, p. 178-182, 2005.
- ATWOOD, D. A., YEARWOOD C. The future of aluminum chemistry. **Carbohydrate Polymers**. v. 71, P. 135–139, 2008.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; GUEDES, R. C. G. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 452–457, 2012.
- BECARIA, A.; CAMPBELL, A.; BONDY SC Aluminum as a toxicant. **Toxicology and Industrial Health**. v. 18, p. 309-320, 2002.

BELL-AJY K.; ABBASZADEGAN M., IBRAHIM E., VERGES D., LECHEVALLIER M. Conventional and optimized coagulation for NOM removal. **American Water Works Association Journal**. v. 10, p. 44-58, 2000.

BHATTACHARJEE, S.; ZHAO Y.; HILL, J. M.; CULICCHIA, F.; KRUCK, T.P.A.; PERCY, M. E.; POGUE, A. I.; WALTON, J.R.; LUKIW, W. J. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 126, p. 35–37, 2013.

BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research** v. 41, p. 2301– 2324, 2007.

BONDY, S. C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. **NeuroToxicology**. v. 52, p. 222-229, 2016.

BONDY, S. C.; CAMPBELL A. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. **Advances in Neurotoxicology**. v. 1, p. 131-156, 2017.

BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; PEREIRA DA SILVA, R.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, p. 144 - 150, 2010.

DELONCLE, R.; HUGUET, F.; FERNANDEZ, B.; QUELLARD, N.; BABIN, PH.; GUILLARD, O. Ultrastructural study of rat hippocampus after chronic administration of aluminum l-glutamate: an acceleration of the aging process. **Experimental Gerontology**. v. 36, p. 231-244, 2001.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DA SILVA, M. A. S. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols**. v. 16, p. 10-19, 2005.

DJOUINA, M.; ESQUERRE, N.; DESREUMAUX, P.; VIGNAL, C.; BODY-MALAPE M. I Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 91, p. 108-116, 2016.

DONALDSON, L. The manufacture of aluminium sulfate. New Zealand Institute of Chemistry Website. Available at: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/production/1F.pdf> [accessed 21.10.16], 2013.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T.L.; SUSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interaction**. v. 187, p. 10–22, 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral Brain Research**. v. 31, p. 47-59, 1988.

FARHAT, S. M.; MAHBOOB, A.; AHMED, T. Cortex- and Amygdala-Dependent Learning and Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Expression is Severely Impaired in Mice Orally Treated with $AlCl_3$. **Biological Trace Element Research**. v. 197, p. 91-101, 2017.

FARINA, M.; ROTTA L.N.; SOARES, F.A.A.; JARDIM, F.; JACQUES R.; SOUZA D.O.; ROCHA, J.B.T. Hematological changes in rats chronically exposed to oral aluminum. **Toxicology**. v. 20, p. 29–37, 2005.

FREITAS, J. H. E. S.; SANTANA K. V., NASCIMENTO A. C. C., PAIVA S. C., MOURA M. C., COELHO L. C. B. B., OLIVEIRA M. B. M., PAIVA P. M. G., NASCIMENTO A. E., NAPOLEÃO T. H. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble Moringa oleifera seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**. v. 163, p. 133-141, 2016.

GARCÍA-AYLLÓN, M. S.; RIBA-LLENA, I.; SERRA-BASANTE, C.; ALOM, J.; BOOPATHY R.; VALERO J. S. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. **Plos one**. v. 5, p. 1-11, 2010.

GATTA, V.; DRAGO, D.,; FINCATI, K.; VALENTI, M. T.; CARBONARE, L. D.; SENSI, S. L.; ZATTA, P. Microarray Analysis on Human Neuroblastoma Cells Exposed to Aluminum, β_{1-42} -Amyloid or the β_{1-42} -Amyloid Aluminum Complex. **Plos one**. v. 6, p. 1-16, 2011.

GERMANO, P. C. P. S.; SILVA; D. L.; SOARES, G. S. F.; AMANCIO-DOS-SANTOS; A.; GUEDES, R.C.A. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, p. 275-281, 2013.

GIORGIANNI, C. M.; D'ARRIGO, G.; BRECCIAROLI, R.; ABBATE, A.; SPATARI, G.; TRINGALI, M. A.; GANGEMI, S.; LUCA, A. Neurocognitive effects in welders exposed to aluminium Toxicol. Industrial Health. v. 30, p. 347-356, 2014.

GUEDES, R. C. A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: "Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field, LIEBERMANN, H.; KANAREK, T.; PRASAD, C (eds.), CRC Press, New York. **Nutrition, Brain and Behavior Series**, v. 3, cap. 4, p. 39-54, 2005.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P., TEODÓSIO N. R. Nutrição Adequada: A Base do Funcionamento Cerebral. **Neurociência**. p. 32-35, 2004

GUILHERMITTI A, C. Comportamento de filhotes de ratos (*Rattus norvegicus*) em um campo aberto na presença e ausência de animais adultos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Departamento de Psicologia e Educação, Programa de Pós-graduação em Psicobiologia Universidade de São Paulo, 2011.

HALL, C. S., Emotional behavior in the rat. I. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**. v. 18, p. 385-403, 1934.

HENEKA, M. T.; O'BANION, M. K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**. v. 184, p. 69–91, 2007.

HJORTSBERG, U.; ORBAEK, P.; ARBORELIUS, J.R. M.; KARLSSON, J.E. Upper airway irritation and small airways hyperreactivity due to exposure to potassium aluminium tetrafluoride flux: an extended case report. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 50, p. 06–09, 1994.

<http://www.pelotas.rs.gov.br/sanep/tratamento/> (acessado em 29/03/17 às 10:40)

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Aluminium from all sources, including food additives (addendum). In: Safety evaluation of certain food additives and contaminants, prepared by the sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO food additives series 58. Geneva: Organization WH, p. 119–208, 2007.

KASBEA, P.; JANGRA, A.; LAHKAR, M. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 31, p. 107-112, 2015.

KHALAF AL MOUTAERY, F.R.C.S.; SALEH AL DEEB, F.R.C.P.; NABIL BIARY, M.D.; CHRISTUDAS MORAIS, M.PHIL.; HASEEB AHMAD KHAN, PH.D.; MOHAMMAD, TARIQ, F.R.C.P. Effect of aluminum on neurological recovery in rats following spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery**. v. 93, p. 276–282, 2000.

KLINGELFUS, T.; COSTA, P. M.; SCHERER M., CESTARI M. M. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate. **Genetics and Molecular Biology**. v.38, p. 499-506, 2015.

KWON, J.; SEO, G.; JO, E.; LEE M.; KIM, H.; SHIM, I.; LEE, B.; YOON, B.; KIM, P.; CHOI, K. Aluminum Nanoparticles Induce ERK and p38MAPK Activation in Rat Brain. **Toxicology Research**. v. 29, p. 181-185, 2013.

LANKOFF, A.; BANASIK A.; DUMA A.; OCHNIAK E.; LISOWSKA H.; KUSZEWSKI T.; GOZDZ S.; WOJCIK A. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology Letters**. v.161, p.27–36, 2006.

LANTZY, R.J.; FRED, T.M. Atmospheric trace metals: global cycles and assessment of man's impact. **Geochim Cosmochim Acta**. v.43, p.25, 1979.

LAURITZEN, M.; RICE, M.; OKADA, Y.; NICHOLSON, C. Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. **Brain Research**. v. 475, p. 317–327, 1988.

LEÃO, A. P., Spreading depression of activity in the cerebral cortex, **Journal Neurophysiology**. v.1, p.359-390, 1944.

LI, D.; TOMLJENOVIC, L.; LI, Y.; SHAW C. A. Subcutaneous injections of aluminum at vaccine adjuvant levels activate innate immune genes in mouse brain that are homologous with biomarkers of autism. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 34, p. 1-46, 2017.

LIMA, P.D.L.; LEITE, D.S.; VASCONCELLOS, M.C.; CAVALCANTI, B.C.; SANTOS, R.A.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 1154–1159, 2007.

LIMA, S. M. V., MEDEIROS, L.B., BENEVIDES, R. D. L., SANTOS, C. N., LIMA-DA-SILVA, N.O., GUEDES, R. C. A. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional Neuroscience**. v. 20, p. 1-9, 2017.

MAIA, L. M. S. S., AMANCIO-DOS-SANTOS, A., GERMANO, P. C. P. S., FALCÃO, A. C. S. S. M., DUDA-DE-OLIVEIRA, D., GUEDES, R. C. A. Do the accelerating actions of tianeptine and L-arginine on cortical spreading depression interact? An electrophysiological analysis in young and adult rats. **Neuroscience Letters**. v. 650, p. 134-138, 2017.

MARTINEZ C. S., ALTERMAN C. D. C., PEÇANHA F. M., VASSALLO D. V., MELLO-CARPES P. B., MIGUEL M., WIGGERS G. A. Aluminum Exposure at Human Dietary Levels for 60 Days ReACHes a Threshold Sufficient to Promote Memory Impairment in Rats. **Neurotoxic Research**. v. 31, p. 20–30, 2017.

MATILAINEN A., VEPSÄLÄINEN M., SILLANPÄÄ M. Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 159, p. 189–197, 2010.

MELLO, P. B. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. v. 80, p. 301-309, 2008.

MENDES-DA-SILVA, R. F., LOPES, A. A. C., BANDIM-DA-SILVA, M.E., CAVALCANTI, G. A., RODRIGUES, A. R.O., ANDRADE-DA-COSTA, B. L. S., GUEDES, R. C. A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**. v. 86, p. 155-160, 2014.

MIRZA A., KING A., TROAKES C., EXLEY C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 40, p. 30–36, 2017.

NAYAK, P., Aluminum: impacts and disease. **Environmental Research**. v. 89, p.101–115, 2002.

NELSON D. L.; COX M. M. **Princípios de Bioquímica**. Editora Artmed, ed. 5, p 44-70, 2011.

NURCHI V. M., CRISPONI G., BERTOLASI V., FAA G., REMELLI M. Aluminium-dependent human diseases and chelating properties of aluminium chelators for biomedical applications. **Metal Ions in Neurological Systems**. v. 10, p. 103-123, 2012.

OLIVEIRA, V. M., ASSIS C. R. D., COSTA H. M. S., SILVA R. P. F., SANTOS, J. F., CARVALHO JR L. B., BEZERRA R. S. Aluminium sulfate exposure: A set of effects on hydrolases from brain, muscle and digestive tract of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 191, p. 101–108, 2017.

PAZ, L. N. F., MOURA, L. M., FEIO, D. C. A., CARDOSO, M. S G, XIMENES, W. L. O., MONTENEGRO, R. C., ALVES, A. P. N., BURBANO, R. R., LIMA, P. D. L. Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride. **Chemosphere**. v.175, p. 130-137, 2017.

PIRES, G. N., TUFIK, S., ANDERSEN, M. L. Relationship between sleep deprivation and anxiety – experimental research perspective. **Einstein**. v. 10, p. 519-523, 2012.

PISOI I. Coagulation of Surface Water using Simple and Prehydrolyzed Aluminium Salts. **Revista de Chimie (Bucharest)**. v. 62, p. 575-578, 2011.

POGUE, A.; DUA, P.; HILL, JM.; LUKIW, WJ. Progressive inflammatory pathology in the retina of aluminum-fed 5xFAD transgenic mice. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 152, p. 206-209, 2015.

POHANKA, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 54, p.1-16, 2012.

POLIZZI, S.; PIRA E.; FERRARA M.; BUGIANI M.; PAPALEO, A.; ALBERA, R.; PALMI S. Neurotoxic Effects of Aluminium Among Foundry Workers and Alzheimer's Disease. **NeuroToxicology**. v. 23, p. 761–774, 2002.

PREMA, A.; THENMOZHI, A. J.; MANIVASAGAM, T.; ESSA, M. M.; GUILLEMIN, G. J. Fenugreek Seed Powder Attenuated Aluminum Chloride-Induced Tau Pathology, Oxidative Stress, and Inflammation in a Rat Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 60, p. S209-S220, 2017.

RAWI, S. M., AL NASSR F. M. S. Zinc sulfate and vitamin E alleviate reproductive toxicity caused by aluminium sulfate in male albino rats. **Toxicology and Industrial Health**. v. 31, p. 221–234, 2012.

RODGERS, C. I., ARMSTRONG G. A. B., SHOEMAKER K. L., LABRIE J. D., MOYES C. D., ROBERTSON R. M. Stress Preconditioning of Spreading Depression in the Locust CNS. **Plos one**. v. 12, p. 8-17, 2007.

RUBIO-PEREZ, J. M. & MORILLAS-RUIZ J. M. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. **The ScientificWorld Journal**. p. 1-16, 2012.

SALAH, E. I., SABAHELKHIER M. K., ADAM S. I. Y. Effects of Deionization Water Treated with Different Dose of Aluminum Chloride ($AlCl_3$) on Creatinine and Liver Enzymes of Wistar Rats. **Annual Research & Review in Biology**. v.8, p. 1-7, 2015.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicações como Inseticidas e Agentes Antitumorais. **Química Nova**, v. 30, p. 159-170, 2007.

SANTOS E., LEON F., SILOS H., SANCHEZ-PORRAS R., SHUTTLEWORTH C W., UNTERBERG A., SAKOWITZ O. W. Incidence, hemodynamic, and electrical characteristics of spreading depolarization in a swine model are affected by local but not by intravenous application of magnesium. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 36, p. 1–7, 2016.

SCHEGG, K. M., HARRINGTON L. S., NEILSEN S., ZWEIG R. M., PEACOCK J. H. Soluble and Membrane-Bound Forms of Brain Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, Vol. 13, pp. 697-704, 1992.

SILMAN, I., SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**. v.5, p. 293–302, 2005.

SJOGREN, B; LIDUMS, V; HAKANSSON, M; HEDSTROM, L. Exposure and urinary excretion of aluminum during welding. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**. v.11, p.39–43, 1985.

SOARES, G. S. F.; LIMA, C. B.; CAVALCANTI, L. C.; VILLACAMPA, N., CASTELLANO, B.; GUEDES, R. C. A. Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: A spreading depression and microglia immunolabeling study. *Nutritional Neuroscience*, v. 18, p. 140512065140000-315, 2014.

STACCHIOTTI, A.; LAVAZZA, A.; FERRONI, M.; SBERVEGLIERI, G.; BIANCHI, R.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F. Effects of aluminium sulfate in the mouse liver: Similarities to the aging process. **Experimental Gerontology**. v.43, p. 330–338, 2008.

SWEGERT, C. V.; DAVE, K. R.; KATYARE, S. S. Effect of aluminium-induced Alzheimer like condition on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 112, p. 27–42, 1999.

TASAKI, I.; BYRNE, P.M., Demonstration of heat production associated with spreading depression in the amphibian retina. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.102, p. 293–297, 1991.

SHAW, C. A.; TOMLJENOVIC, L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. **Immunologic Research** v.56, p.304–316, 2013.

VIANA, L. C.; LIMA, C. M.; OLIVEIRA, M. A.; BORGES, R. P.; CARDOSO, T. T.; ALMEIDA, I. N. F.; DINIZ, D. G.; BENTO-TORRES, J.; PEREIRA, A.; BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; SILVA, R. F. M.; ABADIE-GUEDES, R.; SANTOS, A. A.; LIMA, D. S. C.; VASCONCELOS, P. F. C.; CUNNINGHAM, C.; GUEDES, R. C. A.; PICANÇO-DINIZ, C. W. Litter Size, Age-Related Memory Impairments, and Microglial Changes in Rat Dentate Gyrus: Stereological Analysis and Three Dimensional Morphometry. **Neuroscience**. v. 238, p. 280–296, 2013.

WANG, B; XING, W; ZHAO Y, DENG X. Effect of chronic aluminium exposure on memory through multiple signal transduction pathways. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.29, p. 308–313, 2010.

YOKEL, R. A.; MCNAMARA, P. J. Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview. **Pharmacology & Toxicology**. v. 88, p. 159–167, 2001.

YOKOTA, C.; KUGE Y.; HASEGAWA, Y.; TAGAYA, M., ABUMIYA, T.; EJIMA N.; TAMAKI N.; YAMAGUCHI T.; MINEMATSU K. Unique profile of spreading depression in a primate model. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 22, p. 835–842, 2002.

YOUNG, W. Spreading depression in elasmobranch cerebellum. **Brain Research**. v.199, p. 113–126, 1980.

ZEMMOURIA, H.; DROUCHEA, M.; SAYEH, A.; LOUNICI H.; MAMERI, N. Coagulation Flocculation Test of Keddara's Water Dam Using Chitosan and Sulfate Aluminium. **Procedia Engineering**. v.33, p. 254 – 260, 2012.

ZENG, D.; WUA, J.; KENNEDY, J. F. Application of a chitosan flocculant to water treatment. **Carbohydrate Polymers**. v. 71, p. 135–139, 2008.

ZHAO, Y.; HILL, J. M.; BHATTACHARJEE S.; PERCY, M. E.; POGUE, A. I. D.; LUKIW, W. J. Aluminum-Induced Amyloidogenesis and Impairment in the Clearance of Amyloid Peptides from the Central Nervous System in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neurology**. v. 5, p. 1-3, 2014.

ZHU, G.; ZHENG, H.; CHEN, W.; FAN, W.; ZHANG, P.; TSHUKUDU, T. Preparation of a composite coagulant: Polymeric aluminum ferric sulfate (PAFS) for wastewater treatment. **Desalination**. v. 285, p. 315-323, 2012.

ZOUBOULIS, A. I.; MOUSSAS, P. A.; VASILAKOU, F. Polyferric sulfate: Preparation, characterisation and application in coagulation experiments. **Journal of Hazardous Materials**. v.155, p. 459–468, 2008.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 25 de fevereiro de 2015.

Ofício nº 16/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Ranilson Souza Bezerra**
Departamento de Bioquímica – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.050889/2014-00

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Avaliação do efeito do sulfato de alumínio no cérebro de ratos utilizando modelos neurofisiológicos”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 45 dias; Peso: 150g; Sexo: machos; Nº total de animais: 60.


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB-UFPE
SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver