

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DO ACETATO DE CHUMBO EM TECIDO ÓSSEO DE
RATOS**

FABIO ALEXANDRE CASARIN PASTOR

SÃO CARLOS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DO ACETATO DE CHUMBO EM TECIDO ÓSSEO DE
RATOS**

FABIO ALEXANDRE CASARIN PASTOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P293ea

Pastor, Fabio Alexandre Casarin.

Efeitos do acetato de chumbo em tecido ósseo de ratos /
Fabio Alexandre Casarin Pastor. -- São Carlos : UFSCar,
2009.

132 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2009.


1. Tecido ósseo. 2. Acetato de chumbo. 3. Biomecânica
óssea. 4. Densidade óssea. 5. Rato. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Fabio Alexandre Casarin Pastor

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka.....
Profa. Dra. Maria do Carmo Sitta.....
Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada.....



Orientadora
Profª. Dra. Keico Okino Nonaka

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à
pesquisa do CNPq.

"Conhece-te a ti mesmo."

Sócrates

Aos meus pais, José Carlos e Marisa, pelo amor, carinho, educação, dedicação, incentivo, apoio incondicional e principalmente pelos valores que sigo em vida.

A minha companheira, Juliana, pela grande dedicação e cumplicidade nesta jornada.

Ao meu irmão, Eduardo e todos os nossos amigos, por terem acreditado em mim e proporcionado muita alegria durante esta vida.

A TODOS ESTES: AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

Ao grande Deus, por sua onipresença e guia de todos os objetivos almejados e realizados em vida;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, pela ótima oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, o exemplo de ética profissional e grande caráter;

Aos meus pais, José Carlos Pastor e Marisa Elizabeth Casarin Pastor, pela educação, amor, carinho, dedicação, incentivo, apoio incondicional e principalmente pelos valores que sigo em vida.

À minha companheira, Juliana Rodrigues Prada, pelo eterno companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu irmão, Eduardo Alexandre Casarin Pastor e todos os nossos amigos rio clarenses, Lucas Barsotti, Fabrício Amaral Gobbo, Rodrigo Augusto Dalia, Lucas Gaspar, Alexandre Barreto, João Eduardo Dietrich, Luciano Castelar das Neves, e meu grande amigo araraquarense Roberto Alves Junior, por terem acreditado e proporcionado muita alegria!

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho, especialmente Sr. Sérgio Dias, técnico do laboratório de Neuroendocrinologia;

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar) para a utilização de uma balança de precisão;

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela utilização do leitor de micro placas (ELISA) do Laboratório de Histologia e Microscopia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar.

Ao Prof. Dr. Elson Longo pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Laboratório de Análise Microestrutural, Departamento de Química, LIEC –

UFSCar. Ao técnico de laboratório Rorivaldo de Camargo e o aluno Ricardo Luís Tranquilin pela ajuda na preparação das amostras e realização da análise.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, pela utilização da Espectrometria de Absorção com Chama, Departamento de Química – UFSCar e aos alunos Mário H. Gonzalez, Eveline A. Menezes e Amália G. Dionísio (Grupo de Análise Instrumental Aplicada), pelo auxílio na realização e interpretação da análise.

Aos professores Dra. Marisa Narciso Fernandes / Departamento de Ciências Fisiológicas (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa) – UFSCar, Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte / Departamento de Educação Física e Motricidade Humana – UFSCar e Dr. Nivaldo Antônio Parizotto / Departamento de Fisioterapia – UFSCar (São Carlos) pelas contribuições importantes no exame de qualificação.

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Daniel Mochiutti, Juciléia Barbosa Bezerra, Fernando Vidal D'Ávila, Charles Chenwei Wang, José Aparecido Ferreira, Valéria Gonçalves Albieri Mattos, Edvanina de Souza Costa Queiroz, Lucélia Maria Albertin pelo companheirismo indispensável ao cumprimento deste trabalho.

Aos meus amigos de república: Julio Damálio, Leonardo Novaes, Rafael Flora Ramos e André Lopes Guelli, e todos os grandes amigos de encontrei em São Carlos (inclusive os vários do departamento), pelo companheirismo ao longo desse período e pelos momentos de descontração em momentos difíceis.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Profa. Dra. Keico pela confiança depositada, pelo exemplo, profissionalismo, caráter e generosidade.

A disponibilidade profissional e pessoal, da qual permitiu contribuir para meu crescimento profissional e pessoal, de forma exigente, carinhosa, crítica e descontraída.

Minha eterna gratidão, todo meu respeito e admiração!

RESUMO

Chumbo é um poluente ubíquo no ecossistema cuja distribuição ambiental é principalmente antropogênica, oriunda da queima de combustíveis fósseis, mineração e fabricações industriais diversas. Há pouco conhecimento do envolvimento deste elemento sobre o metabolismo ósseo. O objetivo deste estudo foi estabelecer possíveis alterações ósseas em ratos adultos, contaminados com acetato de chumbo durante a fase de desenvolvimento, por meio da incorporação de chumbo neste tecido. Foram analisados parâmetros biométricos, biofísicos, e biomecânicos ósseos. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, com 9 ratos tratados com salina 0,9% (0,1 ml/100g MC) e contaminados C-100 e C-200 com 10 animais cada, intoxicados com acetato de chumbo (100 e 200 mg/kg MC, respectivamente), 1 vez por semana, por 8 semanas pelo método de gavagem gástrica. A incorporação de chumbo foi analisada com microscopia eletrônica de varredura e as concentrações deste elemento no tecido ósseo com espectrometria de absorção atômica com chama. Calculou-se o volume ósseo, e a partir deste parâmetro a densidade óssea foi determinada. As propriedades biomecânicas dos fêmures foram obtidas pelo teste de flexão a três pontos. A contaminação com acetato de chumbo promoveu incorporação e aumento da concentração de chumbo no tecido ósseo para as duas doses testadas, entretanto não foram suficientes para provocar alterações no desenvolvimento somático e ósseo destes animais. A dose de 100 mg/kg MC não foi suficiente para provocar alterações ósseas e a dose de 200 mg/kg MC provocou redução da densidade e resistência óssea. Portanto, os resultados apontam a capacidade deste elemento em prejudicar a qualidade do tecido ósseo e talvez servir como fonte endógena para contaminações subseqüentes.

Palavras chaves: tecido ósseo, acetato de chumbo, biomecânica óssea, densidade óssea, ratos

ABSTRACT

Lead is a ubiquitous pollutant in the environmental ecosystem which distribution is mainly anthropogenic, come from burning fossil fuels, mining and various industrial products. There is little knowledge of the involvement of this element on the bone metabolism. This study aimed to determine possible changes in adult rat bone, contaminated with lead acetate during the development phase, through the incorporation of lead in the tissue. Biometric, biophysical, and biomechanical bone parameters were analyzed. The animals were divided into 3 groups: control, 9 rats treated with saline 0.9% (0.1 ml/100g BM) and contaminated groups C-100 and C-200 with 10 animals each, poisoned with lead acetate (100 and 200 mg / kg BM, respectively), once per week for 8 weeks by gastric gavage method. The incorporation of lead was examined with scanning electron microscopy and the concentration of this element in bone tissue with atomic absorption spectrometry with flame. We calculated the bone volume, and from this parameter the bone density was determined. The biomechanical properties of femurs were obtained by three points bending test. Contamination with lead acetate promoted incorporation and increased the concentration of lead in bone for the two doses tested, however were not sufficient to cause changes in the somatic and bone development of these animals. The dose of 100 mg / kg BM was not enough to cause bone changes and the dose of 200 mg / kg BM caused reduced bone density and strength. Therefore, the results indicate the ability of this element in damage the quality of the bone and maybe, serve as a source for endogenous subsequent contamination.

Key words: bone tissue, lead acetate, bone biomechanics, bone density, rat.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Máquina universal Instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato.	42
FIGURA 2.	Gráfico Carga x Deformação, obtido com o teste de flexão, utilizado para determinação das propriedades biomecânicas.	45
FIGURA 3.	Esquema da preparação das amostra da diáfise tibial para ser analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura.	48
FIGURA 4.	Micrografia da superfície externa de tíbias direitas, obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (mapeamento da amostra).	50
FIGURA 5.	Micrografia da superfície interna de tíbias direitas, obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (mapeamento da amostra).	53
FIGURA 6.	Representação Esquemática da Média das massas (g) durante as 8 semanas de tratamento dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	53
FIGURA 7.	Representação Esquemática da Massa Corporal Inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	54
FIGURA 8.	Representação Esquemática da Massa Corporal Final (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	54
FIGURA 9.	Representação Esquemática do Comprimento (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	57
FIGURA 10.	Representação Esquemática do Diâmetro Maior (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	57
FIGURA 11.	Representação Esquemática do Diâmetro Menor (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	58
FIGURA 12.	Representação Esquemática do Peso Úmido (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	58
FIGURA 13.	Representação Esquemática do Peso Imerso (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	59
FIGURA 14.	Representação Esquemática do Peso Seco (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	59

FIGURA 15.	Representação Esquemática do Peso das Cinzas (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	60
FIGURA 16.	Representação Esquemática da Porcentagem de Água dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	62
FIGURA 17.	Representação Esquemática da Porcentagem de Material Mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	62
FIGURA 18.	Representação Esquemática da Porcentagem de Material Orgânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	63
FIGURA 19.	Representação Esquemática do Volume Ósseo (cm ³) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	63
FIGURA 20.	Representação Esquemática da Densidade Mineral (g/cm ³) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	64
FIGURA 21.	Representação Esquemática da Densidade Óssea (g/cm ³) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	64
FIGURA 22.	Representação Esquemática do Deslocamento no Ponto na Fratura (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	67
FIGURA 23.	Representação Esquemática do Força Máxima (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	68
FIGURA 24.	Representação Esquemática do Rigidez (N/mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	68
FIGURA 25.	Representação Esquemática do Tenacidade (J) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	69
FIGURA 26.	Representação Esquemática do Deslocamento Máximo (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	69

FIGURA 27. Representação Esquemática da Resiliência (J) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

70

FIGURA 28. Representação Esquemática da Carga da Fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Concentração de Pb obtidas por meio da Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, nas tíbias esquerdas dos animais nos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	52
TABELA 2.	Massa corporal (PC) inicial e final, e ganho de massa em gramas (g) dos animais nos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	55
TABELA 3.	Massa dos órgãos sexuais acessórios: próstata e vesículas seminais (g/100 g MC), dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	56
TABELA 4.	Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises femorais (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	60
TABELA 5.	Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volume Ósseo (em cm ³), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm ³), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	65
TABELA 6.	Valores do conteúdo de Fósforo e Cálcio Ósseo (mg) e Cálcio Plasmático (mg/dl plasma) realizado por meio de espectrofotometria, das cinzas dos fêmures direitos dos animais nos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	66
TABELA 7.	Parâmetros Biomecânicos: Deslocamento no Ponto da Fratura (mm), Força Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J), Deslocamento Máximo (mm) Resiliência (J) e Carga da fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPc Adenonisa Monofosfato Cíclico
- ALP Enzima Fostase Alcalina
- ATF6 Fator de Transcrição Ativado 6
- BMPs Proteínas Morfogenéticas Ósseas
- C₁ Carga no Limite Elástico
- C₂ Carga Máxima
- C₃ Carga de Fratura
- Ca Cálcio
- Ca²⁺ Cálcio Divalente
- Cd Cádmio
- Pb(C₂H₃O₂)₂.3(H₂O) Acetato de Chumbo
- CHO-K1 Linhagem celular de ovário de hamster
- D₁ Deformação no Limite Elástico
- D₂ Deformação na Carga Máxima
- D₃ Deformação no Ponto de Fratura
- DCF Departamento de Ciências Fisiológicas
- DCT1 Transportador de Cátion Divalente 1
- DMT1 Transportador de Metal Divalente 1
- DP Desvio Padrão
- EAAC Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
- EDX Espectrometria de Dispersão de Raios-X
- EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético
- Fe Ferro
- FGF Fator de Crescimento Fibroblástico
- FOXO Forkhead Box
- g Gramas
- GH Hormônio de Crescimento
- GM-CFU Unidades Formando Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- GRP78 Proteína-78 Regulada pela Glicose
- HAS Hipertensão Arterial Sistêmica
- Hg Mercúrio

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio
IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-I Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I
IGF-II Fator de Crescimento Semelhante à Insulina II
IP3 Inositol-3-fosfato
IRE1 Proteína 1 Requerente de Inositol
JNK c-Jun Amino-Terminal Quinase
l Litro
LH Hormônio Luteinizante
MC Massa Corporal
M-CSF Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
MEC Matriz Extracelular
MED Média
MEV Microscópio Eletrônico de Varredura
MMPs Metalopeptidases de Matriz
2 N Dois Normal
n Número de Animais
NRAMP2 Proteína de Macrófago Associada à Resistência Natural 2
O[•] Oxigênio Singleto
OAT1 Transportador de Ânion Orgânico 1
OAT3 Transportador de Ânion Orgânico 3
OH Radical Hidroxil
OPG Osteoprotegerina
ρ Rô
Pb Chumbo
Pb²⁺ Chumbo Divalente
PDGF Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas
PGE2 Prostaglandina E2
Pi Peso Imerso
Pm Peso do Material Mineral (cinzas)
Ppm Partes por Milhão
PO₄⁻ Fosfato
Ps Peso Seco
PTH Hormônio da Paratireóide

Pu Peso úmido

QI Coeficiente de Inteligência

RE Retículo Endoplasmático

RANK Receptor de Membrana de Osteoclastos e Pré-Osteoclastos

RANKL Ligante de Superfície dos Osteoblastos e Pré-Osteoblastos

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SH Grupos sulfidrílicos

T Inclinação da Reta

TfR1 Transferrina 1

TfR2 Transferrina 2

TGF β Fator de Crescimento Transformante Beta

Wnt Proteína Sinalizadora que Regula o Turnover da β -catenina

vs Versus

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Tecido Ósseo.....	23
1.2 Chumbo.....	29
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Modelos de Estudo.....	39
3.2 Animais.....	39
3.3 Protocolo Experimental.....	39
3.4 Eutanásia.....	40
3.5 Parâmetros Analisados.....	40
3.5.1 Parâmetros Biométricos.....	40
3.5.2 Parâmetros Biomecânicos.....	41
3.5.3 Parâmetros Físicos.....	45
3.5.4 Propriedades Bioquímicas.....	47
3.5.5 Análise Microestrutural.....	47
3.5.6 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.....	49
3.6 Análises Estatísticas.....	49
3.7 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho.....	49
4. RESULTADOS	47
4.1 Análise Microestrutural.....	50
4.2 Concentrações de Chumbo.....	51
4.3 Parâmetros Biométricos.....	52
4.3.1 Massa Corporal.....	52
4.3.2 Massa dos Órgãos Sexuais Acessórios.....	55
4.3.3 Análise do Fêmur Direito.....	56
4.4 Parâmetros Físicos.....	61
4.5 Análise Bioquímica.....	65
4.6 Parâmetros Biomecânicos.....	66
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é constituído por uma matriz extracelular altamente organizada, contendo componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%) (HILL, ORTH, 1998) e um distinto e complexo grupo celular. Funcionalmente, a fase orgânica é determinante da estrutura e das propriedades mecânicas ósseas, sendo composta pelo osteóide (pré-osso) e pelas células do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente por colágeno tipo I e outras moléculas como fatores de crescimento, citocinas e proteínas da matriz extracelular (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteínas ósseas, proteoglicanos, fosfoproteínas e proteolipídeos, perfazendo 98% do material orgânico ósseo). Das proteínas não colágenas ressalta-se a importância da osteocalcina como recrutadora de osteoclastos e de precursores destas células no processo de reabsorção óssea; da osteopontina como potencializadora da sobrevivência celular e migração em áreas de metabolismo ativo ósseo; e da osteonectina, regulando a formação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, servindo como núcleo para a mineralização óssea (HALL, 2005). O restante (2%) é formado por células ósseas, os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea; os osteócitos, representando os osteoblastos que ficam circundados pela matriz óssea e os osteoclastos, células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea (EINHORN, 1996; FERNANDEZ et al., 2006a).

A fase inorgânica (mineral) é composta principalmente por grandes quantidades de cálcio, fosfato e carbonato na forma de pequenos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$ e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor em associação às fibras de colágeno (FERNANDEZ et al., 2006a). A presença de cargas eletrostáticas mantém os íons na superfície do cristal, conseqüentemente sustentando a conformação característica desta estrutura. Apenas íons com propriedades químicas semelhantes às do elemento que compõe o cristal são capazes de penetrar e tornar-se parte do cristal. Por exemplo, metais pesados, como o estrôncio, podem substituir as posições do cálcio na hidroxiapatita (BRONNER, 2002); o fluoreto ou cloreto podem substituir o íon hidroxila (RABINOWITZ, 1991; TUREK, 1991).

O tecido ósseo em associação com outras estruturas como: cartilagem, medula óssea, gordura, vasos sanguíneos e nervos caracterizam o osso como estrutura física orgânica.

Biomecanicamente por sua vez, o osso em conjunto com diversas estruturas funcionais (articulações, ligamentos e tendões) faz parte do conjunto de estruturas que formam o arcabouço de sustentação do nosso organismo: o esqueleto. Ademais, diversas funções são atribuídas ao esqueleto: suporte e proteção a órgãos vitais como os contidos na caixa torácica e craniana; sistema de alavancas cujo conjunto com os músculos caracteriza o sistema músculo-esquelético, permitindo o deslocamento do indivíduo; sustentação e conformação estrutural ao corpo; reservatório iônico para o organismo (cálcio, fósforo, magnésio e outros); hematopoiese via medula óssea (BILEZIKIAN, RAIZ, RODAN, 1996; MARTINI, 1998). Outro aspecto relevante do esqueleto é sua atuação como segunda linha de defesa contra acidose e devido à sua vasta área de superfície mineral há uma capacidade de absorção de toxinas e metais pesados cuja ação pode minimizar seus efeitos sobre outros tecidos (LOVERIDGE, 1999; RAISZ, 1999; FERNANDEZ et al., 2006a).

Há os seguintes tipos celulares no tecido ósseo: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras são células tronco mesenquimais cuja capacidade de proliferação e diferenciação as permite tornarem-se osteoblastos, podendo manter-se quiescentes ou ativas conforme a demanda metabólica imposta ao tecido. Estas células osteogênicas, estimuladas por diversos fatores, como proteínas e fatores de crescimento diferenciam-se e passam a ser osteoblastos (células com retículo endoplasmático rugoso grande e intensa atividade metabólica). Uma classe dessas proteínas que possui importante função regulatória durante o processo de diferenciação osteoblástica tanto *in vivo* como *in vitro* é a das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Quando ativos, os osteoblastos são responsáveis pela osteogênese, sintetizando e exportando componentes da matriz óssea orgânica como colágeno, principalmente do tipo I e proteoglicanos sulfatados na matriz extracelular adjacente, em arranjos regulares que futuramente serão calcificados pela deposição dos componentes inorgânicos da matriz. Após a calcificação alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz óssea mineralizada, diferenciam-se e passam a ser denominados osteócitos. Os osteoblastos e os osteócitos se comunicam por proteínas de membrana (conexina 43) ou integrinas, que agem como um fator de ligação entre essas células ou entre uma célula e a matriz extracelular, permitindo a passagem de mensageiros, tais como cálcio, citoquinas e prostaglandinas. Os osteócitos comunicam-se entre si, por meio de prolongamentos adjacentes, localizados em canalículos presentes no interior do osso, mantendo dessa forma o equilíbrio e a manutenção da matriz óssea (conteúdo mineral e protéico). Ressalta-se das funções do osteócito, a sua participação como célula responsável pela tradução da força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o

turnover ósseo (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; NOMURA, YAMAMOTO, 2000; PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; BONEWALD, 2004; TATE et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2006b; RUBIN, RUBIN, JACOBS, 2006).

Completando os tipos celulares, temos os osteoclastos (células gigantes multinucleadas), que são células promotoras da osteólise (reabsorvem tecido ósseo). Estas são originadas a partir da diferenciação de células mononucleadas hematopoiéticas conhecidas como “Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Units” (GM-CFU), precursoras de macrófagos e monócitos. Os osteoblastos são células com papel fundamental durante a fase inicial da osteoclastogênese por meio da produção do Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos (M-CSF). Há três chaves moleculares que regulam esse processo: OPG (osteoprotegerina, uma proteína solúvel sintetizada por osteoblastos e pré-osteoblastos), RANKL (um ligante situado sobre a superfície dos osteoblastos e pré-osteoblastos) e RANK (um receptor situado na membrana de osteoclastos e pré-osteoclastos). A interação entre RANKL e seu receptor inicia a atividade e diferenciação osteoclástica, aumentando a reabsorção. A ligação de OPG a RANK inativa esse receptor, sendo assim a diferenciação osteoclástica é inibida. A regulação sistêmica se dá principalmente através da ação do hormônio da paratireóide (PTH) que tem seu receptor nos osteoblastos, e uma ação parácrina sobre os osteoclastos. Nessas células, o PTH ativa a reabsorção do tecido mineralizado com finalidade da manutenção das concentrações dos íons de cálcio no sangue. Os osteoclastos deterioram a superfície óssea mineralizada e iniciam a absorção pela secreção de íons de hidrogênio e enzimas lisossomais, tais como a catepsina K, os quais podem degradar todos os componentes da matriz óssea, incluindo colágeno, em baixo pH (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; RAISZ, 1999; PALUMBO et al., 2001; TROEN, 2003; FERNANDEZ et al., 2006b).

Como observado, a formação do osso é dependente da síntese de uma matriz orgânica inicial (não mineralizada), rica em colágeno (osteóide) da qual se converte em osso mineralizado (calcificado). A deposição deste osso depende de uma base pré-existente, seja tecido conjuntivo rico em colágeno, seja matriz cartilaginosa (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996). Portanto há formação de esqueleto por dois processos distintos:

1) Ossificação intramembranosa: ocorre no interior de uma membrana de tecido conjuntivo durante o desenvolvimento do embrião pela transformação direta das células mesenquimais em osteoblastos. Esse processo de ossificação é restrito a ossos do crânio: frontal, parietal e partes do occipital, do temporal, dos maxilares superior e inferior e partes da clavícula. Contribui também para o crescimento de ossos curtos e em espessura para os ossos longos.

Exemplificando, os ossos do crânio crescem em direção ao centro de ossificação primária (local da membrana conjuntiva onde se inicia a ossificação) e se encontram nas suturas. As suturas são domínios celulares fibroblásticos compostas de perióstio de ossos adjacentes. O centro da sutura contém uma população de células em proliferação que se diferenciam e migram em direção à superfície óssea adjacente, tornando-se osteoblastos. Durante a migração essas células produzem colágeno tipo III em baixa quantidade, tipos V e XI em quantidade média e finalmente colágeno tipo I, o principal colágeno ósseo (WURTZ et al., 1998). A parte que não sofrer ossificação passa a constituir o endóstio e perióstio.

2) Ossificação endocondral: processo de formação óssea na qual o osso é formado a partir de um molde cartilaginoso (hialina). Em tal processo as células mesenquimais se diferenciam em células cartilaginosas, refletindo a posição e a forma do osso a ser formado. Este é o principal meio de formação de ossos curtos e longos. O crescimento longitudinal resulta da proliferação e da atividade metabólica dos condrócitos na placa de crescimento, que pode ser subdividida em várias zonas distintas, na qual as células podem ser caracterizadas pela sua forma, tamanho e atividade metabólica específicas:

- a) Zona de repouso: encontram-se condrócitos em repouso que são, posteriormente, recrutados para a zona de proliferação.
- b) Zona de proliferação: os condrócitos dividem-se e formam colunas paralelas, empilhadas no sentido longitudinal do osso. Após esta configuração estas células param a divisão e entram na zona de hipertrofia.
- c) Zona hipertrófica: os condrócitos hipertrofiados produzem uma abundante matriz extracelular que mais tarde se tornará mineralizada. Em seguimento, os condrócitos sofrem apoptose.
- d) Zona de cartilagem calcificada: ocorre mineralização da matriz cartilaginosa e termina a apoptose dos condrócitos.
- e) Zona de ossificação: tecido ósseo. Capilares sanguíneos e células osteogênicas originadas do perióstio invadem as cavidades deixadas pelos condrócitos mortos. Há diferenciação celular em osteoblastos, que formam uma camada contínua sobre os restos da matriz cartilaginosa calcificada. Sobre estes restos de matriz cartilaginosa, os osteoblastos depositam a matriz óssea.

O crescimento ósseo em diâmetro esta relacionado à formação externa (perióstio) e reabsorção interna (endóstio). Este processo ocorre restritamente na região central dos ossos longos. Na região apical de um osso longo em crescimento, o colar perióstio cerca externamente parte da placa epifisária e se estende perifericamente ao centro ósseo.

Conseqüentemente, durante o crescimento ósseo, com a extensão de um novo colar periosteal, o colar periosteal antigo é removido e modificado em direção ao centro ósseo. Este processo é acompanhado pela formação sobre a superfície periosteal e reabsorção sobre a superfície endosteal (BILEZIKIAN, RAISZ, RODAN, 1996).

A regulação do crescimento longitudinal não foi completamente elucidada, mas sabe-se que há uma grande variedade de fatores locais e sistêmicos envolvidos neste processo, como fatores de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante beta (TGF β), 1,25-dihidroxitamina D3, hormônio paratireodiano (PTH), entre outros (LOVERIDGE, 1999).

Como observado, diversos fatores e grupos celulares atuam sobre o tecido ósseo tornando-o dinâmico, um tecido em constante modificação. Este dinamismo está ligado a vias metabólicas associadas à homeostasia mineral sendo necessário para manter a integridade estrutural e manutenção dos estoques de cálcio e fósforo. Esse processo denominado remodelamento ósseo é regulado pelas células responsáveis pela formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) do tecido, cuja ação envolve a liberação de diversas enzimas, com o intuito de regular o turnover da matriz extracelular (MEC). O remodelamento inclui funções metabólicas integrais para o turnover do colágeno fibrilar, a deposição e reabsorção de tecido. O sistema apresentado é de essencial importância para os tecidos, e estas enzimas proteolíticas extracelulares atuam no remodelamento tecidual (STERNLICHT, WERB, 2001).

Este processo de remodelamento ósseo demonstra um comportamento resposta-dependente de alguns tipos de sinalizadores, sendo estes, químicos, mecânicos, elásticos e eletromagnéticos. Em condições normais, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção visa garantir a integridade das funções do esqueleto, mantendo a sua funcionalidade biomecânica, prevenindo-o contra o acúmulo de fadigas e protegendo os componentes teciduais para que estes estejam sempre disponíveis para manter o equilíbrio mineral (HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

Este evento cíclico de remodelamento envolve diversos estágios: quiescência, ativação, reabsorção, formação e mineralização. Na quiescência, a superfície óssea encontra-se inativa (não há remodelamento), sendo coberta por uma fina camada de células de revestimento (osteoblastos modificados). O sinal que inicia e desencadeia o processo de remodelamento permanece desconhecido, mas evidências demonstram células de revestimento possuindo receptores para diversos fatores sistêmicos e locais, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E2 (PGE2). A partir do estímulo celular previamente aplicado por estes fatores, há síntese e liberação de proteases cuja ação, expõe uma

determinada área de matriz óssea mineralizada (EINHORN, 1996; HILL, ORTH, 1998). Uma classe de proteases responsáveis pela exposição da matriz óssea mineralizada e do remodelamento da MEC denomina-se metalopeptidases de matriz (MMPs). Estas MMPs são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da MEC, desempenhando atividade pertinente no remodelamento da mesma em vários processos fisiológicos e patológicos (VU, WERB, 2000). Em tecidos ricos em colágeno como o tecido ósseo, a organização da MEC envolve vários fatores estimulatórios e inibitórios.

Conseqüentemente ao evento descrito, ocorre a conversão da superfície quiescente para atividade, iniciando o estágio de ativação. As células mononucleares do sistema fagocitário são atraídas para esta superfície, ancoram-se e fundem-se, originando os osteoclastos. O estágio subsequente é o de reabsorção, quando os osteoclastos começam a erodir uma cavidade de forma e dimensões características, denominada lacuna de Howship no osso trabecular e cone de reabsorção (de desgaste) no osso cortical. Este processo induz e permite a liberação de fatores de crescimento presentes dentro da matriz, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Posteriormente, inicia-se o estágio de formação, nos quais os fatores liberados durante a fase de reabsorção estimulam a diferenciação dos pré-osteoblastos. Em poucos dias, os osteoblastos diferenciados iniciam a síntese da matriz óssea, que posteriormente é mineralizada, a cavidade produzida pelos osteoclastos é preenchida e a superfície óssea retorna à quiescência. A duração do estágio de formação é de aproximadamente 3 meses e o ciclo de remodelamento ósseo leva aproximadamente 4 meses para estar completo, entretanto, um período com variação de 3 a 6 meses é requerido para o osso tornar-se plenamente maduro (PARFITT, CHIR, 1987; HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

O desenvolvimento do tecido ósseo ocorre por meio de constantes modificações durante a vida do indivíduo. Essa alteração fisiológica dar-se-á pela relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, cujo pico máximo de desenvolvimento na espécie humana encontra-se aos 30 anos de idade, onde há prevalescência da formação tecidual. Entre os 35 e 40 anos ocorre uma estabilização dos dois mecanismos (BERGLUND et al., 2000). Após esse período de equilíbrio, a reabsorção passa a prevalecer, culminando na diminuição progressiva de massa óssea. Neste período há perda aproximada de 0,3% da massa óssea ao ano. No sexo feminino, a redução da massa óssea é maior nos dez primeiros anos pós-menopausa, podendo atingir 3% ao ano, sendo que fatores intrínsecos (hormonais) e extrínsecos (sedentarismo) podem elevar drasticamente este índice. Porém, a constante relação formação/reabsorção é de

fundamental importância no estado fisiológico, pois contribui para a preservação de um tecido qualitativamente funcional, sempre renovado, preservando sua integridade mecânica (VAANANEN, 1991; YAMAMOTO, JEE, MA, 1995; MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996).

O processo de formação do tecido ósseo é influenciado por diversos fatores tais como hormonais, alimentação, genética, sexo, idade, doenças intercorrentes e fatores ambientais (YONAGA et al., 1985; MARCUS, FIELDMAN, KELSEY, 1996; SCHIRRMACHER et al., 1998; JIN et al., 2002; AKHTER et al., 2004; NGUYEN et al., 2003; DOREA, DONANGELO, 2006; VAHTER et al., 2007). Dentre os fatores ambientais, há relatos na literatura da influência de metais pesados, como o chumbo, sobre o desenvolvimento e remodelamento ósseo (MAHAFFEY, 1974; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; RABINOWITZ, 1991; ESCRIBANO et al., 1997; GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997; RONIS et al., 2001; BRONNER, 2002; BAGCHI, PREUSS, 2005).

1.2 Chumbo

O chumbo (Pb), com número atômico 82, peso atômico 207,19 é um metal cinza azulado ou cinza prateado com um ponto de fusão de 327,5 °C e um ponto de ebulição de 1740 °C. Há ocorrência de quatro isótopos com pesos atômicos de 208, 206, 207 e 204 (em ordem decrescente de abundância) (IPCS, 1995; WHO, 2001; ATSDR, 2007). Este elemento ocorre naturalmente na crosta terrestre, sendo a maior fonte natural, erupções vulcânicas e o desgaste geoquímico (IPCS, 1995; COWI, 2003; WIWANITKIT, SUWANSAKSRI, 2006). Entretanto, é raramente encontrado naturalmente como metal e usualmente encontra-se combinado com dois ou mais elementos para formar compostos de Pb (ATSDR, 2007). Apesar do Pb apresentar 4 elétrons em sua camada de valência, seu típico estado de oxidação é +2. À exceção do nitrato, clorato e, numa escala menor o cloreto, a maioria dos sais inorgânicos de Pb possuem pouca solubilidade em água (WHO, 2001).

Chumbo é um poluente ubíquo no ecossistema (HAN et al., 1997; WHO, 2001; BAGCHI, PREUSS, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006; EL-ASHMAWY et al., 2006; MUDIPALLI, 2007). Este elemento pode ser encontrado em todo o ambiente (QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003, BURBURE et al. 2006; ATSDR, 2007). Como não é um elemento degradável naturalmente, permanece no ambiente (COWI, 2003). Esta ampla

distribuição ambiental é principalmente antropogênica, oriunda da queima de combustíveis fósseis, mineração e fabricações industriais diversas (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005; ATSDR, 2007). Como o Pb metálico é resistente à corrosão, facilmente moldado e em combinação com outros metais formando ligas, comumente é encontrado em canos, baterias, pesos, munição de armamentos, revestimento de cabos e chapas usadas para blindagem contra radiação. O maior uso para o Pb é nas baterias de carros e outros veículos. Os componentes do Pb são usados como pigmentos em tintas, tinturas, esmaltes cerâmicos e na calafetagem (IPCS, 1995; VOGIATZIS, LOUMBOURDIS 2001; WHO 2001; WAKEFIELD, 2002; BARBOSA et al., 2005; WIWANITKIT, SUWANSAKSRI, 2006; ATSDR, 2007). Tetraetil e o tretametil de Pb foram usados no mundo inteiro como aditivos de combustíveis para aumentar o índice de octana (NRIAGU, 1990). A quantidade de Pb usado nestes produtos foi reduzida recentemente com o intuito de reduzir os efeitos nocivos em humanos e animais. Nos Estados Unidos (EUA) a utilização destas substâncias foi proibida na década de 80, e a adição de Pb na gasolina foi banida em 1º de janeiro de 1996 (THOMAS et al., 1999; ATSDR, 2007). No Brasil, a partir de 1975 com o surgimento do Programa Nacional de Etanol Anídrico, o tetraetil de Pb foi gradualmente substituído pelo álcool anídrico na gasolina e em 1979, uma disposição regulatória (Resolução 14/79) editado pelo Conselho Nacional de Petróleo (CNP), determinou a proibição do uso do tetraetil de Pb na gasolina brasileira (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007). Entretanto, o tetraetil de Pb continua sendo utilizado em alguns veículos “off-road”, aviões, veículos militares e ainda é utilizado em vários países em desenvolvimento, onde não há uma fiscalização adequada (ATSDR, 2007).

Munições com Pb em sua composição constituem a maior utilização deste elemento sem ser as utilizações vinculadas às baterias. A maior parte do Pb usado industrialmente provém da escavação mineral (primário) ou da reciclagem de metais descartados e baterias ácido-Pb (secundário). Dados demonstram que um total de 97% das baterias são recicladas no EUA (ATSDR, 2007). Conseqüentemente, verificamos que a atividade industrial e automobilística são os principais causadores do aumento da concentração deste elemento no ambiente (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005).

A literatura científica brasileira relacionada aos efeitos adversos do Pb em trabalhadores e na população geral, tem sido produzida irregularmente desde o fim do século 19 (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007). No Brasil, efeitos adversos do Pb na população geral, especialmente em crianças, tornaram-se interesse da saúde pública somente a partir de 1980 (CARVALHO et al, 2003).

A produção brasileira de Pb (8.832 ton em 2000) representa 0,003% da produção mundial, e foi claramente reduzida nos últimos anos. Atualmente representa 8,1% da quantidade total de Pb que é consumido no país por ano. Toda a produção mineral é exportada, pois o refino local de Pb foi cessado em 1996. Atualmente 90% do consumo nacional total vêm das atividades de reciclagem. No entanto, é estimado que 2 milhões de baterias usadas sejam anualmente perdidas sem possibilidades de reciclagem (FRANCO-NETTO et al., 2003). Os maiores consumidores de Pb no país são os produtores de bateria (80%), representando 88,000 ton, seguidos por óxidos e pigmentos (12%), e os setores eletrônicos e elétricos com 8% (BRASIL, 2001). Não obstante, os dados epidemiológicos da exposição humana ao chumbo têm sido insuficientes, não permitindo um entendimento mais acurado do impacto sobre a saúde pública (FRANCO-NETTO et al, 2003). No Brasil, os limites propostos pela legislação para os níveis de Pb no sangue são de 60 µg/dl (para trabalhadores que tem contato com Pb), e é contrastante com os limites da Conferência Americana das Indústrias Governamentais Higienistas (ACGIH), que é de 30 µg/dl (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007).

A ingestão humana de metais pesados provenientes do ambiente tem sido foco de contínuo interesse. Chumbo é encontrado em plantas (folhas de fumo), animais e humanos, por meio do consumo de água, comida e do ar que respiramos (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Quando liberado no ar o Pb percorre grandes distâncias antes de sedimentar-se ao solo, e adere-se a diversas partículas no solo. Conseqüentemente, este contaminante pode atingir lençóis freáticos e difundir-se por uma enorme área (ATSDR, 2007).

Os efeitos do Pb dar-se-ão, por meio da inalação ou ingestão deste elemento. Este metal pode afetar praticamente todos os órgãos e sistemas do nosso organismo (ATSDR, 2007; MUDIPALLI, 2007; LIAO et al, 2008). No ambiente, o Pb é tóxico para plantas, animais e microorganismos, sendo bioacumulativo no esqueleto e tecidos moles de mamíferos, algas aquáticas e invertebrados. Ademais, este elemento é altamente tóxico para humanos e não há efeitos benéficos para o organismo (COWI, 2003; BAGCHI, PREUSS, 2005), sendo que o grau da toxicidade pode ser influenciado por diversos fatores, como sexo, idade, estado fisiológico, condição nutricional e genética (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995). Além disso, a forma química do Pb como intoxicante do organismo pode influenciar a sua biodisponibilidade. Como exemplo, o acetato de chumbo - $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3(H_2O)$, um sal com grande solubilidade em água, branco e inodoro, apresenta uma maior taxa de absorção via sistema gastrointestinal quando comparado a outros sais e compostos de Pb (IPCS, 1995;

CETESB, 2001; SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). DIETER et al, 1993, mostraram que o armazenamento de chumbo em fêmures de ratos, é altamente dependente da forma química de Pb administrado, sendo que a biodisponibilidade do acetato de chumbo foi a maior, em comparação com outros compostos de chumbo.

Há aumento da quantidade de Pb corporal por meio da dieta e ingestão de água contaminada ou por meio da liberação deste elemento pelos ossos, uma vez que este elemento pode permanecer no osso por décadas (LIN et al., 2003). O Pb por si só não se decompõe quimicamente, porém a partir da formação de compostos de Pb há decomposição química e alteração por meio da luz solar, ar e água (COWI, 2003). Desta forma, a intoxicação com Pb, pode provocar efeitos mutagênicos, carcinogênicos, citotóxicos e genotóxicos (IPCS, 1995; CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Em humanos, o Pb pode resultar em um amplo efeito biológico, dependente do nível e duração da exposição. Os efeitos podem variar desde a inibição de determinadas enzimas (mudanças bioquímicas súbitas), inibição da divisão celular, a produção de mudanças morfológicas e morte (IPCS, 1995, MESTEK et al., 1998; EL-ASHMAWY et al., 2006).

Iniciando a lista de efeitos deletérios do Pb, temos os neurológicos, como os mais estudados e revisados pela literatura científica. Vários autores relatam a toxicidade do Pb sobre o sistema nervoso central (SNC) (FERGUSON, et al., 1998; UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY, 2002; QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003; CHEN et al., 2005; FAZAKAS, LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). Os danos a este sistema envolvem retardo do aprendizado com redução do coeficiente de inteligência (QI) em crianças expostas a este metal e deficiências do desenvolvimento neuropsicológico e das funções neurocomportamentais (IPCS, 1995; CANFIELD et al., 2003; BAGCHI & PREUSS, 2005; CHEN et al., 2005; BURBURE et al., 2006; DOREA, DONANGELO, 2006). Associa-se este elemento também à encefalopatias, redução da função nervosa periférica e da condução das fibras nervosas mielinizadas (BLEECKER et al., 2005, CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). GORELL et al. (1999) associaram a intoxicação por chumbo ao aumento do risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. WEISSKOPF et al., 2007, relacionaram a intoxicação do chumbo com a redução dos níveis cognitivos e com a doença de Alzheimer. KAMEL et al. (2008) sugerem que a exposição ao chumbo está relacionada a uma doença neurodegenerativa progressiva denominada esclerose lateral amiotrófica.

Recentemente, associou-se as complicações cardiovasculares e subseqüentemente, o surgimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) à intoxicação com Pb, confirmando a ação

prejudicial deste metal no sistema cardiovascular (HU et al., 1996; UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY, 2002; BAGCHI & PREUSS, 2005; CHEN et al, 2005; MARTIN et al., 2006; PARK et al., 2006). No sistema hematopoiético, o Pb afeta a formação de eritrócitos e prejudica a síntese heme e da globina, o que pode acarretar anemia ao organismo contaminado (FOX, 1987; IPCS, 1995; REISS, HALM, 2007).

No sistema renal, os efeitos prejudiciais estão associados à exposições crônicas e agudas ao Pb, induzindo nefropatias (LIN et al., 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006). A nefrotoxicidade aguda é caracterizada pelo decréscimo da reabsorção de compostos com baixo peso molecular pelo túbulo renal, particularmente, aminoácidos, glicose e fosfato. Mudanças morfológicas da exposição crônica ao Pb incluem citomegalia, desenvolvimento de corpos de inclusão nucleares e mudanças ultraestruturais nas mitocôndrias (IPCS,1995). LIN et al (2003) demonstraram que a exposição crônica ao Pb (níveis baixos) pode influenciar subitamente a progressão da insuficiência renal em pacientes sem diabetes com doença renal crônica acarretando danos glomerulares e tubulares renais.

No tecido hepático, igualmente demonstrou-se evidências da toxicidade do Pb (FAZAKAS LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005). SMITH, MIELKE, HENEGHAN (2008) demonstraram um aumento da concentração de acetato de chumbo dose dependente, no tecido hepático. EL-ASHMAWY et al. (2006) associaram a disfunção hepática (redução do número de divisões celulares e aumento das aberrações celulares e de cromossomos) após a contaminação com chumbo com aumentos significativos da peroxidação lipídica, e um decréscimo dos níveis de antioxidantes endógenos neste tecido.

O Pb é um dos maiores intoxicantes do sistema reprodutivo (JARRELL et al., 2006). No sistema reprodutor masculino, provoca alterações morfológicas e da contagem dos espermatozóides e no sexo feminino, induz alterações da gestação e dos níveis hormonais do hormônio luteinizante e folículo estimulante, por meio de ações nos ovários (IPCS, 1995; COWI, 2003; KRIEG, 2007). Também interage com o sistema imunológico, provocando redução da resistência do organismo, aumentando a mortalidade em organismos expostos previamente a agentes virais e bacterianos. Chumbo prejudica a formação de anticorpos e a resposta imune (KOLLER, ROAN, 1980; QUEIROZ et al., 2003).

O Pb no osso é outro foco de interesse por diversas razões, sendo o esqueleto o maior sítio de armazenamento deste elemento no organismo (WHO, 2001; BRONNER, 2002) e a maior fonte endógena de chumbo (BERGLUND et al., 2000). Recentemente associou-se o envenenamento por Pb às desordens ósseas. O osso é o depósito para o Pb dos organismos previamente expostos a este contaminante, onde há incorporação na matriz óssea durante a

calcificação (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997). Esse acúmulo inicia-se durante o desenvolvimento fetal e prolonga-se ao longo da vida, instalando-se em áreas de crescimento e mineralização óssea (BARRY, 1975; EISENSTEIN, KAWANOUE, 1975; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995). Este elemento apresenta uma meia vida biológica longa (10 a 30 anos) e o conhecimento da cinética de armazenamento do chumbo é muito importante devido à possibilidade de liberação deste estoque sobre determinadas condições e intoxicação de outros tecidos moles (sangue, fígado, rim, encéfalo) (RABINOWITZ, 1991; HU et al., 2007). Devido à variação do turnover no osso trabecular, cortical e nas diversas regiões do esqueleto, o acúmulo de um dado metal no esqueleto, como o chumbo, será maior naquelas regiões onde a taxa de turnover for menor (BRONNER, 2002). BARBOSA et al. 2005, afirmam que ossos trabeculares apresentam um período de turnover menor, o que torna o chumbo acumulado nesse tipo ósseo mais biologicamente ativo.

Com o desenvolvimento da técnica de fluorescência por raios-X e testes de mobilização de EDTA dissódio de cálcio para mensuração de Pb no osso *in vivo*, permitiu-se o início do entendimento de como o Pb pode interferir no metabolismo ósseo e os fatores que influenciam sua retenção e sua liberação (GRAZIANO, 1994; LIN et al, 2003; BARBOSA et al., 2005; HU et al., 2007). O interesse nesta relação surgiu juntamente com evidências das quais estados fisiológicos e patológicos, por exemplo, gestação, lactação (SILBERGELD, 1991; REISS, HALM, 2007), e osteopatias (CAMPBELL et al., 2004) como a osteoporose (SILBERGELD et al., 1988; SUN et al. 2008), poderiam mobilizar o Pb estocado nos ossos e promover efeitos adversos a outros tecidos, incluindo contaminação do feto (IPCS, 1995, DOREA, DONANGELO, 2006), aumento do risco de aborto e nascimento de crianças mortas (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Há relatos sobre o Pb como prejudicial ao crescimento em crianças (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997). Além disso, a deposição de chumbo afeta a função celular do osso, tanto a atividade osteoblástica quanto a osteoclástica (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; BRONNER, 2002). A inibição da atividade osteoblástica está associada à redução da síntese de osteocalcina (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997).

Há evidências que o Pb pode afetar direta e indiretamente vários aspectos do metabolismo ósseo, sendo a manifestação desta intoxicação resultado de uma complexa interação entre efeitos endócrinos sistêmicos, processos celulares nos ossos e processos químicos na matriz óssea (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). O Pb inibe a enzima renal 1-alfa-hidroxilase, reduzindo os níveis plasmáticos do 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D

ativa). Chumbo prejudicou o remodelamento dos sistemas haversianos em cães expostos cronicamente a este elemento (ANDERSON, DANYLCHUK, 1977).

Muitos autores estudaram alterações do tecido ósseo em ratos durante seu desenvolvimento, demonstrando que o desenvolvimento ósseo nesses animais possui as mesmas características fisiológicas na formação e reabsorção que ocorre durante o desenvolvimento do tecido ósseo em humanos (BERG, HARMISSON, 1957; KALU et al., 1989; THOMPSON et al., 1995).

Existem relatos sobre a influência de metais pesados, como o Pb, sobre as alterações do desenvolvimento ósseo em ratos durante a fase de crescimento. HAMILTON e O'FLAHERTY (1995) demonstraram alterações morfológicas metafisárias e nas placas de crescimento em ossos de ratos expostos ao Pb. GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) relataram inibição do desenvolvimento das epífises de crescimento em fêmures de ratos contaminados com dose de 17 mg de acetato de chumbo por kg de peso corporal por um período de 50 dias. Para ESCRIBANO et al. (1997), o crescimento longitudinal e periférico de ossos longos não é prejudicado pelo Pb, mas altera o desenvolvimento do esqueleto axial. Outros autores como BAGCHI e PREUSS (2005) observaram uma redução da densidade mineral óssea em ratos contaminados com acetato de chumbo a 1% na água consumida por estes animais durante 40 dias. Estudos *in vitro* também não descartam alterações em células ósseas expostas a Pb^{2+} (5 μ mol/l) por longos períodos, como a redução do acoplamento elétrico mediado por conexina-43 em cultura de células osteoblásticas, provavelmente esgotando os estoques de cálcio intracelular, já que a comunicação célula-a-célula via junções do tipo "gap" são sensíveis ao cálcio (SCHIRRMACHER et al., 1998). *In vivo*, RONIS et al. (2001), associaram a intoxicação com acetato de chumbo com a inibição da osteoblastogênese e a exposição prolongada a este elemento reduziram a resistência óssea e o crescimento esquelético.

Vários trabalhos determinaram que animais não completamente desenvolvidos demonstraram sensibilidade quando expostos a metais pesados, praguicidas ou outros agentes tóxicos (MOSER, 2000; FERRI et al., 2003; SINGH, RISHI, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). A grande vulnerabilidade desses organismos quanto a agentes químicos está relacionada à imaturidade dos órgãos e membranas e à incapacidade de processar adequadamente os mesmos (NIES, SPIELBERG, 1996; TYL, 1998). O dano ao organismo pode ser direto, pela deposição deste elemento nos tecidos, e indiretos, por meio dos distúrbios do metabolismo (MESTEK et al, 1998). Nas células eucarióticas, este metal tem um efeito genotóxico, com mecanismos não bem caracterizados e possivelmente envolvendo danos indiretos ao DNA, quer seja afetando a estabilização da cromatina, quer seja

interagindo com processos de reparo e acredita-se que o chumbo é capaz de interagir covalentemente com íons fosfato terciários em ácidos nucléicos e proteínas (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGU, 2005).

Todos os compostos de chumbo são tóxicos. Devido à alta afinidade entre chumbo e grupos sulfídricos (SH) (GRAZIANO, 1994), há modificação de grupos tióis nas proteínas de membrana, peptídeos e aminoácidos, indiretamente pela produção de produtos oxidativos e por meio da alteração do estado redox da célula. Este efeito dá-se por meio da peroxidação lipídica e/ou modulação da síntese de produtos imunorreguladores (QUEIROZ et al., 2003). BAGCHI, PREUSS (2005), também relatam como possíveis efeitos adversos do Pb o estresse oxidativo. Essa interação com SH de proteínas como as metalotioneínas, glutathiona e cisteína está diretamente envolvida com a captação, acúmulo, transporte e conseqüentemente, toxicidade do Pb. A indução da expressão de metalotioneínas é o um dos efeitos intracelulares do Pb^{2+} , tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HAN et al., 1999, DOREA, DONANGELO, 2006). A interação dos metais pesados com estes SH resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000); inibição de enzimas antioxidantes estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o oxigênio singlete (O^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) e assim, induzindo aumento da peroxidação lipídica, o que induz danos ao DNA e alteração da homeostase do cálcio (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). A intoxicação de animais com Pb está intimamente associada ao metabolismo de cálcio (COWI, 2003), sendo que as proteínas ligantes de cálcio apresentam grande afinidade por chumbo, o que, por conseguinte, permite assumir a competição entre os sítios ativos de ligação de cálcio (MAHAFFEY, 1974; BÜSSELBERG, 1991; FULLMER, 1991; HAN et al., 1997; MESTEK et al., 1998; HAN et al., 2000). O chumbo ainda, pode competir com o cálcio em múltiplos sítios de ligação, reduzindo o estoque de cálcio intracelular, o que afetaria os canais de junção do tipo “gap” (SCHIRRMACHER et al., 1998). Não obstante, HAN et al. (1999), sugerem que os mecanismos de conservação orgânica do Pb podem ser similares aos de conservação orgânica do elemento ferro (Fe). Recentemente associou-se os receptores de ferro, transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2, respectivamente), presentes em diversos tipos celulares, como passíveis de transporte para diversos cátions metálicos covalentes, inclusive o Pb (BALLATORI, 2002). GUNSHIN et al. (1997) descreveram o mecanismo de entrada do Fe^{2+} e outros cátions divalentes, com o Pb, por meio de um transportador denominado transportador de cátion divalente 1 (DCT1 ou

DMT1 ou NRAMP2) dependente de potencial de membrana e acoplamento de prótons. Várias evidências apontam que alguns efeitos do Pb estão localizados no retículo endoplasmático (RE), sendo esta organela o maior sítio de armazenamento e regulação de cálcio intracelular. Por sua vez, o Pb intracelular se liga a uma proteína chaperona de peso molecular de 78 kD, conhecida como GRP78 promovendo uma falha no seu funcionamento, o que pode estimular respostas protéicas específicas via transdução por IRE1/ATF6 (proteína 1 requerente de inositol e fator de transcrição ativado 6, respectivamente) e/ou IRE1/JNK (c-Jun amino-terminal quinase) (QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003).

Conseqüentemente, verifica-se nos últimos anos, o esforço no desenvolvimento de técnicas para monitoramento e compreensão de efeitos em organismos expostos cronicamente a poluentes (SILVA et al., 2000). Portanto, como observado, há pouco conhecimento sobre os efeitos do Pb sobre o metabolismo mineral ósseo. Em virtude da escassez de dados, do conhecimento prévio da gravidade da contaminação como um problema sério de saúde pública atingindo diversos sistemas e órgãos, inclusive o tecido ósseo, torna-se importante investigar os parâmetros ósseos influenciados pelo elemento Pb nesse tecido.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar os efeitos da contaminação com acetato de chumbo no tecido ósseo de ratos adultos intoxicados durante sua fase de desenvolvimento.

Específicos:

Avaliar em animais intactos e contaminados (100 e 200 mg de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})/\text{kg}$ MC):

- A eficácia da contaminação durante o período de tratamento proposto;
- A incorporação de Pb no tecido ósseo por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (mapeamento dos elementos da amostra);
- As concentrações de Pb por meio da Espectrometria de Absorção Atômica com Chama;
- Os parâmetros bioquímicos por meio da verificação das concentrações plasmáticas de cálcio e conteúdo de cálcio e fósforo;
- Os parâmetros biométricos ósseos;
- Os parâmetros biofísicos ósseos;
- Os parâmetros biomecânicos ósseos por meio do teste de flexão a três pontos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelos do Estudo

Neste estudo experimental o modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos: Protocolo CEEA n°. 005/2008.

3.2 Animais

Utilizou-se neste experimento, 29 ratos intactos da linhagem “Wistar” (*Rattus norvegicus albinus*), do gênero masculino, com 30 dias de idade (média de peso corporal inicial de 70g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

O experimento foi realizado no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Os ratos permaneceram em biotério próprio do laboratório, durante todo o protocolo experimental, sob as seguintes condições: regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro), temperatura controlada ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentação com ração comercial e água “*ad libitum*”.

3.3 Protocolo Experimental

Para análise dos efeitos do Acetato de Chumbo - $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ - sobre variáveis ósseas, dividiu-se aleatoriamente os animais seguindo o delineamento experimental:

- Grupo Controle: 9 animais intactos tratados com salina 0,9% (0,1ml/100g MC), com o intuito de simulação da contaminação.

- Grupo C-100: 10 animais intactos intoxicados com Acetato de Chumbo (100mg/kg MC, administrados na concentração de 0,1ml/100g MC).

- Grupo C-200: 10 animais intactos intoxicados com Acetato de Chumbo (200mg/kg MC, administrados na concentração de 0,2ml/100g MC).

As doses selecionadas para intoxicação dos animais (100 mg/kg MC e 200 mg/kg MC) foram derivadas da dose máxima para ratos (500 mg/kg MC) determinada pela literatura (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005), com o objetivo de simular os níveis de exposição ambientais diárias ao chumbo em humanos (ESCRIBANO et al, 1997). A administração da salina e do acetato de chumbo foi realizada pelo método da gavagem gástrica (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005; FAZAKAS, LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005), uma vez na semana por um período de 8 semanas.

3.4 Eutanásia

Após oito semanas da administração de salina e acetato de chumbo, realizou-se decapitação dos animais, com subsequente coleta de sangue (diretamente do tronco do rato) e dissecação femoral e tibial (direita e esquerda), para coleta do material ósseo (fêmures e tíbias), os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C para as subseqüentes análises.

3.5 Parâmetros Analisados

3.5.1 Parâmetros Biométricos

Peso corpóreo e Peso dos Órgãos Acessórios Sexuais

Durante as 8 semanas de tratamento, os animais foram pesados semanalmente com o intuito de adequação da dose individual utilizada no tratamento (veículo ou contaminante), para o acompanhamento do desenvolvimento e verificação da vitalidade dos animais. Após a

eutanásia dos animais, os pesos das próstatas e vesículas seminais (em gramas) foram obtidos por meio de uma balança eletrônica (marca Chyo).

Medidas do comprimento do fêmur direito

Esta mensuração foi realizada com um paquímetro (precisão de 0,05 mm) seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tíbia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

Medidas das espessuras das diáfises femorais

Foram mensurados com o paquímetro, os diâmetros maiores (realizado na posição látero-lateral) e menores (realizado na posição ântero-posterior) da diáfise femoral, seguindo a padronização referencial: base do terceiro trocânter.

3.5.2 Parâmetros Biomecânicos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direito foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 1), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 kN). As extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a região central (das diáfises) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (ROBLING, TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO, VOLPON, 2002; AKHTER et al., 2003; AKHTER et al, 2004).

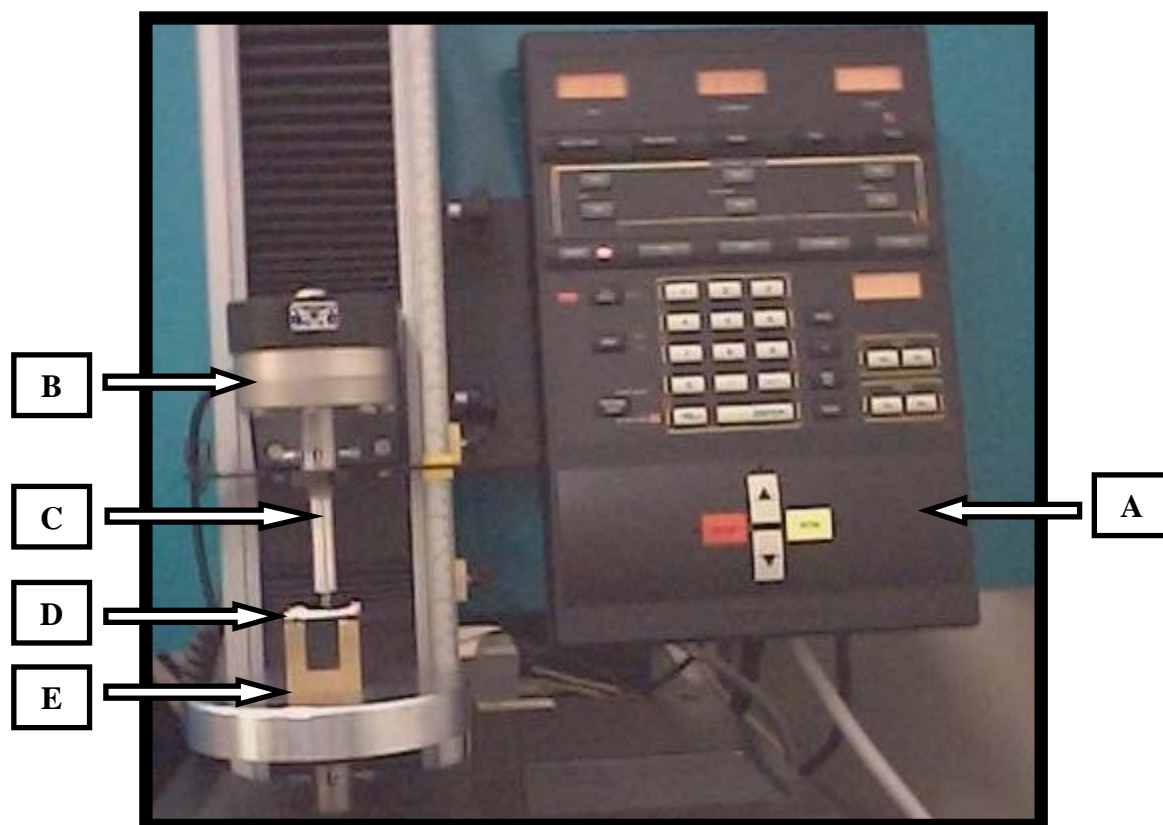


Figura 1: Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

Doze horas antes do início do ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento antecedente ao teste (ENGESAETER, EKELAND, LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994).

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 5 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra (estabilização do fêmur). Padronizou-se o tempo de acomodação em um minuto para todas as amostras e após este período, aplicou-se uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min, até o momento da fratura do osso.

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva: carga x deformação (Figura 2). Da análise das curvas obtiveram-se as seguintes propriedades biomecânicas: deformação (deslocamento) máxima, deformação (deslocamento) no ponto da fratura, carga (força) máxima e carga (força) de fratura, resiliência, tenacidade e rigidez.

Deformações (mm)

Corresponde a distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento: no limite elástico, no ponto de carga máxima e de fratura (D_1 , D_2 e D_3 respectivamente, na figura 2).

Carga no Limite Elástico (N)

Corresponde a carga que separa a fase elástica da plástica (C_1 , na figura 2). Para o tecido ósseo a fase elástica corresponde à porção linear da curva e a fase plástica, a parte não linear da mesma. (EINHORN, 1996). O ponto de união das duas corresponde ao limite elástico.

Carga Máxima (N)

Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio (C_2 , na figura 2).

Carga de Fratura (N)

Corresponde a carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio (C_3 , na figura 2).

Resiliência (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, o impacto que a amostra suporta sem deformar-se permanentemente.

Tenacidade (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o ponto de ruptura. Representa a energia necessária para provocar a ruptura do material, ou seja, a capacidade de uma estrutura resistir a uma força de impacto depende da tenacidade do material.

Rigidez (N/mm)

Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD et al., 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.

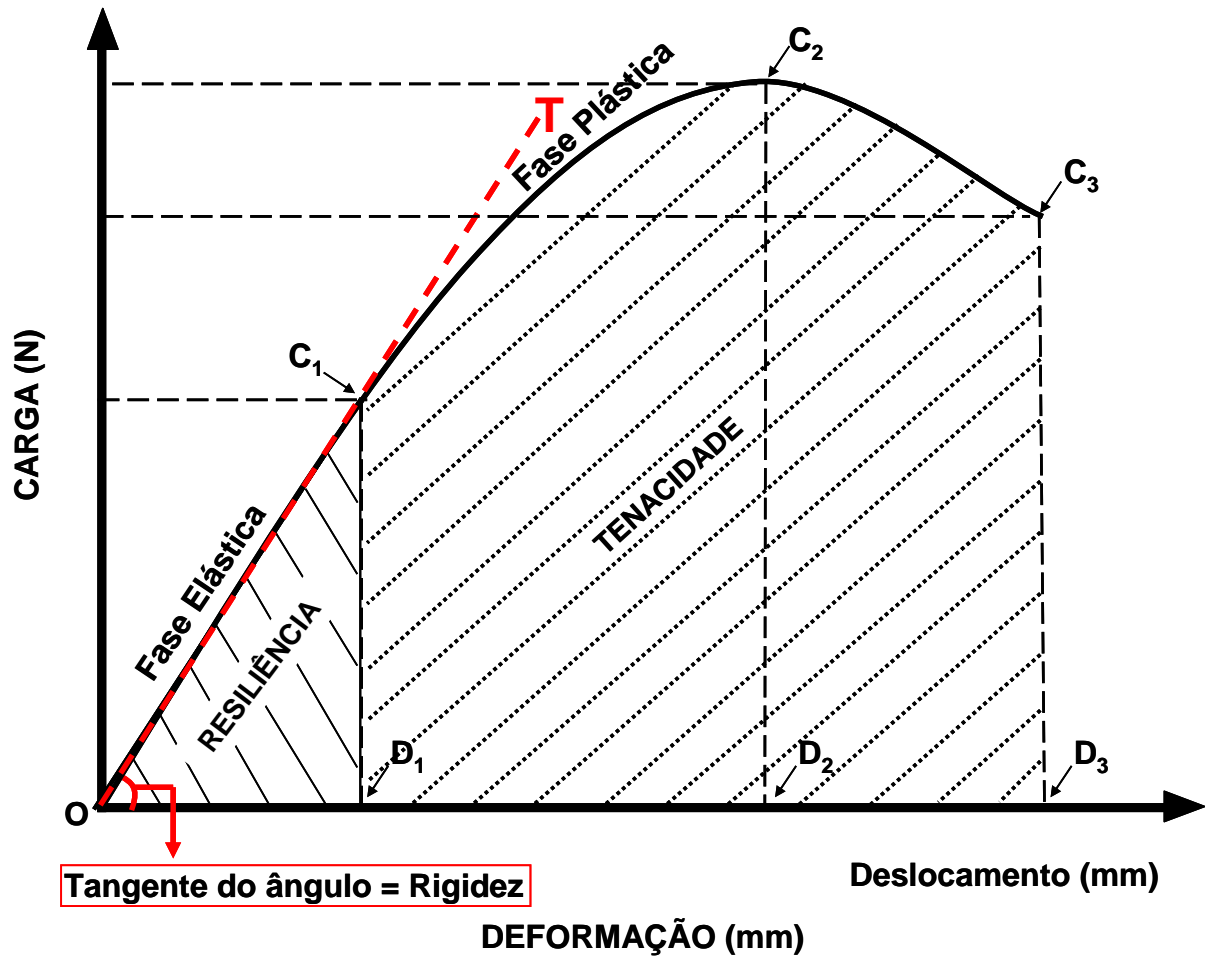


Figura 2: Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas: C_1 : Carga no Limite Elástico; D_1 : Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C_2 : Carga Máxima; D_2 : Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C_3 : Carga de Fratura; D_3 : Deformação (deslocamento) na Carga de Fratura (máxima); $O/C_1/D_1$: a área desta região corresponde a Resiliência (a energia absorvida na fase elástica); $C_1/C_3/D_1/D_3$: a área desta região corresponde à tenacidade (energia absorvida até a carga máxima); T : tangente da região O/C_1 da curva, sendo o ângulo desta correspondente a Rigidez.

3.5.3 Parâmetros Físicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures dos animais (grupos controle e intoxicados), mantiveram-se os ossos (imersos em água destilada) em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa

na temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se o peso seco (Ps). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral - Pm), os ossos foram colocados em uma mufla na temperatura de 800° C por um período de 24 horas (NORDSLETTEN et al., 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica (marca Chyo).

Baseando-se no Princípio de Arquimedes, calcularam-se o volume ósseo e subsequentemente densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.5.4 Propriedades Bioquímicas

Conteúdo de Cálcio e Fósforo do Fêmur Direito

Com a obtenção do material mineral dos fêmures direitos, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico o conteúdo de cálcio e fósforo dos ossos foram determinados, com a utilização do kit comercial específico Labtest®.

Conteúdo de Cálcio Plasmático

O sangue reservado na eutanásia foi centrifugado e dele foi extraído o plasma que foi armazenado a -20° C até a presente análise. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico as concentrações de cálcio plasmático foram determinadas, com a utilização do kit comercial específico Labtest®.

3.5.5 Análise Microestrutural

Para a detecção do elemento chumbo, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nas tíbias direitas dos animais. Utilizou-se um microscópio ZEISS (modelo DSM 940A) acoplado a um detector de dispersão energético de raios-X (EDX) e um software

analisador de imagens (INCA). As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural – Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Para o preparo das amostras, realizaram-se dois cortes transversais na diáfise das tíbias direitas, segundo o padrão referencial: tuberosidade da tibia seguindo 5 mm abaixo desta, o que formou uma baguete óssea de 5 mm que posteriormente foi cortada longitudinalmente, dividindo a baguete em duas porções igualmente dimensionadas (Figura 3), objetivando a análise da superfície externa e superfície interna deste osso.

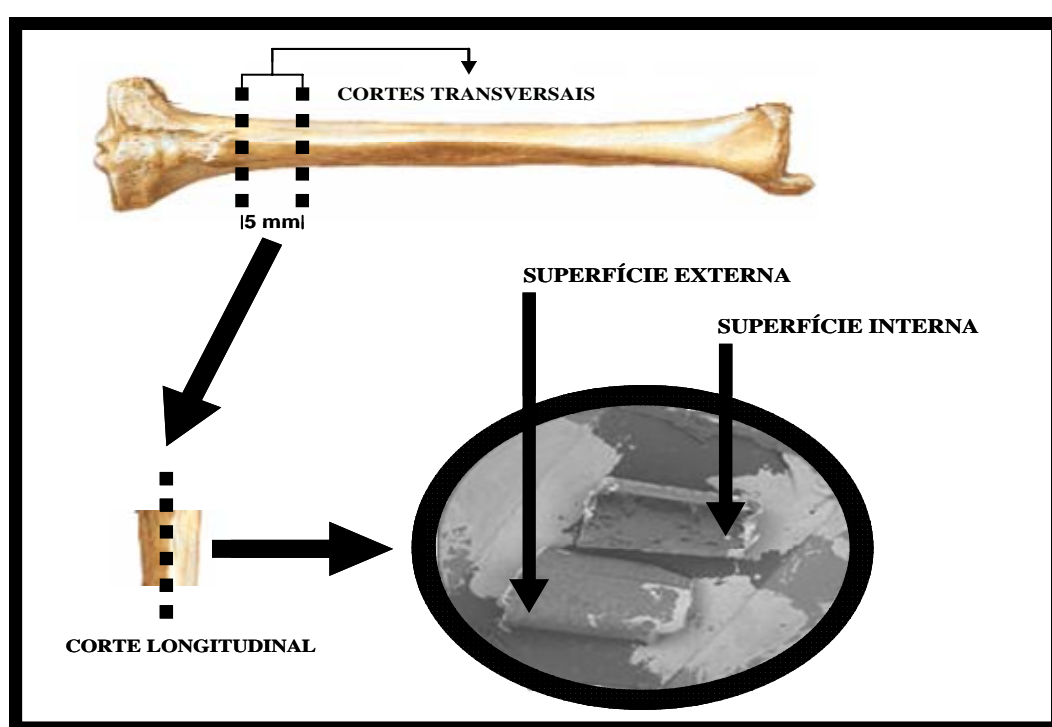


Figura 3: Esquema da preparação de uma amostra da diáfise tibial para ser analisada por MEV.

Após a preparação das amostras, houve fixação destas com fita de carbono, acoplando-as aos suportes próprios do aparelho. Em seguida, foi passada uma tinta à base de prata nas extremidades das amostras com o objetivo de facilitação do fluxo dos elétrons. Finalmente as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (Sputter Coater – Balzers ISCD 004 Bal Tec), tornando-as condutoras e, portanto, prontas para observação no microscópio eletrônico de varredura. O aumento utilizado foi de 200 vezes. Para detectar a presença do elemento chumbo nas superfícies externa e interna da tíbia, utilizou-se técnica específica da MEV denominada mapeamento da amostra, o que permitiu a identificação da composição elemental da amostra, inclusive da incorporação ou não de chumbo nestas.

3.5.6 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

Para determinação das concentrações de chumbo foi realizado espectrometria de absorção atômica com chama (EAAC) nas tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais. Inicialmente os ossos foram liofilizados por 24 horas. Subseqüentemente, foram triturados por um triturador criogênico em dois ciclos de 9 minutos cada. Em seguida, retirou-se 0,2 gramas por amostra e adicionou-se aos tubos de ensaio, 3 ml da solução HNO_3 $7,0 \text{ mol l}^{-1}$ e 1 ml de H_2O_2 $30 \% \text{ v v}^{-1}$. Por conseguinte, foi realizada digestão desta solução no aparelho microondas e diluição em 10 ml de água deionizada, conseqüentemente deixando as amostras prontas para a leitura. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Grupo de Análise Instrumental e Aplicada – Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em cada grupo (média \pm desvio padrão - D.P.) foram comparados entre si por meio do teste não-paramétrico de Kruskal Wallis e os testes de comparações múltiplas de Dunn e Fischer indicaram em quais grupos havia diferenças. Toda análise foi realizada por meio do software Minitab adotando-se um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Esta análise foi assessorada pelo departamento de Estatística da Universidade Federal de São Carlos.

3.7 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem as normas da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar versão on-line, acesso em novembro de 2008.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Microestrutural

As figuras 4 e 5 mostram a incorporação ou não de chumbo nas superfícies externas e internas das tíbias direitas dos animais dos diferentes grupos experimentais (A: controle, B: C-100 e C: C-200) por meio da técnica de mapeamento do elemento chumbo na amostra realizado por microscopia eletrônica de varredura. Os pontos azuis nas figuras representam o elemento Pb.

Verifica-se a incorporação do Pb tanto na superfície externa como na superfície interna das tíbias dos animais dos grupos experimentais contaminados (C-100 e C-200), onde há presença de pontos azuis representando o elemento Pb. No grupo controle não há presença de Pb.

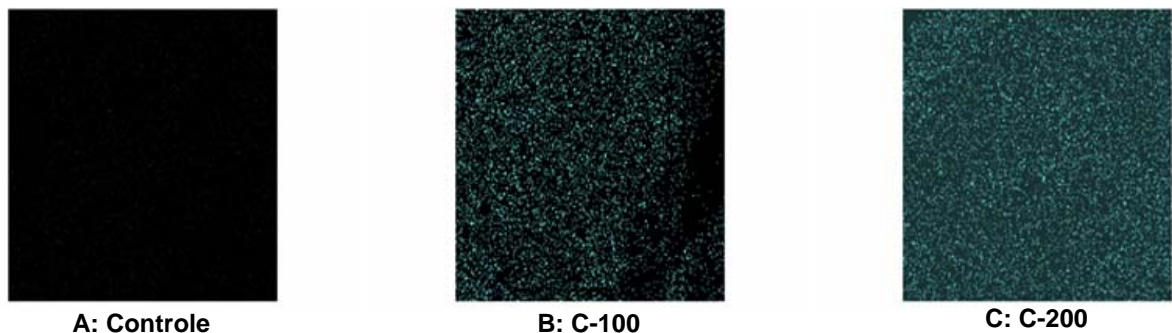


Figura 4: Micrografia da superfície externa de tíbias direitas, obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (mapeamento da amostra). Os pontos azuis observados nas figuras B e C (animais contaminados com 100 e 200 mg de acetato de Pb/kg PC, respectivamente) representam o elemento Pb incorporado ao tecido ósseo. Nota-se na figura A (animais controles), a ausência de Pb.

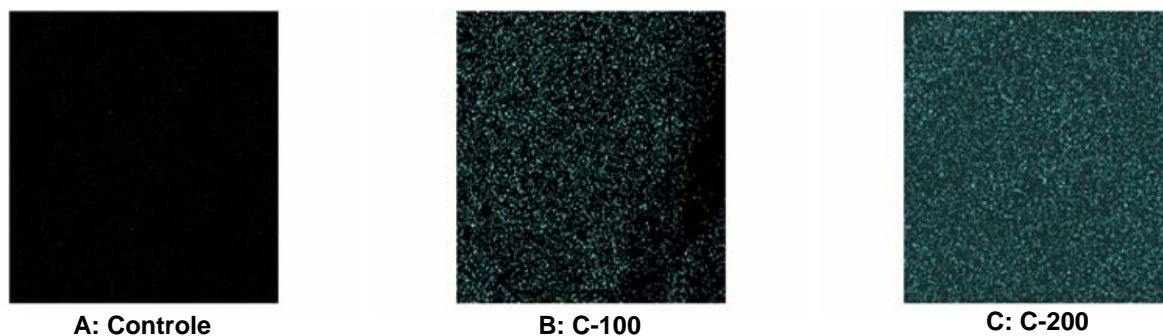


Figura 5: Micrografia da superfície interna de tíbias direitas, obtida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (mapeamento da amostra). Os pontos azuis observados nas figuras B e C (animais contaminados com 100 e 200 mg de acetato de Pb/kg PC, respectivamente) representam o elemento Pb incorporado ao tecido ósseo. Nota-se na figura A (animais controles), a ausência de Pb.

4.2 Concentrações de Chumbo

A tabela 1 (média \pm DP) mostra as diferentes concentrações de Pb (ng Pb/mg osso) mensuradas por meio da espectrometria de absorção atômica com chama em tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200).

Verifica-se por meio da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal Wallis a existência de diferenças significativas ($p=0,001$) entre os grupos. O correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-100 (na tabela representada por *), Controle vs. C-200 (representado na tabela por *) e C-100 vs. C-200 (na tabela representada por #). Portanto houve aumento da concentração dose dependente de Pb nos grupos C-100 e C-200.

Tabela 1: Concentração de Pb, nas tíbias esquerdas dos animais nos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
[Pb] (ng Pb/mg osso)	1,650 ± 2,451	44,520 ± 17,008*	84,720 ± 18,617* #

Média ± DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, # vs. C – 100; () = nº. animais.

4.3 Parâmetros Biométricos

4.3.1 Massa Corporal

A figura 6 mostra a média das massas corporais dos animais dos grupos Controle, C-100 e C-200 durante as 8 semanas de tratamento. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos. O asterisco (grupo C-100) no desenho esquemático representa a presença de um ponto atípico. Nesse caso, houve um animal do grupo C-100, que apresentou uma média de sua massa maior que os demais valores do grupo. Porém, pelo número total da amostra, este valor não compromete a análise estatística.

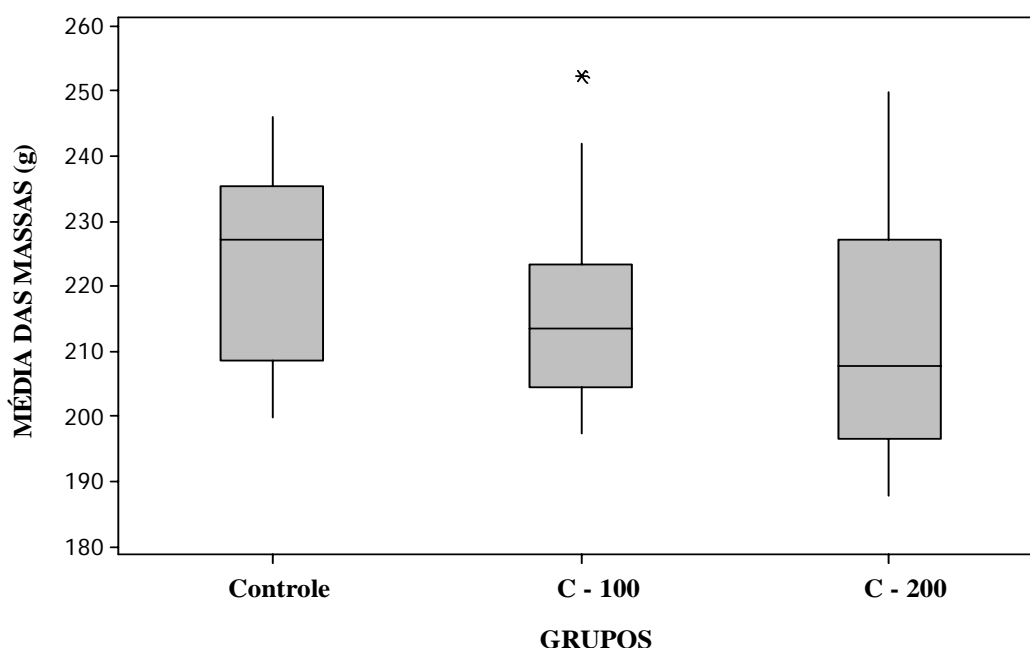


Figura 6: Representação Esquemática da Média das massas (g) durante as 8 semanas de tratamento dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana e o asterisco indica a presença de um ponto atípico. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos, para $p < 0,05$.

As figuras 7 e 8 apresentam, respectivamente, os valores da massa corporal inicial (do início do tratamento) e final (finalizado as 8 semanas de tratamento) dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos, tanto para massa inicial, quanto para massa final. O asterisco (grupo C-200) no desenho esquemático representa a presença de um ponto atípico. Nesse caso, houve um animal do grupo C-200, que apresentou um valor da massa inicial maior que os demais valores do grupo. Porém, pelo número total da amostra, este valor não compromete a análise estatística.

A tabela 2 apresenta os valores médios com seus respectivos desvios padrões da massa inicial, massa final e média das massas durante o tratamento nos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200).

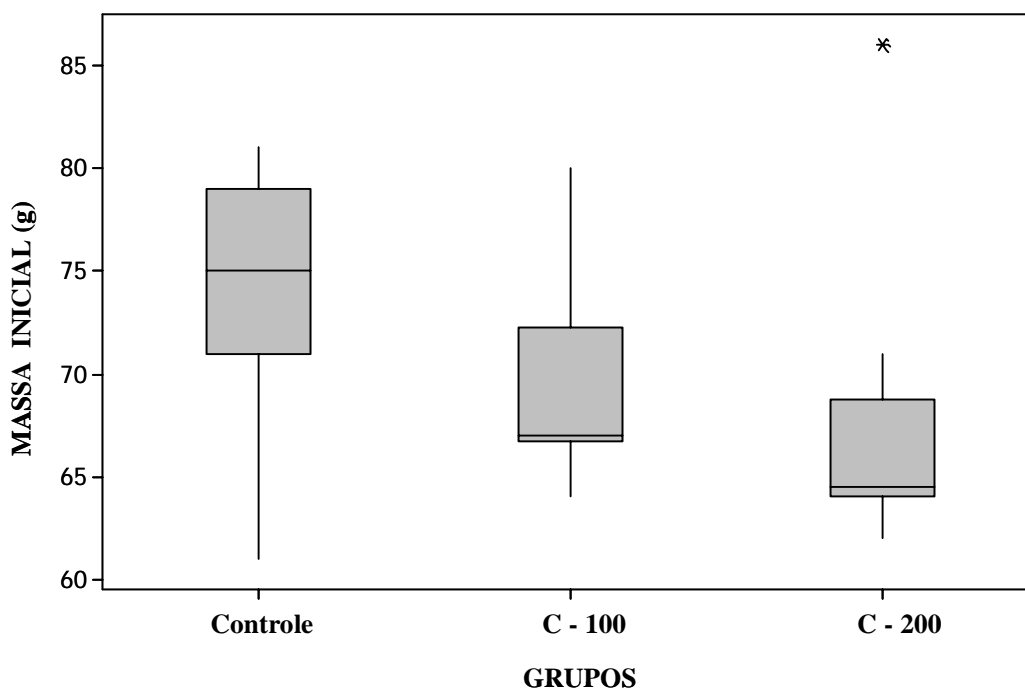


Figura 7: Representação Esquemática da Massa Corporal Inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa a mediana e o asterisco indica a presença de um ponto atípico. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

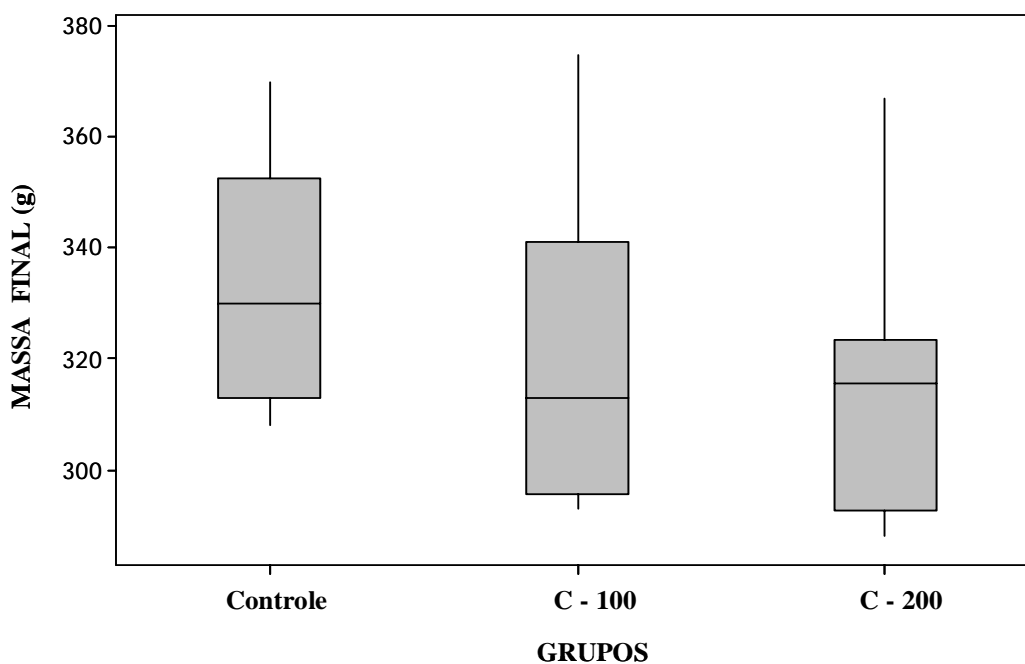


Figura 8: Representação Esquemática da Massa Corporal Final (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa a mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

Tabela 2: Massa corporal (PC) inicial e final, e ganho de massa em gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
MC Inicial (g)	74,11 ± 6,19	69,60 ± 5,46	69,00 ± 8,35
MC Final (g)	322,78 ± 21,73	320,50 ± 27,82	317,40 ± 24,23
Média do MC (g)	222,51 ± 16,07	216,93 ± 17,34	211,95 ± 19,81

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = nº. animais.

4.3.2 Massa dos Órgãos Sexuais Acessórios

A tabela 3 expressa as massas dos órgãos sexuais acessórios: próstatas e vesículas seminais (g/100g MC) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). Para a próstata, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos.

Para o peso das vesículas seminais, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p=0,01$). O correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle e C-100 (na tabela representada por *) e C-100 vs. C-200 (na tabela representada por #). Portanto, houve aumento das massas das vesículas seminais do grupo C-100 quando comparado às massas do grupo Controle e houve diminuição das massas das vesículas do grupo C-200, quando comparado aos valores das massas das vesículas do grupo C-100.

Tabela 3: Massa dos órgãos sexuais acessórios: próstata e vesículas seminais, dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
Próstata (g/ 100g MC)	0,078 ± 0,012	0,084 ± 0,026	0,090 ± 0,011
Vesículas Seminais (g/ 100g MC)	0,118 ± 0,011	0,141 ± 0,012*	0,110 ± 0,024 #

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. C – 100; () = n°.

4.3.3 Análise do Fêmur Direito

As figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 expressam respectivamente, os valores do comprimento, diâmetro maior e menor (em milímetros), peso úmido, peso imerso, peso seco e peso das cinzas (em gramas) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros descritos acima. Os dois asteriscos (grupo Controle), no desenho esquemático número 11, representam a presença de dois pontos atípicos. Nesse caso, houve um animal do grupo Controle, que apresentou um valor de diâmetro maior do fêmur direito superior aos demais valores do grupo e outro que apresentou valor inferior, respectivamente. Porém, pelo número total da amostra, este valor não compromete a análise estatística. A tabela 4 apresenta os valores médios com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

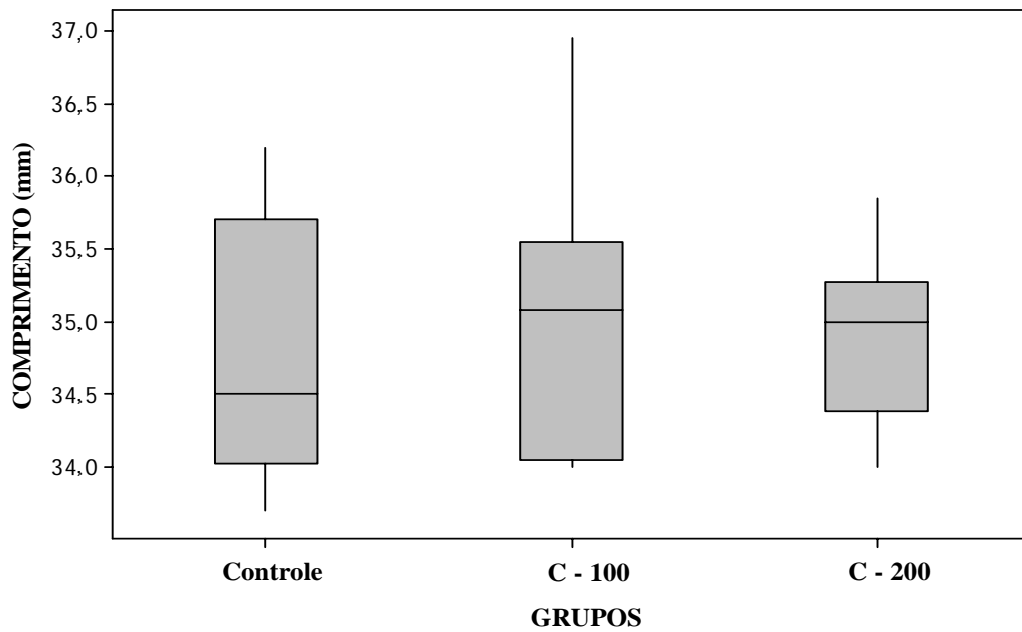


Figura 9: Representação Esquemática do Comprimento (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

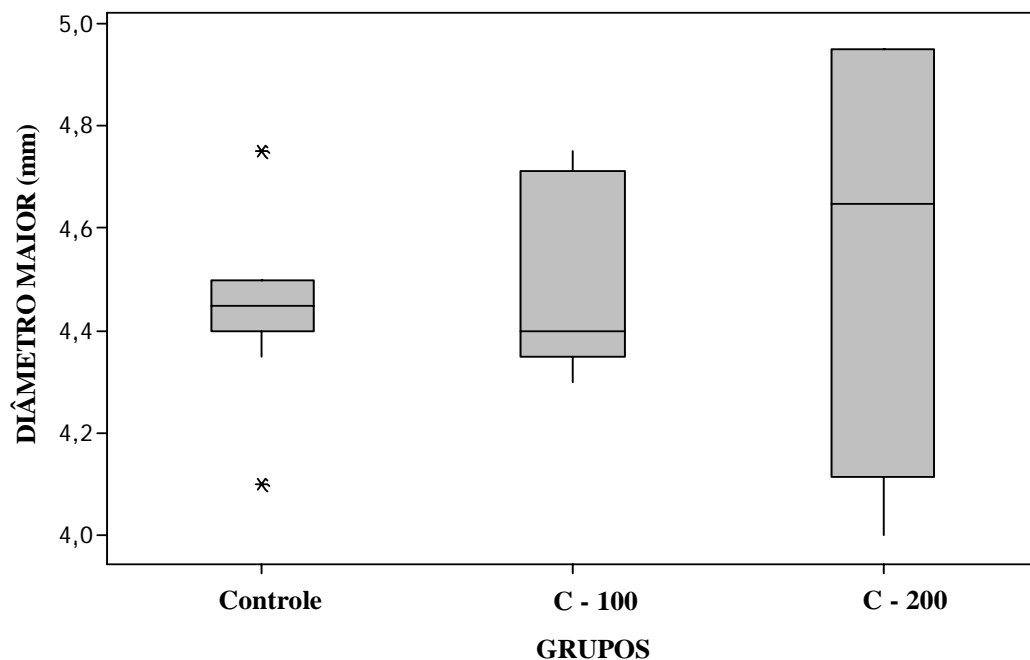


Figura 10: Representação Esquemática do Diâmetro Maior (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana e os asteriscos indicam a presença de dois pontos atípicos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

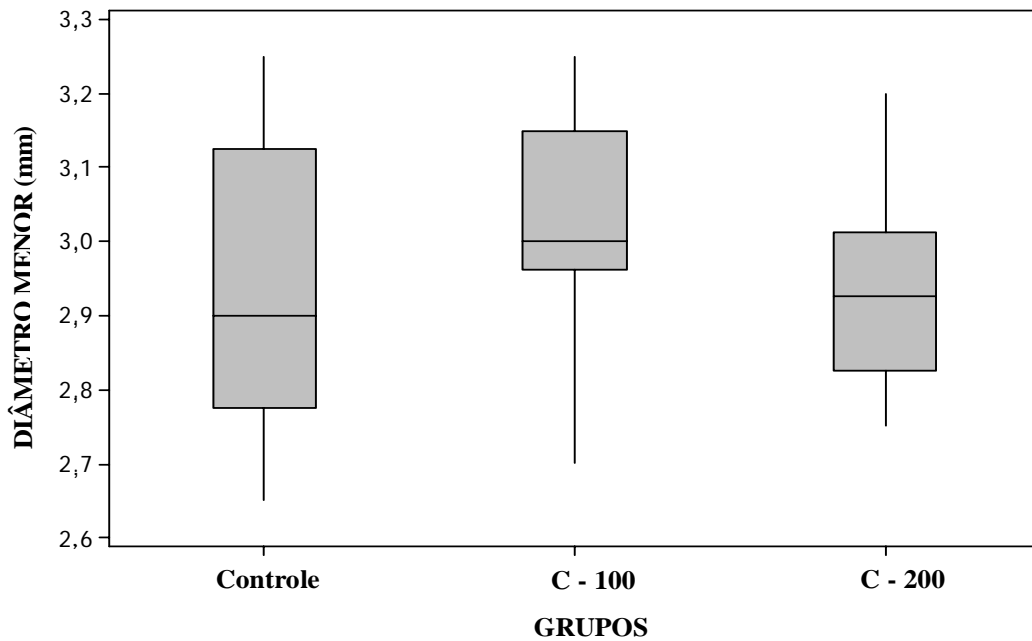


Figura 11: Representação Esquemática do Diâmetro Menor (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças estatísticas significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

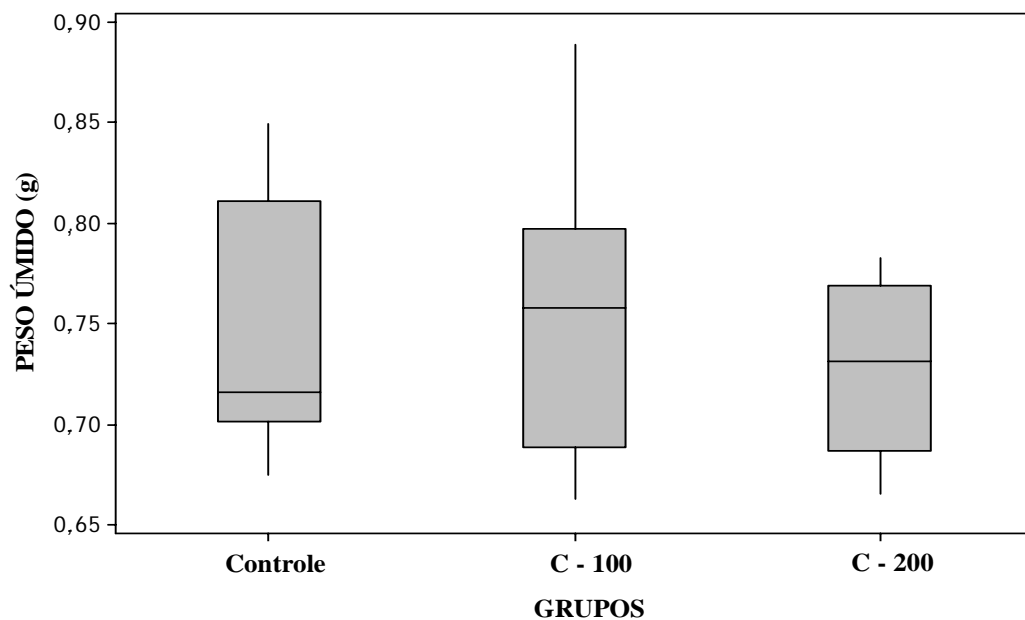


Figura 12: Representação Esquemática do Peso Úmido (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

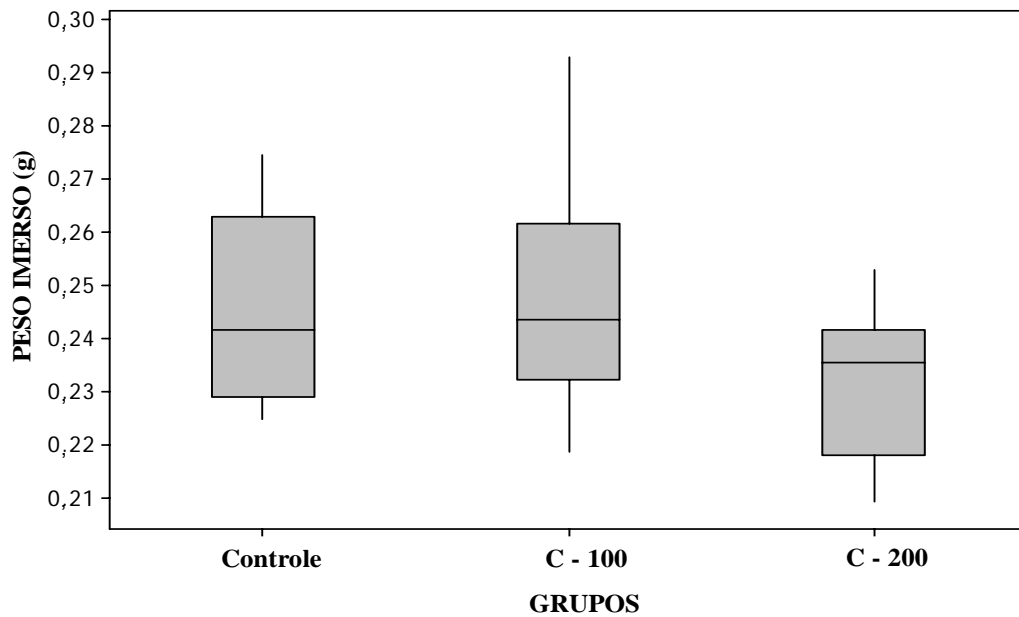


Figura 13: Representação Esquemática do Peso Imerso (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

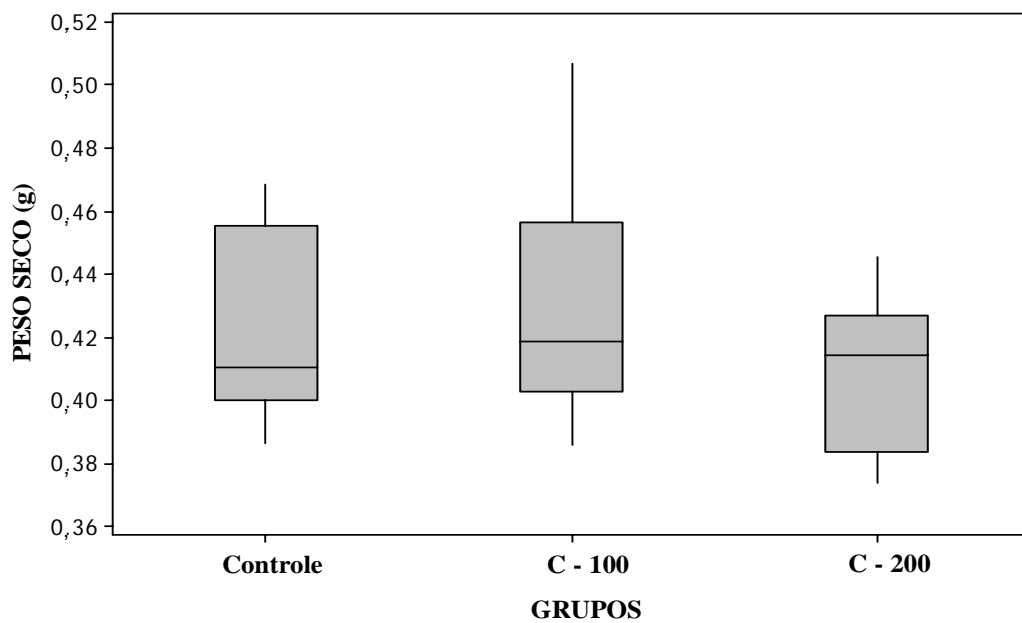


Figura 14: Representação Esquemática do Peso Seco (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

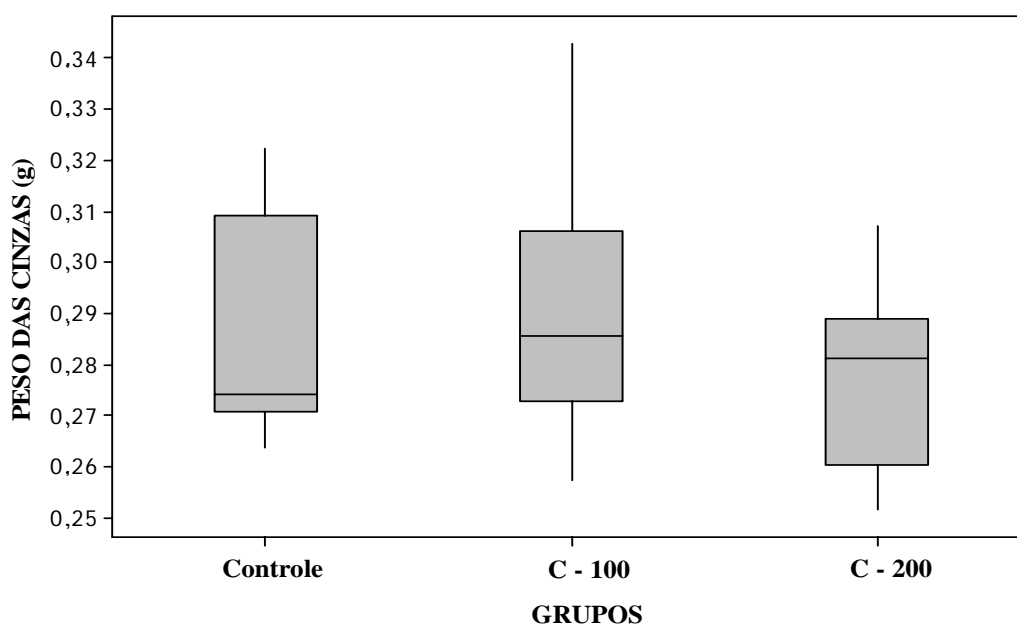


Figura 15: Representação Esquemática do Peso das Cinzas (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

Tabela 4: Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises femorais em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
Comprimento (mm)	34,800 ± 0,902	35,055 ± 0,914	34,905 ± 0,585
Diâmetro Maior (mm)	4,450 ± 0,169	4,505 ± 0,183	4,570 ± 0,399
Diâmetro Menor (mm)	2,938 ± 0,199	3,020 ± 0,158	2,930 ± 0,139
Peso Úmido (g)	0,750 ± 0,064	0,755 ± 0,072	0,725 ± 0,043
Peso Imerso (g)	0,246 ± 0,018	0,248 ± 0,022	0,231 ± 0,014
Peso Seco (g)	0,424 ± 0,030	0,430 ± 0,037	0,408 ± 0,025
Peso das Cinzas (g)	0,287 ± 0,022	0,291 ± 0,026	0,277 ± 0,017

Média ± DP; () = n°. animais.

4.4 Parâmetros Físicos

As figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21 expressam, respectivamente, os valores das propriedades físicas: percentual ósseo de água, de material mineral e de material orgânico, volume ósseo (cm^3), densidade mineral e óssea (g/cm^3) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros: percentual ósseo de água, de material orgânico e de material mineral, volume ósseo e densidade mineral. O asterisco (grupo Controle) no desenho esquemático 20 (% Material Orgânico) representa a presença de um ponto atípico. Nesse caso, houve um animal do grupo Controle, que apresentou um percentual de material orgânico abaixo dos demais valores do grupo. Porém, pelo número total da amostra, este valor não compromete a análise estatística.

Para o parâmetro densidade óssea (figura 21), o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p=0,0371$). O correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 (representado na tabela como *) e C-100 vs. C-200 (representado na tabela como #). Portanto, para as duas diferenças significativas apontadas, houve diminuição da densidade óssea do grupo C-200, quando comparada às densidades ósseas dos grupos Controle e C-100, respectivamente.

A tabela 5 apresenta os valores médios com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

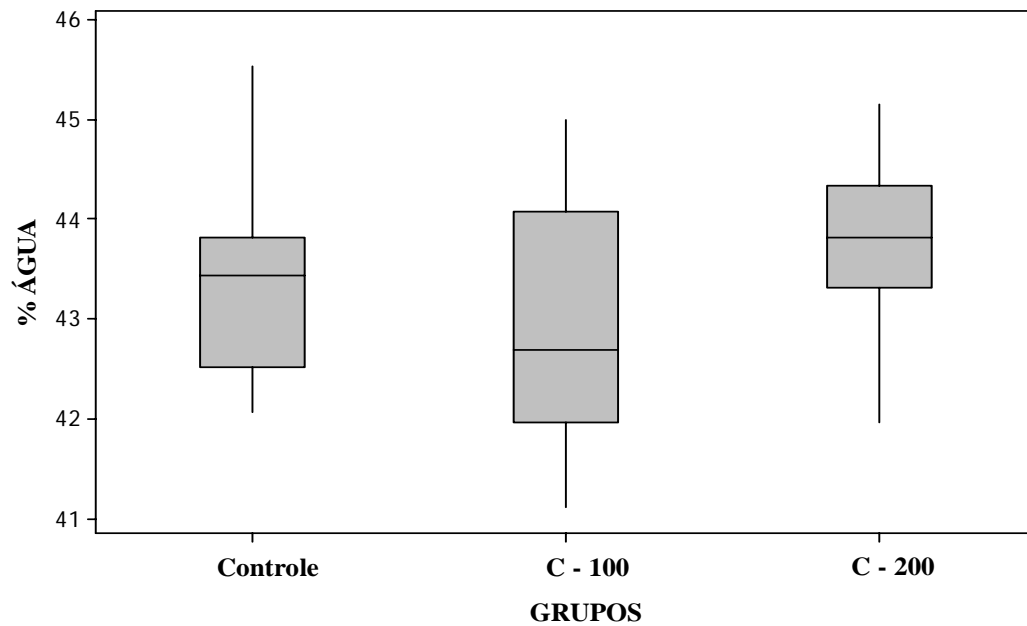


Figura 16: Representação Esquemática da Porcentagem de Água dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

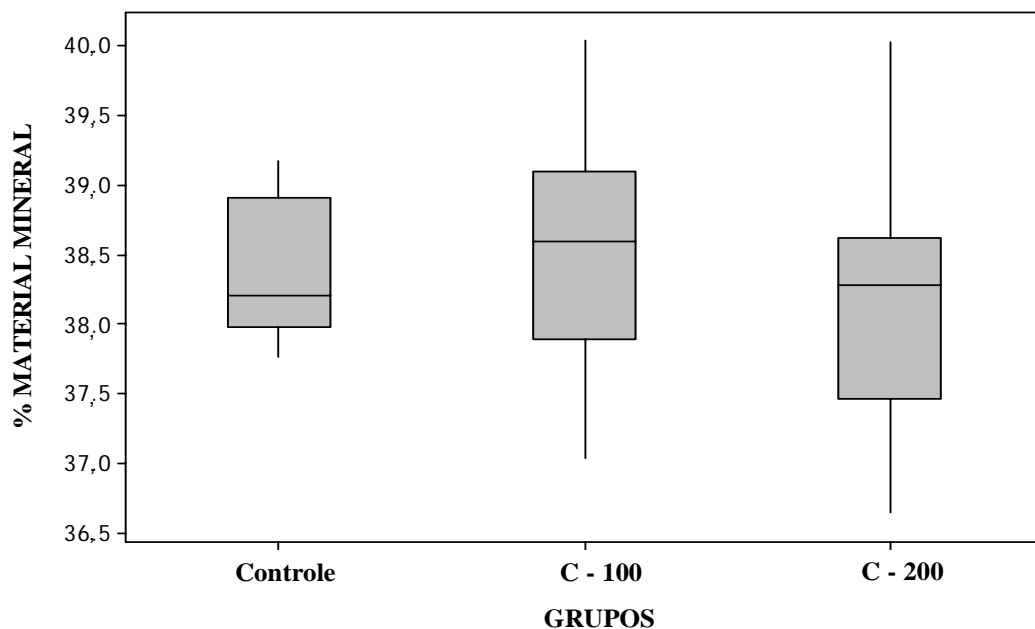


Figura 17: Representação Esquemática da Porcentagem de Material Mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

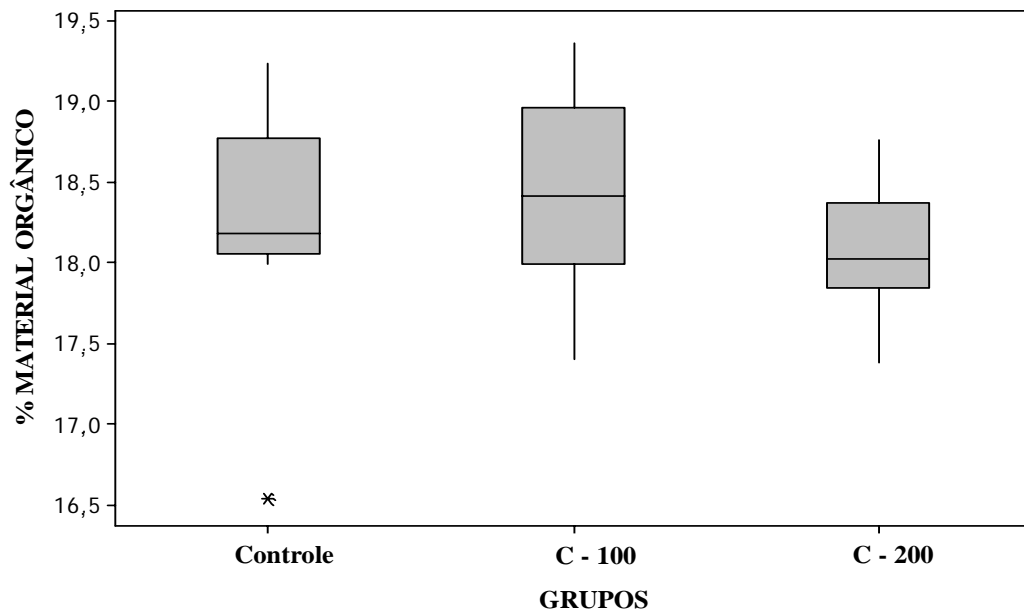


Figura 18: Representação Esquemática da Porcentagem de Material Orgânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana e o asterisco indica a presença de um ponto atípico. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

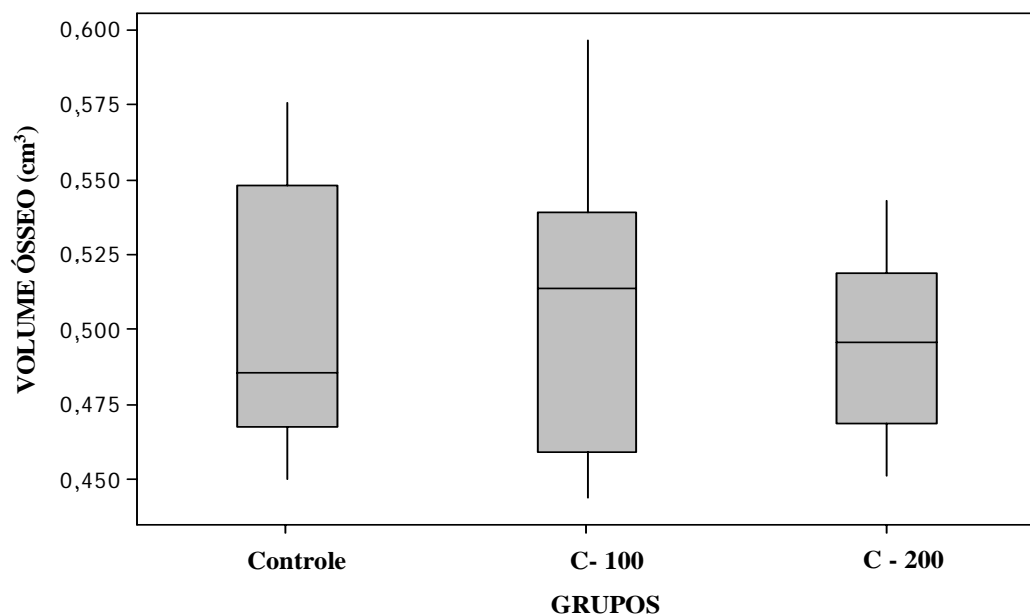


Figura 19: Representação Esquemática do Volume Ósseo (cm^3) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

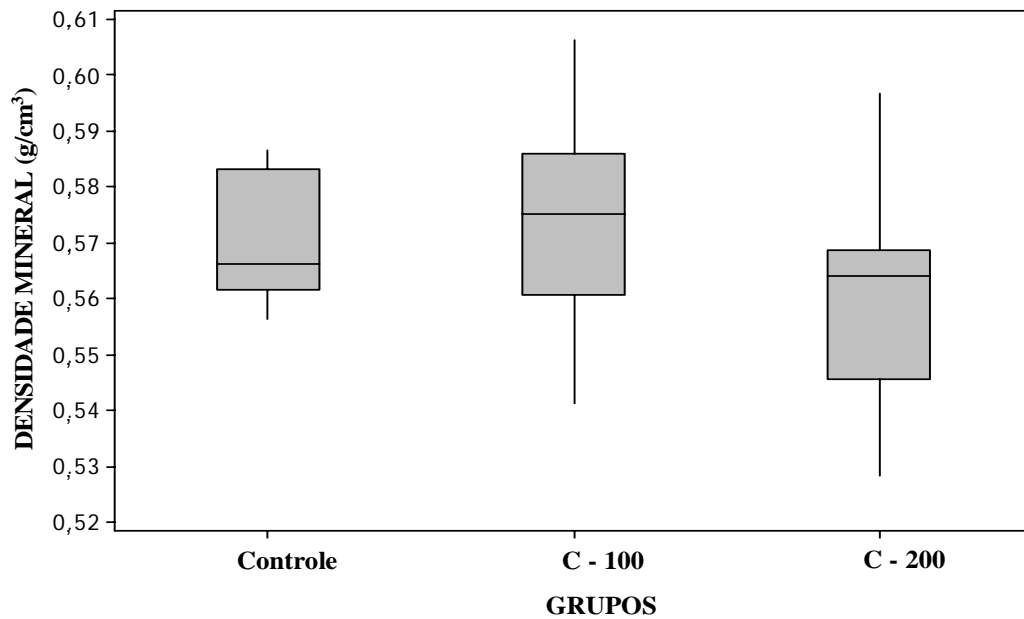


Figura 20: Representação Esquemática da Densidade Mineral (g/cm^3) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

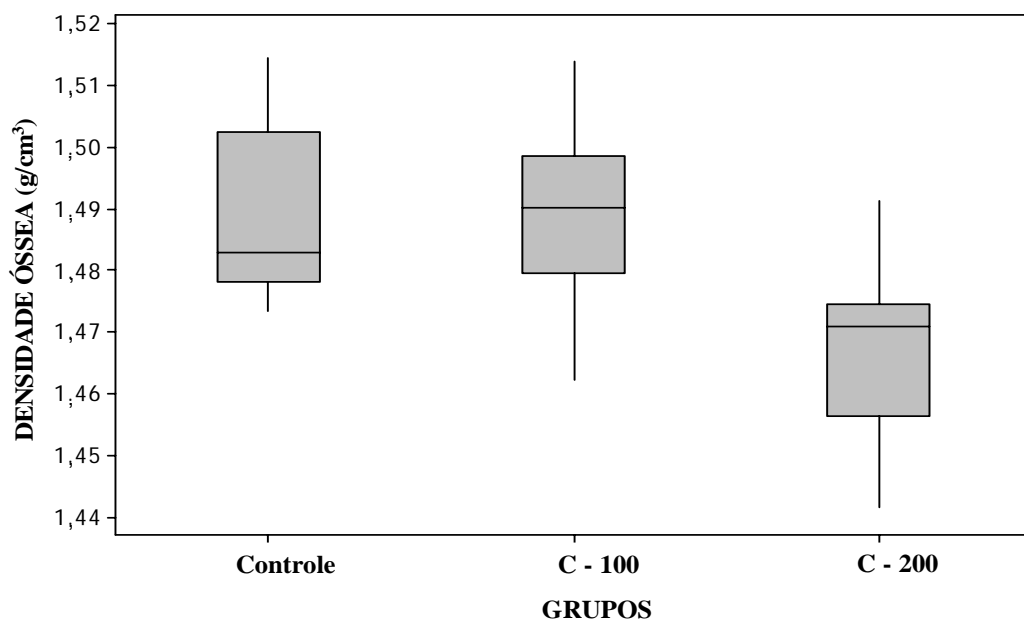


Figura 21: Representação Esquemática da Densidade Óssea (g/cm^3) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p = 0,0371$) entre os grupos e o correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 e C-100 vs. C-200, para $p < 0,05$.

Tabela 5: Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volume Ósseo (em cm³), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm³), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
Água no Osso (%)	43,373 ± 1,034	43,005 ± 1,303	43,731 ± 0,868
Material Mineral (%)	38,373 ± 0,507	38,553 ± 0,855	38,180 ± 0,918
Material Orgânico (%)	18,254 ± 0,761	18,442 ± 0,648	18,088 ± 0,432
Volume Ósseo (cm ³)	0,504 ± 0,046	0,507 ± 0,050	0,494 ± 0,030
Densidade Mineral (g/cm ³)	0,571 ± 0,011	0,574 ± 0,018	0,560 ± 0,018
Densidade Óssea (g/cm ³)	1,489 ± 0,014	1,489 ± 0,015	1,467 ± 0,014* #

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. C – 100; () = n°. animais.

4.5 Análise Bioquímica

A tabela 6 expressa o conteúdo de fósforo ósseo, cálcio ósseo e cálcio plasmático (mg/dl plasma), mensurados por meio de espectrofotometria das cinzas dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros: fósforo e cálcio ósseo.

Ademais, para o parâmetro cálcio plasmático, verifica-se por meio da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a existência de diferenças significativas (p=0,01) entre os grupos. O correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 (na tabela representada por *) e C-100 vs. C-200 (na tabela representada por #). Portanto, para a diferença significativa apontada, houve diminuição dos valores de cálcio plasmático do grupo C-200, quando comparado aos valores de cálcio plasmático dos grupos Controle e C-100, respectivamente.

Tabela 6: Conteúdo de Fósforo Ósseo, Cálcio Ósseo e Cálcio Plasmático das cinzas dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle (9)	C-100 (10)	C-200 (10)
Fósforo Ósseo (mg)	59,16 ± 4,69	64,20 ± 7,72	58,68 ± 4,37
Cálcio Ósseo (mg)	100,93 ± 11,70	102,34 ± 20,70	92,23 ± 13,81
Cálcio Plasmático (mg/dl plasma)	9,94 ± 0,51	9,77 ± 0,45	7,52 ± 1,46* #

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. C – 100; () = n°. animais.

4.6 Parâmetros Biomecânicos

As figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 expressam, respectivamente, os parâmetros biomecânicos: deslocamento no ponto da fratura (mm), força máxima (N), rigidez (N/mm), tenacidade (J), deslocamento máximo (mm), resiliência (J) e carga da fratura (N), mensurados por meio do ensaio biomecânico, dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200). Para os parâmetros deslocamento no ponto da fratura (mm), força máxima (N), rigidez (N/mm), tenacidade (J), figuras 22, 23, 24 e 25 respectivamente, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos.

Para o parâmetro deslocamento máximo (figura 26), o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas (p=0,0194) entre os grupos e o correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 (na tabela representada por *). Portanto, para a diferença significativa apontada, houve diminuição dos valores de deslocamento máximo do grupo C-200, quando comparado aos valores de deslocamento máximo do grupo Controle.

Além disso, para o parâmetro resiliência (figura 27) o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas (p=0,0463) e o teste de Fisher (de comparações múltiplas) indicou diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 (na tabela representada por *) e C-100 vs. C-200 (na tabela representada por #). Portanto, para as diferenças significativas apontadas, houve diminuição dos valores de resiliência do grupo

C-200, quando comparado aos valores de resiliência do grupo Controle e C-100, respectivamente.

Para o parâmetro carga da fratura (figura 28), verifica-se por meio da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a existência de diferenças significativas ($p=0,0371$) entre os grupos e o correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: C-100 vs. C-200 (na tabela representada por #). Portanto, para a diferença significativa apontada, houve diminuição dos valores de carga de fratura do grupo C-200, quando comparado aos valores de carga de fratura do grupo C-100. O asterisco (grupo C-100) no desenho esquemático 28 (carga da fratura) representa a presença de um ponto atípico. Nesse caso, houve um animal do grupo C-100, que apresentou um valor de carga da fratura muito maior que os demais valores do grupo. Porém, pelo número total da amostra, este valor não compromete a análise estatística.

A tabela 7 apresenta os valores médios com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

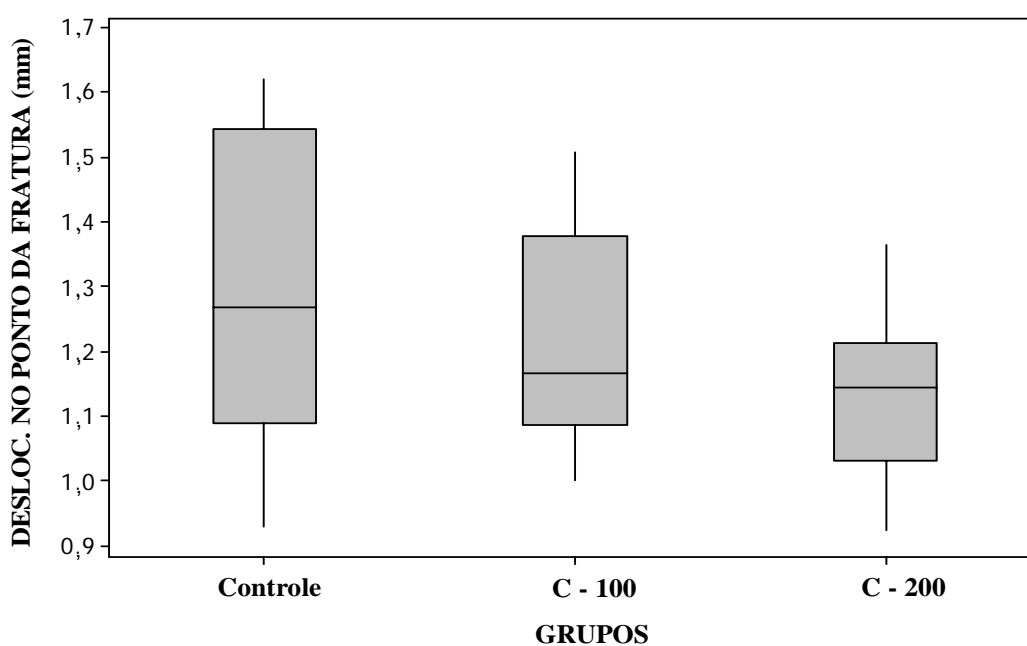


Figura 22: Representação Esquemática do Deslocamento no Ponto na Fratura (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p<0,05$.

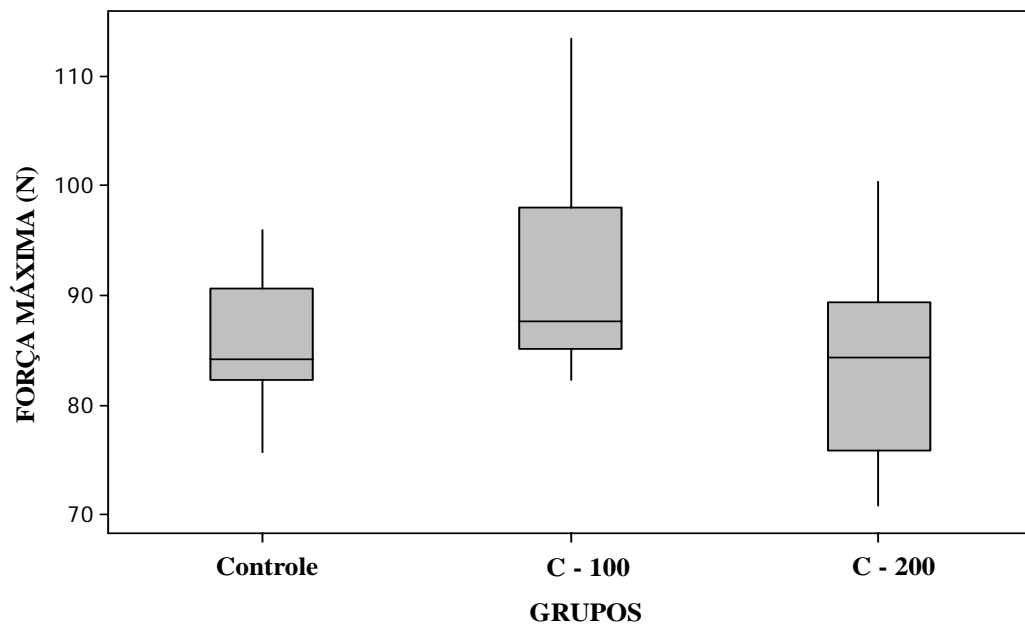


Figura 23: Representação Esquemática da Força Máxima (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

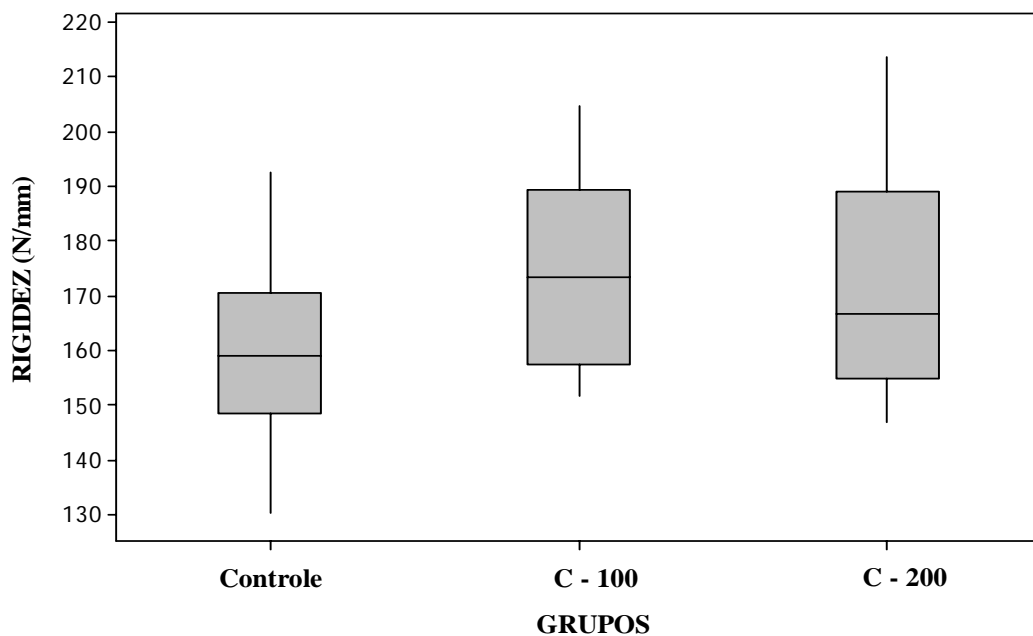


Figura 24: Representação Esquemática da Rigidez (N/mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

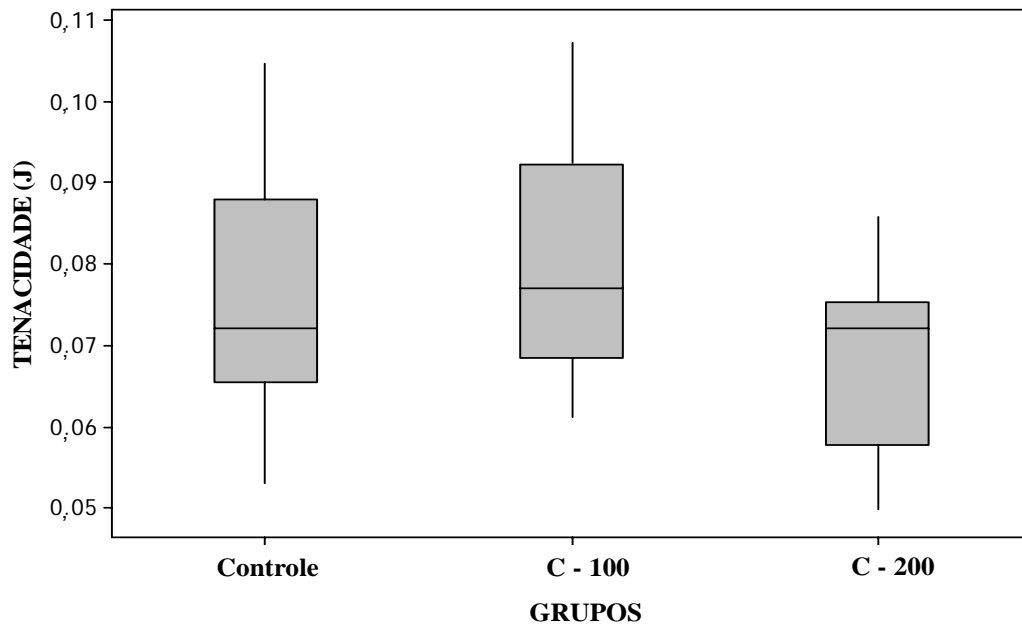


Figura 25: Representação Esquemática da Tenacidade (J) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os grupos para $p < 0,05$.

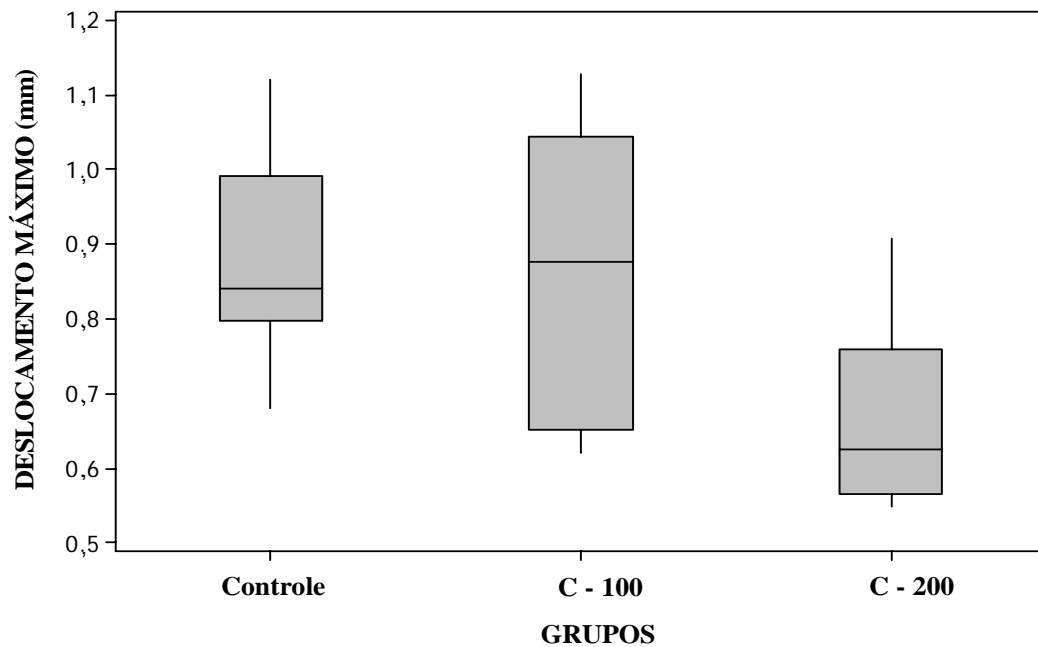


Figura 26: Representação Esquemática do Deslocamento Máximo (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p = 0,0194$) entre os grupos e o correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. I-200 para $p < 0,05$.

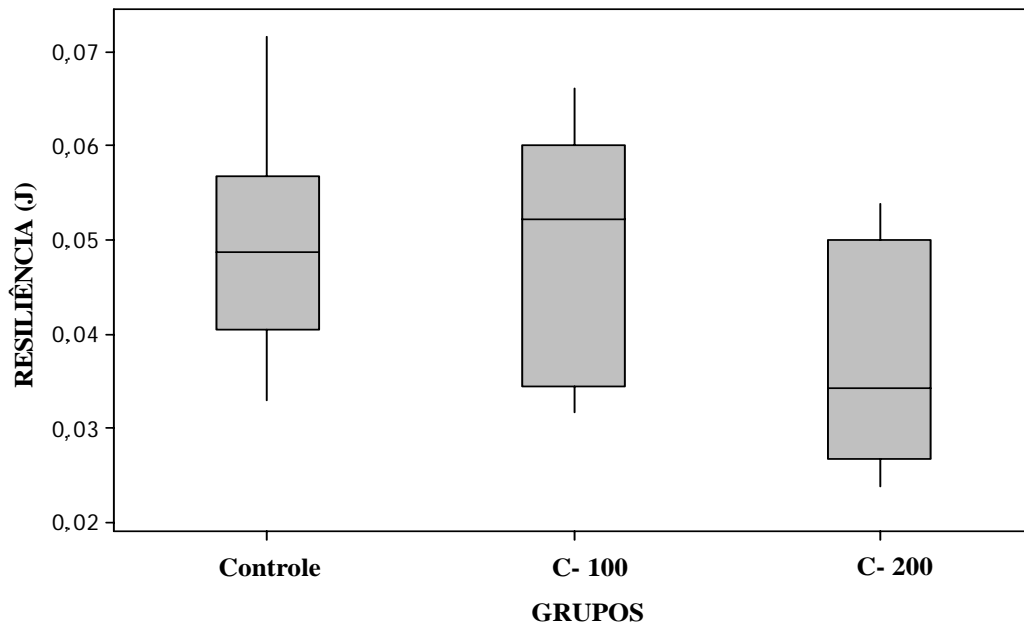


Figura 27: Representação Esquemática da Resiliência (J) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p=0,0463$) e o teste de Fisher (de comparações múltiplas) indicou diferenças significativas entre os grupos: Controle vs. C-200 e C-100 vs. C-200 para $p<0,05$.

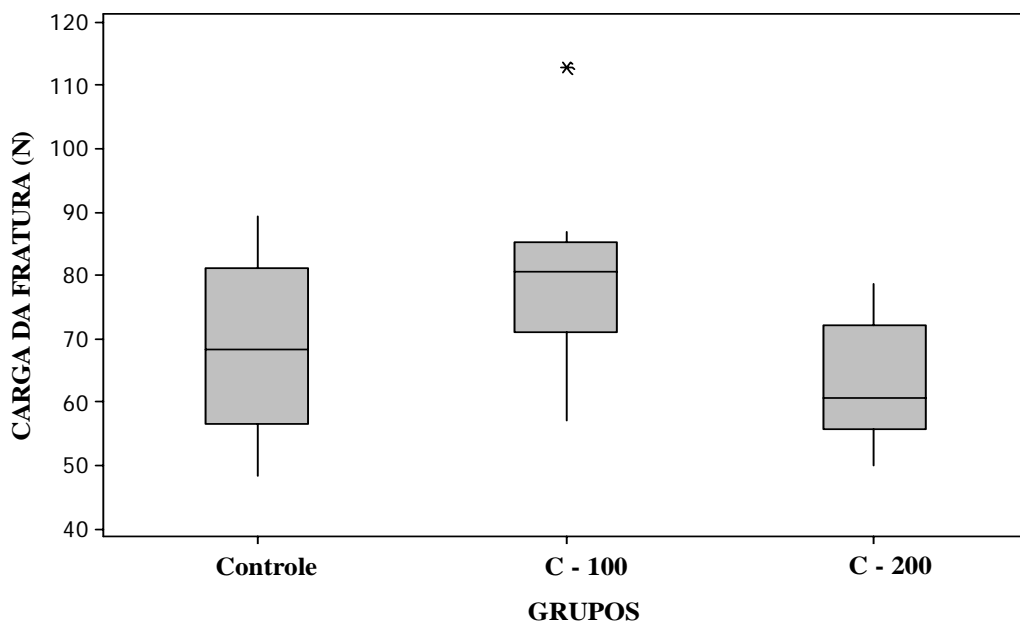


Figura 28: Representação Esquemática da Carga da Fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200. A linha inserida dentro do retângulo representa à mediana e o asterisco indica a presença de um ponto atípico. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas ($p=0,0371$) e o correspondente teste de Dunn (de comparações múltiplas), indica diferenças significativas entre os grupos: C-100 vs. C-200 para $p<0,05$.

Tabela 7: Parâmetros Biomecânicos: Deslocamento no Ponto da Fratura (mm), Força Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J), Deslocamento Máximo (mm) Resiliência (J) e Carga da fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, C-100 e C-200.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	C-100	C-200
Deslocamento no Ponto da Fratura (mm)	1,289 ± 0,239	1,215 ± 0,168	1,132 ± 0,125
Força Máxima (N)	85,81 ± 6,04	91,56 ± 9,60	83,85 ± 8,89
Rigidez (N/mm)	159,67 ± 17,52	174,39 ± 17,34	173,25 ± 22,46
Tenacidade (J)	0,075 ± 0,015	0,080 ± 0,014	0,069 ± 0,011
Deslocamento Máximo (mm)	0,888 ± 0,135	0,865 ± 0,183	0,670 ± 0,136 *
Resiliência (J)	0,050 ± 0,011	0,049 ± 0,012	0,036 ± 0,011 * #
Carga da Fratura (N)	69,26 ± 14,08	79,42 ± 15,53	62,81 ± 9,79 #

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. C – 100; () = n°. animais.

5 DISCUSSÃO

O estudo analisou os efeitos provocados pela contaminação com chumbo, durante a fase de desenvolvimento, sobre o tecido ósseo de ratos adultos. O modelo de contaminação por meio da gavagem gástrica promoveu fácil adaptação dos animais ao sistema proposto, não proporcionando alterações significativas da massa corpórea e de aspectos comportamentais. A literatura mostra que o rato é a mais freqüente espécie de roedor usado em estudos toxicológicos com repetição de doses (MACGREGOR et al., 1995; CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Modelos experimentais em ratos são considerados adequados para extrapolação de resultados para o ser humano (ESCRIBANO et al., 1997). TIMCHALK et al., (2006) sugerem que o acetato de chumbo administrado via gavagem oral é rapidamente absorvido, sendo o pico da concentração de chumbo no sangue de 30 minutos a 1 hora pós-dose. Esta rápida absorção no rato é semelhante à absorção do acetato de chumbo observada em humanos. Uma vantagem de estudos com animais, é a possibilidade de se obter um sistema biológico completo do qual permite a avaliação do efeito geral de mudanças observadas em sistemas celulares. Estudos animais controlados cuidadosamente constituem um passo essencial para a extrapolação de efeitos biológicos para a segurança da saúde humana. A similaridade fundamental da estrutura celular e bioquímica entre animais e humanos proporciona uma base de validação geral para a predição de efeitos semelhantes aos químicos em populações humanas (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Conseqüentemente, sendo o rato um bom modelo para o estudo da toxicidade de chumbo em humanos é possível verificar a hipótese que ratos em desenvolvimento com exposição ao chumbo acumulam grande quantidade deste elemento no esqueleto (HAN et al, 1997).

Metais pesados, como o chumbo, têm a capacidade de se incorporar em tecidos biológicos. Neste estudo observou-se incorporação de chumbo na superfície externa e interna das tíbias de ratos contaminados com 100 e 200 mg de acetato de chumbo /kg MC, enquanto no grupo animal controle, não foi detectada a presença deste metal (Figura 4 e 5). Vários estudos confirmam a capacidade do chumbo de se incorporar ao tecido ósseo, tornando este tecido o maior reservatório deste elemento no organismo (RABINOWITZ, 1991; BERGLUNG et al., 2000; WHO, 2001; BRONNER, 2002; LIN et al., 2003; HU et al. 2007). Além disso, 90% do Pb acumulado no organismo está contido nos ossos (AUFDERHEIDE, WITTMERS, 1992). Há várias possibilidades de como o chumbo se fixa ao osso. HAN et al. (1997) afirmam que cálcio e chumbo competem pelos mesmos sítios de ligação no osso.

QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI (2003) afirmam que o Pb pode ser transportado e entrar em vários tipos celulares via canais de Ca^{2+} tipo L. Em outro estudo, HAN et al. (1999) sugerem que os mecanismos de conservação orgânica do Pb podem ser similares aos de conservação orgânica do elemento ferro (Fe). Recentemente, BALLATORI (2002) associou os receptores de ferro, transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2, respectivamente), presentes em diversos tipos celulares, como passíveis de transporte para diversos cátions metálicos covalentes, inclusive o chumbo. Em tecidos excitáveis, o Pb^{2+} pode entrar nas células via canais sensíveis a voltagem. GUNSHIN et al. (1997) descreveram o mecanismo de entrada do Fe^{2+} e outros cátions divalentes por meio de um transportador denominado transportador de cátion divalente (DCT1 ou DMT1 ou NRAMP2) dependente de potencial de membrana e acoplamento de prótons. Ademais, o chumbo incorporado às células ósseas pode ter atingido o meio intracelular, por meio do Transportador de Ânion Orgânico 1 (OAT1) e 3 (OAT3), transportadores descritos cuja função envolve transporte absorvivo de vários metais nas células epiteliais renais, endoteliais e gliais (BALLATORI, 2002; ZALUPS, AHMAD, 2004). É possível que os mecanismos de entrada do chumbo nas células ósseas assemelhem-se aos discutidos acima. Além disso, esse metal fixa-se em áreas de crescimento e mineralização óssea (BARRY, 1975; EISENSTEIN, KAWANOUE, 1975; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995; GONZALEZ-RIOLA, 1997). Neste estudo, supomos que o chumbo adere-se ao tecido ósseo, provavelmente por meio da substituição do cálcio por este elemento no cristal de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Estudos *in vitro* demonstram a capacidade de cristais de hidroxiapatita sintéticos de retirar o chumbo do ambiente (principalmente em solos e água), via reação do chumbo com o fosfato, formando um composto menos biodisponível e não tóxico ao ambiente, a hidroxipiromorfita ($\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (RYAN, et al., 2001; ELLIS et al., 2006; SINGH, HENDRY, 2006; SRINIVASAN, FERRARIS, WHITE, 2006; JANG et al., 2008; SMICIKLAS et al., 2008). ZHANG et al (1998) observaram um decréscimo na biodisponibilidade do chumbo com formação de piromorfita, após simular certas condições gastrointestinais de mamíferos. GIAMMAR, XIE, PASTERIS (2008), utilizando nanocristais de hidroxiapatita de ossos de peixes, conseguiram observar a precipitação do chumbo e a formação de piromorfita. No entanto, 2 estudos revelam a interação entre chumbo e este cristal *in vivo*. PEARSON et al. (2000) analisaram minhocas em solo contaminado com chumbo e tratadas com fosfatos. O estudo revelou uma redução parcial (30%) do acúmulo de chumbo nestes organismos e formação de piromorfita. ARNICH et al (2003), realizando experimentos *in vitro*, demonstraram a capacidade da hidroxiapatita sintética de reter Pb, formando piromorfita. Os

autores supõem que isto possa ocorrer pela troca do Ca^{2+} pelo Pb^{2+} na hidroxiapatita, conseqüentemente formando piromorfita. Os mesmo autores, realizando estudos *in vivo*, com ratos divididos em quatro grupos: controle, grupo que recebeu hidroxiapatita, grupo que recebeu chumbo e grupo que recebeu chumbo e hidroxiapatita, durante 31 dias via gavagem, verificaram que a hidroxiapatita foi efetiva na imobilização do chumbo produzindo uma forma insolúvel (piromorfita). As concentrações de Pb em vários órgãos testados (sangue, intestino, fígado, rins, baço, encéfalo, ossos) foram reduzidas nos animais tratados com hidroxiapatita sintética.

Há duas teorias para explicar os mecanismos de conversão da hidroxiapatita em piromorfita. O primeiro segue a linha da dissolução/precipitação, onde a apatita pode prover fosfatos (MA, TRAIANA, LOGAN, 1993; MA et al., 1994a, MA, TRAIANA, LOGAN, 1994b, MA, LOGAN, TRAIANA, 1995; RUBY et al., 1994; LAPERCHE et al., 1996; LAPERCHE et al., 1997; CHEN et al., 1997; ZHANG et al., 1998; ZHANG, RYAN, 1998; ZHANG, RYAN 1999a, ZHANG, RYAN 1999b). A reação principal segue a equação: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14 \text{H}^+ \rightarrow 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O}$ (dissolução da hidroxiapatita) e $10\text{Pb}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14\text{H}^+$ (precipitação da piromorfita). O segundo mecanismo segue a hipótese da troca de íons. O chumbo poderia ser absorvido primeiro na superfície da partícula de apatita e posteriormente por difusão, haveria troca de cátions, do Ca^{2+} da apatita pelo Pb^{2+} (SUZUKI, ISHIGAKI, MIYAKE., 1984; MIYALKE, ISHIGAKI, SUZUKI, 1986; TAKEUCHI, ARAI, 1990; SHASHKOVA et al., 1999; SUGYIAMA et al., 1999). A reação seria: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Pb}^{2+} \rightarrow (\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Ca}^{2+}$ (SHASHKOVA et al., 1999). SANDRINE et al. (2007) apresentaram resultados cinéticos, mostrando a entrada de chumbo na hidroxiapatita, formando o composto piromorfita, exemplificado por meio da fórmula $\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Entretanto, os mecanismos de ocorrência exatos deste processo permanecem incertos e constituem uma fonte potencial para novas pesquisas da área.

No presente estudo, não só se observou a incorporação de chumbo nas superfícies externa e interna dos ossos dos animais intoxicados, como diferenças significativas da concentração de chumbo nos diferentes grupos experimentais. Como se observou na Tabela 1, houve aumento da concentração dose dependente de chumbo nas tíbias dos animais contaminados (grupos C-100 e C-200) e não se observou a presença deste elemento no grupo animal controle. Ressalta-se a importância da espectrometria de absorção atômica como o método de mensuração mais utilizado atualmente para detectar diagnósticos de envenenamento por Pb (GRAZIANO, 1994). FERGUSON et al. (1998) verificaram que a

concentração de Pb nos fêmures de ratas após ingestão de solução de acetato de Pb preparada para prover 350 ppm de acetato de Pb foi de $32,1 \pm 5,0$ µg de Pb/g MC. Os resultados indicaram um possível acúmulo deste elemento no tecido ósseo dos animais intoxicados. LIAO et al. (2008) verificaram que seus resultados analisados com espectrometria de absorção atômica indicaram um aumento da concentração de chumbo em fêmures de camundongos tratados com dose de 0,1% de acetato de chumbo na água de consumo dos animais por 4 semanas, em relação à concentração de chumbo dos animais controles.

O acúmulo de chumbo no tecido ósseo envolve a toxicocinética deste elemento. Toxicocinética pode ser definida como a mensuração e a aprendizagem do movimento de substâncias tóxicas, como o chumbo, no interior do organismo (RABINOWITZ, 1991). O Pb absorvido pode estar presente em três compartimentos separados: sangue, tecidos moles e ossos que, no entanto, interagem entre si. Cada um destes compartimentos apresenta capacidade de ligação, de absorção e taxa de turnover próprios (SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). FOX (1987), após análise de alguns trabalhos, observou que os mesmos traziam variações das concentrações de Pb em diversos tecidos do organismo exposto ao chumbo, porém o único que mantinha grandes concentrações deste elemento pós intoxicação era o tecido ósseo. Portanto, a incorporação de chumbo na superfície externa e interna e o aumento da concentração de chumbo nas tíbias dos animais intoxicados com acetato de chumbo deste estudo confirmam claramente o potencial do tecido ósseo de acumular este elemento e sua substancial capacidade para ser uma grande fonte endógena de chumbo para os demais tecidos e compartimentos do organismo.

A homogeneidade de massa corporal é uma variável importante pois exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea (BERG, HARMISON, 1957; BURR, ROBLING, TURNER, 2002). Dada a importância da homogeneidade da massa corporal inicial verificou-se a padronização adequada desta variável nos animais dos diferentes grupos experimentais, processo este fundamental para o controle do ensaio proposto (Figura 7 e Tabela 2). Em relação à variação da massa corporal (Figura 6 e Tabela 2) e o massa corporal final dos animais (Figura 8 e Tabela 2) dos diferentes grupos experimentais, não se observou diferenças significativas entre os grupos analisados (Controle, C-100 e C-200) durante as 8 semanas de tratamento. Portanto, nossos resultados demonstram que não houve alteração significativa do desenvolvimento somático (geral) dos animais. Dependendo do período e da quantidade ingerida, metais pesados, como o chumbo, provocam ou não redução do consumo de alimento, ocasionando diminuição do crescimento e ganho de massa (NTP, 1993). Na literatura, resultados conflitantes em relação à interferência do

chumbo sobre a massa de animais experimentais são encontrados, com variações no período, dose e via de administração deste elemento. Os dados de SMITH, MIELKE, HENEGHAN (2008) corroboram com os nossos, pois em testes utilizando ratos Sprague-Dawley machos com 21 dias de vida, intoxicados durante 35 dias com diferentes doses de acetato de chumbo e nitrato de chumbo (6,75; 18,75; 37,5; 75 e 150 $\mu\text{g/g}$ de dieta), os autores demonstram que os animais testados não apresentam efeitos adversos significativos sobre o ganho de massa, consumo de comida e quantidade de fezes produzidas quando comparados aos animais controle. Dados da NTP (2003) demonstram que camundongos intoxicados com diferentes doses de acetato de chumbo (50, 200, 1,000 $\mu\text{g/ml}$) não tiveram seus ganhos de massa alterados em relação aos animais controles do estudo. HAN et al. (1997) utilizaram ratas Sprague-Dawley em seu experimento com uma oferta de água contendo 250 mg/l de acetato de chumbo, com 3 grupos de animais que iniciaram a intoxicação com 5, 10 e 15 semanas de vida respectivamente. Correlacionando as curvas de crescimento destes animais intoxicados, os autores concluíram que a idade onde se inicia a exposição ao chumbo não interfere no crescimento e o ganho de massa dos animais contaminados com chumbo. No entanto, os dados obtidos por UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY (2002) contrastam com nossos resultados. Utilizando ratos machos adultos, intoxicados com 500 mg de acetato de chumbo por kg MC durante 12 semanas, os autores evidenciaram uma redução do ganho de massa dos animais intoxicados com acetato de chumbo. HAMILTON, O'FLAHERTY (1995), encontraram reduções de massa corporal de ratos previamente tratados com chumbo na água consumida quando comparado aos animais controle do estudo. Contrariando todos os resultados, GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) verificaram que a massa corporal final dos animais controles foi significativamente menor que o do grupo intoxicado com 17mg acetato de Pb/kg de alimento.

Estes dados conflitantes refletem a não padronização dos protocolos experimentais e são resultados das diferentes condições experimentais. A diferença entre estudos pode ser resultado da variável biodisponibilidade. Biodisponibilidade do chumbo pode ser definida como a porção de Pb ingerida retida pelo corpo para interagir com vários processos metabólicos (SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). No entanto, existem vários fatores fisiológicos, físicos e químicos (como a forma do composto, o tamanho da partícula, variações do período de intoxicação, dose, via de administração deste elemento, idade do organismo utilizado) envolvidos que auxiliam na determinação de qual fração de Pb ingerida foi retida no organismo e quais compostos podem interagir com diversos sistemas,

prejudicando o desenvolvimento e o ganho de peso de diversos animais utilizados em experimentos (MIELKE, HENEGHAN, 1991).

Comparando-se as massas dos órgãos acessórios sexuais, observou-se um aumento significativo das massas das vesículas seminais do grupo C-100 em relação ao grupo Controle e redução significativa das massas das vesículas seminais dos animais do grupo contaminado C-200 quando se comparou com o grupo contaminado C-100 (Tabela 3). Para as massas das próstatas não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3). Nossos resultados demonstram uma possível alteração da secreção dos hormônios esteróides sexuais causada pela intoxicação com chumbo, elucidada pela redução das vesículas seminais dos animais contaminados do grupo C-200. O Pb é um dos maiores intoxicantes do sistema reprodutivo (JARRELL et al., 2006). Há sugestão na literatura que a exposição ao chumbo pode afetar a regulação e suprimir diversos hormônios no organismo afetado, como o hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e esteróides sexuais (RONIS et al., 2001). Além disso, o chumbo tem a capacidade de afetar e danificar (redução do tamanho) os órgãos sexuais acessórios (RONIS et al., 1996; KLINEFELTER, HESS, 1998). PILLAI, PRIYA, GUPTA (2002) sugerem que a exposição ao chumbo provoca acúmulo deste elemento na hipófise e diminui a fluidez da membrana desta estrutura, conseqüentemente afetando sua função e provocando alterações da ligação de receptores e dos mecanismos secretores dos hormônios da hipófise. RONIS et al. (1996) sugerem que os efeitos do crescimento relacionados ao Pb estão relacionados a um atraso do desenvolvimento dos padrões de secreção do hormônio de crescimento hipofisário específico do sexo, e não de um defeito do desenvolvimento que persiste ao longo da vida do indivíduo. Portanto, os efeitos de crescimento e reprodutivos do chumbo são complexos e sexo-dependente, e parecem estar envolvidos com múltiplos sítios no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Em modelos experimentais utilizando ratos, os efeitos da toxicidade do chumbo envolvem alteração dos níveis circulantes de testosterona, variações das concentrações plasmáticas e hipofisárias de hormônio luteinizante (LH), redução dos sítios de ligação para LH nos testículos (SOKOL, BERMAN, 1991; KEMPINAS et al., 1994). O eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal funciona em uma faixa restrita das concentrações hormonais para produzir as concentrações circulantes de hormônios sexuais e fatores de crescimento necessários para o crescimento normal, desenvolvimento da fisiologia sexual e manutenção do comportamento sexual (RONIS et al., 1996). Mudanças da fluidez da membrana resultantes da peroxidação lipídica podem afetar proteínas de membrana. A correlação entre peroxidação lipídica, fluidez e função da membrana foi documentada em

alguns estudos (DINIS, ALMEIDA, MADEIRA, 1993; KAPLAN et al., 1995). Diversos estudos demonstraram que esta correlação reduz significativamente a atividade da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ pós exposição ao chumbo devido ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica (THEVENOD, FRIEDMMANN, 1999; JARRAR, MAHAMOUD, 2000; PILLAI, PRIYA, GUPTA, 2002). Tem sido sugerido que o chumbo atua em dois níveis: hipotalâmico-hipofisário e diretamente nos sítios gonadais para desorganizar a fisiologia reprodutiva e comportamental (SOKOL, MADDING, SWERDLOFF, 1985; WINDER, 1989; KLEIN et al., 1994). Esses sítios de ação possivelmente envolvem interações com sistemas de segundo mensageiros dependentes de cálcio, relacionados com o controle de secreção hormonal e biossíntese de esteróides (RONIS et al., 1996).

Nossos resultados podem estar relacionados a uma possível alteração provocada pela intoxicação com chumbo em sistemas endócrinos, provavelmente com este elemento interagindo com mecanismos hipotalâmicos-hipofisários-gonadais e prejudicando a produção/secreção de hormônios esteróides sexuais. De maneira semelhante, mecanismos similares envolvendo estresse oxidativo, peroxidação lipídica e interações com sistemas de segundo mensageiro dependentes de cálcio podem afetar o funcionamento celular do tecido ósseo. POUNDS, LONG, ROSEN, 1991, sugerem que chumbo tem efeitos diretos sobre a regulação local da função celular óssea via interferência com a homeostase de cálcio e sistemas mensageiros secundários regulados por cálcio ou via desorganização de sinais AMPc. Além disso, é possível hipotetizar que além da interação do sistema endócrino, provocando efeitos diretos sobre o tecido ósseo, os mecanismos que provocam estes efeitos endócrinos possam ser semelhantes aos que provocam efeitos sobre o tecido ósseo (via estresse oxidativo e peroxidação lipídica).

Para o grupo de parâmetros biométricos, as medidas de comprimento, diâmetro maior e menor dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais (Controle, C-100 e C-200) não mostraram diferenças significativas quando comparadas entre si (Figuras 9, 10 e 11 respectivamente e Tabela 4), mostrando que a contaminação com chumbo não alterou esses parâmetros. Nossos resultados portanto, demonstram que não houve alteração do crescimento ósseo dos fêmures dos animais intoxicados com doses de 100 e 200 mg de acetato de chumbo por kg de MC durante as 8 semanas de tratamento. Nossos dados corroboram com os de ESCRIBANO et al. (1997). Estes autores não encontraram diferenças significativas do comprimento de fêmures de ratos intoxicados com 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação durante 50 dias. Entretanto, os mesmos autores encontraram diferenças significativas das alturas das vértebras dos mesmos animais intoxicados com acetato de

chumbo, concluindo que o crescimento longitudinal e periférico de ossos longos não é prejudicado pelo chumbo, mas pode alterar o desenvolvimento do esqueleto axial. GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) não encontraram alterações significativas do comprimento de fêmures de ratos intoxicados com 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação durante 50 dias quando comparado aos animais controle do estudo, no entanto, relataram inibição do desenvolvimento das epífises de crescimento nos fêmures dos ratos contaminados após análise histomorfométrica. Com estes resultados, os autores atribuem ao chumbo um efeito inibitório sobre o processo de ossificação endocondral, envolvendo danos não só a osteoblastos e osteoclastos, como aos condrócitos. Em suporte aos dados destes autores, HAMILTON e O'FLAHERTY (1995) demonstraram alterações morfológicas metafisárias e nas placas de crescimento em ossos de ratos de intoxicados com mil ppm de chumbo na água consumida quando comparado aos animais controles do estudo, comprovando a capacidade do chumbo de danificar o crescimento ósseo. HICKS et al. (1996) reportaram que doses subletais de Pb causam supressão da fosfatase alcalina em condrócitos isolados de aves e da expressão de colágeno tipo II e tipo X, com decréscimo da incorporação de timidina. Os dados sugerem uma inibição da ossificação endocondral pelo Pb. RONIS et al. (2001) associaram a intoxicação com acetato de chumbo com a inibição da osteoblastogênese e um efeito inibidor sobre o crescimento ósseo longitudinal. A diferença entre resultados está relacionada ao tipo de osso analisado, a dose, o tempo de contaminação, a via de administração e a técnica usada para análise do crescimento. Entre estes fatores o tipo de osso analisado é um fator importante, pois efeitos distintos, tanto do esqueleto axial como periférico, podem derivar da diferença de constituição entre ossos e a predominância relativa de osso cortical e osso trabecular (ESCRIBANO et al. 1997). BARBOSA et al. 2005 afirmam que ossos trabeculares apresentam um período de turnover menor, o que torna o chumbo acumulado nesse tipo ósseo mais biologicamente ativo. Conseqüentemente, devido à variação do turnover do osso trabecular, cortical e em várias regiões do esqueleto, o acúmulo de um dado metal no esqueleto será maior naquelas regiões onde a taxa de turnover for menor. A parte trabecular do osso apresenta o turnover maior em relação à porção cortical do osso sendo, portanto, o acúmulo de chumbo maior no osso cortical (BRONNER, 2002). O'FLAHERTY (1993) estabeleceu que o Pb apresenta comportamento semelhante de entrada, no interior e de saída do osso quando comparado ao cálcio, sendo que dois terços do Pb acumulado no osso são retidos no componente cortical do mesmo, enquanto o terço restante permanece no componente trabecular. No entanto, o turnover da porção trabecular do osso é mais rápido que da cortical, portanto grande parte do Pb circulante no sangue é oriundo da

porção trabecular do osso. Tíbia, fêmur e vértebra diferem em suas constituições predominantes, o que pode estar induzindo as diferenças de resultados entre esses estudos. A vértebra apresenta maior predominância de osso trabecular em relação a tíbia, que por sua vez apresenta maior quantidade de osso trabecular e menor de osso cortical quando comparada ao fêmur, cujo constituinte cortical é prevalente sobre o trabecular. SHAINI et al. (2000) demonstraram que osteoblastos são mais afetados pelos efeitos tóxicos de metais pesados do que células periosteais. Esta diferença de toxicidade celular está relacionada à grande quantidade de células não-diferenciadas na população de células periosteais, e estas células não-diferenciadas ajudariam a compensar o número de células mortas. Portanto, há uma explicação plausível para os diferentes efeitos do chumbo, nos diferentes tipos e regiões ósseas. A diferença do acúmulo deste elemento pode explicar a quantidade de resultados conflitantes e a capacidade do chumbo em afetar predominantemente algumas regiões ósseas mais específicas dependentes do tipo ósseo.

As propriedades físicas ósseas dos fêmures dos animais foram analisadas a partir da determinação do volume ósseo, de forma indireta por meio do princípio de Arquimedes, um método simples, confiável e de fácil execução (MARTIN, 1990; RENNO et al., 2007). O tecido ósseo é composto por uma combinação de minerais, material orgânico, frações de água, e conseqüentemente, alterações da densidade deste tecido podem estar associadas a mudanças em alguns ou em todos estes parâmetros. Para os parâmetros peso úmido, peso imerso, peso seco e peso das cinzas não houve diferenças significativas (Figuras 12, 13, 14 e 15 respectivamente e Tabela 4). Apesar de não ser significativa, houve uma redução do peso úmido e peso imerso dos animais do grupo I-200 quando comparado aos animais do grupo controle (Figuras 12 e 13 respectivamente e Tabela 4). Esses dois parâmetros reduzidos refletiram um menor volume ósseo (Figura 19 e Tabela 5) dos fêmures dos animais do grupo C-200 quando comparado aos animais do grupo controle (sabendo que o volume ósseo = peso úmido-peso imerso/densidade da água) que, no entanto, não foram significativas. Entretanto, quando foram realizados os cálculos para obtenção indireta da densidade óssea (sabendo que densidade óssea = peso úmido/volume ósseo), os parâmetros descritos acima, refletiram uma redução significativa deste parâmetro entre o grupo contaminado C-200 quando este foi comparado ao grupo controle e o grupo contaminado C-100 (Figura 21 e Tabela 5). Houve ainda uma redução da densidade mineral (sabendo que densidade mineral = peso das cinzas/volume ósseo) quando comparado os valores do grupo contaminado C-200 aos valores dos grupos Controle e C-100, porém estas diferenças não foram significativas (Figura 20). Para os demais parâmetros físicos, porcentagem de água, de material mineral e de material

orgânico, (Figuras 16, 17, 18 respectivamente e Tabela 5), não houve diferenças significativas quando se comparou os grupos (Controle, C-100 e C-200). Corroborando com nossos achados, ESCRIBANO et al. (1997) verificaram com estudos histomorfométricos um aumento da reabsorção óssea, ou seja, uma redução da densidade óssea mineral em animais previamente expostos a 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação. BAGCHI, PREUSS (2005), observaram uma redução da densidade mineral óssea em ratos contaminados com acetato de chumbo a 1% na água consumida por estes animais durante 40 dias. MIYAHARA et al. (1995) observaram que o chumbo aumenta a reabsorção óssea em cultura de células ósseas, exceto com o tratamento prévio com calcitonina, um hormônio que apresenta forte efeito inibidor sobre a atividade osteoclástica, a principal célula envolvida com o processo de reabsorção. O estudo encontrou, por meio do método histomorfométrico, aumento da reabsorção óssea. Isto significa que o chumbo afeta tanto a atividade osteoblástica como a osteoclástica, induzindo osteopatias. Os 3 mecanismos para o chumbo induzir osteoporose são decréscimo da massa óssea, aumento da reabsorção óssea e mudanças da estrutura do esqueleto (BERGLUND, et al., 2000).

Em relação à diminuição da densidade óssea neste estudo, vários mecanismos que influenciam a atividade de osteoblastos e osteoclastos e interferem no processo de remodelamento ósseo podem explicar este achado. Um dos mecanismos está relacionado a dano renal e gastrointestinal, interferindo sobre o metabolismo dos minerais como cálcio e fósforo. Um outro mecanismo envolve a estimulação da reabsorção e inibição da formação óssea via uma influência direta sobre a diferenciação e ativação de osteoclastos e osteoblastos (BRZÓSKA, JAKONIUK, 2005). De acordo com o primeiro mecanismo, danos às células epiteliais do túbulo proximal do néfron causam decréscimo da reabsorção de compostos com baixo peso molecular pelo túbulo renal, particularmente, aminoácidos, glicose, fosfato e cálcio (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995; LIN et al., 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006). LIN et al (2003) demonstraram que a exposição crônica ao Pb pode influenciar subitamente a progressão da insuficiência renal em pacientes sem diabetes com doença renal crônica acarretando danos glomerulares e tubulares renais. Esse fato poderia contribuir para a causa da deficiência renal e alteração do equilíbrio ácido-básico. Esse desequilíbrio poderia induzir aumento da excreção urinária de cálcio, induzindo um hiperparatireoidismo secundário ou devido ao efeito direto do ácido sobre o tecido ósseo. BUSHINSKY (2001) relatou, em trabalho de revisão, alterações em culturas de células ósseas de camundongo promovidas pela diminuição do pH durante 3 horas, modelo de acidose aguda, causando dissolução mineral óssea. Esses estudos indicam que o mecanismo pelo o

qual íons hidrogênio causam liberação do cálcio ósseo durante curto período é devido a alterações de fatores físico-químicos que governam a deposição e dissolução de minerais do tecido ósseo, e não mediado por alterações de atividades celulares relacionadas à reabsorção. BURCK et al. (2005) em estudo usando cultura de células ósseas, observaram que a acidose pode contribuir para redução da mineralização óssea via aumento da solubilidade da hidroxiapatita e diminuição da atividade da fosfatase alcalina (ALP).

No outro mecanismo, o chumbo poderia agir diretamente sobre as células ósseas (osteoblastos) por meio da inibição da atividade da fosfatase alcalina (ALP), uma enzima essencial para o processo de mineralização óssea (ROBINSON, 1923; REGISTER, WURTHIER, 1984; BRADBEER et al., 1992, BRADBEER, LINDSAY, REEVE, 1994). HAMILTON, O'FLAHERTY (1995) observaram que após intoxicação com chumbo, ratos tem alteração da morfologia das epífises de crescimento e que a enzima ALP, uma enzima que é normalmente associada à mineralização da cartilagem, diminuiu nos animais intoxicados com Pb. Isto pode indicar uma inibição da atividade osteoblástica e de condrócito (GONZALEZ-RIOLA et al., 1997). Desta forma, como apresentaram os autores citados, o chumbo poderia estar alterando a atividade dos osteoblastos por meio da inibição da ALP, e como consequência, levaria a redução da densidade óssea dos fêmures dos animais contaminados encontrado neste estudo.

O chumbo poderia estar ainda causando toxicidade às células ósseas por meio do mecanismo de indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Devido à alta afinidade entre chumbo e grupos sulfídricos (GRAZIANO, 1994), há modificação de grupos tióis nas proteínas de membranas, peptídeos e aminoácidos, indiretamente pela produção de produtos oxidativos e por meio da alteração do estado redox da célula. Este efeito dá-se por meio da peroxidação lipídica e/ou modulação da síntese de produtos imunorreguladores, como os leucotrienos (QUEIROZ et al., 2003). BAGCHI, PREUSS (2005), também relatam o estresse oxidativo como efeito adverso do Pb. A interação entre grupos sulfídricos e proteínas como as metalotioneínas, glutatona e cisteína está diretamente envolvida com a captação, acúmulo, transporte e conseqüentemente, toxicidade do chumbo. A indução da expressão de metalotioneínas é o um dos efeitos intracelulares do chumbo divalente, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HAN et al., 1999, DOREA, DONANGELO, 2006). A interação dos metais pesados com estes grupos sulfídricos, resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000); inibição de enzimas antioxidantes estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o

oxigênio singleto (O^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH) e assim, induzindo aumento da peroxidação lipídica, o que induz danos ao DNA e alteração da homeostase do cálcio (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). STOHS, BAGCHI (1995) afirmam que o Pb depleta glutatona e proteínas que se ligam a grupos sulfídricos, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio como íons superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. EL-ASHMAWY et al. (2006) demonstraram que a intoxicação por acetato de Pb elevou significativamente os peróxidos lipídicos hepáticos. Este aumento pode ser relacionado ao metabolismo do ácido araquidônico via elevação de eicosanóides, ciclooxigenases e lipooxigenases cuja atividade envolve a peroxidação lipídica e a promoção de tumores (BOND et al 1993). VALKO, MORRIS, CRONIN (2005) sumarizaram estudos mostrando que um fator comum na intoxicação com metais pesados é a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estes processos poderiam inibir até a divisão celular (EL-ASHMAWY et al 2006).

Recentes estudos demonstram que a produção de radicais livres e o estresse oxidativo, hábito de fumar, hipertensão e diabetes mellitus estão classificados como fatores de risco para osteoporose (SÁNCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2007; SHEWEITA, KHOSHHAL, 2007). Outros estudos que mostram que altos níveis de H_2O_2 favorecem a diferenciação de osteoclastos e inibem a diferenciação de osteoblastos e liberação do estoque de cálcio intracelular por um mecanismo sensível ao IP3 (inositol-3-fosfato) (NAM et al., 2002), propiciando dessa forma uma acentuada diminuição da densidade mineral óssea corroborando com alguns de nossos resultados que indicam reduções de densidade do osso, dos quais nos permite sugerir que ocorra aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e/ou diminuição da formação óssea pelos osteoblastos (MODY et al., 2001; SONTAKE, TARE, 2002; BAI et al., 2004). O chumbo pode estar alterando a expressão da via de sinalização da Wnt, induzindo o fator de transcrição FOXO (Forkhead Box) por ROS (espécies reativas de oxigênio) e, assim antagonizando a via de sinalização Wnt/ β -catenina que é um estímulo essencial para a osteoblastogênese e responsável por suprimir a apoptose osteoblástica, adipogênese e osteoclastogênese (ALMEIDA et al., 2007). Portanto, pressupomos que o processo de indução do estresse oxidativo e peroxidação lipídica por meio da intoxicação com chumbo, cuja capacidade de afetar e prejudicar a atividade de diversos grupos celulares está comprovada na literatura, possa estar atuando similarmente nas células ósseas e provocando diversos efeitos no tecido ósseo como as reduções de densidade óssea.

O teste de flexão a três pontos possibilita a observação das principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo. De acordo com MELTON et al. (1986), as propriedades

biomecânicas correspondem a um dos parâmetros mais importantes, cujo aspecto clínico de maior relevância na osteoporose é referente ao risco de fraturas. Para PENG et al. (1994), embora a osteopenia em ratos não represente necessariamente um risco para fraturas ósseas, é possível avaliar a resistência mecânica, e conseqüentemente, a qualidade óssea dos animais estudados por meio destes parâmetros. A resistência mecânica do osso às fraturas está diretamente relacionada ao grau de mineralização deste tecido (BOYDE et al., 1995; CURREY, BREA, ZIOUPS, 1995, LEOPOLA et al., 1996). Esta relação tem sido estudada extensivamente, mas os valores da densidade mineral de referência para a resistência óssea não tem sido determinados, embora estudos recentes tenham sugerido que esta variável pode ser modificada (BOYDE et al., 1998). A redução significativa da densidade óssea do grupo contaminado C-200, quando comparado com o grupo Controle e C-100 poderia promover alterações do comportamento biomecânico. Conseqüentemente, por meio da análise biomecânica, observou-se neste estudo diferenças significativas para os parâmetros biomecânicos: deslocamento máximo, resiliência e carga de fratura. (Figuras 27, 28 e 29 respectivamente e Tabela 7). Para o deslocamento máximo observou-se redução significativa deste parâmetro quando comparado o grupo contaminado C-200 em relação ao grupo controle (Figura 27 e tabela 7). Para a resiliência observamos redução significativa do grupo contaminado C-200 quando comparado com os grupos Controle e C-100 (Figura 28 e Tabela 7). Completando, para a carga da fratura, observamos redução significativa do grupo contaminado C-200 quando comparado com o grupo contaminado C-100. Para os demais parâmetros biomecânicos, deslocamento no ponto da fratura, força máxima, rigidez e tenacidade não foi observada diferenças significativas quando comparado os grupos experimentais entre si (Figuras 23, 24, 25 e 26 respectivamente e Tabela 7). Corroborando com nosso estudo, RONIS et al 2001, com um modelo proposto de intoxicação com 0,15% e 0,45% de acetato de chumbo na água consumida por ratos, dos quais resultou em uma concentração sanguínea de chumbo na faixa de 67-192 µg/dl e 120-388 µg/dl, respectivamente, observaram reduções significativas da resistência das tíbias dos animais, quando realizado o teste de flexão a três pontos.

Diversos mecanismos (celulares, moleculares e estruturais) podem estar afetando esses parâmetros. HAN et al (1999) afirmam que o fígado é um órgão chave na metabolização de toxicantes endógenos. Este órgão contém inúmeras proteínas, como as metalotioneínas, que apresenta uma grande afinidade por chumbo *in vitro*, mas não *in vivo*, embora o chumbo possa induzir produção de metalotioneínas no fígado (WAALKES, HARVEY, KLAASSEN, 1984). A produção de metalotioneína no rim e fígado é induzida pela contaminação com

metais pesados (ZALUPS, 2000). Sendo assim, quando a expressão de metalotioneína é interrompida, o acúmulo de metais pesados diminui no rim e a toxicidade em outros tecidos é aumentada, inclusive no tecido ósseo por meio da alteração da atividade das células ósseas (osteoblastos e osteoclastos). Além disso, podemos considerar que a produção de metalotioneínas está relacionada com a deposição de chumbo no tecido ósseo e que a sua produção estimulada por metais pesados é maior no osso trabecular do que no osso cortical (ODA et al., 2001; BRANDÃO et al., 2005; PEIXOTO et al., 2007). Em nosso estudo supõe-se que ocorreu produção de metalotioneína em menor proporção à necessária para prevenir os efeitos tóxicos do chumbo no osso ou pode ter ocorrido uma alta produção de metalotioneínas no rim e fígado, mas esta produção não afetou a toxicidade do chumbo. Um estudo organizado por BEATTIE et al. (2005) em linhagem de células CHO-K1 (ovário de hamster) no qual se estimulou a superexpressão de metalotioneínas com metais pesados, observou-se que dependendo do tipo de metal, este interage com ligantes de menor constante de dissociação (menor afinidade) do que as metalotioneínas. Assim a presença abundante de metalotioneína pode ter menos influência sobre a ligação de alguns metais a este ligante de alta afinidade. Em suporte a esta idéia, sabe-se que vários metais pesados, como o chumbo, é um potente inibidor de Na^+/K^+ -ATPase presente na membrana plasmática.

Turnover ósseo é influenciado por diversos hormônios e vitaminas como o 1,25-diidroxicolecalciferol, PTH, calcitonina, estrógeno, andrógenos e fatores de crescimento (BERGLUND et al. 2000). Turnover do osso é o maior mecanismo para manutenção da homeostase de cálcio, sendo a vitamina D e o PTH os dois maiores reguladores do metabolismo do cálcio. A forma ativa da vitamina D é formada nos rins e aumenta a absorção gastrointestinal de cálcio e fosfato (PO_4^-). A mineralização normal do osso também é dependente da 1,25-diidroxicolecalciferol. Os osteoblastos apresentam receptores para a vitamina D e sintetizam osteocalcina. PTH aumenta os níveis de cálcio plasmático por meio da estimulação da reabsorção óssea. Osteoblastos, mas não osteoclastos, apresentam receptores para PTH. Algumas proteínas ósseas poderiam estar envolvidas com a alteração de certos parâmetros biomecânicos, sendo uma delas a osteocalcina. Associou-se o Pb à inibição da atividade osteoblástica pela redução da síntese da osteocalcina (GONZALEZ-RIOLA, 1997). SAUK et al. (1992) evidenciaram *in vitro* que, na presença do Pb, células semelhantes a osteoblastos inibem a liberação de osteocalcina. DOWD et al. (1994) reportaram que o Pb e o Ca competem para ligar-se a osteocalcina e conseqüentemente o Pb inibi a ligação da osteocalcina na hidroxiapatita, o que pode inativar a osteocalcina e afetar a dinâmica mineral óssea. Correlacionando os mecanismos intracelulares de entrada do chumbo

parcialmente discutidos na incorporação do tecido ósseo, temos autores com diversas hipóteses de como o chumbo entra na célula, com vários tipos de transportadores associados ao influxo de Pb: canais de Ca^{2+} tipo L, receptores de Fe, as transferrinas (TfR1 e TfR2), transportadores de cátions divalentes (DCT1) e transportadores de ânions orgânicos (OAT1 e OAT3). (GUNSHIN et al., 1997; HAN et al., 1999; BALLATORI, 2002; QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003). Nosso estudo pressupõe que os mecanismos de entrada do chumbo nas células ósseas possam ser via estes tipos de transportadores. QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI (2003) afirmam que após a entrada em células nervosas (da astroglia), por mecanismos com canais de Ca^{2+} ou DCT1, várias evidências apontam que alguns efeitos do Pb estão localizados no retículo endoplasmático (RE), sendo esta organela o maior sítio de armazenamento e regulação de cálcio intracelular. A concentração de Ca^{2+} no lúmen do RE é de 3 a 4 vezes maior que o do citosol, um gradiente mantido por cálcio-ATPases ou proteínas SERCA. O Pb pode inibir a Ca^{2+} -ATPase, estimulando a depleção do Ca^{2+} estocado, prejudicando a restauração dos estoques. Intracelularmente, este elemento é distribuído por vários carregadores desconhecidos para vários destinos celulares, incluindo proteínas, organelas, e DNA. Além disso, pela grande possibilidade de interações tóxicas com transportadores iônicos, Pb pode interagir prejudicialmente com uma série de proteínas no citoplasma. Uma dessas proteínas é uma reguladora de glicose (chaperona) localizada no RE, de peso molecular de 78 kD, conhecida como GRP78, sendo que o chumbo pode promover uma falha no seu funcionamento, o que pode estimular respostas protéicas específicas via transdução por IRE1/ATF6 (proteína 1 requerente de inositol e fator de transcrição ativado 6, respectivamente) e/ou IRE1/JNK (c-Jun amino-terminal quinase). Isto poderia interromper uma série de fosforilações e comprometer a síntese e o transporte protéico nestas células. Como resultado isto pode afetar e conseqüentemente comprometer a função da célula. Mecanismos similares podem estar ocorrendo nas células ósseas e conseqüentemente interferindo na qualidade do tecido ósseo. Este elemento pode estar afetando a função celular (osteoblastos e osteoclastos), diretamente e indiretamente (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). O Pb afeta indiretamente a diferenciação óssea e sua função via redução dos níveis plasmáticos de Vitamina D e PTH (MAHAFFEY et al., 1982b). Os efeitos diretos estão relacionados aos distúrbios na habilidade das células ósseas em responder a regulação hormonal normal, e o Pb pode competir com o cálcio em sistemas mensageiros de ligação com cálcio (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). MIYAHARA et al. (1994) reportaram que o Pb pode induzir a formação de células semelhantes à osteoclastos pelo aumento das concentrações de Ca^{2+} e adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O Pb altera os canais de Ca^{2+}

de uma forma que aumenta o influxo de Ca^{2+} extracelular. Estes canais podem ser sensíveis ao Pb e promover influxo deste elemento para o interior de osteoblastos e osteoclastos. Todos estes fatores podem estar interferindo diretamente nos parâmetros biomecânicos do tecido ósseo.

KATSUMATA et al. (1995) observaram diminuição da densidade mineral óssea do fêmur de ratas ovariectomizadas em relação ao grupo intacto, no entanto não houve diferença da força de fratura e da rigidez. Nossos achados de diminuição da densidade óssea dos fêmures diante da intoxicação com acetato de chumbo, podem ser um dos fatores para reduções dos parâmetros biomecânicos: carga de fratura, deslocamento máximo e resiliência. Este fato pode estar relacionado com os mesmos mecanismos que induziram redução da densidade óssea, sendo eles a indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica nas células ósseas, assim como em outros tipos celulares (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). Este tipo de intoxicação provocada pelo chumbo pode alterar a qualidade deste tecido e conseqüentemente os parâmetros biomecânicos do mesmo.

Outros fatores, como a geometria óssea e as propriedades materiais também poderiam estar influenciando os resultados dos parâmetros biomecânicos deste estudo (EINHORN, 1996). Como discutido, o chumbo estando incorporado nos cristais de hidroxiapatita, substituindo o cálcio e formando outro composto (a hidroxipiromorfita) pode alterar as propriedades materiais dos ossos, como demonstrado pela redução dos parâmetros biomecânicos ósseos (força da fratura, deslocamento máximo e resiliência) dos fêmures dos animais dos grupos contaminados (C-100 e C-200). Ainda, metais pesados como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e Pb podem ligar-se a proteínas ósseas, incluindo as metalotioneínas (BRANDÃO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2007) ou a outras substâncias e formar um complexo organo-metal mimetizando o efeito de outras. Essa concepção de mimetismo molecular e iônico tem sido postulada como mecanismo pelo quais certos metais tóxicos têm a capacidade de entrar na célula e agir ou servir como análogo estrutural e/ou funcional de outros endógenos biomoleculares (BRIDGES, ZALUPS, 2004). O metal incorporado nos cristais de hidroxiapatita poderia estar afetando suas propriedades e contribuindo para a alteração dos parâmetros biomecânicos servindo como análogo estrutural ou funcional no lugar do cálcio, diminuindo a sua incorporação ou aumentando a sua liberação do osso.

Em relação ao conteúdo de fósforo e cálcio dos fêmures dos animais determinados por meio do ensaio colorimétrico não houve diferença significativa entre os grupos experimentais

(Tabela 6). No entanto, quanto ao cálcio plasmático, há uma acentuada redução no grupo contaminado C-200 quando comparado ao grupo Controle e contaminado C-100 (Tabela 6).

A Interação entre Pb e cálcio pode ocorrer em vários sítios do organismo, incluindo mecanismos celulares que regulam o transporte iônico pela membrana (MAHAFFEY, 1974; LIAO et al 2007). Após a ingestão, o chumbo segue as mesmas rotas do cálcio. O chumbo se liga a calbidina no duodeno, sendo que a absorção do Pb é aumentada pela vitamina D e também é absorvido por rotas paracelulares, principalmente no íleo (BRONNER, 2002). MAHAFFEY (1974) afirma que, via sistema gastrointestinal, o chumbo compete com o cálcio para sua absorção (passiva e ativa). Essa competição está presente nos ossos e nas paratireóides, o que pode induzir efeitos sobre o PTH. A idéia é que o chumbo modifica os níveis séricos de cálcio por meio da alteração da secreção do PTH. Metabólitos da vitamina D atuam sobre o sistema gastrointestinal, renal e ósseo regulando metabolismo do cálcio. O chumbo ainda, pode afetar a conversão de 25-hidroxicoilecalciferol em 1,25-dihidroxicoilecalciferol. Juntamente com os danos provocados pelos rins nos túbulos renais e subsequente redução da reabsorção de cálcio pelos rins, como já discutido, há contribuição para as reduções dos níveis plasmáticos de cálcio (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995; LIN et al., 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006). Especificamente relacionado ao osso, os metais pesados, como o chumbo, interagem com as células ósseas, podendo afetar o metabolismo ósseo, conseqüentemente afetando as funções osteoblásticas e osteoclásticas (BRONNER, 2002). O Pb que entrou nos fluidos corporais deixa o mesmo via urina, intestino e incorporação ao tecido ósseo. SCHANNE, GUPTA, ROSEN (1992) evidenciaram *in vitro*, com células osteoclásticas, a interferência do chumbo sobre o 1,25-diidroxicoilecalciferol, induzindo aumento da concentração de cálcio intracelular. HSU et al (1973) observaram corpos de inclusão intranucleares contendo chumbo em osteoclastos de porcos tratados com chumbo. Os autores sugerem que os osteócitos estão metabolicamente ativos durante a osteólise e respondem à intoxicação por Pb. Durante uma exposição contínua, os osteócitos morrem, a área óssea correspondente torna-se necrótica e este tecido é reabsorvido por osteoclastos. O Pb por sua vez contido na área é absorvido pelos osteoclastos e corpos de inclusão desenvolvem-se nestas células. Portanto esta possível interação do chumbo com o PTH e reduções da reabsorção de cálcio via sistema renal (por danos do chumbo aos túbulos renais) pode explicar as alterações das concentrações plasmáticas de cálcio. Além disso, a quantidade de chumbo utilizada neste experimento parece não ter sido suficiente para provocar alterações das concentrações de cálcio e fósforo nos ossos dos animais intoxicados com chumbo.

Em suma, nós revisamos os intrínsecos e complexos mecanismos que podem envolver a intoxicação com chumbo, nos mais variados sistemas orgânicos. Sendo o principal foco do estudo, discutir os principais meios de interação entre este elemento e o tecido ósseo, os mecanismos apontados, demonstram fortes evidências da potencialidade do chumbo em prejudicar e danificar o tecido ósseo via interação com células ósseas e outros sistemas (como o endócrino e o renal). Destacamos que os efeitos ósseos foram função dose dependente da contaminação, entretanto, a dose de 100 mg de acetato de chumbo/kg MC não foi suficiente para provocar alterações ósseas, porém com as reduções da concentração de cálcio plasmático, densidade e resistência óssea evidenciadas na contaminação com 200 mg de acetato de chumbo/kg MC, verificou-se a capacidade deste elemento em prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

6 CONCLUSÕES

As análises nas doses de 100 e 200 mg/kg MC durante 8 semanas permitiram observar:

- O tratamento via gavagem gástrica foi efetivo em promover a incorporação e aumento da concentração em função dose dependente desse metal no tecido ósseo para as duas doses propostas.
- Não houve alteração do crescimento somático (geral) dos animais, nas duas doses administradas, representado pela não alteração das massas e dos parâmetros biométricos (comprimento, diâmetro maior e menor dos fêmures dos ratos).
- Dos órgãos acessórios sexuais (próstatas e vesículas seminais), as vesículas seminais do grupo contaminado com 200 mg de acetato de chumbo/kg MC apresentaram comprometimento do tamanho e massa.
- Redução da densidade óssea do grupo animal contaminado com 200 mg de acetato de chumbo/kg MC.
- Redução dos parâmetros biomecânicos analisados por meio do teste de flexão a três pontos: carga da fratura, resiliência e deslocamento máximo para o grupo contaminado com 200 mg de acetato de chumbo/kg MC.
- Dos parâmetros bioquímicos analisados (cálcio e fósforo ósseo e cálcio plasmático), observamos reduções das concentrações de cálcio plasmático para o grupo contaminado com 200 mg de acetato de chumbo/kg MC.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação com acetato de chumbo com duas doses (100 e 200 mg/kg MC) durante 8 semanas, provocou incorporação e aumento da concentração de chumbo nos ossos dos animais tratados em função das duas doses propostas, não provocando alteração do desenvolvimento somático e ósseo dos ratos, pois não houve alteração da massa dos animais intoxicados e dos parâmetros biométricos (comprimento, diâmetro maior e menor da diáfise femoral). Entretanto houve redução da massa das vesículas seminais e da densidade óssea, que pode ter auxiliado na alteração dos parâmetros biomecânicos: carga da fratura, resiliência e deslocamento máximo (por meio de mecanismos endócrinos e estruturais). Ademais, as alterações de cálcio plasmático reforçam a hipótese de mecanismos endócrinos envolvidos com a contaminação com chumbo e alterações do tecido ósseo. Portanto há evidências que o tecido ósseo pode ser uma fonte endógena de chumbo para contaminações subsequentes e ser um elemento capaz de prejudicar a qualidade do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C.; DANYLCHUK, K. D. The effects of chronic low level lead intoxication on the haversian remodeling system in dogs. **Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 37, p. 466-469, 1977.

ALMEIDA, M. et al. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 41342-41351, 2007.

AKHTER, M. P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal Orthopedic Research**, v. 1, n. 21, p. 14-19, may 2003.

AKHTER, M. P. et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-169, july 2004.

ARNICH, N. et al. In vitro and in vivo studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite. **Environmental Pollution**, v. 124, p. 139-149, 2003.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for lead. **U.S. Department of Health and Human Services**, august 2007.

AUFDERHEIDE A. C. WITTMERS L. E. Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 809-819, 1992.

BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Effects of acute and chronic oval exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p. 1155-1164, march 2005.

BAI, X. C. et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells ERK and NF-Kappa B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 197-207, 2004.

BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 689-694, 2002.

BARBOSA Jr. F. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead : advantages, limitations and future needs. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 1669-1674, december 2005.

BARRY, P.S.I., A comparison of concentration of lead in human tissues. **British Journal of Industrial Medicine**, v.32, p.119-139, 1975.

BEATTIE, J. H. et al. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. **Toxicology Letters**, v. 157, p. 69-78, 2005.

BERG, B. N.; HARMISSON, C. R. Growth, disease, and aging in the rat. **Journals of Gerontology**, v. 12, n. 4, p. 370-377, oct. 1957.

BERGLUND, M. et al. Metal-bone interations. **Toxicology Letters**, v. 112-113, p. 219-225, 2000.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. Academic Press. San Diego, Califórnia, capítulo 1, p. 11-13, 1996.

BLEECKER, M. L. et al. Effect of lead exposure and ergonomic stressors on peripheral nerve function. **Environmental Health Perspective**, v. 113, p. 1730-1734, december 2005.

BOND, L. et al. Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis associated with stimulation of lipoxygenase activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, p. 1836-1852, 1993.

BONEWALD, L. F. Osteocyte biology: its implications for osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2004.

BOYDE, A. et al. Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by back-scattered electron image analysis – Variations with age, sex and degree of osteoarthritis. **Bone**, v. 16, p. 619-627, 1995.

BOYDE, A. et al. The effects of estrogen suppression on the mineralization density of iliac crest biopsies in young women as assessed by backscattered electron imaging. **Bone**, v. 22, p. 241–250, 1998.

BRADBEER, J.N. et al. Relationship between the location of osteoblastic alkaline phosphatase activity and bone formation in human iliac crest bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 7, p. 905–912, 1992.

BRADBEER, J. N.; LINDSAY, P. C.; REEVE, J. Fluctuation of mineral apposition rate at individual bone-remodeling sites in human iliac cancellous bone: independent correlations with osteoid width and osteoblastic alkaline phosphatase activity. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 9, p. 1679–1686, 1994.

BRANDÃO, R. et al. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. **Cell Biology Toxicology**, v. 22, p. 429-438, 2006.

BRASIL. **Balanco mineral brasileiro: chumbo**. 2001. Acesso disponível em <<http://www.dnpm.gov.br/>>- acessado em novembro de 2008.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Homocysteine, system $b^{0,+}$ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **The American Journal of Pathology**, v. 4, p. 1385-1394, 2004.

BRONNER, F. Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lead, Silicon and Strontium. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. Academic Press. San Diego, California, cap. 22, p. 359-369, 2002.

BRZÓSKA, M. M.; JAKONIUK, J. M. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 195– 211, 2005.

BURBURE, C. et al. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 584-590, april 2006.

BURCK, A. B. et al. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 77, p. 167-174, 2005.

BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, p. 781-786, may 2002.

BUSHINSKY, D. A. Acid-base imbalance and the skeleton. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 238-244, 2001.

BUSSELBERG, D. et al. Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 65, p. 786-795, 1991.

CANFIELD, R. L. et al. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 μg per deciliter. **New England Journal of Medicine**, v.348, p. 1517-1526, 2003.

CAMPBELL, J. R. et al. The association between environmental lead exposure and bone density in children. **Environmental Health Perspective**, v. 112, n. 11, p. 1200-1203, 2004.

CARVALHO, F. M. et al. Blood lead levels in children and environmental legacy of a lead foundry in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 13 p. 19-23, 2003.

CELIK, A.; ÖGENLER, O.; ÇÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v.20, p. 411-415, august 2005.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Ficha de informação sobre produto químico: acetato de chumbo**. janeiro 2001.

CHEN, A. et al. IQ and Blood Lead from 2 to 7 Years of Age: Are the Effects in Older Children the Residual of High Blood Lead Concentrations in 2-Year-Olds? **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 597-601, 2005.

CHEN, X. et al. Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 624–631, 1997.

COWI (Consultancy within Engineering, Environmental Science and Economics). Lead Review. **Nordic Council of Ministers**, january 2003.

CURREY, J. D.; BREAR, K.; ZIOUPS, P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. **Journal of Biomechanics**, v. 29, p. 257-260, 1995.

DIETER et al. Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide or lead ore concentrate from Skagway, Alaska. **Journal of Toxicological and Environmental Health**, v. 39, p. 79-93, 1993.

DINIS, T. C. P.; ALMEIDA, L. M., MADEIRA, V. M. C. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, p. 256–264, 1993.

DOREA, J. G.; DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 369-376, junho 2006.

DOWD, T. L. et al. The displacement of calcium from osteocalcin at submicromolar concentrations of free lead. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1226, p. 131-137, may 1994.

EINHORN, T. A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, p. 3-22, 1996.

EISENSTEIN, R.; KAWANOUE S. The lead line in bone – a lesion apparently due to chondroclastic indigestion. **American Journal of Pathology**, v. 80, p. 309-16, 1975.

EL-ASHMAWY I. M. et al. Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity Induced by lead acetate in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 32-27, 2006.

ELLIS, D. E. et al. A theoretical and experimental study of lead substitution in calcium hydroxyapatite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.8, p. 967-976 , 2006.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthopaedica Scandinavia.**, v. 49, p. 512-518, 1978.

ESCRIBANO, A. et al. Effect of lead on bone development and bone mass: a morphometric, densitometric, and histomorphometry study in growing rats. **Calcified Tissue International**, v. 60, p. 200-203, 1997.

FAZAKAS, Z.; LENGYEL, Z.; NAGYMAJTÉNYI, L., Combined effects of subchronic exposure to lead, mercury and alcohol on the spontaneous and evoked cortical activity in rats. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 56, n.3, p.249-256, September 2005.

FERGUSON, S. A. et al. Minimal behavioral effects from moderate posnatal lead treatment in rats. **Neurotoxicology Teratology**, v. 20, p. 637-643, 1998.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 11, p. E47-E51, 2006a.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 11, p. E151-E157, 2006b.

FERRI, A. et al. Iron, zinc and copper levels in brain, serum and liver of neonates exposed to 2,2-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 607-613, 2003.

FOX, M. R. S. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 1744-1752, 1987.

FRANCO-NETTO et al. Human health risk reduction due to lead exposure in Brazil. **Salud Pública de Mexico**, v. 45, p. S255-S258, 2003.

FULLMER, C. S. Intestinal calcium and lead absorption: effects of dietary lead and calcium. **Environmental Research**, v. 54, p. 159-168, april 1991.

GIAMMAR, D. E.; XIE, L.; PASTERIS, J. D. Immobilization of Lead with Nanocrystalline Carbonated Apatite Present in Fish Bone. **Environmental Engineering Science**, v. 25, p. 725-736, 2008.

GONZÁLEZ-RIOLA, J. et al. Effect of lead on bone and cartilage in sexually mature rats: a morphometric and histomorphometry study. **Environmental Research**, v.74, p. 91-93, 1997.

GORELL, J. M. et al. Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. **Neuroepidemiology**, v.18, p. 303-308, 1999.

GRAZIANO, J. H. Validity of lead exposure markers in diagnosis and surveillance. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1387-1390, 1994.

GUNSHIN, H. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 31, p. 482-488, 1997.

HALL, B. K. **Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology**. Elsevier, 800 p., 2005.

HAMILTON, J. D.; O'FLAHERTY, E. J. Influence of lead on mineralization during bone growth. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.26, p. 265-271, july 1995.

HAN, S. et al. Effects of lead exposure before pregnancy and dietary calcium during pregnancy on fetal development and lead accumulation. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 527-531, june 2000.

HAN, S. et al. Effects of weight loss and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats with prior lead exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 657-662, august 1999.

HAN, S. et al. Lead exposure at an early age substantially increases lead retention in the rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 412-417, april 1997.

HICKS et al. Effects of lead on growth plate chondrocyte phenotype. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p.164-172, 1996.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone Remodeling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, p. 101-107, 1998.

HSU, F. S. et al. Lead inclusion bodies in osteoclasts. **Science**, v. 181, p. 447-448, 1973.

HU, H. et al. The epidemiology of lead toxicity in adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. **Environmental Health Perspective**, v. 115, p. 455-462 march 2007.

HU, H. et al. The relationship of bone and blood lead to hypertension: the normative aging study. **Jama**, v.275, p. 1171-1176, 1996.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead. **World Health Organization**, Geneva, Suiça, 1995.

JANG, S. H. et al. Preparation and lead ion removal property of hydroxyapatite/polyacrylamide composite hydrogels. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 294-299, november, 2008.

JARRAR, B. M.; MAHAMOUD, Z. N. Histochemical demonstration of changes in the activity of hepatic phosphatases induced by experimental lead poisoning in male white rats (*Rattus norvegicus*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 16, p. 7–15, 2000.

JARREL, J. F. et al. Maternal lead exposure and the secondary sex ratio. **Human Reproduction**. v. 21, p. 1901-1906, july 2006.

JIN, G. B. et al. Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, p. 98-110, 2002.

KALU, D. N. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 7-16, 1989.

KAMEL, F. et al. Association of lead exposure with survival in amyotrophic lateral sclerosis. **Environmental Health Perspective**, v. 116, p. 943-947, July 2008.

KAPLAN, P. et al. Change in fluidity of brain endoplasmic reticulum membranes by oxygen free radicals: a protective effect of stobadine, α -tocopherol acetate, and butylated hydroxytoluene. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 15-820, 1995.

KATSUMATA, T. et al. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 6, p. 921-931, 1995.

KEMPINAS, W. G. et al. Time-dependent effects of lead on rat reproductive functions. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, p.427-433, 1994.

KLEIN, D. Et al. Effects of toxic levels of lead on gene regulation in the male axis: increase in messenger ribonucleic acids and intracellular stores of gonadotrophs within the central nervous system. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 802-811, 1994.

KLINEFELTER, G. R.; HESS, R. A. Toxicology of the male excurrent ducts and accessory glands. In: KORACH, K. S. **Reproductive and Developmental Toxicology**. Marcel Dekker, New York, p. 553-591, 1998.

KOLLER, L. D.; ROAN, J. G. Effect of lead, cadmium and methylmercury on immunologic memory. **Journal Environmental Pathology and Toxicology**, v. 4, p. 47-52, 1980.

KRIEG Jr., E. F. The relationships between blood lead levels and serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Environmental Research**, v. 104, p. 374-382, July 2007.

LAPERCHE, V. et al. 1996. Chemical and mineralogical characterizations of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite. **Environmental Science and Technology** v. 30, p. 3321–3326, 1996.

LAPERCHE, V. et al. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 2745–2753, 1997.

LEOPOLA, V. T. et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 191-196, 1996.

LIAO, Y. et al. Therapeutic potentials of combined use of DMSA with calcium and ascorbic acid in the treatment of mild to moderately lead intoxicated mice. **Biometals**, v.21, p. 1-8, february 2008.

LIN, J. L. et al., Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. **New England Journal Medicine**, v. 348, n. 4, p. 277-286, 2003.

LOVERIDGE, N. Bone: More Than Stick. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 190-196, 1999.

MA, Q. Y. et al. Effects of NO_3^- , Cl^- , F^- , SO_4^{2-} , and CO_3^{2-} on Pb^{2+} immobilization by hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 408– 418, 1994a.

MA, Q. Y.; LOGAN, T. J. TRAIANA, S. J. Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphates rocks. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1118–1126, 1995.

MA, Q. Y.; TRAIANA, S. J.; LOGAN, T. J. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe (II), Ni and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 1219–1228, 1994b.

MA, Q. Y.; TRAIANA, S. J.; LOGAN, T. J. In situ lead immobilization by apatite. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 1803–1810, 1993.

MACGREGOR, J. T. et al. Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 328 – 337, may 1996.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1301-1305, 2003.

MAHAFFEY, K. R. et al. Association between age, blood lead concentrations, and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, p. 1327-1331, 1982b.

MAHAFFEY, K. R. Nutritional factors and susceptibility to lead toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 7, p.107-112, may 1974.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis. The Bone Organ System**, p. 3-22. Academic Press. San Diego USA. Einhorn, 1996.

MARTIN, D. et al. Association of blood lead and tibia lead with blood pressure and hypertension in a community sample of older adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, p. 467-478, march 2006.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021-1029, 1990.

MARTINI, F. H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. 4^a edition. New Jersey, Prentice Hall, 1123 p., 1998.

MELTON III, L. J. et al. Osteoporosis and the risk of hip fracture. **American Journal of Epidemiology**, v. 124, p. 254-261, 1986.

MESTEK, O. et al. Accumulation of lead in tissues after its administration in drinking water to laboratory rats. 1998. **Physiological Research**, v. 47, p. 197-202, 1998.

MIELKE, H. W.; HENEGHAN, J. B. Selected chemical and physical properties of soils and gut physiological processes that influence lead bioavailability. **Chemical Speciation Bioavailability**, v.3, p. 129-134, 1991.

MIYAHARA, T. et al. Effects of lead on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cell cultures. **Calcified Tissue International**, v. 54, p.165-169, 1994.

MIYAHARA, T. et al. Stimulation effects of lead on bone resorption in organ culture. **Toxicology**, v. 97, p. 191-197, 1995.

MIYALKE, M.; ISHIGAKI, K.; SUZUKI, T. Structure refinement of Pb^{2+} ion-exchanged apatites by X-ray powder pattern-fitting. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 61, p. 230–235, 1986.

MODY, N. et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radical Biology Medicine**, v. 31, p. 509-519, 2001.

MOSER, V. C. Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 713-723, 2000.

MUDIPALLI, A. Lead hepatotoxicity and potential health effects. **Indian Journal Medical Research**, v. 126, p 518-527, december 2007.

NAM, S. H. et al. H_2O_2 enhances Ca^{++} release from osteoblast internal stores. **Yonsei Medical Journal**, v. 43, n. 2, p. 229-235, 2002.

NGUYEN, T. V. et al. Genetic determination of bone mineral density: evidence for a major gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3614-3620, august 2003.

NIES, A. S.; SPILLBERG, S. P. Principles of therapeutics. *In*: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 3, p. 43-62, 1996.

NOMURA, S.; YAMAMOTO, T. T. Molecular event caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, v. 19, p. 91-6, 2000.

NORDSLETTEN, L. et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, p. 436-442, 1994.

NTP. Report on carcinogens background document for lead and lead compounds. **Technology Planning and Management Corporation**, p. 1-228, 2003.

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS no. 7487-94-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **Research Triangle Park, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP TR 408; NIH Publication No. 91-3139)**, v. 408, p. 1-260, february 1993.

NRIAGU J. O. The rise and fall of leaded gasoline. **Science Total Environmental**, v. 92 p.13-28, 1990.

ODA, N. et al. Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. **Toxicology Letters**, v. 123, p. 143-150, 2001.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically based models for bone-seeking elements. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, p.16-29, 1993.

PALUMBO, C. et al. Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 327-332, 2001.

PAOLIELLO, M. M. B.; DE CAPITANI E. M. Ocupacional and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmenral Research**, v.103, p. 288-297, 2007.

PARFITT, A. M.; CHIR, M. B. B. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 4, p. 789-811, 1987.

PARK, S. K. et al. Low-level lead exposure, metabolic syndrome, and heart rate variability: the VA Normative Aging Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 11, p. 1718-1724, november 2006.

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PEARSON, M. S. et al. Bioremediation and biodegradation, effects of soil amendments on the bioavailability of lead, zinc, and cadmium to earthworms. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, p. 1611–1617, 2000.

PEIXOTO, N. C. et al. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Lifes Sciences**, v. 81, p. 1264-1271, 2007.

PILLAI, A.; PRIYA. P. N. L.; GUPTA, S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. **Archives of Toxicology**, v.76, p. 671-675, december 2002.

POUNDS, J. G.; LONG, G. J.; ROSEN, J. F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 17-32, february 1991.

QIAN, Y.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 153-162, january 2003.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 889-900, 2003.

RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 33-77, 1991.

RAISZ, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1353-1358, 1999.

REGISTER, T. C.; WUTHIER, R. E. Effect of L- and D-tetramisole on ^{32}Pi and ^{45}Ca uptake and mineralization by matrix enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 922-928, 1984.

REISS, M. L.; HALM, J. K. Lead poisoning in an adult: lead mobilization by pregnancy? **Journal of General Internal Medicine**, v. 22, p. 1212-1215, august 2007.

RENNO, A. C. et al. The effects of a progressive loading exercise program on femoral physical properties and strength of osteopenic rats. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 15, n. 5, p. 276-279, 2007.

ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562 – 69, 2002.

ROBINSON, R. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. **Biochemical Journal**, v. 17, p. 286-293, 1923.

RONIS, M. J. J., et al. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 136, p. 361-71, february 1996.

RONIS, M. J. J., et al. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. **Toxicology Sciences**, Arkansas, v. 62, p.321-329, may 2001.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C. R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, p. 1-16, 2006.

RUBY, M. V. et al. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physically based extraction test. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 422–430, 1996.

RYAN, J. A. et al. Formation of Chloropyromorphite in a Lead-Contaminated Soil Amended with Hydroxyapatite, **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3798-3803, 2001.

SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, M. A. S. et al. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, p. 124, 2007.

SANDRINE, B. et al. Removal of aqueous lead ions by hydroxyapatites: equilibria and kinetic processes. **Journal of Harzadous Materials**, v. A139, p. 443-446, 2007.

SAUK, J. J. et al. Lead inhibits secretion of osteonectin/SPARC without significantly altering collagen or Hsp47 production in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 116, p. 240-247, october, 1992.

SCHANNE F. A.; GUPTA, R. K.; ROSEN, J. F. Lead inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D-3 regulation of calcium metabolism in osteoblastic osteosarcoma cells (ROS 17/28). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1180, p. 187-194, 1992.

SCHIRRMACHER, K. et al. Effects of Lead, Mercury, and Methyl Mercury on Gap Junctions and Ca^{+2} in Bone Cells. **Calcified Tissue International**, v. 63, p. 134-139, october 1998.

SHAINI, F. J. et al. In vitro evaluation of the effect of freshly mixed amalgam and gallium-based alloy on the viability of primary periosteal and osteoblast cell cultures. **Biomaterials**, v. 21, p. 113-119, 2000.

SHASHKOVA, I. L et al. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by alkaline-earth metal phosphates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 160, p. 207–215, 1999.

SHEWEITA, S. A.; KHOSHHAL, K. I. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. **Current Drug Metabolism**, v. 8, p. 519-525, 2007.

SHIMANO, M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Histerese de fêmures de ratas submetidas a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 18, n. 2, p. 89-97, maio/agosto, 2002.

SILBERGELD, E. K. et al. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. **Environmental Research**, v. 47, p. 79-94, 1988.

SILBERGELD, E. K. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. **Environmental Health Perspective**, v. 91, p. 63-70, 1991.

SILVA, J., et al. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241–245, 2000.

SINGH, M.; RISHI, S. Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 19, p. 417-476, 2005.

SINGH, S. P.; HENDRY, M. J. Characterization of aqueous lead removal by phosphatic clay: equilibrium and kinetic studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 654-662, 2006.

SMICIKLAS, A. et al. Factors influencing the removal of divalent cations by hidroxyapatite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 876-884, 2008.

SMITH Jr. D. M., MIELKE H. W., HENEGHAN, J. B. Subchronic lead feeding study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 518-528, october 2008.

SOGAARD, C. H., MOSEKILDE, L. I., THOMSEN, J. S., RICHARDS, A., McOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, p. 439-449, 1997.

SOKOL, R. Z; BERMAN, N. The effect of age of exposure on lead induced testicular toxicity. **Toxicology**, v. 69, p. 269-278, 1991.

SOKOL, R. Z.; MADDING, C. E.; SWERDLOFF, R. S. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 722-728, 1985.

SONTAKE, A. N.; TARE, R. S. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 145-148, 2002.

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**, v. 16, p. 103-108, 2000.

SRINIVASAN, M.; FERRARIS, C.; WHITE, T. Cadmium and Lead ion capture with three dimensionally ordered macroporous hydroxyapatite. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 7054-7059, 2006.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Reviews Cell Development Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SUGYIAMA, S. et al. Interdependence of anion and cation exchanges in calcium hydroxyapatite: Pb^{2+} and Cl^- . **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 220, p. 324-328, 1999.

SUN, Y. et al. Osteoporosis in a Chinese population due to occupational exposure to lead. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 51, p. 436-442, march 2008.

SUZUKI, T.; ISHIGAKI, K.; MIYAKE, M. Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers, part 3: exchange characteristics of lead ions (Pb^{2+}). **Journal of Chemical Society**, v. 80, p. 3157-3165, 1984.

TAKEUCHI, Y., ARAI, H. Removal of coexisting Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} ions from water by addition of hydroxyapatite powder. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 23, p. 75-80, 1990.

TATE, M. L. K. et al. The osteocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1-8, 2004.

THEVENOD, F.; FRIEDMAN, J. M. Cadmium mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺K⁺ATPase through proteasomal and endo/lysosomal proteolytic pathways. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1751–1761, 1999.

THOMAS, V. M. et al. Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of the intentional experience. **Environmental Science Technology**, v. 33, p. 3942-3948, 1999.

THOMPSON, D. D. et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 125s-133s, 1995.

TIMCHALK, C. et al. Disposition of lead (Pb) in saliva and blood of Sprague Dawley rats following a single or repeated oral exposure to Pb-acetate. **Toxicology**, v. 222, p. 86-94, 2006.

TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 605-614, 2003.

TUREK, S. L. **Ortopedia. Princípios e sua aplicação**. Traduzido por Alfredo Jorge Cherem, et al. 4 ed, v. 1, São Paulo, Manole, 1991.

TYL, R. W. Toxicity Testing, Developmental. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 305-319, 1998.

UNGVÁRY, G.; MORVAI, V.; SZAKMÁRY, E. Haemodynamic effects of lead(II) acetate, ethanol, and their combination in rats. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 75, p. S45-S53, October, 2002.

VAANANEN, H. K. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. S11-S14, 1991.

VAHTER, M. et al. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 85-89, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VOGIATZIS, A. K.; LOUMBOURDIS, N. S. Exposure of rana ridibunda to lead II. Impact of lead on various parameters of liver metabolism of the frog rana ridibunda. **Journal of Applied Toxicological**, v. 21, p. 269-274, 2001

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, v. 14, p. 2123-133, 2000.

WAALKES, M. P.; HARVEY, M. J.; KLAASSEN, C. D. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. **Toxicology Letters**, v. 20, p. 33-39, 1984.

WAKEFIELD, J. The lead effect? **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. A-574-A-580, october 2002.

WEISSKOP, M. G. et al. Cumulative lead exposure and cognitive performance among elderly men. **Epidemiology**, v.18, p. 59-66, 2007.

WHO (World Health Organization). Lead. **World Health Organization**, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2001.

WINDER, C. Reproductive and chromosomal effects of occupational exposure to lead. **Reproductive Toxicology**, v. 3, p. 221-226, 1989.

WIWANITKIT, V.; SUWANSAKSRI, J. Lead intoxication: a summary of the clinical presentation among thai patients. **BioMetals**, v.19, p. 345-348, 2006.

WURTZ, T. et al. Collagen mRNA expression during tissue development: the temporospatial order coordinates bone morphogenesis with collagen fiber formation. **Matrix Biology**, v. 17, p. 349-360, 1998.

YAMAMOTO, N.; JEE, W. S. S.; MA, Y. F. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n. 243, p. 175-185, 1995.

YONAGA, T. et al. Effect of organic and inorganic mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. **Anatomischer Anzeiger**, v. 159, p. 373-383, 1985.

YU, C. C.; LIN, J. L.; LIN-TAN, D. T. Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: a four-year prospective longitudinal study. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 15, p. 1016-1022, april 2004.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Homcysteine and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury: role of basolateral transporter organic anion transporter OAT-1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 2023-31, 2004.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 113-43, 2000.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Formation of chloropyromorphite from galena (PbS) in the presence of hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 618–624, 1999a.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Formation of pyromorphite in anglesitehydroxyapatite suspension under varying pH conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 3318–3324, 1998.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Transformation of Pb(II) from cerusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 625–630, 1999b.

ZHANG, P.; RYAN, J. A.; YANG, J. In vitro Pb solubility in the presence of hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 2763–2768, 1998.

APÊNDICE M: CONCENTRAÇÕES DE CHUMBOGRUPO CONTROLE

	ng Chumbo/ mg Osso
Ratos	Concentração
1	0,8
2	5,6
3	2,8
4	-1,2
5	4,4
6	1,6
7	0,0
8	-0,8
MED	1,65
DP	2,45
N	8

GRUPO CONTAMINADO C-100

	ng Chumbo/ mg Osso
Ratos	Concentração
1	21,2
2	30,0
3	21,2
4	58,4
5	73,6
6	48,8
7	43,2
8	58,8
9	40,4
10	49,6
MED	49,25
DP	15,44
N	10

GRUPO CONTAMINADO C-200

	ng Chumbo/ mg Osso
Ratos	Concentração
1	76,0
2	85,6
3	50,0
4	85,2
5	77,6
6	113,6
7	74,0
8	98,4
MED	85,70
DP	20,82
N	8

APÊNDICE N: PARÂMETROS BIOQUÍMICOSGRUPO CONTROLE

	mg
Ratos	Cálcio Ósseo
1	92,44
2	112,55
3	91,16
4	113,84
5	84,31
6	98,00
7	102,71
8	118,33
9	95,01
MED	100,93
DP	11,70
N	9

GRUPO CONTAMINADO C-100

	mg
Ratos	Cálcio Ósseo
1	117,83
2	110,41
3	91,16
4	109,56
5	93,30
6	97,15
7	144,22
8	78,32
9	93,72
10	100,14
MED	102,34
DP	20,70
N	10

GRUPO CONTAMINADO C-200

	mg
Ratos	Cálcio Ósseo
1	88,16
2	100,14
3	78,32
4	70,61
5	87,73
6	101,43
7	96,72
8	93,30
9	94,15
10	115,55
MED	92,23
DP	13,81
N	10

APÊNDICE O: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

GRUPO CONTROLE

	mg
Ratos	Fósforo Ósseo
1	62,40
2	61,17
3	62,09
4	58,09
5	52,25
6	53,48
7	65,16
8	63,11
9	54,71
MED	59,16
DP	4,69
N	9

GRUPO CONTAMINADO C-100

	mg
Ratos	Fósforo Ósseo
1	74,23
2	66,70
3	59,94
4	67,01
5	68,24
6	52,56
7	75,00
8	55,94
9	66,09
10	56,25
MED	64,20
DP	7,72
N	10

GRUPO CONTAMINADO C-200

	mg
Ratos	Fósforo Ósseo
1	54,71
2	58,40
3	55,94
4	50,72
5	62,40
6	60,25
7	55,64
8	63,93
9	60,86
10	63,93
MED	58,68
DP	4,37
N	10

APÊNDICE P: PARÂMETROS BIOQUÍMICOSGRUPO CONTROLE

	mg/ dl Plasma
Ratos	Cálcio Plasmático
1	10,05
2	10,17
3	8,77
4	10,19
5	9,85
6	9,87
7	9,95
8	10,69
9	9,88
MED	9,94
DP	0,51
N	9

GRUPO CONTAMINADO C-100

	mg/ dl Plasma
Ratos	Cálcio Plasmático
1	9,83
2	9,79
3	9,83
4	9,32
5	8,77
6	9,98
7	10,17
8	9,54
9	10,07
10	10,49
MED	9,82
DP	0,45
N	10

GRUPO CONTAMINADO C-200

	mg/ dl Plasma
Ratos	Cálcio Plasmático
1	6,01
2	6,54
3	10,42
4	9,39
5	7,33
6	8,10
7	6,76
8	7,61
9	7,12
10	5,80
MED	7,51
DP	1,46
N	10