

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DO EXTRATO DE *CHLORELLA VULGARIS* E DO  
EDTA SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS EXPOSTOS AO  
ACETATO DE CHUMBO**

**JOSÉ APARECIDO FERREIRA**

**SÃO CARLOS**  
**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITOS DO EXTRATO DE *CHLORELLA VULGARIS* E DO  
EDTA SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS EXPOSTOS AO  
ACETATO DE CHUMBO**

JOSÉ APARECIDO FERREIRA

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

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS  
2013

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

F383ee

Ferreira, José Aparecido.

Efeitos do extrato de *Chlorella vulgaris* e do EDTA sobre o tecido ósseo de ratos expostos ao acetato de chumbo / José Aparecido Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
135 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Ossos. 2. Acetato de chumbo. 3. Biomecânica óssea.  
4. *Chlorella vulgaris*. 5. EDTA. 6. Metaloproteinase (MMP-2).  
I. Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

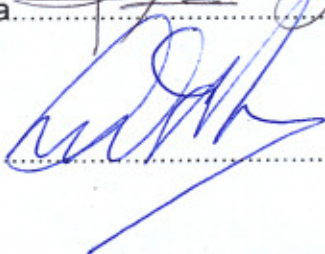
Tese de Doutorado de José Aparecido Ferreira

Dia 10/05/2013

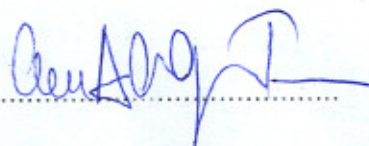
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka.....



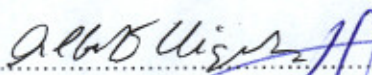
Prof. Dr. Dernival Bertoncello.....



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.....



Prof. Dr. Alberto Cliquet Júnior.....



Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro.....



Esse trabalho recebeu apoio financeiro à  
pesquisa da CAPES.

*"Não importa se a estação do ano muda...  
Se o século vira, se o milênio é outro.  
Se a idade aumenta...  
Conserva a vontade de viver,  
Não se chega a parte alguma sem ela."*

Fernando Pessoa

*Aos meus pais, Antonio (in memorian) e Maria, pelo amor, carinho, educação, dedicação, incentivo e, apoio incondicional.*

*Á minha esposa Edilene, pela grande dedicação, cumplicidade e apoio nesta jornada. Ao meu filho Nicolas, minha inspiração, meu orgulho! Obrigado por existirem!!!*

*Aos meus irmãos e sobrinhos, 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 em todos os momentos difíceis na realização desse objetivo tão almejado;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, pela ótima oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, sem a qual não seria possível essa grande conquista;

Aos meus pais, Antonio Sebastião Ferreira (in memorian) e Maria Aparecida Ferreira, pela educação, amor, carinho, dedicação, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.

À minha esposa, Edilene de Oliveira Batista, pelo eterno companheirismo, apoio e dedicação à família durante todos esses anos.

Aos meus irmãos, Eva Aparecida da Silva, Adão Sebastião Domingues, Lourdes Aparecida Miranda, Quésia de Souza e Aline Daiane Ferreira e a minha sogra Julinda de Oliveira Batista por terem acreditado em mim.

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 do espectrofotômetro e para realização das análises de zimografia;



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. Fernando Barbosa Júnior por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais / Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – USP) para utilização do Espectômetro de Emissão Atômica e a grande ajuda prestada pela técnica Vanessa de Oliveira pelo auxílio na realização e interpretação das análises da concentração de metais.

Ao Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada, UNESP-Araçatuba por ter disponibilizado seu laboratório para a realização da Densitometria Radiográfica.

Aos professores Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez / Departamento de Ciências Fisiológicas (Laboratório de Fisiologia do Exercício) – UFSCar, Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan / UnB – UFSCar e Dra. Patricia Driusso / 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, Valéria Gonçalves Albieri Mattos, Edvanina de Souza Costa Queiroz, Lucélia Maria Albertin, Victor Fabricio, Leonardo Gonçalves Ruffoni, Bruna Biffe, Fábio Bogni, Karina da Silva, Azize Nahrs pelo companheirismo indispensável, pela troca de experiências e apoio na realização desse trabalho.

Aos meus amigos de república: Carlos Henrique Domingues dos Santos, Guilherme Yukio Goto e Thiago Ribeiro Martins e todos os grandes amigos de encontrei em São Carlos, agradeço pelo companheirismo ao longo desse período e pelos momentos de descontração.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

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

Minha eterna gratidão, todo meu respeito e admiração!

## RESUMO

O chumbo, um metal não-essencial e altamente tóxico, é liberado no ambiente por diversas vias, principalmente através da atividade industrial e mineração. Estudos recentes sugerem que o acetato de chumbo causa redução da resistência óssea em ratos. Uma grande variedade de quelantes tem sido usada como possíveis agentes protetores contra a toxicidade provocada pelo acetato de chumbo. Etilenodiaminotetraacetato Cálcico Dissódico (EDTA) é o agente quelante mais usado no tratamento do envenenamento por chumbo. A terapia quelante com EDTA pode induzir redistribuição do chumbo endógeno e sua deposição em órgãos críticos, tal como o cérebro. Entretanto, é questionada a segurança do uso deste composto no tratamento do envenenamento com chumbo. A falta de segurança e eficácia demonstrada pelos quelantes convencionais tem encorajado pesquisas por novas maneiras de remover metais tóxicos do organismo. Recentemente, uma suplementação com Extrato de *Chlorella vulgaris* (CV) mostrou aliviar a toxicidade de metais tóxicos em ratos. O objetivo deste estudo foi avaliar a possível influência protetora da suplementação com *Chlorella* e Na<sub>2</sub>EDTA sobre as propriedades físicas e biomecânicas ósseas de ratos expostos ao acetato de chumbo. Para este propósito, ratos Wistar foram distribuídos em oito grupos (=8): Controle (0,9% salina 0,1 ml/100g massa corporal - MC), EDTA (150 mg/Kg MC), CV 50 (50 mg/Kg MC), CV 250 (250 mg/Kg MC), Pb (250 mg/Kg MC), Pb (250 mg/Kg MC) mais EDTA (150 mg/Kg MC), Pb (250 mg/Kg MC) mais CV 50 (50 mg/Kg MC) e Pb (250 mg/Kg MC) mais CV 250 (250 mg/Kg MC). O tratamento foi realizado uma vez por semana, durante 8 semanas por gavagem gástrica. Volume ósseo, densidade mineral óssea (DMO) e densidade óssea (DO) e propriedades biomecânicas (força máxima, rigidez e resiliência) da diáfise femoral e das quintas vértebras lombares foram examinados. As propriedades biomecânicas dos fêmures foram obtidas pelo teste de flexão a três pontos e das vértebras pelo teste de compressão, usando uma máquina universal Instron 4444. A atividade de MMP-2 óssea foi mensurada por

zimografia de gelatina. Foram também realizadas as análises das concentrações de Pb e Zn no sangue, fígado, rim, cérebro e ossos e das concentrações de Ca e Mg nos fêmures e vértebras determinadas por Espectometria de Emissão Atômica. A exposição ao Pb, na dose de 250 mg/Kg MC causou redução significativa da força máxima, rigidez e resiliência dos fêmures, indicando a habilidade deste elemento em prejudicar a qualidade do tecido ósseo. Nas vértebras, a exposição ao chumbo causou redução da densidade mineral óssea. O tratamento com *Chlorella vulgaris* (50 mg/kg MC e 250 mg/Kg MC) ou EDTA (150 mg/Kg MC) durante exposição ao chumbo, preveniu o enfraquecimento da resistência óssea dos fêmures. Na vértebra, o tratamento com *Chlorella vulgaris* (50 mg/kg MC e 250 mg/Kg MC) ou EDTA (150 mg/Kg MC) preveniu a redução da densidade mineral óssea. A atividade da MMP-2 pro, intermediária e ativa aumentaram nos ossos de animais expostos ao chumbo quando comparada ao controle. A administração de CV 50 aos animais expostos a este metal reduziu a atividade da MMP-2 nas suas isoformas pro, intermediária e ativa a níveis comparados ao controle. A exposição ao chumbo resulta em aumento da concentração de chumbo sanguínea e sua acumulação no fígado, rim, cérebro e ossos. O tratamento com CV ou EDTA reduziu as concentrações sanguíneas de chumbo, levando à redução da concentração de chumbo nos diversos órgãos estudados (fígado, rim, cérebro e ossos). Os resultados indicam que o tratamento com *Chlorella vulgaris* e EDTA durante a exposição ao chumbo pode ser benéfico ao osso de indivíduos expostos cronicamente ao acetato de chumbo.

**Palavras-chave:** Acetato de chumbo, Exposição crônica, *Chlorella vulgaris*, EDTA, Propriedades Biomecânicas Ósseas, MMP-2.

## ABSTRACT

Lead acetate (Pb) is a nonessential and highly toxic heavy metal which is released to the environment by several routes, mainly by industrial and mining activities. Recent studies have suggested that lead caused a decrease in femur strength of adult rats. A wide range of chelating has been evaluated as possible protective agents against lead acetate toxicity. Dissodium ethylenediaminetetraacetate (Na<sub>2</sub>EDTA) is the chelating agent most widely used in the treatment of Pb poisoning. The chelating therapy with EDTA might induce Pb mobilization from inert deposition organs toward such critical tissues as the brain. But, it is questioned the safety of the use of this compound in the management of Pb poisoning. The lack of safety and efficacy demonstrated by conventional chelating has encouraged the search for new ways to remove heavy metals from the body. Recently, a supplementation of *Chlorella vulgaris* extract (CV) was shown to alleviate the heavy metals toxicity in rats. The aim of this study was to evaluate possible protective influence of Chlorella and Na<sub>2</sub>EDTA supplementation on bone physical and biomechanical properties of rats exposed to lead acetate. For this purpose, male Wistar rats were distributed into eight groups (n=8): Control (0.9% saline 0.1 ml/100g body weight- BW), EDTA (150 mg/Kg BW), CV 50 (50 mg/Kg BW), CV 250 (250 mg/Kg BW), Pb (250 mg/Kg BW), Pb (250 mg/Kg BW) plus EDTA (150 mg/Kg BW), Pb (250 mg/Kg BW) plus CV 50 (50 mg/Kg BW) and Pb (250 mg/Kg BW) plus CV 250 (250 mg/Kg BW). The treatment was done once a week, for 8 weeks by gastric gavage. Bone volume, bone mineral density (BMD) and biomechanical properties (maximum load, resilience and stiffness) of the femoral diaphysis and 5th lumbar vertebra were examined. The biomechanical properties of femurs were obtained by the three-points bending test and compression test for vertebrae, using a universal test machine Instron, model 4444. Bone MMP-2 activity was measured by gelatin zymography. Concentrations of lead and zinc in whole blood and lead, zinc, calcium and magnesium in the left femur and 4th lumbar

vertebra were determined by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Exposure to 250 mg/kg BW of Pb caused significant reduction of maximum load, stiffness and resilience indicating the ability of this element to damage the quality of bone tissue. In the 5th lumbar vertebrae, exposure to Pb caused significant reduction of bone mineral density. The treatment with *Chlorella vulgaris* (50 mg/kg BW and 250 mg/Kg BW) and EDTA (150 mg/Kg BW) during Pb exposure prevented the weakening of the bone strength. In the 5th lumbar vertebrae, the CV and EDTA prevented the reduction of bone mineral density due to Pb. The pro, intermediate and active MMP-2 activity in bone of animals exposed to lead showed a significant increase compared to control. The CV 50 administration in animals exposed to lead reduced the activity of MMP-2 isoforms in their pro, intermediate and active levels compared to control group. The exposure to Pb resulted in an increase of the blood concentration of this heavy metal and its accumulation in the liver, kidney, brain and bone concentration. The CV and EDTA reduced blood lead concentrations, leading to reduction of lead concentration in liver, kidney, brain and bone. These findings seem to indicate that treatment with *Chlorella vulgaris* and EDTA during exposure to Pb may be beneficial for the skeleton of subjects chronically exposed to Pb.

**Keywords:** Lead acetate, Chronic exposure, *Chlorella vulgaris*, EDTA, Bone biomechanical properties, MMP-2.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura química do $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ e quelação do chumbo.	37
FIGURA 2.	Estrutura química do D-Penicilina e quelação do chumbo.	38
FIGURA 3.	Estrutura química do DMSA e quelação do chumbo.	39
FIGURA 4.	Estrutura química do Dimercaprol (BAL) e quelação do chumbo.	40
FIGURA 5.	Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444).	53
FIGURA 6.	Representação gráfica da curva força x deformação registrada pelo software Instron Series IX durante o ensaio.	55
FIGURA 7.	Região de interesse circundada na vértebra utilizando ferramentas do programa Imaje J®.	58
FIGURA 8.	Força máxima dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais	71
FIGURA 9.	Força máxima das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais	72
FIGURA 10.	Rigidez dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais	73
FIGURA 11.	Rigidez das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais	74
FIGURA 12.	Resiliência dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais	75
FIGURA 13.	Resiliência das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	75

- FIGURA 14. Densidade radiográfica das terceiras vértebras lombares (L3) obtida por Densitometria Radiográfica. 81
- FIGURA 15. Atividade da pró MMP-2 (72 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). 83
- FIGURA 16. Atividade da MMP-2 intermediária (65 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). 84
- FIGURA 17. Atividade da MMP-2 intermediária (62 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). 86



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Concentrações de Pb no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.	62
TABELA 2.	Concentrações de Zn no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.	63
TABELA 3.	Concentrações de cálcio sérico e conteúdo de cálcio da quinta vértebra lombar dos animais dos diferentes grupos experimentais.	64
TABELA 4.	Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.	65
TABELA 5.	Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg das quartas vértebras lombares (L4) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.	67
TABELA 6.	Concentrações de Pb e Zn nas tíbias dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica .	68
TABELA 7.	Massa corporal (MC) inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.	69
TABELA 8.	Comprimento dos fêmures e altura das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	70
TABELA 9.	Massa úmida, imersa, seca e das cinzas dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.	76
TABELA 10	Massa úmida, imersa, seca e das cinzas das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	77
TABELA 11	Volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral óssea dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do princípio de Arquimedes.	78

TABELA 12	Volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral óssea das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do princípio de Arquimedes.	79
TABELA 13	Porcentagem de Água no osso (% Água), porcentagem de material orgânico (%MO) e porcentagem de material mineral (%MM) nos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.	80
TABELA 14	Porcentagem de água (% Água), porcentagem de material orgânico (%MO) e porcentagem de material mineral (%MM) nas quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALAD	Ácido $\delta$ -aminolevulínico
ALAS	5-Aminolevulinato Sintetase
ALP	Enzima Fosfatase Alcalina
BAL	Dimercaprol
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
Ca	Cálcio
CaNa <sub>2</sub> EDTA	Etilenodiaminotetracetato de Cálcio Dissódico
CAT	Enzima Catalase
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
DMT-1	Transportador de Cátion Divalente
DMSA	Ácido Dimercapto Succínico
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
F	Força
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GM-CFU	Unidades Formando Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GSH – Px	Enzima Glutationa Peroxidase
GST –	Enzima Glutationa-S-Transferase
GR –	Enzima Glutationa Redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL – 11	Interleucina - 11
MC	Massa corporal
M-CSF	Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MED	Média
Mi	Massa imersa
Mm	Massa do material mineral (cinzas)

MMPs Metalopeptidases de matriz  
Ms Massa seca  
Mu Massa úmida  
2 N Dois Normal  
n Número de animais  
O<sup>-</sup> Superóxido de oxigênio  
OH Radical Hidroxil  
OSM Oncostatina M  
OPG Osteoprotegerina  
 $\rho$  Rô  
P Fósforo  
PCs Fitoquelatinas  
PGE<sub>2</sub> Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PDGF Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas  
PGE<sub>2</sub> Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PTH Hormônio da paratireóide  
PTHrP Proteína Relacionada com PTH  
RANK Receptor de RANKL  
RANKL Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear K- $\beta$   
ROS Espécies reativas de oxigênio  
SH Grupos sulfidrílicos  
SOD Superóxido Dismutase  
Tang  $\theta$  Tangente de Theta  
TGI Trato Gastrointestinal  
TGF $\beta$  Fator de Crescimento Transformante Beta  
TfR1 Transferrina 1  
TfR2 Transferrina 2  
vs Versus  
°C Graus Celsius

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
	1.1 Chumbo.....	22
	1.1.1 Aspectos toxicocinéticos do chumbo.....	24
	1.1.2 Aspectos toxicodinâmicos do chumbo.....	27
	1.2 Tecido Ósseo.....	30
	1.3 Chumbo e Tecido Ósseo.....	35
	1.4 Principais Agentes Quelantes do Chumbo Usados na Terapêutica.....	36
	1.5 <i>Chlorella vulgaris</i> .....	41
2.	OBJETIVOS.....	43
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
	3.1 Modelos de Estudo.....	45
	3.2 Animais.....	45
	3.3 Protocolo Experimental.....	46
	3.4 Extrato de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	47
	3.5 Eutanásia.....	48
	3.6 Parâmetros Analisados.....	48
	3.6.1 Parâmetros Químicos.....	48
	3.6.2 Parâmetros Biométricos.....	51
	3.6.3 Parâmetros Biomecânicos.....	51
	3.6.4 Parâmetros Físicos.....	55
	3.6.5 Densitometria Radiográfica.....	57
	3.6.6 Análise da atividade de MMP-2 na tíbia direita.....	58
	3.7 Análises Estatísticas.....	59
	3.8 Normas metodológicas.....	60
4.	RESULTADOS.....	61
	4.1 Parâmetros Químicos.....	61
	4.2 Parâmetros Biométricos.....	69
	4.3 Parâmetros Biomecânicos.....	70
	4.4 Parâmetros Físicos.....	76

4.5 Análise Densitométrica.....	81
4.6 Atividade da MMP-2 na tíbia direita.....	82
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXOS.....	132

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal não-essencial de ocorrência natural na crosta terrestre, sendo a maior fonte natural, erupções vulcânicas e o desgaste geoquímico (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 chumbo (ATSDR, 2007). Entre os compostos de chumbo, o acetato de chumbo é uma forma orgânica que consiste em um pó branco e inodoro, com solubilidade de 60g/100mL em água a 25 °C e que apresenta uma maior taxa de absorção via sistema gastrointestinal quando comparado a outros sais e compostos inorgânicos de chumbo (CETESB, 2001; SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008).

O chumbo pode ser encontrado em todo o ambiente (QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003, BURBURE et al. 2006; ATSDR, 2007). Esta ampla distribuição ambiental é principalmente antropogênica, oriunda da queima de combustíveis fósseis, mineração e fabricações industriais diversas como aditivos de tintas para cabelos e reciclagem de baterias elétricas (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005; ATSDR, 2007). Nos últimos anos, diversas ações tem sido usadas na tentativa de reduzir a exposição a esse metal, como a proibição da adição do Pb à gasolina durante a década de 1980, e redução da quantidade de chumbo acrescida a determinados produtos como tintas. Ainda assim, exposições ocupacionais e ambientais permanecem como um sério problema em muitos

países desenvolvidos e em desenvolvimento (ATSDR, 2007; PAOLIELLO, De CAPITANI, 2007).

Em crianças, o limite de tolerância biológica estabelecido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças é 10  $\mu\text{g Pb/dL}$  de sangue (CDC, 1991; CDC, 1997), mas dados recentes indicam que pode haver alterações bioquímicas e do desenvolvimento neurológico abaixo desse valor (JARUP, 2003; CANFIELD et al., 2003). A Organização Mundial de Saúde observou que, em 2000 aproximadamente 10% das crianças tiveram concentrações de chumbo de 20  $\mu\text{g/dL}$  ou superior e que 99% dessas crianças viviam em países em desenvolvimento, como o Brasil (FEWTRELL, HAULFMAN, PRUSS-USTUN, 2003; ATSDR, 2007). Na indústria, os principais setores de utilização do chumbo são a fabricação e reforma de baterias chumbo-ácidas, pigmentos em tintas, tinturas, esmaltes cerâmicos e a calafetagem (VOGIATZIS, LOUMBOURDIS, 2001; WHO 2001; WAKEFIELD, 2002; BARBOSA et al., 2005; WIWANITKIT, SUWANSAKSRI, 2006; ATSDR, 2007). Em um estudo com pintores e trabalhadores atuando na fabricação e reciclagem de baterias, Conterato et al. (2011), encontraram concentrações sanguíneas de  $5,4 \pm 0,4 \mu\text{g/dL}$  entre os pintores e  $49,8 \pm 4,0 \mu\text{g/dL}$  entre os trabalhadores na fabricação e reciclagem de baterias. Nesses trabalhadores foi constatada correlação entre a concentração sanguínea de chumbo e alterações dos parâmetros de estresse oxidativo, incluindo aumento da peroxidação lipídica e alterações da atividade da glutathione-S-transferase (GST) sanguínea.

Em um estudo conduzido por BARBOSA et al. (2009), em uma população ribeirinha da Amazônia que se alimentava com farinha de mandioca contaminada com o chumbo (CARNEIRO, EVANGELISTA, BARBOSA, 2013), os autores relataram que esses residentes apresentavam elevadas concentrações de chumbo sanguínea, 57% dos participantes tinha níveis sanguíneos iguais ou maiores que 10  $\mu\text{g/dL}$ , enquanto 19% apresentavam concentrações acima de 20  $\mu\text{g/dL}$ . Essas concentrações tem sido associadas à redução do



aprendizado em crianças (BELLINGER et al., 1992; TELLES-ROJO et al., 2006) e a problemas cardiovasculares em adultos (NAVAS-ACIEN et al., 2004; PARK et al., 2006; MURATA et al., 2009).

### **1.1.1 Aspectos toxicocinéticos do chumbo**

#### **1.1.1.1 Absorção**

O chumbo existente no ambiente natural e ocupacional pode ser introduzido no organismo por meio da inalação (ar atmosférico), ingestão (contaminação da água, alimentos e solo) ou por via cutânea (compostos orgânicos do chumbo) (CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGU, 2005).

Sua absorção não dependerá apenas de sua concentração e tempo de exposição, mas, também, de fatores relacionados às propriedades físico-químicas dos compostos, isto é, forma inorgânica ou orgânica. Além disso, o seu grau de toxicidade pode ser influenciado por outros fatores, como sexo, idade, estado fisiológico, condição nutricional e genética (IPCS, 1995).

Na forma orgânica, a absorção ocorre de forma eficaz mesmo na pele íntegra, e no trato gastrointestinal (TGI) em um indivíduo adulto normal é de 5 a 10 % (LARINI, 1987). A absorção pelo TGI em crianças é bem maior, de 40 a 50%; a absorção pelo TGI pode ser alterada pela presença de cálcio (Ca), ferro (Fe) e fósforo (P) na alimentação, por competição direta com o Pb e pelo armazenamento nos ossos (FULLMER, 1991; KLAASSEN, 1998; JAMIESON, TAYLOR, WEILER, 2006). Isto ocorre porque a absorção de chumbo na dieta

ocorre através de processos similares a absorção de metais essenciais como  $\text{Fe}^{2+}$  e outros cátions divalentes (Fe, Zn, Mn, Co, Cd, Cu, Ni, Ca e Pb). Na superfície luminal do intestino o principal transportador responsável pela absorção desses metais é o transportador de cátion divalente 1 (DMT1) (GUNSHIN et al., BRESSLER et al., 2004). Entretanto, o mecanismo predominante de transporte de ferro do plasma para dentro dos hepatócitos e outros tipos celulares ocorre através dos receptores de ferro, transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2) (BALLATORI, 2002, BRIDGES, ZALUPS, 2005). Além de TfR1 e TfR2, lactoferrina, melanotransferrina e receptores de ferritina também contribuem para a absorção de ferro (JOSHI, SCZEKAN, FLEMING, 1989; ROY, ANDREWS, 2001).

#### 1.1.1.2 Distribuição

Uma vez absorvido, o chumbo se distribui entre o sangue, tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos mineralizados (ossos e dentes) (ATSDR,2007). No sangue, cerca de 95% do metal encontra-se associado aos eritrócitos, seja na superfície externa da membrana ou no meio intracelular ligado a proteínas, como o ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALAD) e a hemoglobina (SIMMONS, 1995). Os demais 5% de chumbo podem ser encontrados no plasma, de forma livre ou associado à albumina, à  $\gamma$ -globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo grupos sulfidrílicos (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina), constituindo uma fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar os diversos tecidos (ALMODHEFER; BRADBURY; SIMMONS, 1991). O chumbo é redistribuído de acordo com sua afinidade pelos tecidos. A afinidade entre chumbo e osso se deve à similaridade de valência com a do cálcio. Em casos de exposição crônica,

cerca de 90% (adultos) e 70% (crianças) da carga corpórea de chumbo acumula-se nos ossos, onde sua meia vida é em torno de 20 a 30 anos. A distribuição de chumbo nos ossos, entretanto, não é homogênea e depende do tipo de osso (cortical ou trabecular). O acúmulo de chumbo na infância vai ocorrer predominantemente em osso trabecular, e na vida adulta, tanto no osso cortical como trabecular. No entanto, o osso cortical pode ser um melhor indicador de exposição crônica do que o osso trabecular, devido às diferentes intensidades de vascularização nesse tipo de osso (GUIMARÃES et al., 2012).

Alguns modelos teóricos tem sido propostos para distribuição do chumbo no organismo. Um desses é o modelo clássico de RABINOWITS (1976), baseado em estudos cinéticos com isótopos estáveis de chumbo ( $Pb_2O_4$ ), que propõe um modelo tricompartmental. No primeiro compartimento, contendo cerca de 4% da carga corpórea total de chumbo, há um rápido fluxo entre sangue, fluidos biológicos e tecidos moles com meia-vida de aproximadamente 36 dias. No segundo, onde o chumbo apresenta meia-vida de 40 dias a um ano, ocorre um intercâmbio mais lento entre tecidos moles e ossos. O terceiro é formado somente pelo tecido ósseo, onde o tempo de permanência do metal pode ser de anos a décadas.

#### 1.1.1.3 Biotransformação e Eliminação

No organismo, o chumbo não é metabolizado, e sim, complexado a macromoléculas. Sua eliminação ocorre principalmente pela via renal, através dos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular. O chumbo pode ser excretado também pela via biliar, possivelmente complexado a glutatona (SKERFVING et al., 1993; YUN et al., 2011).

### 1.1.2 Aspectos toxicodinâmicos do chumbo

O chumbo é capaz de estimular o estresse oxidativo por duas vias diferentes que operam simultaneamente: 1) geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o superóxido de oxigênio (O<sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxil (OH); e 2) esgotando as reservas antioxidantes (FLORA et al., 2002). 2) inativando a glutatona pela ligação ao grupo sulfidril e outras enzimas como δ-aminolevulinato-deidratase (ALAD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-S-transferase (GST), no qual deprime ainda mais os níveis de glutatona (AHAMED, SIDIQI, 2007). Outras enzimas que também são inativadas são a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (FLORA, MITAL, MEHTA, 2008).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) inicia uma reação em cadeia que resulta em peroxidação lipídica, perturbação da membrana celular, oxidação de proteínas e oxidação de ácidos nucleicos (RNA e DNA) culminando no processo de apoptose (GURER, ERCAL, 2000; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006).

Além da ligação do chumbo aos grupos sulfidrilas, o chumbo pode também substituir o íon zinco que serve como co-fator de várias enzimas. Essa substituição resulta em alteração da atividade enzimática como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais para o processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000). A intoxicação dos animais com Pb também esta associada ao metabolismo de cálcio (COWI, 2003), sendo que as proteínas ligantes de cálcio apresentam grande afinidade por chumbo, que conseqüentemente, permite assumir a competição entre os sítios ativos de ligação de cálcio (MAHAFFEY, 1974; FULLMER, 1991; HAN et al., 1997;

HAN et al., 2000). Em muitos casos a função da proteína é inibida com a ligação do chumbo ocorrendo em um sítio ativo ou causando mudanças da estrutura quaternária da proteína. Entretanto, para algumas proteínas como as calmodulinas, a substituição do chumbo causa uma ativação inicial seguida por inibição em resposta ao aumento da concentração de chumbo (BROUTON et al., 2001; KIRBERGER, YANG, 2008). Outras proteínas que tem a função afetada pela substituição de cálcio pelo chumbo são as proteínas quinases e a troponina (HABERMANN, CROSWELL, JANICKI, 1983; KIRBERGER, YANG, 2008). Outras proteínas como as metalotioneínas tem aumento de sua expressão na presença de chumbo, como forma de proteger o tecido de danos induzidos por metais tóxicos (BEATTIE et al., 2005).

O chumbo pode se acumular em quase todos os tecidos e sem nenhum papel biológico (ATSDR, 2007; MUDIPALLI, 2007; LIAO et al, 2008). Desta forma, a intoxicação com Pb pode provocar efeitos mutagênicos, carcinogênicos, citotóxicos e genotóxicos (IPCS, 1995; CELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Os efeitos podem variar desde a inibição de determinadas enzimas (mudanças bioquímicas súbitas), inibição da divisão celular, às alterações morfológicas e morte (MESTEK et al., 1998; EL-ASHMAWY et al., 2006).

Entre os efeitos tóxicos do Pb, vários autores relataram efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) (UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY, 2002; QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003; CHEN et al., 2005; FAZAKAS et al., 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). Os principais danos a este sistema incluem retardo do aprendizado com redução do coeficiente de inteligência (QI) em crianças. Esse metal em concentrações elevadas pode levar a dano cerebral permanente e até a morte (CANFIELD et al., 2003; BAGCHI, PREUSS, 2005; CHEN et al., 2005; BURBURE et al., 2006; DOREA, DONANGELO, 2006). Associa-se este elemento a encefalopatias, com redução da função nervosa periférica e da condução das fibras nervosas mielinizadas (BLEECKER et al., 2005). GORELL et al. (1999) associaram a

exposição ao chumbo com o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. WEISSKOP et al., 2007, relacionaram a intoxicação do chumbo à doença de Alzheimer.

A exposição ao chumbo também está associada a complicações cardiovasculares e subseqüentemente, o surgimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) (BAGCHI, PREUSS, 2005; MARTIN et al., 2006; PARK et al., 2006). No sistema hematopoiético, o Pb afeta a formação de eritrócitos e prejudica a síntese da heme e da globina, o que pode acarretar anemia ao organismo contaminado (FOX, 1987; REISS, HALM, 2007). O chumbo pode afetar a síntese heme de maneira dose dependente por “downregulation” das 3 enzimas essenciais envolvidas na sua síntese: ácido  $\delta$ -aminolevulinato-deidratase (ALAD), 5-aminolevulinato sintetase (ALAS) e ferroquelatase (PIOMELLI, 2000). Esse metal pode inibir as três enzimas, mas seu efeito mais pronunciado se dá sobre a ALAD e seu grau de inibição tem sido usado clinicamente para detectar o grau de envenenamento por chumbo. Embora a inibição dessa enzima já ocorra com concentrações sanguíneas de 10-20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , a biossíntese da heme não diminui até a ALAD estar inibida de 80-90%, o qual ocorre com concentrações sanguíneas acima de 55  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (AHAMED et al., 2005).

Entre os tecidos moles, o rim e o fígado apresentam maiores concentrações de chumbo, pois esses órgãos participam da desintoxicação e metabolismo de substâncias tóxicas no organismo (GUIMARÃES et al., 2012). A exposição ao chumbo pode causar no tecido renal, disfunção tubular proximal e nefropatia irreversível dependendo do regime de exposição (YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006, GRANT, 2008; RASTOGI, 2008; BERRAHAL et al., 2011).

No fígado, lesões morfológicas foram observadas em ratos expostos a baixas doses de chumbo (ADEYEMI et al., 2009), confirmando a hepatotoxicidade do chumbo relatada por outros autores (ASSIS et al., 2005; SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). Outros efeitos tóxicos do chumbo nesse tecido incluem aumento da peroxidação lipídica e redução dos níveis

de antioxidantes endógenos, além da redução do número de divisões celulares (EL-ASHMAWY et al., 2006; BERRAHAL et al., 2011).

Vários estudos tem abordado a possível relação entre a função reprodutiva e exposição ao chumbo (RONIS et al., 1996; JARREL et al., 2006; ANJUN et al., 2011). Os principais efeitos tóxicos da exposição ao chumbo sobre o sistema reprodutor masculino em humanos e animais incluem anormalidades da espermatogênese (motilidade e número de espermatozoides reduzidos), infertilidade, função prostática alterada e mudanças dos níveis de testosterona sérica (KASPERCZYK et al., 2008; FLORA, PACHAURI, SAXENA, 2011; ANJUN et al., 2011). No sexo feminino, as principais alterações estão relacionadas à infertilidade, hipertensão durante a gravidez, parto prematuro e alterações dos níveis do hormônio luteinizante e foliculo estimulante, através da ação tóxica do chumbo sobre os ovários (COWI, 2003; KRIEG, 2007; FLORA, PACHAURI, SAXENA, 2011).

A exposição ao chumbo altera vários parâmetros da resposta imune (QUEIROZ et al., 2011), entre os quais podemos destacar a imunossupressão humoral e celular (KOLLER, ROAN, 1980; QUEIROZ et al., 2003). Outros estudos relataram redução da atividade de enzimas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica na medula óssea de ratos expostos ao acetato de chumbo na água de beber por 3 semanas (QUEIROZ et al., 2008; HALEAGRAHARA et al., 2011).

## **1.2 Tecidos Ósseo**

O osso é um tecido metabolicamente ativo que fornece suporte e proteção mecânica para órgãos vitais tais como medula óssea e cérebro, e desempenha também outras funções, dentre as quais podemos destacar sua função como órgão metabólico mantendo as maiores

reservas de cálcio e fosfato do organismo. Esse tecido é constituído basicamente de células ósseas (10%), cristais minerais (60%) e matriz orgânica (30%) (VASHISHTH, 2005; FENG, MCDONALD, 2011). A matriz orgânica inclui especialmente colágeno tipo I (88%), outras proteínas (osteonectina, osteopontina, sialoproteínas ósseas, osteocalcina, fosfoproteínas), lipídeos e glicosaminoglicanos (1-2%) (YOUNG, 2003).

Em termos de constituição celular, o tecido ósseo é formado pelas células osteoprogenitoras: são células derivadas do mesênquima e apresentam potencial de se diferenciar em osteoblastos; os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea e regulam a mineralização desta; os osteócitos, que representam os osteoblastos que ficam circundados pela matriz óssea mineralizada e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; RUBIN, RUBIN, JACOBS, 2006; FERNANDEZ et al., 2006a; FERNANDEZ et al., 2006b;).

O componente mineral do osso é constituído por cálcio, fosfato e carbonato formando os cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$  e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês, zinco e fluoreto em associação às fibras de colágeno (FERNANDEZ et al., 2006a). Alguns íons com propriedades químicas semelhantes às dos minerais que compõem o cristal podem penetrar e tornar-se parte do cristal. Metais pesados como o estrôncio e o chumbo podem substituir cálcio na hidroxiapatita (BRONNER, 2002; DOWD et al., 2001); o fluoreto ou cloreto podem substituir o íon hidroxila (RABINOWITZ, 1991; TUREK, 1991;).

O osso é um tecido dinâmico que é constantemente formado e reabsorvido em resposta a mudanças da carga mecânica, alteração dos níveis séricos de cálcio e em resposta a uma grande variedade de fatores endócrinos e parácrinos (WALKLEY et al., 2007). Em condições fisiológicas, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea garante a sua integridade biomecânica, prevenindo-o contra o acúmulo de microfissuras e mantendo o



equilíbrio mineral (FERNANDEZ et al., 2006b; WALDORFF, GOLDSTEIN, McCREADIE, 2007). Distúrbios do balanço entre a formação e a reabsorção óssea podem ser causados por diversos fatores, tais como uso de medicamentos (CANALIS et al., 2007), alterações hormonais (HAMADA et al., 2007; HOLLAND et al., 2013; COSTA, BILEZIKIAN, 2013), idade (LEPPANEN et al., 2008) e xenobióticos (AKTER et al., 2003; BROULIK et al., 2010; MONIR et al., 2010; BEIER et al., 2013; KUPRASZEWICZ, BROZÓSKA, 2013).

O processo de remodelamento ósseo pode ser dividido em quatro fases distintas que se sobrepõem:

1) fase de iniciação/ativação do remodelamento: os sinais que desencadeiam a ativação do processo de remodelamento não são completamente entendidos, mas evidências demonstram que as células da linhagem osteoblástica que revestem a superfície óssea são estimuladas pela ação de citocinas como interleucina-11 (IL-11), prostaglandina E2 (PGE2), e proteína relacionada com PTH (PTHrP) e oncostatina M (OSM). Outro fator estimulador do processo de remodelamento é a ocorrência de apoptose do osteócito, induzindo o aparecimento de uma microfissura na matriz óssea, que estimulam as células da linhagem osteoblástica a sintetizarem e liberarem proteases que expõem uma pequena área de matriz óssea mineralizada, iniciando o recrutamento de progenitores osteoclásticos e iniciando o processo de remodelamento (LERNER, 2000; TROEN, 2003). Uma classe destas proteases responsáveis pela exposição da matriz óssea mineralizada e do remodelamento da MEC é a das metalopeptidases de matriz (MMPs), das quais a MMP-2 parece ter um papel fundamental na osteogênese e iniciação do processo de remodelamento (MOSIG et al., 2007; GALLIERA, BANFI, CORSI, 2010). Os osteoblastos também secretam fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF), que promove proliferação e estimula a expressão de RANK pelos precursores osteoclásticos hematopoiéticos. Outra molécula expressa pelos osteoblastos é a RANKL (um ligante de RANK na superfície de osteoblastos e pré-osteoblastos). A interação

entre RANKL e seu receptor inicia a atividade e diferenciação osteoclástica e a síntese de proteínas de fusão e adesão, estimulando a reabsorção. As células da linhagem osteoblástica também expressam osteoprotegerina (OPG). A RANKL se liga à OPG, um receptor solúvel, e assim a diferenciação osteoclástica é inibida (WRIGHT et al., 2009; PARFITT, 2006). Outros fatores sistêmicos, tais como fator de crescimento fibroblástico (FGF), hormônio da paratireóide (PTH), vitamina D3, glicocorticóides, estrógeno e prostaglandina E2 agem sobre o processo de remodelamento ósseo através da modulação da expressão de OPG e RANKL (DIMITRIOS et al., 2006; BOYCE et al., 2012).

2) fase de reabsorção óssea e recrutamento de células osteoprogenitoras mesenquimais: os osteoclastos se aderem à superfície óssea mineralizada através da ligação de integrinas expressas em sua superfície com sequência de aminoácidos específicos de proteínas na superfície da matriz óssea (DAVIES et al., 1989). Após adesão à matriz, os osteoclastos 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 (PALUMBO et al., 2001; TROEN, 2003; FERNANDEZ et al., 2006b). O processo de reabsorção da matriz óssea libera diversos fatores presentes na própria matriz, incluindo o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que estimulam a diferenciação osteoblástica e formação da matriz óssea (síntese do osteóide) (SIMS, GOOI, 2008). Os osteoclastos também produzem fatores capazes de estimular a diferenciação osteoblástica, como a Efrina-B2 (um ligante presente na membrana de osteoclastos) que age através de um mecanismo de contato sobre EphB-4, seu receptor na superfície de osteoblastos, para promover diferenciação osteoblástica e formação óssea (ZHAO et al., 2006, MATSUO, OTAKI, 2012).

3) diferenciação osteoblástica e síntese da matriz osteóide: osteoblastos iniciam a síntese da matriz óssea. A comunicação entre osteoblastos através de junções gap parece ser importante nesse processo (CIVITELLI, 2008).

4) mineralização do osteóide e finalização do ciclo de remodelamento: A medida que o ciclo de remodelamento termina, a secreção de osteóide é finalizada e alguns osteoblastos tornam-se quiescentes e ficam na superfície óssea, enquanto outros ficam aprisionados pela matriz óssea mineralizada e tornam-se osteócitos (SIMS, GOOI, 2008). Osteócitos produzem esclerostina, que suprime a formação óssea osteoblástica (BEZOOIJEN et al., 2008).

A definição de qualidade óssea ainda é controversa, mas esta abrange as propriedades materiais e estruturais do osso. Entre os parâmetros considerados para prever a força óssea e o risco de fraturas, a quantidade de tecido ósseo, avaliada pela densidade mineral óssea ainda é um dos mais utilizados (AMMANN, RIZZOLI, 2003; SAITO, FUJII, MARUMO, 2006). No entanto, a densidade mineral óssea não é capaz de explicar a variação de força óssea e risco de fraturas em diferentes populações (FERRETI, CAPOZZA, ZANCHETTA, 1996). Dados publicados de Estudo de Fraturas Osteoporóticas demonstram que a densidade mineral óssea podem prever apenas 28% das fraturas de quadril (STONE et al., 2003). A importância de outros fatores tem sido considerados, dentre estes podemos destacar as propriedades geométricas (rede trabecular e macroestrutura cortical) e propriedade materiais (calcificação da matriz e composição e arranjo espacial dos cristais, fibras colágenas e lamelas) e as microfissuras potencialmente existentes (VIGUET, CARRIN et al., 2006; FRIEDMAN, 2006; COMELEKOGU et al., 2007). Adicionalmente, outro fator a ser considerado é a taxa de turnover ósseo como determinante da integridade estrutural do osso e que pode também influenciar a resistência óssea. Um aumento da formação óssea produz pequenos cristais e um aumento da absorção óssea impede a maturação mineral e das ligações cruzadas de colágeno (WEINSTEIN, 2000). Também, acelerado turnover ósseo tem mostrado

aumento da fragilidade óssea devido ao acúmulo de osteóide e redução da mineralização secundária, resultando em reduzida resistência óssea (LLOYD et al., 2008).

### 1.3 Chumbo e Tecido Ósseo

O osso é o principal local de armazenamento de chumbo no organismo (WHO, 2001; BRONNER, 2002) e a maior fonte endógena de chumbo (BERGLUND et al., 2000). Este metal se acumula no esqueleto durante a vida e afeta o tecido ósseo diretamente, influenciando a formação de hidroxiapatita (DOWD et al., 2001) e a atividade das células ósseas (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991), bem como indiretamente através da perturbação do metabolismo mineral (KUPRASZEWICKZ, BROZÓSKA, 2013).

A intoxicação por chumbo já é bem conhecida, mas só recentemente demonstrou-se que exposição a baixas doses de chumbo estão relacionadas com diversas patologias, tais como osteopatias (CAMPBELL et al., 2004) e osteoporose (SILBERGELD et al., 1988; SUN et al. 2008). Redução do crescimento em crianças (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997) e redução do crescimento da cauda em ratos (HAMILTON, O'FLAHERTY, 1994) expostos ao chumbo tem sido relatadas. Evidências de alterações do crescimento ósseo tem sido relatadas em animais expostos ao chumbo (ESCRIBANO et al., 1997), como indicado por alterações da placa de crescimento ósseo (HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995) e inibição do crescimento das epífises em fêmures de ratos contaminados com a dose 17 mgPb/Kg MC de chumbo, durante o período de 50 dias (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997).

Existem estudos epidemiológicos associando a concentração de chumbo sanguínea ( $3,3 \pm 2,2 \mu\text{g/dL}$ ) à redução da densidade mineral (THEPPEANG et al., 2008; CAMPBELL et

al., 2004; SUN et al., 2008; RAAFAT, HASSAN, AZIZ, 2011) e à fraturas ósseas (KHALIL et al., 2008) em humanos. Outros autores, como BAGCHI e PREUSS (2005), observaram redução da densidade mineral óssea em ratos contaminados com acetato de chumbo a 1% na água consumida por estes animais durante 40 dias. RONIS et al. (2001) associaram a intoxicação com acetato de chumbo à inibição da osteoblastogênese, e a exposição prolongada reduziu a resistência óssea e o crescimento esquelético em ratos. Em outro estudo, realizado por MONIR et al., 2010, com ratas expostas à dose de 250 ppm de chumbo por 4 meses, observou-se redução da densidade mineral óssea, aumento do remodelamento ósseo e tendência à redução da resistência óssea. KUPRASZEWICZ, BROZÓSKA (2013), em um estudo conduzido em ratos com 8 semanas, administrando acetato de chumbo na dose de 500 mg/Kg na água de beber, durante 12 semanas, observaram aumento da reabsorção óssea e inibição da formação, além de inibição da biossíntese e aumento da degradação do colágeno ósseo. Recente estudo conduzido por BEIER et al (2013), em ratas recebendo 50 ppm de chumbo, demonstraram redução da densidade mineral óssea, acompanhada por redução do número de osteoblastos e da resistência óssea a fraturas.

#### **1.4 Principais Agentes Quelantes do Chumbo Usados na Terapêutica**

Utilizam-se agentes quelantes na terapêutica para desintoxicação do chumbo em casos de exposição aguda nos quais os pacientes apresentem concentrações sanguíneas entre 73,1 e 96,3 µgPb/dL (OGAWA et al., 2008; D'SOUSA et al., 2011). Particularmente para o Pb, a desintoxicação é usualmente realizada empregando-se Etilenediaminatetracetato de Cálcio Dissódico (CaNa<sub>2</sub>EDTA), D-Penicilamina, Dimercaprol (BAL), Succimer- ácido 2,3-dimercapto succinico (DMSA) análogo estrutural do “British Anti Lewisite” - BAL (FLORA, PACHAURI, 2010).

#### 1.4.1 $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ (Etilenodiaminatetracetato de cálcio dissódico)

- Indicação: tratamento das intoxicações por metais, principalmente o chumbo.
- Mecanismo de ação: Forma um complexo quelante estável com o chumbo do depósito extracelular, sendo excretado pelos rins, sem ser metabolizado (KLAASSEN, 1998).
- Dose: 150 mg/kg/dia (CORY-SLECHTA et al., 1987).
- Efeitos colaterais e adversos: náusea, vômito, mal estar, fadiga, calafrios, mialgia intensa, cefaléia frontal, anorexia, poliúria, febre em humanos e depleção dos estoques de cálcio e zinco, nefrotoxicidade (falência renal do túbulo distal) em ratos (ANDERSEN, AASETH, 2002; KALIA, FLORA, 2005, FLORA, PACHAURI, 2010).



Figura 1. Estrutura química do  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  e quelação do chumbo.

#### 1.4.2 D-Penicilamina

- Indicações: intoxicações por metais, particularmente o alumínio
- Efeitos colaterais e efeitos adversos: são semelhantes aos da hipersensibilidade à penicilina, tais como: eritema, febre, anorexia, náuseas, vômitos, eosinofilia, leucopenia, agranulocitose,

anemia hemolítica autoimune, hiporeflexia, hematúria, proteinúria, glomerulopatia membranosa (FLORA, PACHAURI, 2010).

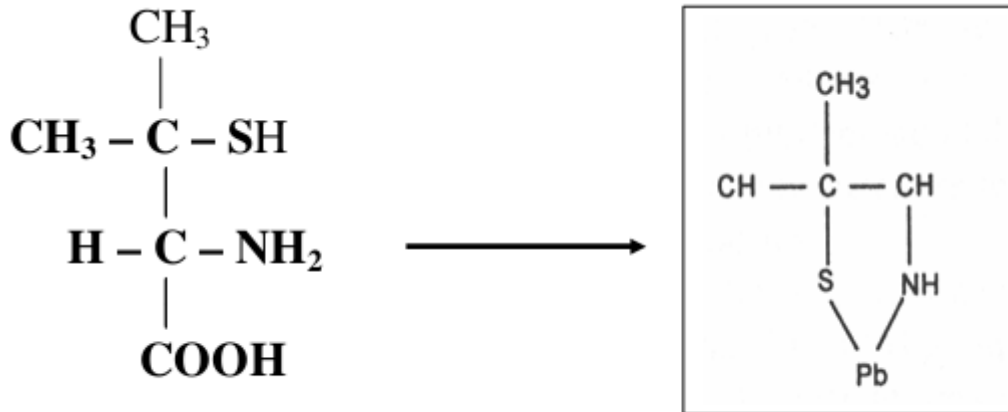


Figura 2. Estrutura química do D-Penicilina e quelação do chumbo.

#### 1.4.3 Ácido Dimercapto Succínico (DMSA)

- Indicações: intoxicações por metais, especialmente chumbo, arsênio e mercúrio. .
- Efeitos colaterais e adversos: São menos frequentes se comparados aos outros agentes quelantes, a maioria das queixas são brandas, mas são observados: náusea, vômitos, dor abdominal, flatulência, hiperventilação e aumento da atividade das transaminases (ANDERSEN, 2004, FLORA, PACHAURI, 2010).

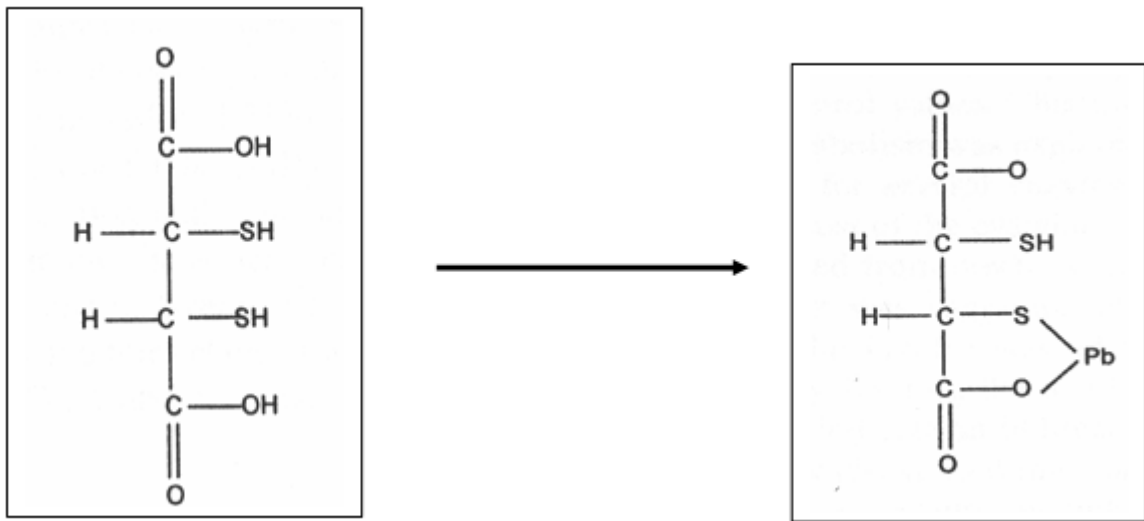


Figura 3. Estrutura química do DMSA e quelação do chumbo.

#### 1.4.4 Dimercaprol ou BAL (British Anti Lewisite).

- Indicações: intoxicações por metais, principalmente mercúrio e chumbo.
- Efeitos colaterais e adversos: taquicardia, irritabilidade, febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, parestesias (formigamento) das extremidades, hipertensão arterial, queimação na língua, nos lábios e nos olhos, sudorese, espasmos musculares e cefaléia (KALIA, FLORA, 2005).



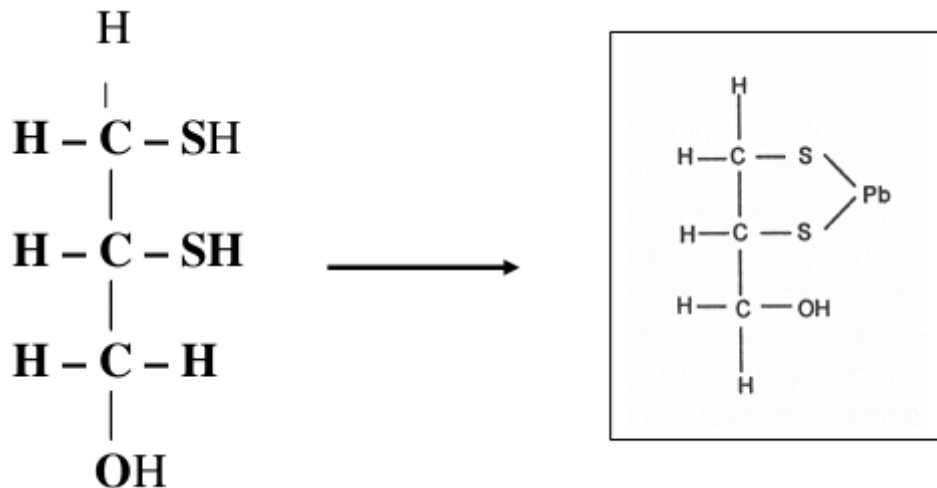


Figura 4. Estrutura química do Dimercaprol (BAL) e quelação do chumbo.

Diante dos inúmeros efeitos colaterais e/ou adversos supracitados questiona-se a terapêutica convencional para desintoxicação dos metais. Novas opções terapêuticas estão emergindo com a utilização de vitaminas - Tiamina B1, Piridoxina B6 e Riboflavina,  $\alpha$ -tocoferol. Outros tratamentos incluem a utilização de quelantes e antioxidantes naturais como carotenóides ( $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína), flavonóides (quercetina, catequinas e ácido lipóico) e curcumina (KALIA, FLORA, 2005; FLORA, PACHAURI, 2010). Nos últimos anos tem aumentado o interesse, entre as pesquisas de fitoterapia, em usar plantas com atividade quelante e antioxidante contra a toxicidade de metais tóxicos. Recentemente tem sido demonstrada a capacidade de *Chlorella vulgaris* de quelar metais e agir como antioxidante em intoxicações por metais tóxicos. Este efeito tem incentivado pesquisas para testar os possíveis efeitos protetores dessa alga sobre toxicidade de metais tóxicos sobre diversos órgãos.

## 1.5 *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* (CV) é uma alga unicelular usada como um alimento saudável e funcional no Japão, Estados Unidos e outros países. CV contém muitas substâncias bioativas, como estabelecida por sua atividade anti-aterogênica (SANO, TANAKA, 1987), antiolesterolêmica (LEE, PARK, KIM, 2008), antitumoral (RAMOS, TOLEDO, QUEIROZ, 2010), antioxidante (YUN et al., 2011), e efeitos protetores contra infecção viral e bacteriana (HASEGAWA et al., 1997). Bioquimicamente, *Chlorella* contém muitos antioxidantes como clorofila, luteína,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, e  $\alpha$ -tocoferol, e grande quantidade de outras vitaminas, minerais e fibras (SHIN et al., 2008). *Chlorella* e outras algas contêm altas concentrações de fitoquelatinas (PCs), que são olipeptídeos de glutathione capazes de ligar fortemente íons metálicos ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) e metais essenciais ( $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) (QUEIROZ et al., 2008).

Alguns estudos tem mostrado que administração de *Chlorella vulgaris* (CV) pode reduzir a absorção e acúmulo de cádmio, e também prevenir ou reduzir o dano histológico hepático em ratos (KIM, KWON, 2009; SHIM et al., 2009). Outros autores demonstraram que *Chlorella* influencia a absorção e excreção de metilmercúrio, um metal pesado altamente tóxico (UCKIKAWA et al., 2010). *Chlorella* também age restaurando a celularidade da medula óssea e produção de citocinas, alteradas em animais expostos ao chumbo (QUEIROZ et al., 2011). Recentemente, demonstrou-se a habilidade de CV de reduzir a toxicidade do chumbo sobre o sangue e órgãos alvo tais como osso, rim e fígado (QUEIROZ et al., 2008; UCKIKAWA et al., 2009; YUN et al., 2011). Além disso, os agentes quelantes contidos em *Chlorella* restauraram os níveis normais de ALA, particularmente no fígado, e a biossíntese da heme em animais expostos ao chumbo, sugerindo elevada afinidade da *Chlorella* a esse metal

(QUEIROZ et al., 2008). Os compostos contendo um grupo sulfidrila quelando metais já está bem estabelecido na literatura e pode ser um fator envolvido na remoção de metais tóxicos por CV (SINICROPI et al., 2010). Entretanto, a influência benéfica de CV sobre a resistência esquelética à fraturas em animais expostos ao chumbo não tem sido estudada até agora.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral:**

Avaliar a possível influência protetora do Extrato de *Chlorella vulgaris* (CV) e do Ácido Etilenodiaminotetracético de Cálcio Dissódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) sobre as propriedades físicas e biomecânicas ósseas em ratos expostos ao Acetato de Chumbo (Pb).

### **Específicos:**

- Analisar as concentrações de chumbo, cálcio, zinco e magnésio, por meio da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente, em fêmur esquerdo e 4ª vértebra lombar dos animais dos diferentes grupos experimentais. Usando a mesma técnica, analisar as concentrações de chumbo e zinco no sangue, fígado, rim, cérebro e tibia dos animais dos diferentes grupos experimentais.
- Analisar as concentrações de cálcio sérico e conteúdo de cálcio nas 5ª vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais.
- Analisar os parâmetros biométricos ósseos dos fêmures direitos e 5ª vértebras lombares (L5) de animais dos diferentes grupos experimentais.
- Analisar os parâmetros biomecânicos ósseos por meio do teste de flexão a três pontos em fêmures direitos e do teste de compressão nas 5ª vértebras lombares de animais dos diferentes grupos experimentais.
- Analisar os parâmetros físicos ósseos dos fêmures direitos e 5ª vértebras lombares de animais dos diferentes grupos experimentais.

- Analisar a densidade mineral óssea das 3ª vértebras lombares (L3) dos animais dos diferentes grupos experimentais pela técnica de Densitometria Radiográfica.
- Analisar a atividade de MMP - 2 em tíbias direitas de animais dos diferentes grupos experimentais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo do Estudo

Este estudo experimental, cujo modelo foi o animal randomizado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos: Protocolo CEEA nº. 047/2009.

#### 3.2 Animais

Utilizou-se neste experimento, 64 ratos da linhagem “Wistar” (*Rattus norvegicus albinus*), do gênero masculino, com 90 dias de idade (média de massa corporal inicial de 300-345g), 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 Extrato de *Chlorella vulgaris* (CV) sobre as variáveis ósseas em animais expostos ao Acetato de Chumbo (Pb), os animais foram distribuídos em 8 grupos com 8 animais cada:

- Grupo Controle: 8 animais tratados com solução salina 0,9% (0,1ml/100g MC).
- Grupo EDTA: 8 animais tratados com Ácido Etilenodiaminatetraacético de Cálcio Dissódico (150 mg/Kg MC).
- Grupo CV 50: 8 animais tratados com Extrato de *Chlorella vulgaris* (50 mg/Kg MC).
- Grupo CV 250: 8 animais tratados com Extrato de *Chlorella vulgaris* (250 mg/Kg MC).
- Grupo Pb: 8 animais tratados com Acetato de Chumbo (250 mg/Kg MC).
- Grupo Pb + EDTA: 8 animais tratados com Acetato de Chumbo (250 mg/Kg MC) mais EDTA (150 mg/Kg MC).
- Grupo Pb + CV 50: 8 animais tratados com Acetato de Chumbo (250 mg/kg MC) mais CV 50 (50 mg/Kg MC).
- Grupo Pb + CV 250: 8 animais tratados com Acetato de Chumbo (250 mg/kg MC) mais CV 250 (250 mg/Kg MC).

Os tratamentos com EDTA e com *Chlorella* ocorreram simultaneamente à exposição com Acetato de Chumbo. A dose selecionada de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  baseou-se nas exposições ambientais em humanos (ESCRIBANO et al, 1997; ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005). A administração dos compostos foi realizada pelo método da

gavagem gástrica (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005; FAZAKAS, LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005), uma vez na semana, durante 8 semanas. A dose de EDTA foi selecionada como recomendada pela literatura (OSER, OSER, SPENCER, 1963; CORY-SLECHTA et al., 1987). As doses de *Chlorella* foram baseadas em estudos anteriores (QUEIROZ et al., 2003; QUEIROZ et al., 2008; QUEIROZ et al., 2011), nos quais os autores observaram redução significativa da concentração de chumbo sanguínea.

Durante o tratamento, a massa corporal foi mensurada semanalmente para adequação da dose a ser administrada e para monitorar o desenvolvimento e saúde dos animais.

### **3.4 Extrato de *Chlorella vulgaris* (CV)**

*Chlorella vulgaris*: O extrato liofilizado da alga *Chlorella vulgaris* foi gentilmente doado pelo Dr. Takashi Hasegawa, Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd. (Japão). A análise química da composição do extrato, fornecida pelo fabricante, demonstrou a presença de 44,0 g de proteínas, 39,5 g de carboidratos e 15,4 g de ácidos nucleicos em 100 g de extrato seco (HASEGAWA et al., 1990).

Para o tratamento dos animais, o Extrato de *Chlorella vulgaris* foi ressuspenso em água destilada a 37 °C e doses de 50 mg/kg e 250 mg/Kg foram administradas por via oral (gavagem), uma vez por semana, durante 8 semanas.



### **3.5 Eutanásia**

Após oito semanas da administração de salina, acetato de chumbo e CV, os animais foram eutanaziados por decapitação cervical, com subsequente coleta de sangue diretamente do tronco. Os fêmures direitos e vértebras foram dissecados e mantidos em solução salina a -20 °C. O fêmur esquerdo, tíbia esquerda e direita foram dissecados e mantidos a -80 °C até as subseqüentes análises. O fígado, rim e cérebro e sangue foram mantidos a -80 °C para as análises das concentrações dos metais.

### **3.6 Parâmetros Analisados**

#### **3.6.1 Parâmetros químicos**

##### **3.6.1.1 Concentração de chumbo, cálcio, zinco e magnésio no tecido ósseo**

As concentrações de chumbo, cálcio, zinco e magnésio foram determinadas no fêmur e vértebra lombar (L4). Na tíbia foram mensuradas as concentrações de Pb e Zn. As concentrações dos metais foram determinadas por ICP-MS (Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente) de acordo com o método proposto por PALMER et al.

(2006) e BATISTA et al. (2009). As amostras (75 mg) foram pesadas dentro de tubos cônicos (15 mL), onde foi adicionado 2 mL de uma solução de HNO<sub>3</sub> concentrado e mantidas por 24 horas. Após esse período adicionou-se 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e mantidas por mais 24 horas. Depois desse tempo completou-se o volume para 15 mL com água milli Q. O limite de detecção (LD) para o chumbo foi de 0,0066 µg/g e para o zinco 0,1 µg/g. A validação dos dados foi baseada na análise de seis materiais de referências certificados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia de Instituto Nacional de Pesquisas do Canadá. Os resultados foram expressos em µg/g para Pb e Zn e em mg/g para Ca e Mg.

#### 3.6.1.2 Concentração de chumbo e zinco no sangue total, fígado, rim e cérebro

As concentrações de chumbo e zinco no sangue total foram determinadas por ICP-MS (Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente) de acordo com o método proposto por Batista et al. (2009). As amostras (100 µl) foram diluídas 50x em tubos de polipropileno Falcon® (Becton Dickinson) com uma solução contendo 0,01% (v/v) Triton® X-100 e 0,5% (v/v) de ácido nítrico e 10 µg/L de Ródio (padrão interno). O limite de detecção (LD) para o chumbo foi 3 ng/L. O controle de qualidade para determinação do chumbo no sangue total foi fixada pela análise de Materiais Padrão de Referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias dos Estados Unidos. Adicionalmente, vários materiais de referência secundários fornecidos ambos pelo Departamento de Saúde de Nova Iorque ou pelo Instituto Nacional de Saúde de Quebec, Canadá, foram usados para determinação de elementos traço em sangue total. As amostras de referência foram analisadas antes e após as

amostras ordinárias. Valores experimentais estavam sempre de acordo com a referência fornecida ou certificada. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de sangue total.

As concentrações de chumbo e zinco em fígado, rim e cérebro foram determinadas por ICP-MS (Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente) de acordo com o método proposto por Batista et al. (2009). As amostras (75 mg) foram colocadas em tubos cônicos (15 mL) e adicionado 1 mL de uma solução de Hidróxido de Tetrametilamônia (TMAH) 50% (v/v). A seguir foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 12 h e o volume completado para 10 mL com uma solução contendo 0,5% (v/v)  $\text{HNO}_3$ , 0,01% (v/v) Triton® X-100 e 10  $\mu\text{g/L}$  de Ródio. Após a preparação, as amostras foram incubadas a  $-20^\circ\text{C}$  por 3 dias até as análises por ICP-MS. O limite de detecção (LD) para o chumbo foi de 0,0066  $\mu\text{g/g}$  para o chumbo e 0,1  $\mu\text{g/g}$  para o zinco. A validação dos dados foi baseada em análise de seis materiais de referências certificados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia de Instituto Nacional de Pesquisas do Canadá. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{g/g}$ .

### 3.6.1.3 Concentração de cálcio sérico e conteúdo de cálcio

O sangue foi centrifugado e o soro foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até a presente análise. Com a obtenção do material mineral das quintas vértebras lombares, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico as concentrações de cálcio sérico e conteúdo de cálcio das quintas vértebras lombares foram determinadas, com a utilização do kit comercial Labtest®.

### **3.6.2 Parâmetros Biométricos**

#### **3.6.2.1 Massa Corporal**

A Massa Corporal (g) de cada animal dos diferentes grupos experimentais foi verificada semanalmente com o intuito de adequação da dose individual utilizada no tratamento (salina, contaminante ou quelantes) e para o acompanhamento do desenvolvimento e verificação da saúde dos animais.

#### **3.6.2.2 Comprimento dos ossos**

O Comprimento (mm) são medidas dos fêmures e das vértebras, mensuradas por paquímetro. Nos fêmures, esta mensuração foi realizada seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tíbia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

### **3.6.3 Parâmetros biomecânicos**

A força máxima (N), rigidez (N/mm) e resiliência (J) foram os parâmetros biomecânicos utilizados para avaliar as propriedades mecânicas dos fêmures e das vértebras. Estes parâmetros foram obtidos através do ensaio mecânico de flexão a três pontos (fêmures)

e de compressão (vértebras), utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 5).

### 3.6.3.1 Ensaio mecânico de flexão a três pontos

No teste de flexão a três pontos, as extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso (Figura1) (SHIMANO, SHIMANO, VOLPON, 2002; AKHTER et al, 2003; AKHTER et al, 2004).

No início do teste foi aplicada uma pré-carga de 10 N por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido antero-pósterior e perpendicular ao eixo longitudinal para estabilizar o fêmur. Após a acomodação foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min., até o momento da fratura do osso.

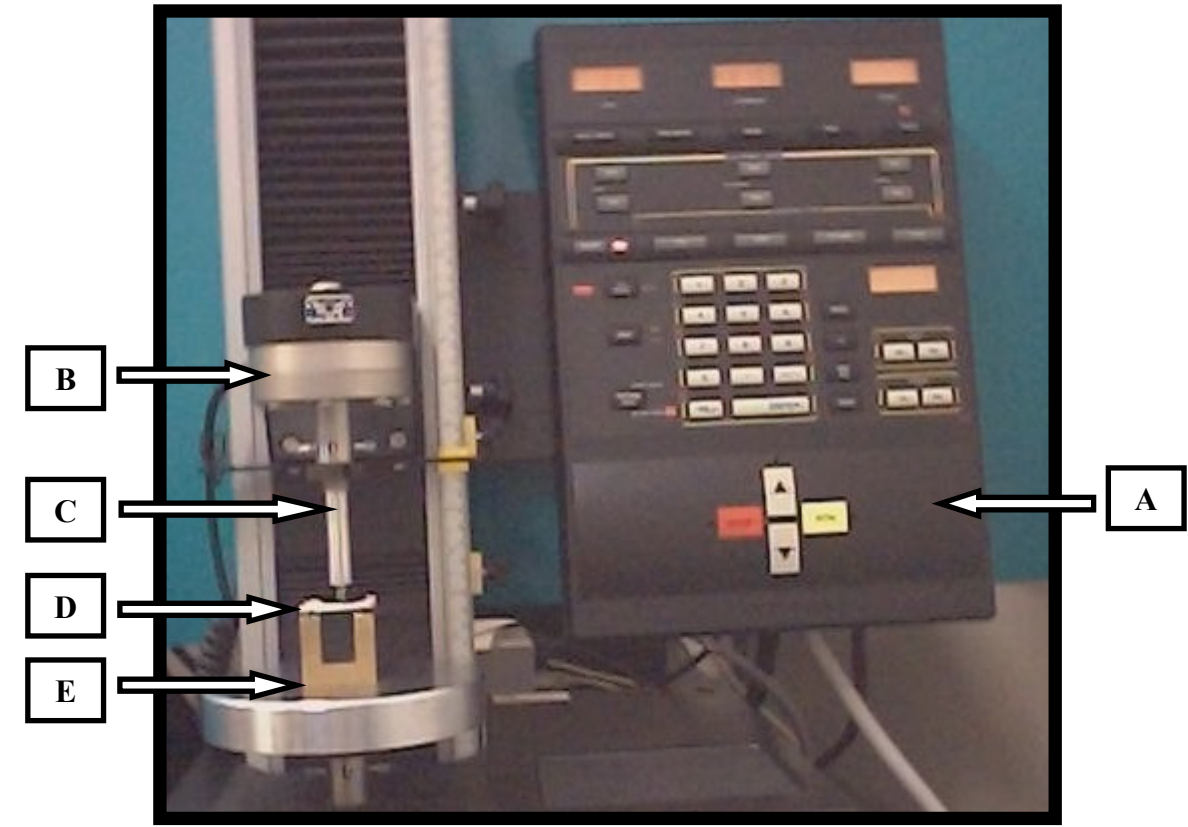


Figura 5: Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **E:** suporte.

### 3.6.3.2 Ensaio mecânico de compressão de vértebras

No teste de compressão das vértebras, as extremidades do corpo vertebral foram previamente lixadas para obtenção de superfícies planas, mensurada o comprimento para a padronização e colocadas sobre um suporte plano para receberem a carga de compressão. Esta carga foi aplicada utilizando um célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1 kN. A carga foi aplicada no sentido crânio-caudal por uma haste com

extremidade plana em uma velocidade constante de 2 mm/min até a compressão de dois terços da altura de cada amostra.

Como resultado da força aplicada ao fêmur e vértebra, obteve-se um gráfico força-deformação pelo software Instron Series IX. Através desta curva obtiveram-se os principais parâmetros relacionados a seguir.

Força Máxima (N) – (F<sub>máx</sub>)

Caracteriza a maior força aplicada no ensaio, também conhecida como última força (Figura 6).

Rigidez (N/mm) – (Rig)

Determinada por meio da inclinação da reta ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD et al., 1994). Representa a capacidade de resistir a deformações (Figura 6).

Resiliência (J) – (Res)

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 (Figura 6).

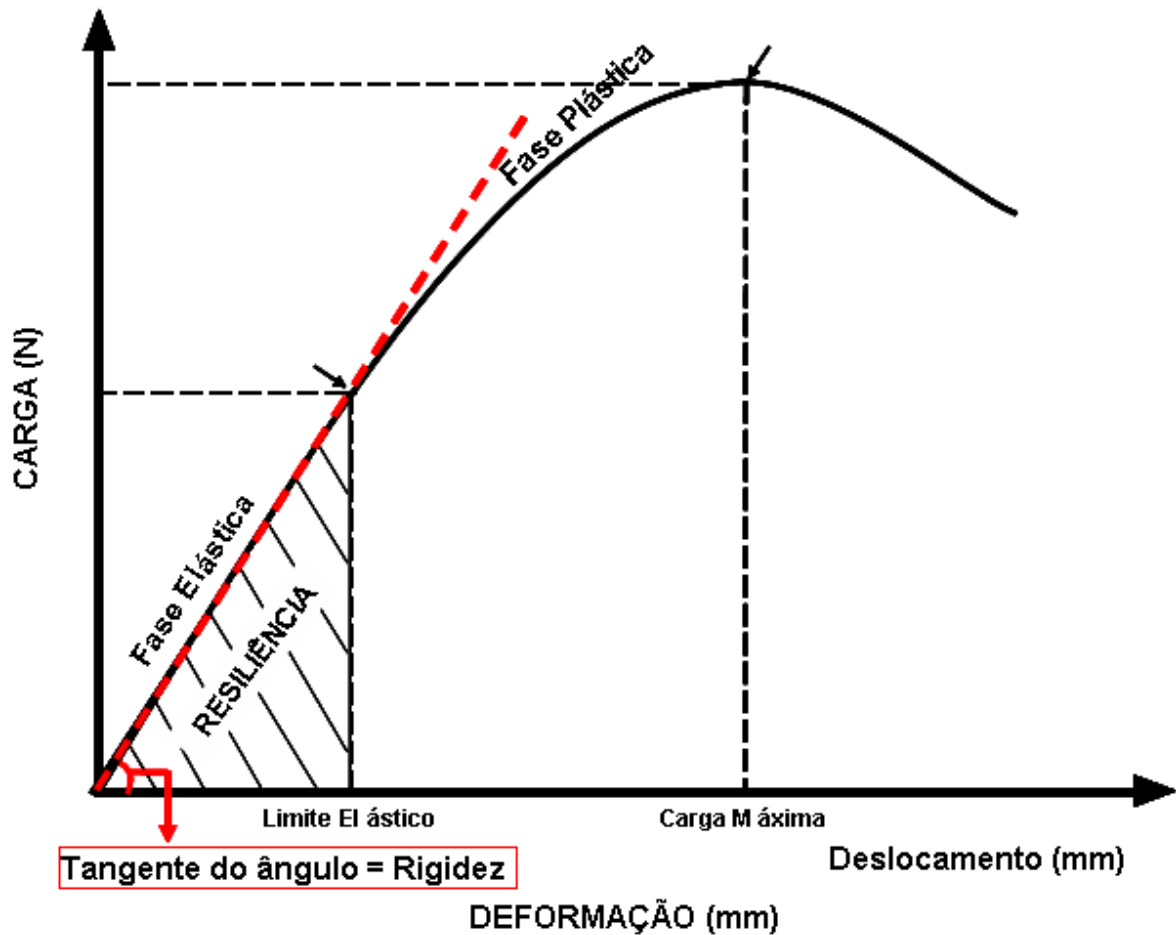


Figura 6: Representação gráfica da curva força x deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas, ilustrando o ponto máximo da força aplicada (limite máximo); o cálculo da (Tangente do ângulo) determina a rigidez do material e a região elástica (o cálculo desta área hachurada determina a resiliência ou a energia absorvida pelo material na fase elástica).

### 3.6.4 Parâmetros Físicos

Os fêmures e as vértebras foram mantidos imersos em água destilada e colocados em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se as massas imersa ( $M_i$ ) e úmida ( $M_u$ ). Esses dados



foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram colocadas em uma estufa (marca Funbec) a 100° C, durante 24 horas com o intuito de desidratação e, posteriormente, obteve-se a massa seca ( $M_s$ ). Para obtenção da massa das cinzas (material mineral -  $M_m$ ), os ossos foram colocados em uma mufla a uma temperatura de 800° C por um período de 24 horas. 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 subseqüentemente densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

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

$\rho$

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

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

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100x(\text{Mu}-\text{Ms})}{\text{Pu}}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100x(\text{Ms}-\text{Mm})}{\text{Pu}}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100x\text{Mm}}{\text{Mu}}$$

Onde:

Mu = massa úmida óssea

Ms = massa óssea da amostra desidratada

Mi = massa imersa óssea

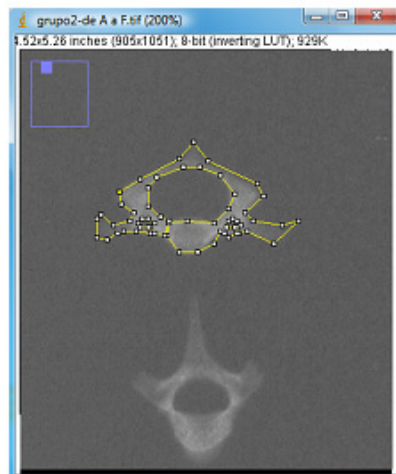
Mm = massa do material mineral (cinzas)

$\rho$  = densidade da água

### 3.6.5 Análise Densitométrica

A análise densitométrica ocorreu na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp-Araçatuba, Estado de São Paulo. Para a obtenção das imagens radiográficas foram utilizados procedimentos radiológicos de rotina. As vértebras foram radiografadas juntamente com o referencial de densidade. Esse referencial foi um penetrômetro ou escada de alumínio (largura

de 10 mm) de 9 degraus (0,18 mm de espessura para o primeiro degrau), variando de 0,5 em 0,5 mm até o sétimo, o oitavo com 3,92 e o nono com 5,0 mm de espessura. As radiografias foram então reveladas, escaneadas e analisadas com o auxílio de um programa computacional (Imaje J®). A imagem (Figura 07) foi processada pelo programa Imaje J® mostrando como é realizado o contorno da área da região de interesse. Cada um dos 9 degraus da escada foram mensurados e em seguida submetidos a cálculos para obtenção dos valores da densidade radiográfica em milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA, 1994; LOUZADA et al., 2001, BARREIRO et al., 2009).



---

Figura 7: Região de interesse circundada na vértebra utilizando ferramentas do programa Imaje J®.

### 3.6.6 Análise da atividade de MMP-2 na tíbia direita

Os procedimentos para determinação da atividade de MMP-2 do osso foram realizados segundo protocolo estabelecido por MARQUETI et al (2008). Cada grupo de ratos (n = 8) foi

analisado separadamente. O terço proximal da tíbia direita foi retirado, mensurou-se a massa de 100 mg de tecido e macerou-se em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0; 0,15 M NaCl; 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 20 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,5 mM NaN<sub>3</sub> e 0,01% de Triton X-100] (25 mg de tampão para cada mg de tecido) a 4 °C por um período de 24 horas. Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (10 minutos, 4°C em 13000 rpm). As amostras foram concentradas para 15  $\mu$ g de proteína total e 10  $\mu$ l de tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol (agente redutor) e resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 1mg/ml. Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. A seguir, incubou-se o gel com tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub>.5mM; NaN<sub>3</sub> 0,02% e ZnCl<sub>2</sub> 10 mM), a 37°C, por 20 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) e descorado com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização das áreas de atividade. Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e visualizar a atividade proteolítica das bandas. A análise densitométrica das bandas foi realizada usando o software de imagem GeneTools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK). As bandas encontradas em todos os grupos foram 72-62 Kda, sugerindo a ativação da MMP-2 conforme proposto por Fredericks e Mook (2004).

### **3.7 Análises Estatísticas**

Os dados obtidos em cada grupo média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os grupos foram comparados entre si pela análise de variância ANOVA Two-way (2 x 3) seguido

pelo teste de Bonferroni aplicados pelo programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL), versão 17 para Windows. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

### **3.8 Normas Técnicas referentes à elaboração deste 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 janeiro de 2013.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros Químicos

#### 4.1.1 Concentrações de chumbo no sangue, fígado, rim e cérebro

Na Tabela 1 encontram-se os valores das concentrações de chumbo no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A exposição ao chumbo resultou em um aumento da concentração desse metal no sangue total e nos órgãos estudados (fígado, rim e cérebro) quando comparada aos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. A administração de EDTA, CV 50 e CV 250 reduziram respectivamente as concentrações sanguíneas de chumbo em animais expostos ao acetato de chumbo, na razão de 30% com EDTA, 26% com CV 50 e 44% com CV 250, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes demonstrada pelos resultados da análise ANOVA/UNIANOVA (Análise de Variância Univariada).

No fígado, os quelantes EDTA, CV 50 ou CV 250 reduziram as concentrações de chumbo em 47%, 47% e 52% respectivamente, o que sugere interação dos agentes quelantes (EDTA, CV 50 e CV 250) com chumbo de forma significativa como revelado pela análise ANOVA/UNIANOVA.

Os tratamentos com EDTA (34%) ou CV 250 (48%) foram mais efetivos em reduzir a concentração de chumbo no rim em relação ao tratamento com CV 50 (28%).

Observa-se também a redução da concentração de chumbo no cérebro dos animais expostos seguida da quelação com EDTA (34%), CV 50 (20%) e CV 250 (43%).

**Tabela 1:** Concentrações de Pb no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.

Grupos	Pb sangue (ug/dl)	Pb fígado (ug/g)	Pb rim (ug/g)	Pb cérebro (ug/g)
Controle	0,80 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,04
EDTA	1,35 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
CV 50	1,00 ± 0,09	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
CV 250	0,62 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,02
Pb	18,74 ± 1,71 a, b, c, d	0,72 ± 0,09 a, b, c, d	5,92 ± 0,63 a, b, c, d	0,44 ± 0,02 a, b, c, d
Pb + EDTA	12,96 ± 1,41 a, b, e	0,38 ± 0,04 a, b, e	3,75 ± 0,51 a, b, e	0,29 ± 0,02 a, b, e
Pb + CV 50	13,76 ± 1,51 a, c, e	0,38 ± 0,07 a, c, e	4,12 ± 0,95 a, c	0,36 ± 0,02 a, c, e
Pb + CV 250	10,48 ± 0,67 a, d, e	0,34 ± 0,06 a, d, e	3,35 ± 0,28 a, d, e	0,25 ± 0,02 a, d, e

Média ± EPM. n= 7-8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb, p<0,05, (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo mais EDTA (Pb + EDTA), Chumbo mais Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo mais Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.1.2 Concentrações de zinco no sangue, fígado, rim e cérebro

As concentrações de zinco no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais encontram-se na Tabela 2.

Observa-se redução da concentração sanguínea de zinco no grupo Pb. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 não preveniu a redução da concentração de zinco em relação ao grupo Pb.

A concentração de zinco hepática aumentou em animais expostos a dose de 250 mg Pb/Kg MC quando comparada a do grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 não reduziu a concentração de zinco no fígado quando comparada ao grupo Pb.

As concentrações de zinco no rim e no cérebro foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 2:** Concentrações de Zn no sangue, fígado, rim e cérebro dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.

Grupos	Zn sangue (ug/ml)	Zn fígado (ug/g)	Zn rim (ug/g)	Zn cérebro (ug/g)
Control	5,41 ± 0,12	29,57 ± 1,16	24,60 ± 1,25	15,35 ± 0,17
EDTA	5,24 ± 0,12	28,38 ± 0,75	27,93 ± 1,25	16,60 ± 0,45
CV 50	4,97 ± 0,14	28,43 ± 0,48	27,43 ± 1,33	15,65 ± 0,40
CV 250	4,91 ± 0,11	31,17 ± 1,01	25,17 ± 0,76	16,19 ± 0,68
Pb	4,08 ± 0,08 a	35,62 ± 0,78 a	25,50 ± 0,57	16,03 ± 0,41
Pb + EDTA	4,04 ± 0,18 a, b	34,11 ± 0,74 a, b	24,67 ± 1,14	15,99 ± 0,31
Pb + CV 50	4,18 ± 0,10 a, c	34,11 ± 0,64 a, c	24,73 ± 0,23	15,98 ± 0,39
Pb + CV 250	3,97 ± 0,11 a, d	33,94 ± 1,24 a, d	23,91 ± 0,40	17,60 ± 0,85

Média ± EPM. n = 7-8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb p<0,05, (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.1.3. Concentrações de cálcio sérico e conteúdo de cálcio das vértebras lombares (L5)

Não observamos diferença das concentrações de cálcio sérico e do conteúdo de cálcio da quinta vértebra lombar (L5) quando comparamos os diferentes grupos experimentais (Tabela 3).



**Tabela 3:** Concentrações de cálcio sérico e conteúdo de cálcio da quinta vértebra lombar dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Parâmetros	
	Cálcio sérico (mg/dl)	Cálcio L5 (mg)
Controle	8,53 ± 0,39	14,83 ± 1,08
EDTA	8,78 ± 0,36	13,70 ± 0,85
CV 50	8,10 ± 0,10	13,89 ± 0,87
CV 250	8,56 ± 0,39	15,46 ± 1,47
Pb	8,29 ± 0,35	15,09 ± 1,03
Pb + EDTA	9,25 ± 0,19	15,44 ± 1,06
Pb + CV 50	9,30 ± 0,17	19,05 ± 0,61
Pb + CV 250	9,60 ± 0,59	19,67 ± 0,87

Média ± EPM. n = 7-8. Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250) Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.1.4 Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg no fêmur

Na Tabela 4 encontram-se as concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A concentração de chumbo aumentou no grupo exposto Pb quando comparada a dos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. Houve redução das concentrações de chumbo dos fêmures em animais expostos ao acetato de chumbo, na razão de 28% com EDTA, 39% com CV 50 e 62% com CV 250, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes de forma significativa como demonstrados pelos resultados da análise ANOVA/UNIANOVA.

Observa-se redução da concentração de zinco no grupo Pb quando comparada a dos grupos controle e EDTA. O tratamento com EDTA preveniu parcialmente (embora não

estatisticamente significativa) esta redução em animais expostos ao chumbo (Pb), enquanto CV 50 e CV250 não tiveram tal efeito.

Ressalta-se que não houve diferença das concentrações de cálcio dos fêmures quando comparamos os diferentes grupos experimentais. Entretanto, observa-se concentração de cálcio menor no grupo Pb em relação a todos os outros grupos experimentais.

A concentração de magnésio reduziu no grupo Pb quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com os diferentes agentes quelantes sozinhos ou concomitante com o Pb não mostraram diferenças.

**Tabela 4:** Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg do fêmur dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica .

Grupos	Chumbo (ug/g)	Zinco (µg/g)	Cálcio (mg/g)	Magnésio (mg/g)
Controle	0,12 ± 0,02	92,22 ± 3,85	25,00 ± 0,79	1,08 ± 0,03
EDTA	0,07 ± 0,01	97,99 ± 5,16	26,77 ± 0,94	1,15 ± 0,03
CV 50	0,06 ± 0,01	86,24 ± 1,96	24,44 ± 0,66	1,02 ± 0,03
CV 250	0,03 ± 0,00	91,28 ± 3,68	25,38 ± 1,09	1,01 ± 0,03
Pb	136,2 ± 12,6 <sub>a, b, c, d</sub>	74,76 ± 3,60 <sub>a, b</sub>	24,00 ± 0,80	0,96 ± 0,03 <sub>a</sub>
Pb + EDTA	97,33 ± 6,24 <sub>a, b, e</sub>	81,24 ± 3,64 <sub>b</sub>	24,87 ± 1,13	1,00 ± 0,04 <sub>b</sub>
Pb + CV 50	81,90 ± 7,25 <sub>a, c, e</sub>	74,48 ± 3,33 <sub>a, c</sub>	24,40 ± 0,84	0,97 ± 0,04
Pb + CV 250	51,38 ± 8,18 <sub>a, d, e</sub>	72,83 ± 4,34 <sub>a, d</sub>	24,46 ± 0,92	0,94 ± 0,04

Média ± EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb, p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.1.5 Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg nas vértebras lombares

Os valores das concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg nas quartas vértebras lombares (L4) dos animais dos diferentes grupos experimentais encontram-se na Tabela 5.

A concentração de chumbo aumentou no grupo Pb quando comparada a dos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. As concentrações de chumbo das vértebras em animais expostos ao acetato de chumbo reduziram na razão de 27% com EDTA, 14% com CV 50 e 42% com CV 250, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes como demonstrado pelos resultados da análise ANOVA/UNIANOVA.

Nas vértebras, observa-se redução da concentração de zinco do grupo Pb quando comparada a dos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 não foi efetiva em prevenir a redução da concentração de zinco nesse osso.

Em relação à concentração de cálcio, observa-se redução da concentração do grupo Pb quando comparada a dos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. Observa-se aumento da concentração de cálcio no grupo Pb + CV 250 (26%) comparado ao grupo Pb, o que sugere interação entre CV 250 e Pb de forma significativa como revelaram os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA.

Em relação ao magnésio, observa-se redução da concentração de magnésio do grupo Pb quando comparada aos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 não foi efetiva em prevenir esta redução de Mg da vértebra L4.

**Tabela 5:** Concentrações de Pb, Zn, Ca e Mg das quartas vértebras lombares (L4) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica.

Grupos	Chumbo (ug/g)	Zinco (ug/g)	Cálcio (mg/g)	Magnésio (mg/g)
Controle	0,09 ± 0,01	229,60 ± 12,84	69,30 ± 3,61	2,75 ± 0,13
EDTA	0,12 ± 0,00	201,91 ± 7,74	61,85 ± 1,46	2,41 ± 0,07
CV 50	0,11 ± 0,01	214,36 ± 8,26	69,06 ± 1,76	2,78 ± 0,07
CV 250	0,14 ± 0,03	210,41 ± 9,26	66,78 ± 2,26	2,71 ± 0,12
Pb	251,12 ± 23,59 <sub>a, b, c, d</sub>	161,97 ± 5,03 <sub>a, b, c, d</sub>	39,45 ± 1,84 <sub>a, b, c, d</sub>	1,71 ± 0,09 <sub>a, b, c, d</sub>
Pb + EDTA	181,04 ± 16,62 <sub>a, b, e</sub>	151,68 ± 7,31 <sub>a, b</sub>	41,14 ± 1,32 <sub>a, b</sub>	1,39 ± 0,04 <sub>a, b</sub>
Pb + CV 50	214,96 ± 14,67 <sub>a, c</sub>	150,16 ± 12,19 <sub>a, c</sub>	42,88 ± 1,65 <sub>a, c</sub>	1,35 ± 0,08 <sub>a, c</sub>
Pb + CV 250	143,49 ± 17,44 <sub>a, d, e</sub>	143,93 ± 6,71 <sub>a, d</sub>	49,74 ± 2,05 <sub>a, d, e</sub>	1,34 ± 0,07 <sub>a, d</sub>

Média ± EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb, p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.1.6 Concentrações de Pb e Zn na tíbia

As concentrações de Pb e Zn nas tíbias dos animais dos diferentes grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 6.

A concentração de chumbo é maior no grupo Pb em relação aos grupos controle, EDTA, CV 50 e CV 250. A análise ANOVA/UNIANOVA revelaram a influência de EDTA, CV 50, CV 250 sobre as concentrações de chumbo das tíbias de animais expostos a este metal. A interação desses agentes reduziu as concentrações de chumbo das tíbias na razão de 36% com EDTA, 45% com CV 50 e 69% com CV 250.

A administração de CV 50 ou CV 250 reduziu a concentração de zinco das tíbias em relação ao grupo controle. A exposição ao chumbo reduziu a concentração de zinco das tíbias de animais expostos a este metal. Os tratamentos com EDTA ou CV 50 não foram efetivos em prevenir esta redução. A análise ANOVA/UNIANOVA mostrou interação da CV 250 com Pb, levando a redução drástica da concentração de zinco observada no grupo Pb + CV 250 quando comparada ao Pb sozinho.

**Tabela 6:** Concentrações de Pb e Zn nas tíbias dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas por meio da Espectrometria de Emissão Atômica .

Grupos	Chumbo ( $\mu\text{g/g}$ )	Zinco ( $\mu\text{g/g}$ )
Controle	$0,03 \pm 0,01$	$70,94 \pm 2,62$
EDTA	$0,01 \pm 0,00$	$61,33 \pm 2,19$
CV 50	$0,01 \pm 0,00$	$57,85 \pm 1,74$ a
CV 250	$0,00 \pm 0,00$	$58,37 \pm 2,59$ a
Pb	$24,04 \pm 1,90$ a, b, c, d	$46,64 \pm 3,56$ a
Pb + EDTA	$15,18 \pm 1,18$ a, b, e	$47,25 \pm 2,25$ a, b
Pb + CV 50	$13,16 \pm 1,21$ a, c, e	$39,43 \pm 3,15$ a, c
Pb + CV 250	$7,10 \pm 0,91$ a, d, e	$29,71 \pm 2,58$ a, d, e

Média  $\pm$  EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

## 4.2 Parâmetros Biométricos

### 4.2.1 Massa Corporal

Na Tabela 7 encontram-se os valores da massa corporal inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais. Observa-se que tanto os valores da massa corporal inicial como final não foram diferentes entre todos os grupos participantes do experimento.

**Tabela 7:** Massa corporal (MC) inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Parâmetros	
	MC inicial (g)	MC final (g)
Controle	340,75 ± 12,35	388,25 ± 9,48
EDTA	326,50 ± 6,05	386,50 ± 10,02
CV 50	335,00 ± 9,07	371,25 ± 9,48
CV 250	341,50 ± 12,84	399,50 ± 15,35
Pb	334,75 ± 6,90	385,00 ± 10,92
Pb + EDTA	322,50 ± 11,50	370,00 ± 13,04
Pb + CV 50	340,75 ± 7,50	407,25 ± 12,88
Pb + CV 250	341,75 ± 9,52	398,00 ± 16,99
Média ± EPM; n=8		

#### 4.2.2 Comprimento do fêmur e altura da quinta vértebra lombar (L5) - (mm)

Na Tabela 8 estão os valores de comprimento do fêmur e altura da quinta vértebra lombar (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença destes parâmetros quando comparamos os diferentes grupos experimentais.

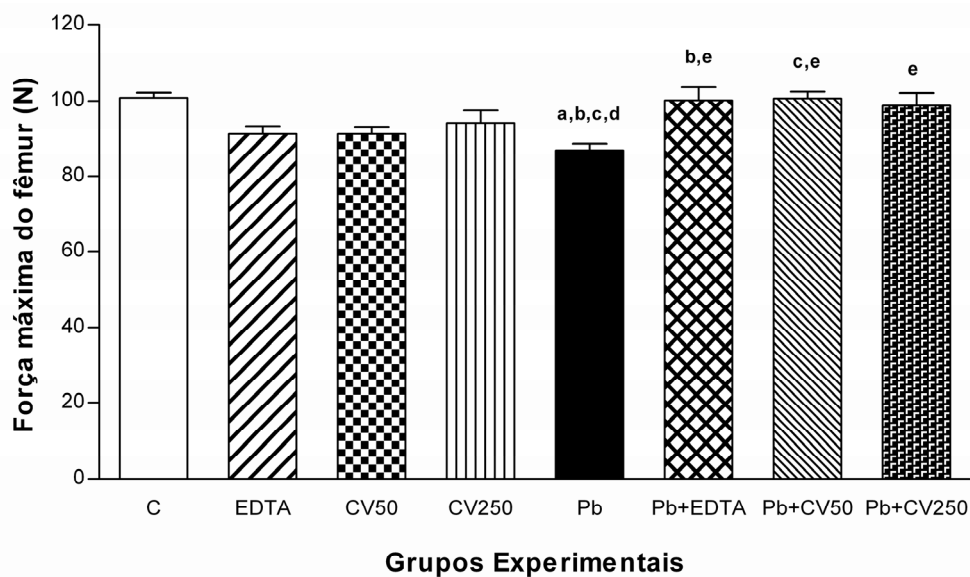
**Tabela 8:** Comprimento dos fêmures e altura das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Parâmetros	
	Comprimento (mm)	Altura (mm)
Controle	39,23 ± 0,12	7,18 ± 0,22
EDTA	38,12 ± 0,29	7,15 ± 0,17
CV 50	38,72 ± 0,47	6,98 ± 0,13
CV 250	39,22 ± 0,29	7,34 ± 0,14
Pb	38,88 ± 0,53	7,39 ± 0,16
Pb + EDTA	39,29 ± 0,34	7,22 ± 0,18
Pb + CV 50	39,46 ± 0,30	7,46 ± 0,21
Pb + CV 250	38,94 ± 0,35	7,41 ± 0,17
Média ± EPM; n=8		

### 4.3 Parâmetros biomecânicos

#### 4.3.1 Força Máxima (N)

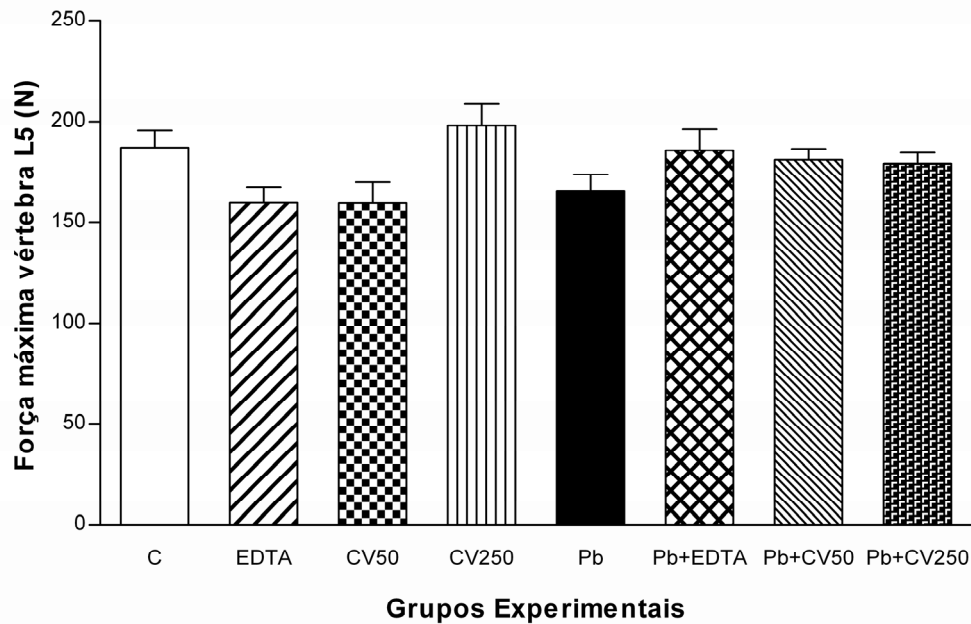
Com o teste de flexão a três pontos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, observa-se redução da força máxima do grupo Pb quando comparado ao grupo controle, EDTA, CV 50 e CV 250 (Figura 8). Observa-se que a administração de EDTA, CV 50 e CV 250 aos animais não expostos ao chumbo, levou a uma redução da força máxima nesses grupos quando comparados ao grupo controle (embora não estatisticamente significativa). A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu a redução da força máxima promovida pelo tratamento com chumbo de forma significativa, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes como revelaram os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA.



**Figura 8:** Média ± EPM da força máxima dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas através do teste de flexão a três pontos. n=8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (e) vs Pb,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-away post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250), Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).



Com o teste de compressão das vértebras não observamos diferença da força máxima entre os diferentes grupos experimentais (Figura 9). Entretanto, pode-se observar que os tratamentos com EDTA e CV 50 sozinhos e com Pb reduziram os valores de força máxima em relação ao grupo controle (embora não estatisticamente significativo).

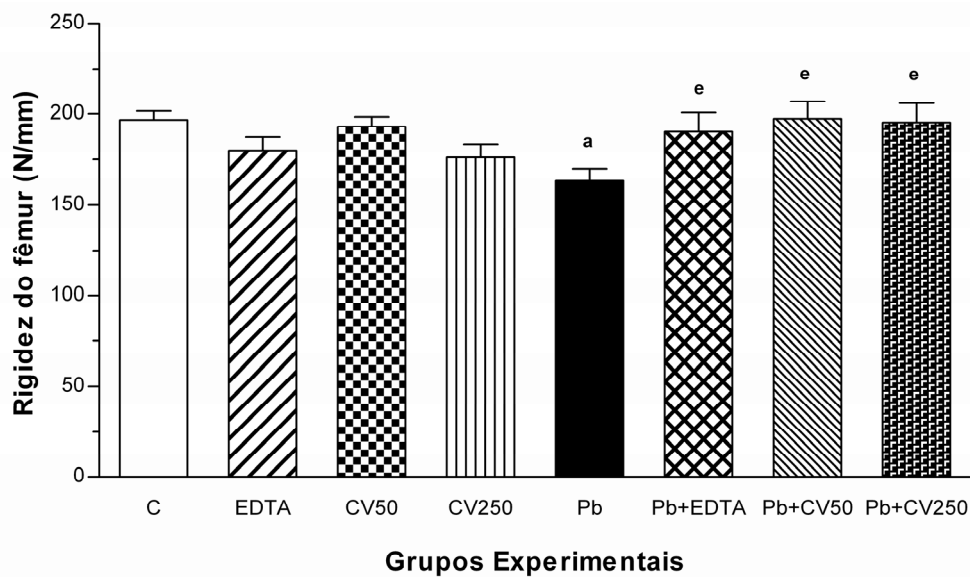


**Figura 9:** Média  $\pm$  EPM da força máxima das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas através do teste de compressão. n=8

#### 4.3.2 Rigidez (N/mm)

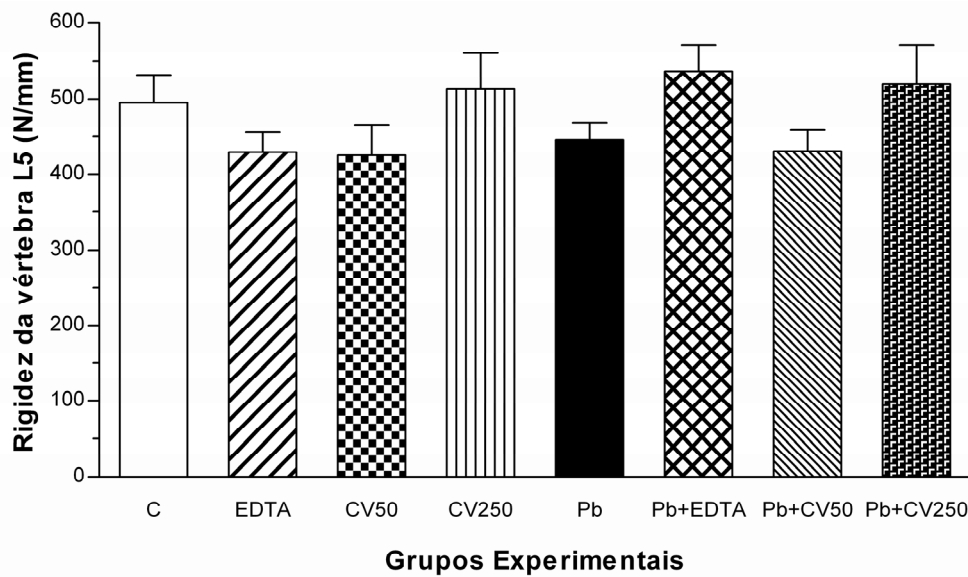
Nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os valores de rigidez dos fêmures e das vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Observam-se valores semelhantes nos grupos controle, EDTA, CV50 e CV 250; e redução da rigidez do fêmur no grupo Pb em relação ao grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu a redução da rigidez promovida pelo tratamento com chumbo, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes como revelaram os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA.



**Figura 10:** Média  $\pm$  EPM da rigidez dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas através do teste de flexão a três pontos.  $n=8$ . Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (e) vs Pb,  $p<0,05$  (ANOVA Two-away post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250), Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

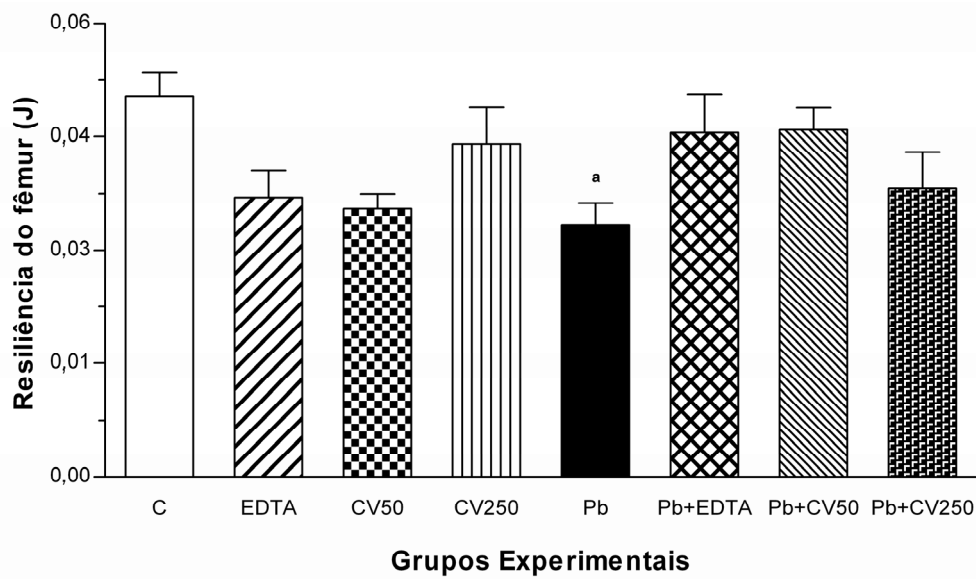
No teste de compressão não observamos diferença estatística da rigidez da vértebra L5 (Figura 11) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Entretanto, os grupos EDTA, CV50, Pb e Pb+CV50 apresentaram valores menores do que o grupo controle (embora não estatisticamente significativo).



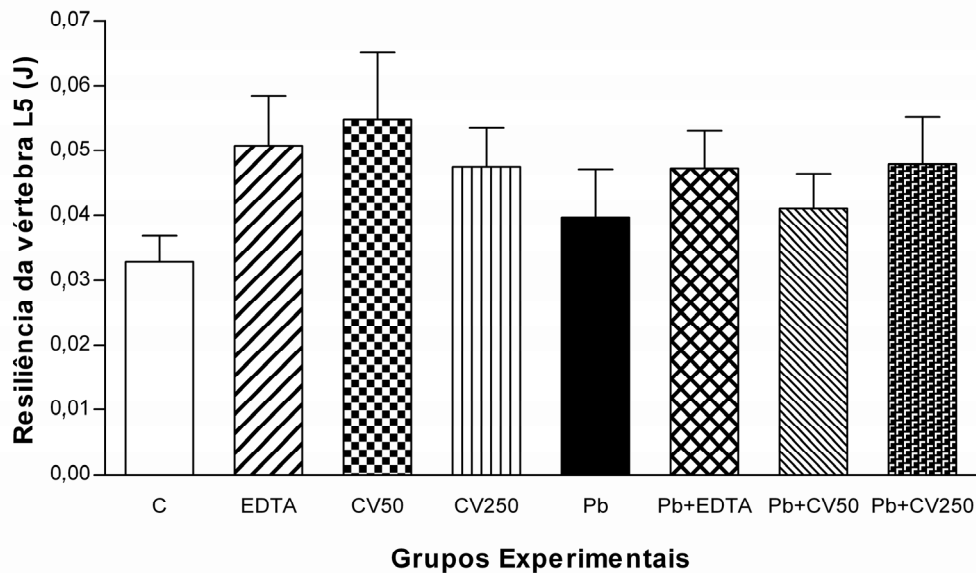
**Figura 11:** Média  $\pm$  EPM da rigidez das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas com o teste de compressão. n=8.

Com o teste de flexão a três pontos dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, observa-se redução da resiliência no grupo Pb quando comparado ao grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu esta redução induzida pela exposição ao chumbo (Pb) (Figura 12).

Com o teste de compressão das vértebras não observamos diferença dos valores de resiliência da vértebra L5 (Figura 13) dos diferentes grupos experimentais.



**Figura 12:** Média ± EPM da resiliência dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas com o teste de flexão a três pontos. n=8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way e post-hoc Teste de Bonferroni).



**Figura 13:** Média ± EPM da resiliência das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidas com o teste de compressão. n=8.

#### 4.4 Parâmetros Físicos

4.4.1 Massa úmida, imersa, seca e das cinzas dos fêmures e das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

No fêmur, observa-se redução da massa úmida do grupo EDTA quando comparada ao grupo controle. Os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA revelaram interação entre EDTA e chumbo, levando ao aumento desse parâmetro no grupo Pb + EDTA.

A massa imersa do fêmur aumentou no grupo CV 250 quando comparada a dos grupos controle e EDTA (Tabela 9).

Em relação à massa seca, observa-se redução no grupo Pb quando comparado ao grupo controle. Os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA revelaram interação entre CV 50 e chumbo, levando ao aumento desse parâmetro no grupo Pb + CV 50.

A massa das cinzas reduziu no grupo Pb e grupo EDTA quando comparadas a do grupo controle (Tabela 9). Observa-se aumento desse parâmetro no grupo Pb + CV 50 quando comparado ao grupo Pb, o que sugere interação entre CV 50 e chumbo.

**Tabela 9:** Massa úmida, imersa, seca e das cinzas dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Massa úmida (g)	Massa imersa (g)	Massa seca (g)	Massa das cinzas (g)
Controle	0,985 ± 0,018	0,337 ± 0,007	0,598 ± 0,008	0,412 ± 0,006
EDTA	0,886 ± 0,015 a	0,326 ± 0,004	0,555 ± 0,006	0,378 ± 0,004 a
CV 50	1,002 ± 0,024	0,367 ± 0,008	0,598 ± 0,011	0,404 ± 0,008
CV 250	1,043 ± 0,032	0,379 ± 0,013 a, b	0,649 ± 0,019	0,444 ± 0,015
Pb	0,939 ± 0,018	0,344 ± 0,007	0,557 ± 0,018 a	0,378 ± 0,010 a
Pb + EDTA	0,984 ± 0,035 b	0,357 ± 0,008	0,597 ± 0,021	0,410 ± 0,014 b
Pb + CV 50	1,035 ± 0,013	0,379 ± 0,006	0,653 ± 0,015 c, e	0,445 ± 0,008 c, e
Pb + CV 250	1,008 ± 0,030	0,360 ± 0,008	0,608 ± 0,012 d	0,413 ± 0,008 d

Média ± EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb, p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni).

Nas vértebras, observa-se redução da massa seca e massa das cinzas no grupo EDTA quando comparadas ao do grupo controle (Tabela 10).

**Tabela 10:** Massa úmida, imersa, seca e das cinzas das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Massa úmida (g)	Massa imersa (g)	Massa seca (g)	Massa das cinzas (g)
Controle	0,115 ± 0,006	0,030 ± 0,002	0,061 ± 0,002	0,036 ± 0,001
EDTA	0,102 ± 0,004	0,029 ± 0,001	0,050 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,030 ± 0,001 <sup>a</sup>
CV 50	0,108 ± 0,003	0,030 ± 0,000	0,054 ± 0,001	0,033 ± 0,001
CV 250	0,128 ± 0,007	0,035 ± 0,002	0,061 ± 0,003	0,038 ± 0,002
Pb	0,118 ± 0,001	0,030 ± 0,001	0,054 ± 0,002	0,032 ± 0,001
Pb + EDTA	0,113 ± 0,005	0,032 ± 0,001	0,054 ± 0,002	0,034 ± 0,001
Pb + CV 50	0,129 ± 0,003	0,036 ± 0,001	0,062 ± 0,001	0,038 ± 0,001
Pb + CV 250	0,133 ± 0,004	0,039 ± 0,001	0,064 ± 0,002	0,039 ± 0,002

Média ± EPM. n = 6-8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo+ EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.4.2 Volume, densidade e densidade mineral óssea do fêmur e das quintas vértebras lombares (Tabela 11).

No fêmur, observa-se redução do volume ósseo nos grupos EDTA e Pb quando comparados ao do controle. No grupo Pb + EDTA, observa-se aumento significativo desse parâmetro comparado ao grupo EDTA (Tabela 11), o que sugere interação entre EDTA e Pb como revelaram os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA. Não se observa diferença entre os valores de densidade óssea e densidade mineral dos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 11:** Volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral óssea dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do princípio de Arquimedes.

Grupos	Volume Ósseo (cm <sup>3</sup> )	Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	Densidade Mineral Óssea (g/cm <sup>3</sup> )
Controle	0,646 ± 0,013	1,52 ± 0,01	0,640 ± 0,016
EDTA	0,559 ± 0,014 a	1,58 ± 0,01	0,678 ± 0,012
CV 50	0,634 ± 0,018	1,58 ± 0,01	0,639 ± 0,013
CV 250	0,662 ± 0,020	1,57 ± 0,01	0,671 ± 0,015
Pb	0,594 ± 0,013 a	1,57 ± 0,01	0,636 ± 0,011
Pb + EDTA	0,626 ± 0,029 b	1,57 ± 0,01	0,657 ± 0,010
Pb + CV 50	0,652 ± 0,013	1,58 ± 0,01	0,684 ± 0,014
Pb + CV 250	0,647 ± 0,024	1,55 ± 0,01	0,642 ± 0,014

Média ± EPM. n= 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

Nas vértebras, observa-se redução da densidade mineral óssea no grupo Pb quando comparada ao grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu a redução da densidade mineral óssea induzida pela exposição ao chumbo (Tabela 12). Não são

observadas diferenças entre os valores de volume e densidade óssea entre os diferentes grupos experimentais.

**Tabela 12:** Volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral óssea das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do princípio de Arquimedes.

Grupos	Volume Ósseo (cm <sup>3</sup> )	Densidade Óssea (g/cm <sup>3</sup> )	Densidade Mineral Óssea (g/cm <sup>3</sup> )
Controle	0,085 ± 0,004	1,36 ± 0,02	0,435 ± 0,012
EDTA	0,073 ± 0,003	1,40 ± 0,01	0,409 ± 0,014
CV 50	0,077 ± 0,002	1,39 ± 0,01	0,426 ± 0,010
CV 250	0,092 ± 0,005	1,39 ± 0,01	0,420 ± 0,014
Pb	0,087 ± 0,002	1,35 ± 0,01	0,371 ± 0,018 a
Pb + EDTA	0,081 ± 0,003	1,39 ± 0,02	0,422 ± 0,008 e
Pb + CV 50	0,093 ± 0,002	1,38 ± 0,00	0,409 ± 0,006 e
Pb + CV 250	0,094 ± 0,003	1,41 ± 0,01	0,418 ± 0,012 e

Média ± EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (e) vs Pb. p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

4.4.3 Porcentagem de água (% água), Porcentagem de material orgânico (% MO) e porcentagem de material mineral (% MM) dos fêmures e das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos para esses parâmetros nos fêmures (Tabela 13).



**Tabela 13:** Porcentagem de Água no osso (% Água), porcentagem de material orgânico (%MO) e porcentagem de material mineral (%MM) nos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Água no osso (%)	Material orgânico (%)	Material mineral (%)
Controle	39,07 ± 1,23	18,93 ± 0,41	41,99 ± 0,93
EDTA	37,20 ± 1,20	20,04 ± 1,07	42,75 ± 0,47
CV 50	40,18 ± 0,88	19,41 ± 0,44	40,40 ± 0,79
CV 250	37,67 ± 0,72	19,70 ± 0,62	42,62 ± 0,61
Pb	40,66 ± 1,13	19,04 ± 0,63	40,45 ± 0,78
Pb + EDTA	39,31 ± 0,25	18,97 ± 0,25	41,71 ± 0,30
Pb + CV 50	38,10 ± 0,37	18,72 ± 0,60	43,17 ± 0,85
Pb + CV 250	39,46 ± 1,35	17,79 ± 0,72	41,12 ± 0,61

Média ± EPM. n = 8.

Nas vértebras, observa-se redução da % MM acarretando aumento da % de água no grupo Pb quando comparado ao grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu a redução da % MM induzida por chumbo (Tabela 14).

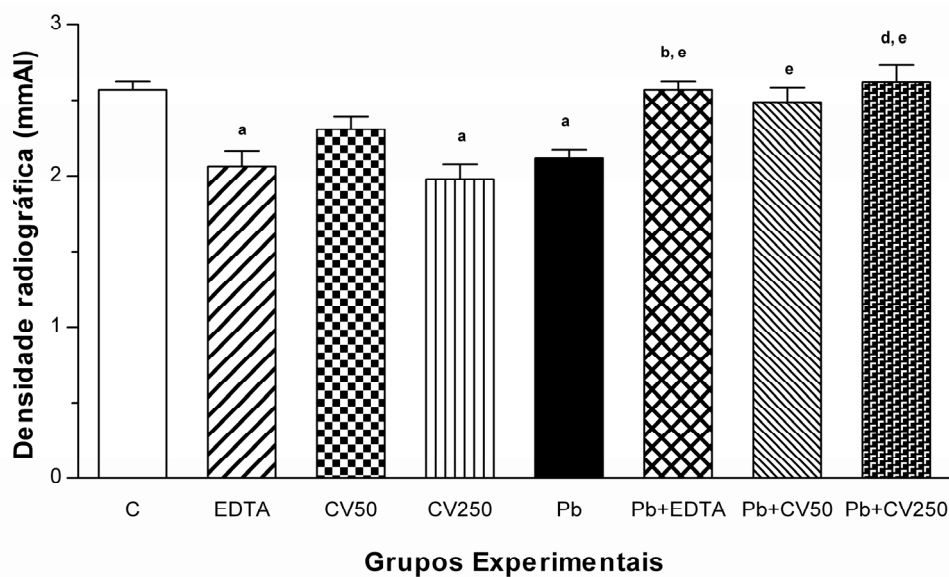
**Tabela 14:** Porcentagem de água (% Água), porcentagem de material orgânico (%MO) e porcentagem de material mineral (%MM) nas quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Água no osso (%)	Material orgânico (%)	Material mineral (%)
Controle	47,15 ± 0,94	20,89 ± 0,97	31,94 ± 0,72
EDTA	51,07 ± 0,79	19,85 ± 1,22	29,06 ± 1,02
CV 50	49,76 ± 1,25	19,72 ± 1,41	30,51 ± 0,69
CV 250	51,96 ± 1,05	17,87 ± 0,94	30,15 ± 0,79
Pb	53,80 ± 1,36 a	18,76 ± 0,98	27,43 ± 1,08 a
Pb + EDTA	51,97 ± 0,50	17,73 ± 0,61	30,28 ± 0,55
Pb + CV 50	52,07 ± 1,01 a	18,37 ± 0,90	29,55 ± 0,67
Pb + CV 250	51,88 ± 1,37	18,56 ± 1,21	29,54 ± 0,87

Média ± EPM. n = 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle.  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

#### 4.5 Densitometria Radiográfica

Os resultados das análises de densidade radiográfica (mmAl) encontram-se na Figura 14. A exposição ao acetato de chumbo (Pb) na dose de 250 mg/Kg MC reduziu a densidade radiográfica quando comparada ao grupo controle. Observa-se também redução deste parâmetro nos grupos EDTA e CV 250 quando comparados ao grupo controle. A administração de EDTA, CV 50 ou CV 250 preveniu a redução da densidade mineral induzida pela exposição ao acetato de chumbo de forma significativa, o que sugere interação entre Pb e os agentes quelantes como revelaram os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA. Outro dado importante a se destacar, é que não houve diferença entre o grupo CV 50 e o grupo controle.

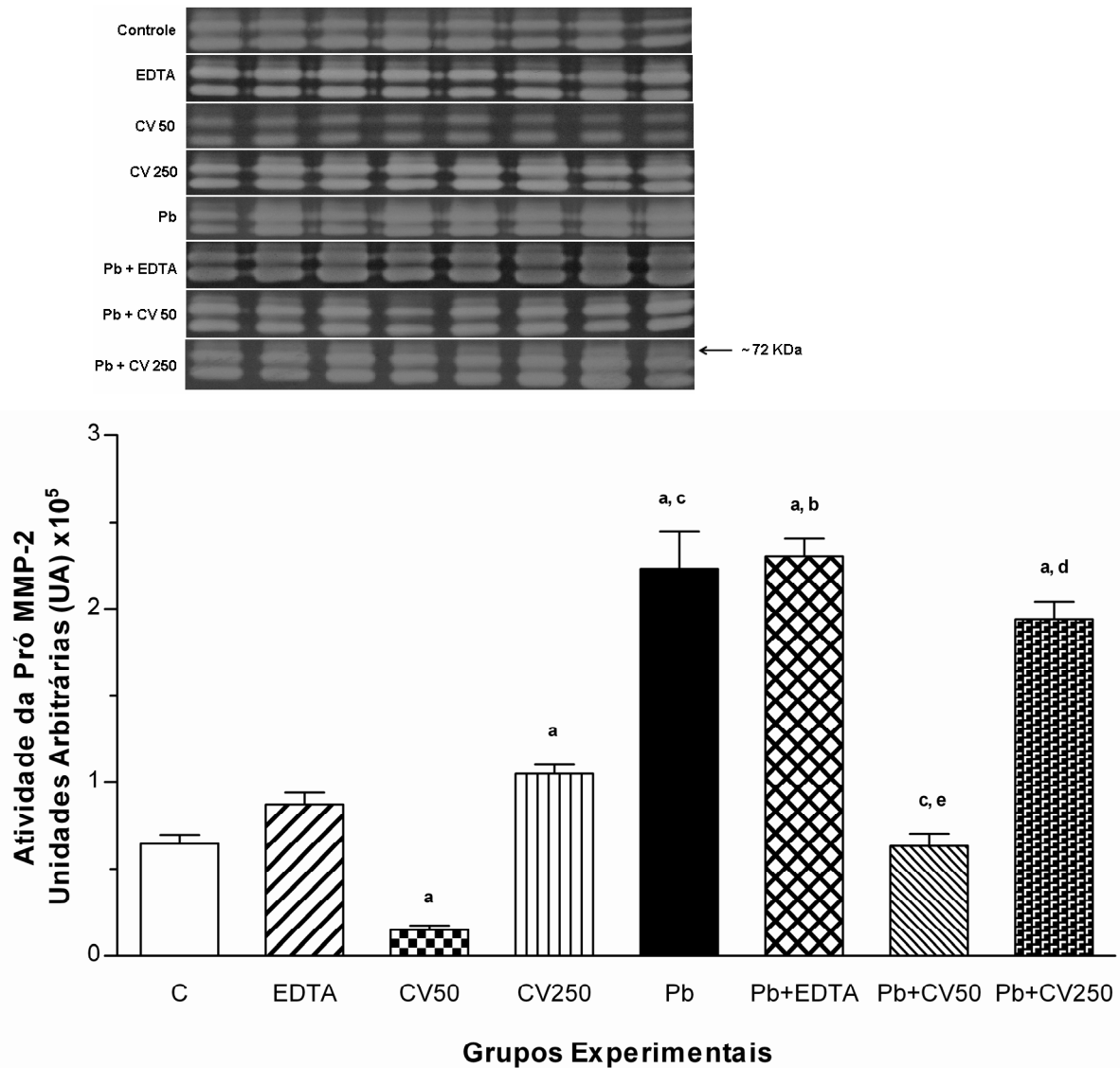


**Figura 14:** Densidade radiográfica obtida por Densitometria Radiográfica e expressa em milímetros de Alumínio (mmAl). Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250), Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250). n=8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (d) vs CV 250, (e) vs Pb,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni).

#### 4.6 Atividade da MMP-2 nas tíbias

Nas Figuras 15, 16 e 17 estão os resultados da atividade da MMP-2 em suas isoformas pró, intermediária e ativa.

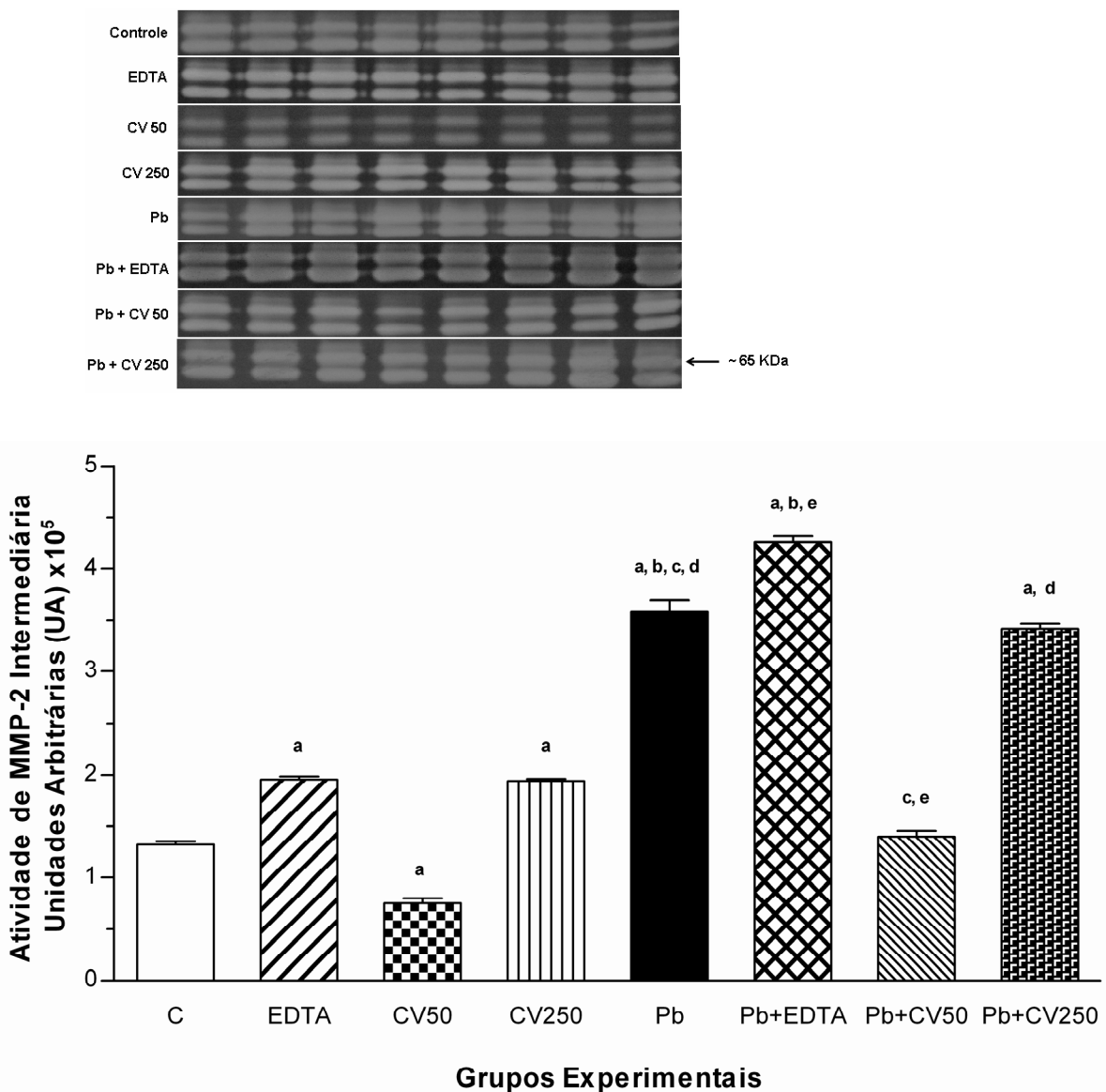
Observa-se que a exposição ao chumbo (Pb) aumentou a atividade da pró MMP-2 quando comparada aos grupos controle e CV 50. A administração de CV 250 aumentou a atividade da pró MMP-2, enquanto a administração de CV 50 reduziu a atividade quando comparadas ao grupo controle. No grupo Pb + EDTA observa-se diferença estatística quando comparadas aos dos grupos controle e EDTA. Os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA revelaram interação entre CV 50 e chumbo. Observa-se redução significativa da atividade de pró MMP-2 no grupo Pb + CV 50 quando comparada ao chumbo, já quando comparamos Pb + CV 50 ao seu grupo CV 50 observa-se aumento.



**Figura 15:** Atividade da pró MMP-2 (72 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250), Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).  $n=8$ . Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb,  $p<0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni).

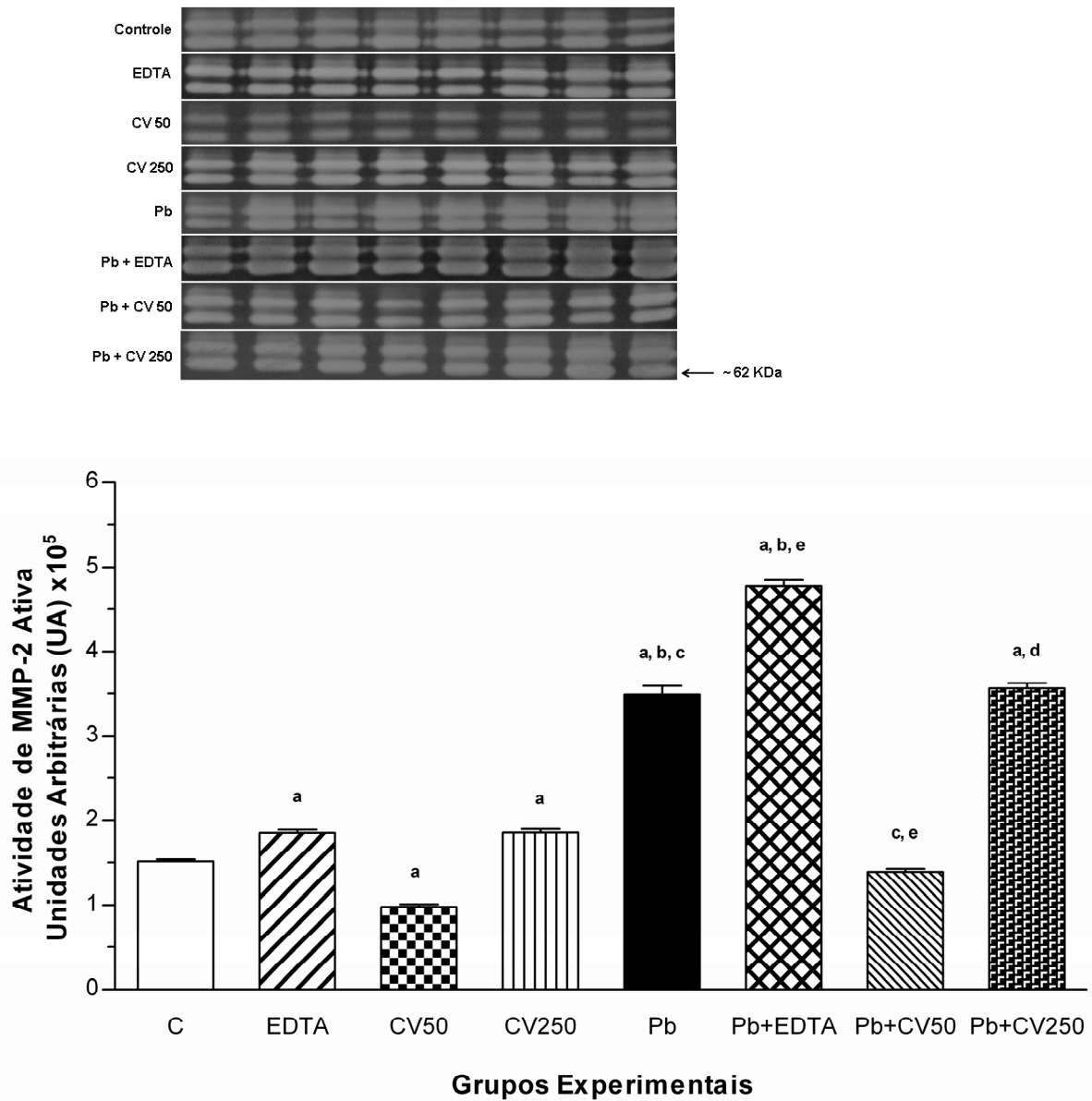
Em relação à MMP-2 intermediária, observa-se atividade aumentada nos grupos EDTA e CV 250 quando comparadas ao controle, enquanto no grupo CV 50 observa-se redução da atividade em relação ao grupo controle. Em animais expostos ao chumbo observa-

se aumento da atividade de MMP-2 intermediária quando comparadas aos grupos controle, EDTA e CV 50 e CV 250. Os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA revelaram interação entre chumbo e os agentes quelantes EDTA, CV 50 e CV 250. A administração de EDTA aos animais expostos ao chumbo aumentou ainda mais a atividade de MMP-2 intermediária quando compara ao chumbo sozinho. No grupo Pb + CV 50 observa-se redução da atividade da MMP-2 intermediária a níveis comparadas ao grupo controle.



**Figura 16:** Atividade da MMP-2 Intermediária (65 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250), Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250). n=8. Diferenças estatísticas significativas são indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni).

Quando a análise é direcionada para a MMP-2 ativa, observa-se da atividade de MMP-2 ativa no grupo Pb quando comparada aos grupos controle, EDTA e CV 50. Observa-se aumento da atividade nos grupos EDTA e CV 250 quando comparadas ao controle, enquanto no grupo CV 50 observa-se redução da atividade em relação ao grupo controle. Os resultados da análise ANOVA/UNIANOVA revelaram interação entre chumbo e os agentes quelantes EDTA, CV 50 e CV 250. A administração de EDTA aos animais contaminados aumentou ainda mais a atividade de MMP-2 ativa quando comparada ao grupo Pb. No grupo Pb + CV 50 observa-se redução da atividade da MMP-2 ativa em relação ao grupo Pb a níveis semelhantes aos do grupo controle.



**Figura 17:** Atividade da MMP-2 Ativa (62 KDa) da tíbia direita obtida por zimografia e expressa em unidades arbitrárias (UA). Os valores estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Grupo Controle (C), Grupo EDTA (EDTA), Grupo Chlorella 50 (CV 50), Grupo Chlorella 250 (CV 250), Acetato de Chumbo (Pb), Acetato de Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Acetato e Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Acetato de Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250). n=8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (b) vs EDTA, (c) vs CV 50, (d) vs CV 250, (e) vs Pb,  $p < 0,05$  (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo nosso interesse estava focalizado na possível influência protetora da administração do extrato de *Chlorella vulgaris* sobre as alterações das propriedades físicas e biomecânicas ósseas em ratos expostos ao Acetato de Chumbo.

O chumbo é reconhecido como um dos metais mais tóxicos (BARBOSA et al., 2009). Apenas 1 hora após a absorção intestinal, o chumbo é capaz de se acumular no osso, fígado, rim, cérebro e outros órgãos (MANSOURI, CAULI, 2009). Em nosso estudo, as concentrações de chumbo aumentaram significativamente no sangue, fígado, rim, cérebro, fêmures, vértebras e nas tíbias de animais expostos ao acetato de chumbo sozinho. A presença de chumbo no sangue e nos vários órgãos estudados dos animais do grupo controle reflete a natureza onipresente desse metal e sua presença na dieta e solo.

A terapia quelante com EDTA reduziu significativamente (30,8 %) a concentração de chumbo sanguínea (Tabela 1). Essa redução de Pb sanguínea reduziu a retenção de chumbo no fígado, rim, cérebro e tecido ósseo (Tabelas 4, 5 e 6). Sabe-se que o EDTA aumenta a excreção urinária desse metal pelo aumento da secreção tubular (CIKRT, LEPSI, TICHY, 1982; SANCHES-FLUCTUOSO et al., 2002). Outros trabalhos demonstraram que a terapia quelante com EDTA reduz a concentração de Pb sanguínea e conseqüentemente a retenção de chumbo em outros órgãos como fígado, rim, cérebro e tecido ósseo (CORY-SLECHTA, WEISS, COX, 1987; TANDON, SINGH, JAIN, 1994; ANGUELOV, CHICHOVSKA, 2004; SAXENA, FLORA, 2004).

A administração de CV nas doses de 50 e de 250 mg/Kg MC reduziram significativamente as concentrações de chumbo sanguínea em 26,4 % e 44%, respectivamente, levando à redução da concentração de chumbo no fígado, rim, cérebro (Tabela 1) e, inclusive no tecido ósseo (Tabelas 4, 5 e 6). Vários estudos (QUEIROZ et al., 2003; QUEIROZ et al.,



2008; QUEIROZ et al., 2011) mostraram que o efeito quelante da alga foi elevado quando CV foi dada simultaneamente à exposição ao acetato de chumbo. A capacidade quelante da CV está relacionada ao fato que esta alga previne a absorção gastrointestinal de chumbo e promove excreção deste metal como descrito por UCKIKAWA et al. (2009). CV tem alta afinidade ao chumbo e esta propriedade de ligar metais está relacionada à presença de cloroplastos na parede celular, uma organela rica em enxofre, potássio, cálcio e fósforo (TRAVIESSO et al., 1999; QUEIROZ et al., 2008). A habilidade de compostos contendo grupos sulfidrila de quelar metais já está bem estabelecida na literatura e pode ser um fator envolvido nos resultados observados nesse estudo (SINICROPI et al., 2010).

A redução da concentração de zinco sanguínea após exposição ao chumbo (Tabela 2) pode ser devido ao desequilíbrio do transporte e distribuição do zinco no organismo, além de alteração da atividade de enzimas zinco-dependentes (CHUN BAI et al., 2004; FLORA, 2009; NABIL, 2012). JIN et al. (2008) explicam que a redução da concentração de zinco no sangue em animais expostos ao chumbo ocorre devido à presença de proteínas com alta afinidade ligante de chumbo em eritrócitos. Assim, o ácido  $\delta$ -aminolevulinato-deidratase (ALAD) possui quatro cisteínas reativas que ligam chumbo e dois diferentes sítios ligantes para zinco. A ligação de Pb é cerca de 20 vezes mais forte do que a ligação para o Zn, portanto o chumbo pode substituir o zinco nessas ligações, levando à redução do Zn sanguíneo (SIMMONS, 1995; JAFFE et al., 2001). Outros estudos (VICTERY et al., 1986; THOMAS, CHISOLM, 1986; WASOWICZ, RYDYNKY, 2001, TANDON, 2002; WANG et al., 2011) também relataram a redução da concentração de zinco sanguínea em animais expostos ao chumbo, possivelmente devido ao aumento da excreção de zinco urinário. Outro importante ponto a ser considerado é que a suplementação com zinco pode bloquear a absorção intestinal de chumbo pela indução de metalotioneína intestinal e reduzir a deposição nos tecidos (JAMIESON, TAYLOR, WEILER, 2006). O tratamento com CV e EDTA não foram capazes de restaurar a

concentração de zinco sanguínea em animais expostos ao chumbo. De acordo com nossos resultados e de outros estudos, a suplementação com zinco durante e após envenenamento com chumbo seguida de terapia quelante pode ser benéfica (FLORA, TANDON, 1990).

O aumento da concentração de zinco no fígado (Tabela 2), após exposição ao chumbo neste estudo está de acordo com os resultados de SUZUKI, YOSIKAWA, 1976. A administração de chumbo aumenta a concentração de zinco metalotioneína no fígado (ARIZONO et al., 1982; ARIZONO et al., 1983). Metalotioneína é uma proteína rica em cisteína que protege o organismo do envenenamento por metais tóxicos e esta envolvida com a homeostase de elementos minerais. A síntese de metalotioneína é induzida por metais pesados como o chumbo (FUJISHIRO et al., 2009). A metalotioneína sintetizada em resposta ao chumbo pode se ligar a este metal para eliminá-lo do organismo. Essa proteína também poderia estar se ligando ao zinco liberado pelo chumbo de outros órgãos, como o osso. A zinco metalotioneína pode então ter sido transportada e estocada no fígado (GASIOROWSKI et al. 1987), levando ao aumento de zinco encontrado neste estudo.

A homogeneidade de massa é uma variável importante, porque a massa corporal exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea (BUR, ROBLING, TURNER, 2002). Não observamos modificações do desenvolvimento somático dos animais (nenhuma alteração da massa corporal e parâmetros biométricos). Nossos resultados corroboram os resultados de outros estudos que não observaram mudanças da massa corporal dos animais expostos ao acetato de chumbo (HAN et al., 1997; SMITH, MIEKE, HENEGHAN, 2008).

Em relação aos parâmetros biométricos, as medidas de comprimento dos fêmures e altura da quinta vértebra lombares (L5) dos animais nos diferentes grupos experimentais não mostraram diferenças estatísticas. Em relação ao comprimento dos fêmures, nossos dados corroboram os de ESCRIBANO et al. (1997) e GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997), nos quais

os autores não encontraram diferenças significativas do comprimento dos fêmures em ratos intoxicados com 17 mg de acetato de chumbo por Kg de alimentação durante 50 dias. Em contraste aos nossos resultados, ESCRIBANO et al. (1997) encontraram diferenças significativas da altura das vértebras. HAMILTON e O'FLAHERTY (1995) observaram que o chumbo promoveu alterações morfológicas metafisárias e nas placas de crescimento em ossos de ratos de intoxicados com 1000 ppm de chumbo na água consumida quando comparado aos animais controles. RONIS et al. (2001) demonstraram que a exposição ao chumbo causou inibição da osteoblastogênese e do crescimento ósseo longitudinal.

As metaloproteinases de Matriz (MMPs) formam uma família de proteases zinco dependentes, contendo um grupo sulfidrila no domínio do pró-peptídeo coordenado com o íon zinco (VISSE, NAGASE, 2003). Distúrbio desta interação é crítico para ativação de MMPs e um mecanismo denominado de “cysteine switch” tem sido descrito para ativação de MMPs (ROSENBLUM et al., 2007). Essas enzimas são encontradas nos tecidos como pró-MMPs (KJAER, 2004) e sua ativação (MMP-2 ativa) é altamente regulada por fatores de crescimento, citocinas, estresse oxidativo, fosforilação e inibidores endógenos de MMPs (TIMPs) (GALIS, KHATRI, 2002; NELSON, MELENDEZ, 2004; VAN Den STEENET et al. 2002; PUSTOVRH et al., 2005; CARMELI et al., 2005; GORMAN, SPANOVIC, HAAS, 2011), tornando-se portanto cruciais em diversos eventos fisiológicos e patológicos, como o desenvolvimento embrionário, angiogênese, reparo de feridas, artrite reumatóide, metástases, remodelamento e homeostase mineral óssea (SHOREY, HEERSCHE, MANOLSON, 2004; GALIERA et al., 2010; GALIERA, BANFI, CORSI, 2010). A MMP-2, em sua forma ativa (62 KDa), é a MMP-2 mais importante na manutenção da massa óssea. Evidências clínicas correlacionam os níveis de reabsorção e perda óssea na osteoporose com o aumento da expressão de diferentes MMPs, particularmente MMP-9, MMP-1 e MMP-2 (LOGAR et al., 2007, GALIERA, BANFI, CORSI, 2010).

Em nosso estudo, a exposição ao chumbo sozinho aumentou significativamente a atividade das isoformas pró, intermediária e ativa da MMP-2 quando comparado ao grupo controle (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente), corroborando com os resultados obtidos por GONZÁLEZ-PUEBLA et al. (2012), que demonstraram aumento da atividade de MMP-2 e redução da expressão de TIMP-2 em placentas de mulheres expostas ao chumbo. BARBOSA et al. (2006) demonstraram uma associação positiva entre a atividade de pró MMP-9 e níveis sanguíneos de chumbo, sugerindo um possível mecanismo pelo qual a exposição ao chumbo pode aumentar a suscetibilidade a doenças cardiovasculares. O chumbo pode ativar diretamente a MMP-2 por interagir com o resíduo SH, assim causando instabilidade do resíduo de cisteína crítico no domínio do pró-peptídeo, perturbando sua interação com o íon  $Zn^{2+}$ , no qual deve resultar em uma enzima ativa (RIZZI et al., 2009). Esta ativação deve resultar em aumento da atividade de MMP-2, uma possibilidade que explicaria o aumento da atividade gelatinolítica observada nesse estudo na tíbia de animais expostos ao chumbo no qual encontramos níveis aumentados de MMP-2 ativa (62 Kda) nos zimogramas.

Alternativamente, o chumbo pode ativar a MMP-2 indiretamente por promover estresse oxidativo em diversos tecidos (GALIS, KHATRI, 2002; NELSON, MELENDEZ, 2004; VAN Den STEENET et al. 2002; SWARNAKAR et al., 2011; MODY et al., 2001; FLORA et al., 2002; NI et al., 2004; VAZIRI, SICA, 2004; SHEWEITA, KHOSHHAL, 2007), inclusive no tecido ósseo (GURER, ERCAL, 2000; PAYAL, KAUR, RAI, 2009). Com aumento do estresse oxidativo aumenta a expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 (GALIS, KHATRI, 2002; NELSON, MELENDEZ, 2004; VAN Den STEENET et al. 2002; PUSTOVRH et al., 2005), sendo possível que a exposição ao chumbo aumente o estresse oxidativo em ossos de animais expostos a este metal, resultando em aumento da atividade de MMP-2. Portanto, o chumbo pode aumentar a atividade das MMP-2 por duas diferentes maneiras, por ativá-la diretamente através da interação com o grupo sulfidrila do pró-peptídeo

ou aumentando as concentrações de EROs. Entretanto, apesar de evidências mostrarem que o chumbo inibe MMPs in vitro (GERLACH, et al., 2000), nosso estudo in vivo mostram que chumbo aumenta a atividade de MMP-2 no tecido ósseo. Como relatado por RA e PARKS (2007), oxidantes tanto podem ativar (através da oxidação do pró-domínio tiol seguido por clivagem autolítica) e subsequentemente inativar (via modificação de aminoácidos críticos para a atividade catalítica), o que poderia explicar as divergências de estudos in vitro e in vivo sobre os efeitos do chumbo sobre as MMPs. O aumento da atividade de MMP-2 ativa promove degradação dos componentes da matriz.

A inibição da atividade de MMP-2 pró, intermediária e ativa no grupo CV 50 sozinho e no grupo exposto ao chumbo e tratado com CV 50 (*Chlorella vulgaris* – 50 mg/Kg MC) pode ser devido a presença de vários antioxidantes na alga. Alguns estudos demonstraram a propriedade antioxidante de *Chlorella* contra doenças, metais tóxicos e exposição a outros contaminantes (VIJAYAVEL, ANBUSELVAM, BALASUBRAMANIAN, 2007; SON et al., 2009; AIAZZAT et al., 2010; LI et al., 2013). A inibição de MMPs por *Chlorella* tem sido demonstrada in vitro (CHENG et al., 2004). Em outro estudo conduzido por SHIH, CHERNG (2008), usando cultura de fibroblastos, os autores observaram que *Chlorella* inibiu a produção da proteína e expressão do RNAm da MMP-1. *Chlorella* contém muitos antioxidantes como clorofila, luteína,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, e  $\alpha$ -tocoferol, e grande quantidade de outras vitaminas, minerais e fibras (SHIM et al., 2008), além de altas concentrações de fitoquelatinas (PCs), que são olipeptídeos de glutathione capazes de ligar fortemente íons metálicos ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) e metais essenciais ( $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) (QUEIROZ et al., 2008). Outros compostos como polifenóis (ácido gálico) e flavonóides (quercetina) tem sido extraídos de *Chlorella vulgaris* pela técnica de extração usando dióxido de carbono supercrítico, sendo estes compostos potentes antioxidantes capazes de inibir a atividade de MMPs (WANG et al., 2010).

Nossos resultados confirmam o fato bem conhecido que o tecido ósseo é o principal local de acúmulo de chumbo no organismo (MASSIE, AIELLO, 1992; McNEILL et al., 2000). FERGUSON et al. (1998) verificaram que a concentração de Pb nos fêmures de ratas após ingestão de solução de acetato de chumbo de 350 mg/mL foi  $32,1 \pm 5,0 \mu\text{gPb/g}$ . 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), o que poderia explicar as concentrações de chumbo mais elevadas encontradas nas vértebras (L4) de animais expostos ao metal. LIAO et al. (2008), usando a técnica de espectrometria de absorção atômica, observaram concentração de chumbo de  $373,15 \pm 39,53 \mu\text{g/g}$  em fêmures de camundongos tratados com solução de acetato de chumbo de 550 mg/L na água consumida pelo animais por 4 semanas, em relação à concentração de chumbo ( $0,47 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$ ) dos animais controle.

Sabe-se que a incorporação de chumbo ao osso interfere com a deposição de Ca e Mg, que são elementos essenciais para o processo de mineralização óssea (HAMILTON, O'FLAHERTY, 1994; HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995; JELEA, JELEA, 2009; AASETH, BOIVIN, ANDERSEN, 2012). Este metal em baixas concentrações pode fazer parte da estrutura da hidroxiapatita, influenciando sua formação e crescimento (DOWD et al., 2001). Nesse estudo, a exposição ao chumbo reduziu as concentrações de cálcio e magnésio nas quartas vértebras lombares (L4) (Tabela 5). Nos fêmures observa-se redução da concentração de magnésio no grupo exposto ao chumbo. Esses resultados estão de acordo com os de MONIR et al. (2010), que relataram uma redução na razão de compostos minerais no tecido ósseo de ratas expostas a dose de 250 mg Pb/L, durante 4 semanas. Outro estudo (TODOROVIC et al., 2008) revelou que ratos expostos a 100 mgPb/Kg MC, durante 30 dias, tem redução de 16% do cálcio dos ossos. Isto é devido a uma maior afinidade de  $\text{Pb}^{2+}$  para o

osso, em comparação com  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Pb}^{2+}$  substituiria o  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mineral óssea, diminuindo assim o teor de  $\text{Ca}^{2+}$  do osso. Outro estudo (VICTERY et al., 1986), conduzido em ratos expostos a dose de 200 e 500 ppm de chumbo por 12 semanas, mostrou redução da concentração de cálcio no fêmur, acompanhada de excreção de cálcio aumentada na urina. A manifestação da intoxicação de chumbo no osso é sem dúvida resultado de complexas interações: efeitos endócrinos sistêmicos, processos celulares ósseos e processos químicos na matriz óssea. Além disso, a toxicidade do chumbo no esqueleto, alteração do metabolismo mineral ósseo e metabolismo do chumbo ósseo, podem ser identificados no contexto de uma complexa interação entre chumbo e reguladores sistêmicos (1,25 dihidrovitamina D<sub>3</sub>, hormônio da paratireóide, glicocorticóides) e reguladores locais (citocinas, fatores de crescimento e prostaglandinas) (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; SILBERGELD, 1991; KUPRASZEWICKZ, BROZÓSKA, 2013). A redução da concentração de cálcio ósseo observada nesse estudo, sem alteração significativa da concentração de cálcio sérico observada em animais expostos ao chumbo, pode ser devido a uma ação compensatória dos hormônios calcitotróficos supracitados e a influência do chumbo sobre o metabolismo mineral, levando ao aumento da reabsorção óssea e manutenção da concentração de cálcio sérica (FULLMER, 1991; BERGLUND et al., 2000; CIVITELLI, ZIAMBARAS, 2011). No envenenamento agudo em ratos, bem como em envenenamentos devido à exposição ocupacional em humanos, pode-se observar magnesúria, causando uma diminuição da concentração de magnésio nos ossos, fígado e rim (WHO, 1995). Além disso, estudos em humanos e animais mostram que a administração oral de chumbo pode diminuir a absorção de cálcio e magnésio e suas concentrações no fígado, rim, ossos e dentes (AUNGST, FUNG, 1981; VARNAI et al., 2003).

O tratamento desses animais com CV (250 mg/Kg MC) produziu uma parcial, mas significativa, restauração da concentração de cálcio na vértebra (L4), o que poderia estar

relacionado com a presença de cálcio na alga *Chlorella*, aumentando a absorção desse mineral e sua incorporação no tecido ósseo (HASEGAWA et al., 1990; SHIM et al., 2008).

O osso contém vários elementos traço. A função dos elementos traço é manter o metabolismo ósseo. Entre esses elementos, o Zn possui um papel no metabolismo ósseo, agindo como co-fator de diversas enzimas, incluindo fosfatase alcalina, a qual é essencial para mineralização óssea, e colagenases, que são necessárias ao remodelamento da matriz (ILICH, KERSTETTER, 2000). O zinco também possui um papel estrutural na matriz óssea: a parte mineral óssea é composta de cristais de hidroxiapatita, que contém zinco complexado com fluoreto (LOWE, FRASER, JACKSON, 2002). Redução da densidade mineral óssea (DMO), osteocalcina sérica e concentração de zinco no fêmur tem sido relatados em ratos tratados com uma solução de acetato de chumbo de 200 mg/L durante 7, 14 ou 21 na água de beber e recebendo dieta deficiente de zinco (JAMIESON, TAYLOR, WEILER, 2006). Em outro estudo conduzido por SCRIMGEOUR et al. (2007), em ratos recebendo dieta deficiente de zinco (0-2 ppm) por 45 dias, os autores demonstram redução da carga máxima, carga de fratura e deslocamento máximo. Em nosso estudo observamos redução da concentração de zinco sanguínea, no fêmur, na vértebra L4 e na tíbia de animais expostos ao chumbo (Pb) quando comparados ao controle. Em um estudo conduzido em ratos neonatos, MILLER et al. (1984) encontraram que exposição a baixas doses de chumbo diminuía significativamente a concentração de zinco no fêmur dos animais. Em outro estudo com animais recebendo 1000 ppm de Pb via água de beber por 4 semanas e EDTA na dose de 75 mg/Kg MC por 5 dias, os autores não observaram alteração da concentração de zinco no fêmur (FLORA, BHATTACHARIA, VIJAYAHARAGHAVA, 1995).

A terapia quelante com EDTA preveniu parcialmente a redução da concentração de zinco no fêmur em animais expostos ao chumbo. O EDTA é um agente quelante que pode melhorar (KRATZER et al., 1959; FORBES, 1961; SUSO, EDWARDS, 1968) ou reduzir



(SOLOMONS et al., 1979) a absorção de zinco, dependendo da razão Zn/EDTA no lúmen intestinal (SUSO, EDWARDS, 1968; SOLOMONS et al., 1979). Essa prevenção da redução de zinco femoral pela administração de EDTA em animais expostos ao chumbo possivelmente seja devido à capacidade do EDTA aumentar a absorção de zinco e conseqüentemente aumentar a concentração de zinco no osso, como descrito por FORBES (1961).

A administração de CV 50 ou CV 250 não preveniu a redução da concentração de zinco ósseo. Os resultados desse estudo discordam dos resultados encontrados por QUEIROZ et al. (2011), no qual o tratamento com CV na dose de 50 mg/ Kg MC restaurou parcialmente a concentração de zinco no fêmur, reduzida após exposição a concentração de 1000 ppm de chumbo. Os autores relacionam tal efeito à presença de diversos minerais como cálcio, fósforo e zinco na alga.

A determinação do volume ósseo foi realizada indiretamente através do princípio de Arquimedes, um métodos simples e confiável (MARTIN, 1990). Houve redução do volume dos fêmures do grupo EDTA e Pb quando comparados ao grupo controle. Sabe-se que administração de EDTA resulta em excreção de cálcio induzindo hipocalcemia em animais (PEREIRA et al., 2008) e humanos (FLORA, PACHAURI, 2010). Redução da concentração de cálcio poderia estar afetando o desenvolvimento dos animais, como a redução observada na massa úmida e massa das cinzas dos fêmures observa nesse estudo e alterações no processo de mineralização óssea, levando à redução de volume em animais recebendo EDTA sozinho. A administração de EDTA não alterou a densidade mineral óssea, discordando dos resultados encontrados por (BAGCHI, PREUSS, 2005), em que os autores demonstraram que animais recebendo EDTA sozinho (20 mg/Kg MC) tiveram a densidade mineral significativamente reduzida. Um estudo anterior em humanos mostrou que a administração de 20 repetidas infusões diárias de 3 gramas de EDTA, durante um período de 5-9 semanas, aumenta a secreção de PTH induzindo aumento da reabsorção óssea e redução da fosfatase alcalina,

mostrando que o tratamento com EDTA é acompanhado por perda óssea (GULDAGER et al., 1993).

Nas vértebras (L5) dos animais tratados com Pb, observa-se redução do percentual mineral ósseo (Tabela 14), levando a redução da densidade mineral óssea (Tabela 12). Um estudo anterior não encontrou nenhum efeito da exposição ao chumbo sobre a densidade mineral em camundongos machos (MASSIE, AIELLO, 1992). Provavelmente esta não redução se deve à dose de exposição (menos do que 1 ppm) muito baixa, comparado a dose usada nesse estudo e em outros (GRUBER et al., 1997; BAGCHI, PREUSS, 2005; CARMOUCHE et al., 2005; KHALIL et al., 2008; BEIER et al., 2013), nos quais se observa redução da densidade mineral óssea. Porém, em nosso estudo apesar da redução da densidade mineral, não se observa alteração dos parâmetros biomecânicos nas vértebras (L5). Alguns autores sugerem que a redução da resistência óssea esta relacionada à redução da densidade mineral (OGOSHI, NANZAI, MORIYAMA, 1992; JARUP, 1998). Entretanto, outros fatores além da densidade mineral estão envolvidos, como as propriedades geométricas (rede trabecular e macroestrutura cortical) e propriedade materias (calcificação da matriz e composição e arranjo espacial dos cristais, fibras colágenas e lamelas) (COMELEKOGU et al., 2007; RONIS et al., 2001; MONIR et al., 2010), o que explicaria os resultados encontrados nesse estudo.

O tecido ósseo é um tecido ativo metabolicamente que sofre contínuo remodelamento durante a vida. Esse processo consiste na reabsorção óssea pelos osteoclastos e síntese osteoblástica de uma matriz orgânica e sua mineralização (PEEL, 2012). Distúrbios no balanço entre a formação e reabsorção óssea causados por numerosos xenobióticos, incluindo metais tóxicos (MONIR et al., 2010; KUPRASZEWICZ, BROZÓSKA, 2013), tem sérias consequências para a saúde óssea, entre as quais destaca-se a perda de massa óssea (GRUBER et al., 1997; BAGCHI, PREUSS, 2005) e aumento da taxa de fraturas devido ao

enfraquecimento das propriedades biomecânicas (RONIS et al., 2001; CONTI et al., 2012; BEIER et al., 2013). Nesse estudo observamos que exposição a Acetato de Chumbo reduziu a carga máxima, a resiliência e a rigidez da diáfise femoral (Figuras 8, 10 e 12). Outros estudos tem relatado redução da resistência óssea devido à exposição ao chumbo (RONIS et al., 2001;; MONIR et al., 2010; CONTI et al., 2012; BEIER et al., 2013). SEEMAN et al. (2001) encontraram uma associação entre fraturas de quadril e volume reduzido de fêmures. Em nosso estudo, o volume ósseo dos fêmures de animais expostos estava reduzido. Esta variável é de grande importância para determinação da força óssea (SEEMAN et al., 2001; SEEMAN, 2003). Adicionalmente, nossos resultados biomecânicos podem sugerir que algum distúrbio no metabolismo do colágeno poderia estar ocorrendo em animais exposto ao chumbo. Uma possível explicação para esses resultados foi relatada por outros autores que demonstraram que a produção de pequenos cristais ósseos durante exposição ao chumbo possui um papel na redução da resistência óssea (MONIR et al., 2010).

Alguns possíveis mecanismos levando à alteração da densidade mineral óssea e ao enfraquecimento das propriedades biomecânicas ósseas em animais expostos ao chumbo tem sido relatados (MONIR et al., 2010; BEIER et al., 2013; KUPRASZEWICZ, BRZÓSKA, 2013). Eles envolvem alterações no processo de formação da matriz e sua mineralização, e a estimulação da reabsorção óssea via ação direta sobre as células ósseas e ação indireta sobre o metabolismo do cálcio e vitamina D devido a dano renal e gastrointestinal. Outro possível mecanismo poderia ser resultado do estresse oxidativo e peroxidação lipídica sobre as células ósseas (GRUBER et al., 1997; MIYAHARA et al., 1997; BAGCHI, PREUSS, 2005, MONIR et al., 2010). Estresse oxidativo tem sido relacionado com perda óssea (SANCHEZ et al., 2007; LIU et al., 2008; SHEN et al., 2008; PAYAL, KAUR, RAI, 2009). Devido à alta afinidade do chumbo a grupos sulfídricos, modificação de grupos tióis em proteínas de membrana, peptídeos e amino ácidos podem ocorrer através de produção indireta de produtos

oxidativos e mudança do estado redox da célula. A interação de metais pesados com grupos sulfidrícos resulta em inibição das enzimas antioxidantes que estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), portanto aumentando peroxidação lipídica, danos ao DNA e alterações da homeostase de cálcio e zinco, além de inibição da divisão celular (KLEIN, WIREN, 1993; MIYAHARA et al., 1995; CHUN BAI et al., 2004).

Uma possível explicação para o efeito diferencial do chumbo sobre os parâmetros físicos e biomecânicos ósseos entre fêmures e vértebras pode ser a diferença de composição óssea e predominância de osso cortical ou trabecular. O osso cortical ou trabecular são de diferentes composições (NINOMIYA et al., 1990), tempo de remodelamento (ERIKSEN et al., 1993), taxa de atividade metabólica (RICO et al., 1994) e possuem diferentes respostas a medicamentos (LAAN et al., 1993). Outros autores (CHRISTOFFERSSON et al., 1987; GUIMARÃES et al., 2012) relataram diferenças da afinidade do chumbo ao osso trabecular e cortical.

Nesse estudo, a administração de CV preveniu as alterações ósseas induzidas pelo acetato de chumbo em fêmures e vértebras. Os efeitos protetores da CV e EDTA consistiram em prevenir a redução da força máxima, rigidez e resiliência dos fêmures e redução da densidade mineral óssea em vértebras em animais expostos ao chumbo. Alguns possíveis mecanismos poderiam estar envolvidos, incluindo as promovidas pelas propriedades quelante e antioxidante da CV ocorrendo em estágios de absorção e captação do chumbo no esqueleto bem como em estágios de sua ação sobre o osso. A suplementação com *Chlorella* pode reduzir a absorção gastrointestinal de chumbo e sua acumulação no organismo, reduzindo os seus efeitos tóxicos, incluindo danos a outros tecidos como o osso (UCHIKAWA et al., 2009; PAYAL, KAUR, RAI, 2009). Nossos resultados corroboram com os de QUEIROZ et al., 2008, em que a suplementação com *Chlorella* reduziu a concentração de chumbo no sangue, fígado, rim e osso. Esses resultados indicam que os efeitos benéficos de *Chlorella* sobre as

propriedades biomecânicas são parcialmente devido à redução do conteúdo de chumbo no tecido ósseo, sugerindo assim um efeito tóxico direto do chumbo como consequência de sua presença nas células ósseas. Sabe-se que a toxicidade do chumbo em células ósseas pode ser resultado do estresse oxidativo e peroxidação lipídica devido à alta afinidade dos metais pesados a grupos sulfidrílicos, reduzindo a atividade de enzimas antioxidantes e a proteção celular (PAYAL, KAUR, RAI, 2009). A geração de EROs, tais como radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxil ( $\cdot OH$ ) e hidroperóxido lipídico (LPO), como resultados de efeitos tóxicos de metais pesados são conhecidos por danificar vários componentes celulares incluindo proteínas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos (YUN et al., 2011). Assim, sugerimos que a atividade antioxidante de CV poderia proteger as células ósseas de dano oxidativo pela competição entre CV e grupos tióis da enzimas e proteínas para chumbo. Além disso, o efeito protetor de CV da toxicidade induzida por chumbo em tecido ósseo pode ser devido a muitos ingredientes bioativos em CV, os quais reagem com vários EROs bem como o inibem o processo de oxidação em lipídeos e compartimentos celulares. As fitoquelatinas (PCs),  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol tem sido sugeridos como os responsáveis pela atividade antioxidante de *Chlorella vulgaris* (SIMMONS et al., 2009; YUN et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011). Em um estudo conduzido por YUN et al. (2011), em ratos expostos a dose de 200 mg/L de chumbo por 4 semanas, os autores demonstraram redução da concentração de chumbo sanguínea, cérebro, fígado e rim após ingestão de ração contendo 2%, 5% e 10% de *Chlorella* na dieta. Além disso, os animais expostos ao chumbo apresentavam redução da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GR) e da concentração de GSH, além de aumento da peroxidação lipídica no cérebro. A administração de *Chlorella* reduziu o dano induzido pelos radicais livres por ação direta na redução da peroxidação lipídica e indiretamente estimulando a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GR) e aumento da concentração de GSH reduzidas em animais expostos ao chumbo.

Como agente quelante, EDTA é um sal que forma um complexo estável com chumbo que pode blindar o íon metálico de alvos biológicos, portanto reduzindo sua toxicidade. A proteção de EDTA sobre o osso pode estar ocorrendo pela sua habilidade para quelar chumbo do sangue como demonstrado neste estudo e reduzir sua toxicidade sobre órgãos alvo, tal como o osso. Adicionalmente outros estudos mostraram que EDTA pode reduzir a concentração de chumbo sanguíneo e ósseo (CORY-SLECHTA, 1987; FLORA, TANDON, 1990; SANCHES- FLUCTUOSO et al., 2002). Diante desses resultados prévios, sugere-se que o EDTA quelando o chumbo teria uma atividade benéfica sobre as propriedades biomecânicas de fêmures e densidade mineral das vértebras L5 em animais expostos ao chumbo. Outro possível mecanismo sugere o envolvimento da atividade antioxidante de EDTA que poderia proteger as células ósseas pela indução de enzimas antioxidantes, reduzindo assim os produtos do estresse oxidativo e danos oxidativos sobre células ósseas. Um estudo recente sobre hepatotoxicidade em animais induzida por tetracloreto de carbono (CC<sub>4</sub>), o tratamento com EDTA induziu aumento da concentração de GSH e reduziu a peroxidação lipídica (ROUSSEL et al., 2009). Também, um segundo estudo demonstrou que a terapia quelante com EDTA exerceu proteção antioxidante in vivo para o DNA e lipídeos (CUEVAS et al., 2009).

## 6 CONCLUSÕES

A exposição a 250 mgPb/Kg MC e suplementação com *Chlorella vulgaris* e EDTA em animais expostos ao acetato de chumbo, uma vez por semana, durante 8 semanas, permitiu observar:

- Aumento das concentrações de chumbo sanguínea e nos diversos órgãos (fígado, rim, cérebro e tecido ósseo) de ratos expostos à dose de 250 mg/Kg MC de acetato de chumbo. O tratamento com CV ou EDTA reduziu significativamente as concentrações de chumbo sanguínea, levando à redução da retenção deste metal nos diversos órgãos estudados (fígado, rim, cérebro e osso).
- Redução da concentração de zinco sanguínea, no fêmur, na vértebra L4 e na tíbia de animais expostos a este metal. A terapia quelante com EDTA preveniu a redução da concentração de zinco no fêmur em animais expostos ao chumbo, enquanto a administração de CV 50 ou CV 250 não teve tal efeito.
- A exposição ao chumbo causou redução da concentração de cálcio e magnésio na vértebra L4. Nos fêmures observa-se redução da concentração de magnésio no grupo exposto ao chumbo. O tratamento desses animais com CV (250 mg/Kg MC) produziu uma parcial, mas significativa, restauração da concentração de cálcio na vértebra (L4).
- Redução da carga máxima, resiliência e rigidez em fêmures no grupo exposto ao chumbo, indicando a habilidade deste elemento para danificar a qualidade do tecido ósseo. Nas vértebras (L5 e L3) foi possível observar redução da densidade mineral óssea e densidade radiográfica em animais expostos a este metal, mas não se observa alteração dos parâmetros biomecânicos das vértebras. Os efeitos protetores da CV e EDTA consistiram em prevenir a redução da força máxima, rigidez e resiliência dos

fêmures e redução da densidade mineral óssea em vértebras em animais expostos ao chumbo.

- Aumento da atividade de MMP-2 pró, intermediária e ativa em animais expostos ao metal e redução a níveis comparados ao controle quando os animais receberam a suplementação com extrato de *Chlorella vulgaris* (50 mg/Kg MC).
- Esses resultados fornecem evidências para o uso benéfico de CV como terapia quelante para proteger o osso de danos induzidos pelo acetato de chumbo na dose de 250 mg/Kg MC.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, H. et al. Subchronic toxic effects of tributyltin (tbt) and inorganic lead (pbii) in rats, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 113–20, 2005.
- AASETH, J.; BOIVIN, G.; ANDERSEN, O. Osteoporosis and trace elements - An overview. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 149– 152, 2012.
- ADEYEMI, O. et al. Toxicological evaluation of the effect of water contaminated with lead, phenol and benzene on liver, kidney and colon of albino rats, **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 885–887, 2009.
- AIAZZAT, O. et al. Modulation of oxidative stress by *Chlorella vulgaris* in streptozotocin (STZ) induced diabetic Sprague-Dawley rats. **Advances in Medical Sciences**, v. 55, p. 281-288, 2010.
- ALMODHEFER, A.J.A.; BRADBURY, M.W.D.; SIMMONS, T.J.B. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. **Clinical Science**, v. 81, p. 823-829, 1991.
- ANDERSEN, O. Chemical and Biological Considerations in the Treatment of Metal Intoxications by Chelating Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 11-21, 2004.
- ANDERSEN, O.; AASETH, J. Molecular mechanisms of in vivo metal chelation: implications for clinical treatment of metal intoxications. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 887-890, 2002.
- AHAMED, M. et al. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. **Science Total Environmental**, v. 346, p. 48–55, 2005.
- 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, 2003.

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

AMMANN, P.; RIZZOLI, R. Bone strength and its determinants, **Osteoporosis International**, v. 14, S13-S18, 2003.

ANGUELOV, A., CHICHOVSKA, M. Study on combined therapeutic potential of meso-2,3-dimecaptosuccinic acid and calcium disodium ethylenediaminetetraacetate on lead mobilization and redistribution in experimentally lead intoxicated rats. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 7, p. 85-95, 2004.

AUNGST, B.J.; FUNG, H.L. Kinetic characterization of in vitro lead transport across the rat small intestine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 61, p. 39, 1981.

ANJUM, M.R. et al. Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 74, p. 793-799, 2011.

ARIZONO, K. et al. Induction of zinc metallothionein in the liver of rats by lead, **Eisei Kagaku**, v. 28, p. 94-98, 1982.

ARIZONO, K. et al. Studies on lead-induced zinc-thionein in rat liver, **Journal Pharmaco-Bio Dyn**, v. 6, p. 19, 1983.

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

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, 2005.

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, 2005.

BARBOSA, F.; GERLACH, F. TANUS-SANTOS, J.E. Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. **Basic Clinic Pharmacology Toxicology**, v. 98, p. 559–564, 2006.

BARBOSA, Jr. F. et al. Elevated blood lead levels in a riverside population in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 109, p. 594–599, 2009.

BARREIRO, F.R. et al. Densitometric and biochemical values of broiler tibias at different ages, **Poultry Science**, v. 88, p. 2644–2648, 2009.

BATISTA, B.L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-IPC-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure, **Analytica Chimica Acta**, v. 639, p. 13-18, 2009.

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

BEIER, E.E. et al. Heavy Metal Lead Exposure, Osteoporotic-like Phenotype in an Animal Model, and Depression of Wnt Signaling, **Environmental Health Perspectives**, v. 121, p. 97-105, 2013.

BELLINGER, D.C.; STILES, K.M.; NEEDLEMAN, H.L. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. **Pediatrics**, v. 90, p. 855–861, 1992.

BERRAHAL, A.A. et al. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead, **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, p. 581-588, 2007.

BERRAHAL, A.A. et al. Effect of Age-Dependent Exposure to Lead on Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Male Rats. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 68-78, 2011.

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

BEZOOIJEN, R.L. et al. Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But Not a Classical BMP Antagonist. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 805–814, 2004.

BOYCE, B.F. et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, p. 1332-1341, 2012.

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

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

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.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 274–308, 2005.

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.

BROULIK, P.D. et al. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. **Physiology Research**, v. 59, p. 599-604, 2010.

BRESSLER et al. Divalent metal Transporter 1 in lead and cadmium transport. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 142-152, 2004.

BROUTON, C.M.L.S. et al. Synaptotagmin I is a molecular target for lead. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 1724-1735, 2001.

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, 2006.

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

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

CANALIS, E. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International**, v. 18, p. 1319-1328, 2007.

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.

CARMELI, E. et al. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Experimental Physiology**, v. 90, p. 613-619, 2005.

CARMOUCHE, J.J. et al. Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency. **Environmental Health Perspectives**, v. 113:749-755, 2005.

CARNEIRO, M.F.; EVANGELISTA, B.; BARBOSA, F. JR. Manioc flour consumption as a risk factor for lead poisoning in the brazilian Amazon. **Journal of Toxicology Environmental Health A**, v. 76, p. 206-216, 2013.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Preventing Lead Poisoning in young children. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1991.

CDC (Centers for DiseaseControl and Prevention). Screening young children for lead poisoning: Guidance for state and local public health officials. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1997.

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, 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.

CHENG, F.C. et al. Effects of Chlorellaon Activities of Protein Tyrosine Phosphatases, Matrix Metalloproteinases, Caspases, Cytokine Release, B and T Cell Proliferations, and Phorbol Ester Receptor Binding. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, p. 146-152, 2004.

CHUN BAI, X. et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- $\kappa$ B, **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 314, p. 197–207, 2004.

CIKRT, M.; LEPSI, P.; TICHY M. Biliary excretion of lead in rats drinking lead-containing water. **Toxicology Letters**, p. 139-143, 1982.

CIVITELLI, R. Cell–cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 473, p. 188–92, 2008.

CIVITELLI, R.; ZIAMBARAS, K. Calcium and phosphate homeostasis: concerted 1258 interplay of new regulators. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 34, p. 3–7, 2011.

COMELEKOGLU, U. et al. Low-exposure cadmium is more toxic on osteoporotic rat femoral bone: mechanical, biochemical, and histopathological evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 267-271, 2007.

CONTERATO, G.M.M. et al. Blood thioredoxin reductase activity, oxidative stress and hematological parameters in painters and battery workers: relationship with lead and cadmium levels in blood. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 142–150, 2011.

CONTI, M.I. et al. Effects of Lead Exposure on Growth and Bone Biology in Growing Rats Exposed to Simulated High Altitude. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, p. 1033–1037, 2012.

CORY-SLECHTA, D.A. et al. Mobilization of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, 804-813, 1987.

COSTA, A.G.; BILEZIKIAN, J.P. Bone Turnover Markers in Primary Hyperparathyroidism. **Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health**, v. 16, p. 22-27, 2013.

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

CHRISTOFFERSSON, J.O. et al. A model describing the kinetics of lead in occupationally exposed workers. In: Ellis, K.T.; Yasumura, S.; Morgan, W.D., editors. *In Vivo Body Composition Studies*. **Institute of Physical Sciences in Medicine**; London, England, p. 334-347, 1987.

CUEVAS, J.G. et al. Ethylenediaminetetraacetic acid induces antioxidant and anti-inflammatory activities in experimental liver fibrosis, **Redox Report**, v. 16, p. 62-70, 2011.

DAVIES, J. et al. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, p. 1817–1826, 1989.

D'SOUSA, H. S. et al. Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Lead Poisoning in General Population. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 197–201, 2011.

DIMITRIOS, J. et al. Bone Remodeling. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385–396, 2006.

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 effect of  $Pb^{2+}$  on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1535, p. 153-163, 2001.

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.

ERIKSEN, E.F. et al. Bone remodeling and bone structure. In: Mundy GR, Martin TJ (eds) *Physiology and pharmacology of bone*. Springer-Verlag, Berlin, pp 67–109, 1993.

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.

FEWTRELL, L.; KAUFMANN, R.; PRUSS-USTUN, A. *Lead: Assessing the Environmental Burden of Disease (Environmental Burden of Disease Series No. 2)*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.

FERGUSON, S. A. et al. Minimal behavioral effects from moderate postnatal lead treatment in rats. **Neurotoxicology Tetratology**, 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.

FERRETI, R.J.L.; CAPOZZA, R.F.; ZANCHETTA, J.R. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. **Bone**, v. 18, p. 97–102. 1996.

FLORA, S.J.; BHATTACHARIA, R.; VIJAYAHARAGHAVA, R. Combined therapeutic potential of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and calcium disodium edetate on the



mobilization and distribution of lead in experimental lead intoxication in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 25, p. 233-240, 1995.

FLORA, S.J.S. Nutritional components modify metal absorption, toxic response and chelation therapy. **Journal Nutrition Environmental Medicine**, v. 12, p. 53–67, 2002.

FLORA, S.J.S. Metal Poisoning: Threat and Management, **Al Ameen Journal of Medical Science**, v. 2, p. 4 -26, 2009.

FLORA, S.J.S.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication, **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 2745-2788, 2010.

FLORA, S.J.S.; MITAL, M.; MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **Indian Journal Medicine Research**, v. 128, p. 501-523, 2008.

FLORA, S.J.S.; TANDON, S.K. Beneficial effect of zinc supplementation during chelation treatment of lead intoxication in rats. **Toxicology**, v. 64, p. 129-139, 1990.

FLORA, S.J.S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. **Reproductive and Developmental Toxicology**, (Academic Press), pp 415–438, 2011.

FORBES, R.M. Excretory Patterns and Bone Deposition of Zinc, Calcium and Magnesium in the Rat as Influenced by Zinc Deficiency, EDTA and Lactose. **Journal of Nutrition**, v. 74, 1961.

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.

FREDERIKS, W.M.; MOOK, O.R. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, p. 711-722, 2004.

FRIEDMAN, A. W. Important Determinants of Bone Strength Beyond Bone Mineral Density. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 12, p. 70-77, 2006.

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

FUJISHIRO, Y.J. et al. Dichotomous effects of lead acetate on the expression of metallothionein in the liver and kidney of mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1037-42, 2009.

GALIS, Z.S.; KHATRI, J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circulation Research**, v. 90, p. 251–262, 2002.

GALLIERA, E., BANFI, G., CORSI, M.M. Human bone disorders: Pathological role and diagnostic potential of matrix metalloproteinases, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1590–1593, 2010.

GALLIERA, E. et al. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9: Are they early biomarkers of bone remodelling and healing after arthroscopic acromioplasty? **Injury, International Journal Care Injured**, v. 41, 1204–1207, 2010.

GASIOROWSKI, K. et al. The influence of subcutaneously administered lead acetate on the concentration of copper, iron and zinc in the blood, kidney, liver and spleen of rats. **The Science of the Total Environment**, v. 64, p. 117-123, 1987.

GERLACH, R.F. et al. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, p. 327–334, 2000.

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.

GONZÁLEZ-PUEBLA, E. et al. Altered expressions of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in placenta from women exposed to lead. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, p. 662–670, 2012.

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

GORMAN, J.L.; ISPANOVIC, E.; HAAS, T.L. Regulation of matrix metalloproteinase Expression. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 8, p. 5–11, 2011.

GRANT, L. D. Lead and compounds. **Environmental Toxicants** (John Wiley & Sons, Inc.). pp. 757–809, 2008.

GUIMARÃES, D. et al. Lead in liver and kidney of exposed rats: Aging accumulation study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 285–290, 2012.

GUIMARÃES, D. et al. Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis: aging effect, **Metallomics**, v. 4, p. 66–71, 2012.

GRUBER, H.E. et al. Osteopenia induced by long-term, low- and high-level exposure of the adult rat to lead. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 23, p. 65-73, 1997.

GULDAGER, B. et al. Effects of intravenous EDTA treatment on serum parathyroid hormone (1-84) and biochemical markers of bone turnover, **Danish Medical Bulletin**, v. 40, p. 627-630, 1993.

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

GURER, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radicals Biology Medicine**, v.29, p. 927-945, 2000.

HABERMANN, E.; CROSWELL, K.; JANICKI, P. Lead and other metals can substitute for Ca<sup>+</sup> in calmodulin. **Archives of Toxicology**, v. 54, p. 61-70, 1983.

HALEAGRAHARA, N. et al. Protective Effect of Alpha-lipoic Acid Against Lead Acetate-Induced Oxidative Stress in the Bone Marrow of Rat. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 217-227, 2011.

HAMADA, Y. et al. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. **Bone**, v. 40, p. 1408–1414, 2007.

HAMILTON, J. D.; O'FLAHERTY. Effects of lead exposure on skeletal development in rats, **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 22, p. 594,604, 1994.

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, 2000.

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, 1997.

HASEGAWA, T. et al. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered of a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. **International Journal Immunopharmacology**, v. 12, p. 883-891, 1990.

HASEGAWA et al. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. **Immunopharmacology**, v. 35, 273-282, 1997.

HOLLAND, J.C. et al. Subchondral osteopenia and accelerated bone remodelling post-ovariectomy – a possible mechanism for subchondral microfractures in the aetiology of spontaneous osteonecrosis of the knee? **Journal of Anatomy**, v. 2, 231-238, 2013.

ILICH, J.; KERSTETTER, J.E. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 715–737, 2000.

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

JAFFE, E.K. et al. The molecular mechanism of lead inhibition of human porphobilinogen synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1531-1537, 2001.

JAMIESON, J.A.; TAYLOR, C.G.; WEILER, H.A. Marginal zinc deficiency exacerbates bone lead accumulation and high dietary zinc attenuates lead accumulation at the expense of bone density in growing rats. **Toxicological Sciences**, v. 92, 286-294, 2006.

JARUP, L. et al. Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 55, p. 435-439, 1998.

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

JELEA, S.G.; JELEA, M. Effects of subacute treatment with lead acetate on the mineral constituents from femur and tibia. **Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences**, v. 4, p. 61-68, 2009.

JIN, C.Y. et al. Blood lead: Its effect on trace element levels and iron structure in hemoglobin, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 266, p. 3607-3613, 2008.

JOSHI, J.G.; SCZEKAN, S.R.; FLEMING, J.T. Ferritin—a general metal detoxicant. **Biological Trace Element Research**, v. 21, p. 105–110, 1989.

KALIA, K.; FLORA, S.J. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. **Journal of Occupational Health**, v. 47, p. 1-21, 2005.

KHALIL, N. et al. Relationship of Blood Lead Levels to Incident Nonspine Fractures and Falls in Older Women: The Study of Osteoporotic Fractures. **Journal of bone and mineral research**, v. 23, 2008.

KASPERCZYK, A. et al. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. **Toxicology of Applied Pharmacology**, v. 228, p. 378–384, 2008.

KRATZER, F.H. et al. The effect of autoclaving soybean protein and the addition of ethylenediaminetetracetic acid on the biological availability of dietary zinc for turkey poults. **Nutrition**, v. 68, p. 313-322, 1959.

KLAASSEN. C. D. Metais Pesados e seus Antagonistas In: As bases Farmacológicas da Terapêutica. GOODMAN, GILMAN , v.2. p. 1054-56, 1998.

KIM, Y.J., KWON, S., KIM, M.K. Effect of *Chlorella vulgaris* intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. **Nutrition Research Practice**, v. 3, n. 2, 89-94, 2009.

KIRBERGER, M.; YANG, J.J. Structural differences between  $Pb^{2+}$  - and  $Ca^{2+}$  binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 1901–1909, 2008.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical load, **Physiological Reviews**, v. 84, p. 649-698, 2004.

KLEIN, R.F.; WIREN, K.M. Regulation of osteoblastic gene expression by lead. **Endocrinology**, v. 132, p. 2531-2537, 1993.

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.

KUPRASZEWICZ, E.; BROZÓSKA, M. Excessive ethanol consumption under exposure to lead intensifies disorders in bone metabolism: A study in a rat model, **Chemico-Biological Interactions**, 2013.

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, 2007.

LAAN, R.F.J.M. et al. Differential effects of glucocorticoids on cortical appendicular and cortical vertebral bone mineral content. **Calcified Tissue International**, v. 52:5–9, 1993.

LARINI, L. SALGADO, P.E.T., LEPERA, J.S. Metais In: Toxicologia, ed. Manole, p.135-141. São Pualo – Brasil, 1987.

LEE, H.S.; PARK, H.J.; KIM, M.K. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 2, p. 204-210, 2008.

LEPPANEN, O.V. et al. Pathogenesis of Age-Related Osteoporosis: Impaired Mechano-Responsiveness of Bone Is Not the Culprit, **PLO ONE**, v. 3, 2008.

LERNER, U.H. Osteoclast formation and resorption, **Matrix Biology**, v. 19, p. 107-120, 2000.

LI, L. et al. Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 73-80, 2013.

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.

LIU, G. et al. Therapeutic effects of an oral chelator targeting skeletal tissue damage in experimental postmenopausal osteoporosis in rats. **Hemoglobin**, v. 32, p. 181–190, 2008.

LOGAR, D.B. et al. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 25, p. 219–25, 2007.

LLOYD, S.A. et al. Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. **Calcified Tissue International**, v. 82, p. 361–372, 2008.

LOWE, N.M.; FRASER, W.D.; JACKSON, M.J. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 181–185, 2002.

LOUZADA, M.J.Q. Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo “In Vitro”.1994. Tese (Doutorado)-Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual Paulista, Campinas, 1994.

LOUZADA, M. J. Q. et al. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. FOL Faculdade de Odontologia de Lins/UNIMEP, v.13, n.1, p.33-38, 2001.

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.

MANSOURI, M. T.; CAULI, O. Motor alterations induced by chronic lead exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 307-313, 2009.

McNEILL, F. E et al. <sup>109</sup>Cd K x ray fluorescence measurements of tibial lead content in young adults exposed to lead in early childhood. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 57, p. 465, 2000.

MARQUETI, R.C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle, **International Journal Sports Medicine**, v. 29, p. 559-563, 2008.

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



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.

MASSIE, H.R.; AIELLO, V.R. Lead accumulation in the bones of aging male mice. **Gerontology**, v. 38, p. 13-17. 1992.

MATSUO, K.; OTAKI, N. Bone cell interactions through Eph/ephrin Bone modeling, remodeling and associated diseases. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, p. 148–156, 2012.

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

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.

MILLER, G.D. et al. Low-level lead exposure and the time dependent organ-tissue distribution of essential elements in the neonatal rat. **Biological Trace Elements Research**, v. 6, p. 519-530, 1984.

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

MONIR, A. U. et al. The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 mice. **Bone**, v. 47, 888-894, 2010.

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

MURATA, K. et al. Relationship of blood lead levels to blood pressure. **Journal of Occupational Health**, v. 51, p. 1-12, 2009.

NABIL, M. et al. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 41-46, 2012.

NAVAS-ACIEN et al. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial Disease. **Circulation**, v.109, p. 3196–3201, 2004.

NELSON, K.K.; MELENDEZ, J.A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. **Free Radical Biology Medicine**, v. 37, p. 768–784, 2004.

NI, Z.S. et al. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Kidney International**, v. 66, p. 2329–2336, 2004.

NINOMIYA, J.T. et al. Heterogeneity of human bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 5, p. 933–938, 1990.

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

OGAWA, M. et al. Two cases of acute lead poisoning due to occupational exposure to lead. **Clinical Toxicology**, v. 46, p. 332–335, 2008.

OGOSHI, K.; NANZAI, Y.; MORIYAMA, T. Decrease in bone strenght of cadmium treated young and old rats. **Archives of Toxicology**, v. 66, p. 315-320, 1992.

OSER, B.L.; OSER, M.; SPENCER, H.C. Safety evaluation studies of calcium EDTA, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 5, p. 142-162, 1963.

PALMER, C.D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 980-990, 2006.

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.

PARFITT, A.M. Misconceptions V-activation of osteoclasts is the first step in the bone remodelling cycle, **Bone**, v. 39, p. 1170–2, 2006.

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, 2006.

PAYAL, B.; KAUR, H.P.; RAI, D.V. New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone, **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, p. 18–23, 2009.

PEEL, N. Disorders of bone metabolism. **Surgery**, v. 30, p. 61–66, 2012.

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.

PEREIRA, L.C.R. et al. Parathyroid hormone secretion in women in late menopause submitted to EDTA-induced hypocalcemia. **Maturitas** v. 59, p. 91–94, 2008.

PIOMELLI, S. Childhood lead poisoning, **Pediatric Clinics of North America**, v. 49, p. 1285–1304, 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.

PUSTOVRH, M.C. et al. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. **Placenta**, v.26, p. 339–348, 2005.

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.

QUEIROZ, C.O. et al. *Chlorella vulgaris* up-modulation of myelossuppression induced by lead: The role of stromal cells, **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, 3147-3154, 2008.

QUEIROZ, M.L.S. et al. *Chlorella vulgaris* restores marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 1-8, 2011.

RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity, **Matrix Biology**, v. 26, p. 587–596, 2007.

RAAFAT, B.M.; HASSAN, N.S.; AZIZ, S.W. Bone mineral density (BMD) and osteoporosis risk factor in Egyptian male and female battery manufacturing workers. **Toxicology and Industrial Health**, 2011.

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

RAMOS, A.L.; TOLEDO, C.O.; QUEIROZ, M.L.S. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. **Nutrition Cancer**, v. 62, p. 1170-1180, 2010.

RASTOGI, S.K. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. **Indian Journal Occupational Environmental Medicine**, v. 12, p. 103–106, 2008.

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.

RICO, H. et al. Quantitative peripheral computed tomodensitometric study of cortical and trabecular bone mass in relation to menopause. **Maturitas**, v. 18, p. 183–189, 1994.

RIZZI, E. et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 439–449, 2009.

ROY, C.N.; ANDREWS, N.C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. **Human Molecular Genetics**, v. 10, p. 2181–2186, 2001.

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, 2001.

ROSENBLUM, G. et al. Molecular Structures and Dynamics of the Stepwise Activation Mechanism of a Matrix Metalloproteinase Zymogen: Challenging the Cysteine Switch Dogma. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 13566-13574, 2007.

ROUSSEL, A.M. et al. EDTA chelation therapy, without added vitamin C, decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation, **Alternative Medicine Review**, v. 14, p. 56-61, 2009.

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

SAITO, M.; FUJII, K.; MARUMO, K. Degree of Mineralization-related Collagen Crosslinking in the Femoral Neck Cancellous Bone in Cases of Hip Fracture and Controls, **Calcified Tissue International**, v. 79, p. 160-168, 2006.

SANCHEZ-RODRIGUES, M.A. 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.

SANCHES-FLUCTUOSO, A.I. et al. Lead mobilization during calcium disodium ethylene diaminetetraacetate chelation therapy in treatment of chronic lead poisoning, **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, 51-58, 2002.

SANO, T., TANAKA, Y. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits. **Artery**, v. 14 p. 76-84, 1987.

SAXENA, G., FLORA, J.S. Flora, Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 18, 221-233, 2004.

SCRIMGEOUR, A.G. et al. Moderate zinc deficiency negatively affects biomechanical rat tibiae independently of body composition. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 813–819, 2007.

SEEMAN, E. et al. Fracture site-specific deficits in bone size and volumetric density in men with spine or hip fractures. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 16, p. 120–127, 2001.

SEEMAN, E. Periosteal bone formation - a neglected determinant of bone strength. **New English Journal of Medicine**, v. 349, p. 320–323, 2003.

SHEN, C.L. et al. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. **Osteoporosis International**, v. 19, p. 979–990, 2008.

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.

SHIH, M.F.; CHERNG, J.Y. Potential protective effect of fresh grown unicellular green algae component (resilient factor) against PMA- and UVB-induced MMP1 expression in skin fibroblasts. **European Journal of Dermatology**, v. 18, p. 303-307, 2008.

SHIM, H.S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats, **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 479-485, 2008.

SHIM, J.A. et al. Effect of *Chlorella* intake on Cadmium metabolism in rats. **Nutrition Research and Practice**, v. 3, p. 15-22, 2009.

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, 2002.

SHOREY, S.; HEERSCHE, J.N.M.; MANOLSON, M.F. The relative contribution of cysteine proteinases and matrix metalloproteinases to the resorption process in osteoclasts derived from long bone and scapula. **Bone**, v. 35, p. 909–917, 2004.

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

SKERFVING, S. et al. Biological monitoring of inorganic lead. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 19, p. 59-64, 1993.

SIMMONS, T.J.B. The affinity of human erythrocyte porphobilinogen synthase for  $Zn^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ . **European Journal of Biochemistry**, v. 234, p. 178-183, 1995.

SIMMONS, D.B.D. et al. Identification and quantification of glutathione and phytochalinins from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free oxidation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 809-817, 2009.

SIMS, N.A.; GOOI, J.H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19 p. 444–451, 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.

SINICROPI, M. S. et al. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating for the pharmacological treatment of metal poisoning. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 501-520, 2010.

SWARNAKAR, S. et al. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin, **Journal of Pineal Research**, v. 50, p. 8–20, 2011.

SOGAARD, C. H. et al. 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.

SOLOMONS, N.W. et al. Studies on the bioavailability of zinc in man. Effects of the Guatemalan rural diet and of the iron-fortifying agent, NaFeEDTA. **Nutrition**, v. 109, p. 1519-1528, 1979.

SON, Y.A. et al. Intake of *Chlorella vulgaris* Improves Antioxidative Capacity in Rats Oxidatively Stressed with Dietary Cadmium. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 54, p. 7–14, 2009.

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.

SUSO, F.A.; EDWARDS, H.M. Influence of various chelating agents on absorption of Co, Fe, Mn and Zn by chickens. **Poultry Science**, v. 47, p. 1417-1425, 1968.

SWARNAKAR, S. et al. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by Melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 50, v. 8–20, 2011.

STONE, K.L. et al. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 18 , p. 1947-1954, 2003.



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, Y.; YOSHIKAWA, H. Induction of hepatic zinc-binding proteins of rats by various metals. **Industrial Health**, v. 14, p. 25-31, 1976.

TANDON, S.K.; SINGH, S.; JAIN, V.K. Efficacy of Combined Chelation in Lead Intoxication. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, p. 585-589, 1994.

TANDON, S.K. et al. Influence of Age on Lead-Induced Oxidative Stress in Rat, **Biological Trace Element Research**, v. 88, p. 59-69, 2002.

TELLEZ-ROJO, M.M. et al. Longitudinal associations between blood lead concentrations lower than 10microg/dL and neurobehavioral development in environmentally exposed children in Mexico City. **Pediatrics**, v. 118, p. e323–e330, 2006.

TODOROVIC, T. et al. Calcium and magnesium content in hard tissues of rats under condition of subchronic lead intoxication. **Magnesium Research**, v. 21, p. 43-50, 2008.

TRAVIESSO, L. et al. Heavy metal removal by microalgae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 144-151, 1999.

THEPPEANG, K. et al. Associations of Bone Mineral Density and Lead Levels in Blood, Tibia, and Patella in Urban-Dwelling Women. **Environmental Health Perspective**, v. 116, 2008.

THOMAS, D.J.; CHISOLM JR, J.J. Lead, Zinc and Copper Decorporation during Calcium Disodium Ethylenediamine Tetraacetate Treatment of Lead-Poisoned. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 239, p. 829-835, 1986.

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

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

UCKIKAWA, T. et al. The influence of Parachlorella beyerinckii CK-5 on the absorption and excretion of methylmercury (MeHg) in mice. **Journal Toxicology Sciences**, v. 35, 101-105, 2010.

UCKIKAWA T. et al. Parachlorella beyenckii accelerates lead excretion in mice. **Toxicology Industrial Health**, v. 25, p. 551-556, 2009.

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.

VAN DER STEEN, P. E. et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 375–536, 2002.

VARNAI, V.M. et al. The effect of dietary supplementation with calcium salts on skeletal calcium in suckling rats. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 54, p. 119, 2003.

VASHISHTH, D. Age dependent-biomechanical modifications in bone. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 15, p. 345-348, 2005.

VAZIRI, N.D.; SICA, D.A. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. **Current Hypertension Reports**, v. 6, p. 314–320, 2004.

VICTERY, W. et al. Essential trace metal excretion from rats with lead exposure and during chelation therapy, **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 129-135, 1986.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v. 17, p. 319-336, 2006.

VIJAYAVEL, K.; ANBUSELVAM, C.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 303, p. 39–44, 2007.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, p. 827–839, 2003.

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.

WALDORFF, E.I.; GOSDSTEIN, S.A.; McCREADIE, B.R. Age-dependent microdamage removal following mechanically induced microdamage in trabecular bone in vivo. **Bone**, v. 40, p. 425-32, 2007.

WANG, H.M. et al. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1865–1872, 2010.

WANG, L. et al. Effects of lead and/or cadmium on the distribution patterns of some essential trace elements in immature female rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, p. 1914-1923, 2011.

WASOWICZ, W.; GROMADZINSKI, J.; RYDZYNSKI, K. Blood concentration of essential trace elements and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium, **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 14, p. 223-229, 2001.

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

WALKLEY, C.R. et al. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. **Cell**, v. 129, p. 1081–95, 2007.

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

WEINSTEIN, R.S. Perspective: True strength. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 15, P. 621, 2000.

WHO. Environmental Health Criteria 165. Inorganic lead. Geneva, 1995.

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

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

WRIGHT, H.L. et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 2, p. 56–64, 2009.

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, 2004.

YUN, H. et al. Protective Effect of *Chlorella vulgaris* against Lead-Induced Oxidative Stress in Rat Brains. **Journal Health Science**, v. 57 p. 245-254, 2011.

YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: more than markers, **Calcified Tissue International**, v. 72, p. 2-4, 2003.

ZHAO, C. et al. Bidirectional ephrinB2–EphB4 signaling controls bone homeostasis, **Cellular Metabolism**, v.4, p.111–121, 2006.

# ANEXOS

**ANEXO A:** Força máxima, resiliência e rigidez óssea dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do teste de Flexão a Três Pontos.

Grupos	Força Máxima (N)	Resiliência (J)	Rigidez (N/mm)
Controle	100,81 ± 1,32	0,050 ± 0,003	196,71 ± 4,92
EDTA	91,16 ± 2,10	0,037 ± 0,003	179,70 ± 7,47
CV 50	91,13 ± 1,93	0,035 ± 0,001	192,95 ± 5,48
CV 250	94,13 ± 3,32	0,044 ± 0,004	176,05 ± 7,10
Pb	86,82 ± 1,77 a	0,033 ± 0,002 a	163,45 ± 6,57 a
Pb + EDTA	100,15 ± 3,50 e	0,045 ± 0,005	190,08 ± 10,53 e
Pb + CV 50	100,63 ± 1,78 e	0,045 ± 0,002	197,41 ± 9,46 e
Pb + CV 250	98,68 ± 3,39 e	0,038 ± 0,004	195,21 ± 10,81 e

Média ± EPM. n= 8. Diferenças estatísticas indicadas por: (a) vs controle, (e) vs Pb, p<0,05 (ANOVA Two-way post-hoc Teste de Bonferroni). Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).

**ANEXO B:** Força máxima, resiliência e rigidez óssea das quintas vértebras lombares (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais, obtidos através do teste de Compressão.

Grupos	Força Máxima (N)	Resiliência (J)	Rigidez (N/mm)
Control	187,15 ± 8,51	0,033 ± 0,004	494,68 ± 37,06
EDTA	159,49 ± 7,78	0,050 ± 0,007	429,13 ± 26,38
CV 50	159,34 ± 10,00	0,054 ± 0,009	424,84 ± 38,40
CV 250	198,14 ± 10,38	0,047 ± 0,006	513,09 ± 47,69
Pb	166,16 ± 8,76	0,040 ± 0,008	443,01 ± 25,04
Pb + EDTA	185,75 ± 10,41	0,047 ± 0,005	536,85 ± 34,65
Pb + CV 50	180,98 ± 5,56	0,041 ± 0,005	430,58 ± 27,95
Pb + CV 250	179,09 ± 5,58	0,048 ± 0,007	519,40 ± 52,03

Média ± EPM. n= 8. Grupo Controle (C), EDTA (EDTA), Chlorella 50 (CV 50), Chlorella 250 (CV 250). Grupo Chumbo (Pb), Chumbo + EDTA (Pb + EDTA), Chumbo + Chlorella 50 (Pb + CV 50) e Chumbo + Chlorella 250 (Pb + CV 250).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 044/2009**

Protocolo nº 047/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 36ª. Reunião, ocorrida em 20/10/2009, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Avaliação dos efeitos do extrato de Chlorella vulgaris sobre o tecido ósseo de ratos expostos ao acetato de chumbo**”, apresentado por José Aparecido Ferreira e Keico Okino Nonaka.

São Carlos, 27 de outubro de 2009.

  
Prof.ª Dr.ª Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal