

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação de efeitos comportamentais e dano ao DNA induzidos por
Benzo(a)pireno em ratas após administração subcrônica.**

Rebeca Vargas Antunes Schunck

Porto Alegre, novembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação de efeitos comportamentais e dano ao DNA induzidos por
Benzo(a)pireno em ratas após administração subcrônica.**

Rebeca Vargas Antunes Schunck

Trabalho de Conclusão

da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

Orientadora

Farma. Érica Santos Maciel

Co-orientadora

Porto Alegre, novembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, quem sempre me sustentou e colocou pessoas certas nas horas certas. Também tenho muito a agradecer a meus pais Jorge Nei e Mara, os quais sempre me incentivaram e me ajudaram para que eu pudesse estudar. Nunca vou esquecer das horas que o meu pai me ajudou a fazer os meus trabalhos e na preocupação e dedicação da minha mãe para me ver bem.

Além de pais maravilhosos, o Senhor colocou na minha vida um companheiro chamado Vitor que, assim como meus pais, sempre me apoiou e me incentivou a realizar o meu sonho de estudar, além de fornecer recursos financeiros. Agradeço a meus sogros, Clara e Cecílio, e aos meus cunhados, Patrícia e Giovani, além do pequeno Augusto, por entender o meu sonho e me ajudar a realizá-lo.

Também tenho que agradecer a meus segundos pais, vó Guiomar e vô Benjamin, por me tratar sempre com muito amor e carinho. Mas não posso me esquecer da minha outra vó Anna e do meu vô Salmo (*in memoriam*), os quais sempre estiveram presentes em minha vida quando precisei.

Quero agradecer também à professora Mirna Bainy Leal por me aceitar em seu grupo de pesquisa (a insistência valeu a pena) e me orientar em um momento tão importante em minha vida. Agradeço também à Érica pela paciência em me co-orientar e pelas ideias valiosas que me forneceu para a confecção deste trabalho. Agradeço também à Gabriela Becker e à Janaina Salomon por dividirmos os trabalhos e sermos uma equipe.

Enfim, mas não menos importante, quero agradecer toda a minha família. Um agradecimento especial também quero dedicar ao meu tio Deto, o qual apesar de não estar mais aqui, seu exemplo e dedicação sempre nos acompanham.

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Materiais e Métodos.....	11
Resultados.....	15
Discussão.....	17
Conclusão.....	19
Referências Bibliográficas.....	20
Anexos.....	24

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo a fim de ser submetido à “Revista Brasileira de Toxicologia”.

As normas para publicação de trabalhos na Revista Brasileira de Toxicologia encontram-se em anexo.

Avaliação de efeitos comportamentais e dano ao DNA induzidos por Benzo(a)pireno em ratas após administração subcrônica

Evaluation of behavioral effects and DNA damage induced by benzo(a)pyrene in female rats after subchronical treatment

Rebeca Vargas Antunes Schunck^{1,*}, Érica Santos Maciel², Mirna Bainy Leal^{2,3}

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS

2. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, sala 107, CEP 90050170, Porto Alegre, RS

3. Departamento de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, sala 202, CEP 90050170, Porto Alegre, RS

*Correspondência autor: (51) 33648011, bequi.vargas@yahoo.com.br

RESUMO

Benzo(a)pireno é um composto carcinogênico e mutagênico pertencente à classe de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Apesar de seus efeitos tóxicos serem amplamente estudados, os mecanismos por meio dos quais pode causar danos ainda permanecem incertos. No presente estudo, investigamos os efeitos da administração subcrônica oral em ratos fêmeas de benzo(a)pireno e o potencial efeito protetor do antioxidante N-acetilcisteína. Animais receberam diariamente (30 dias), benzo(a)pireno 1 mg/kg, N-acetilcisteína 150 mg/kg, benzo(a)pireno 1 mg/kg + N-acetilcisteína 150 mg/kg e veículos via gavagem. Foram realizados o teste de avaliação da atividade locomotora, em três períodos do tratamento, o teste de memória de reconhecimento de objetos e a análise do dano ao ácido dessoxiribonucléico através do ensaio cometa. Não foram observadas alterações na atividade locomotora ($p < 0,05$; ANOVA/Duncan) e no teste de reconhecimento de objetos ($p < 0,05$; Kruskal Wallis/Mann-Whitney). O dano ao DNA classificado como grave, foi significativamente maior nos animais tratados com benzo(a)pireno ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey) quando comparados aos controles. O tratamento com N-acetilcisteína apresentou uma tendência à redução no dano tipo 4 (grave) em relação ao grupo tratado somente com benzo(a)pireno, mas não foi estatisticamente significativo. O dano causado ao DNA pode ser responsável, em parte, pelos efeitos tóxicos do benzo(a)pireno, porém, mais estudos a longo prazo são necessários.

UNITERMOS: N-acetilcisteína, atividade locomotora, reconhecimento de objetos, toxicidade subcrônica.

ABSTRACT

Benzo(a)pyrene is a carcinogenic and mutagenic compound belonging to the class of polycyclic aromatic hydrocarbons. Besides its toxicological effects are very well studied, the mechanisms by it can cause damages remains unknown. In this work we investigated the effects of benzo(a)pyrene oral subchronical administration in female rats and the potential protector effect of the antioxidant N-acetylcysteine. Animals received daily (for 30 days) benzo(a)pyrene 1 mg/kg, N-acetylcysteine 150 mg/kg, benzo(a)pyrene 1 mg/kg + N-acetylcysteine 150 mg/kg and vehicle per oral gavage. Locomotory activity was evaluated in three periods of treatment, object recognition memory test and evaluation of DNA damage through the comet assay. There were no alterations in locomotory activity ($p < 0,05$; ANOVA/Duncan) and in the object recognition test ($p < 0,05$; ANOVA/Mann-Whitney). The DNA damage classified as severe was significantly higher in the group treated with benzo(a)pyrene ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey) compared to control. The treatment with N-acetylcysteine presented a tendency in reduction of damage type 4 (severe) related to the benzo(a)pyrene treated group, but it was not statistically significative. The damage caused to the DNA could be responsible, at least in part, for the benzo(a)pyrene toxic effects, however, more long-term studies are needed.

KEYWORDS: N-acetylcysteine, locomotory activity, object recognition, subchronic toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Benzo(a)pireno (BaP) é um composto tóxico pertencente à classe de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), conhecido por ser um poderoso agente mutagênico e carcinogênico (1-2). Forma-se pela combustão incompleta de matérias orgânicas tais como carvão, madeira, petróleo e gasolina e como resultado da queima de lixos (3). Indústrias promovem a emissão de altas concentrações de HPAs para o meio ambiente durante seus processos, os quais irão se acumular no ar, no solo e na água como material particulado (3). A exposição humana ao BaP pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados (4) ou pela inalação de poluentes (3). Outro fator que também aumenta substancialmente a exposição humana ao BaP é a fumaça de cigarro (3).

Apesar de diversos estudos avaliando a toxicidade do BaP, o mecanismo de ação por meio do qual causa danos ainda permanece pouco esclarecido. Devido ao seu alto peso molecular e principalmente sua acentuada característica lipofílica (5), o BaP consegue facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e, assim, distribuir-se no encéfalo (6-7). Por conseguinte, o sistema nervoso central pode ser extremamente afetado por danos causados pelo BaP. Estudos avaliando a neurotoxicidade em animais tratados com BaP mostraram alterações comportamentais tais como fraqueza neuromuscular quando administrado agudamente via oral (8-9), além de reduções no potencial de longa duração (LTP) do hipocampo quando expostos à inalação do BaP (10-11). BaP também aumentou o estresse oxidativo no hipocampo de ratos tratados agudamente com este composto (12).

Dois estudos recentes avaliaram o processo de aprendizado e memória espacial, através do teste comportamental do labirinto aquático de Morris, utilizando

ratos tratados por via oral por 90 dias com BaP. Ambos os estudos observaram que o tratamento com BaP prejudicou o desempenho dos animais no teste do labirinto aquático de Morris, resultado que pode estar relacionado com déficits nos processos de aprendizagem e memória. No primeiro, além desta constatação, o tratamento com BaP causou alterações no sistema de neurotransmissores hipocampal (13). O segundo estudo, por sua vez, encontrou sérios danos nos neurônios do hipocampo, entre os quais podemos citar: mitocôndrias inchadas e distorcidas com formação de vacúolos, rompimento do aparelho de Golgi, colapso no nucléolo e degeneração da bainha de mielina (14).

Nesse contexto, faz-se necessário um agente que atue contra os efeitos tóxicos do BaP e de outros poluentes existentes no ar e nos alimentos. A N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante contendo um grupamento tiol, mostrou seu potencial antioxidante e sua capacidade em reverter prejuízos neurotóxicos em estudos *in vivo* (15). Acredita-se que sua ação antioxidante se deve à sua habilidade em estimular a síntese da glutathiona (GSH), um substrato para a atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GP_x). A NAC aumenta os níveis de GSH porque é prontamente desacetilada, liberando, dessa forma, o aminoácido cisteína, substrato da síntese de GSH. O grupamento tiol presente na NAC atua como antioxidante por meio da quelação de metais e também por meio da redução de radicais livres (15).

NAC já demonstrou ser capaz de atenuar os efeitos deletérios no sistema antioxidante de encéfalos de ratos tratados agudamente com metanol por diminuir o nível de peroxidação lipídica (16). Outro estudo demonstrou que NAC reverte prejuízos na memória de ratos tratados sub-cronicamente com cádmio, além disso,

se verificou um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (enzima que degrada a acetilcolina, neurotransmissor que cumpre um importante papel no processo de aprendizado e memória) e uma diminuição na peroxidação lipídica (17).

Apesar dos diversos estudos avaliando os efeitos deletérios do BaP, ainda existem lacunas em relação aos mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos induzidos pelo composto. Como as pesquisas existentes geralmente abordam administrações agudas, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito tóxico da administração subcrônica oral de BaP em ratos Wistar fêmeas e o potencial da NAC em reverter alterações induzidas por este composto. Devido ao comprovado efeito de BaP em induzir mutagenicidade, carcinogênese e genotoxicidade, também foi avaliado o potencial de causar dano ao DNA através do ensaio cometa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, adultas (120 dias) pesando entre 250 a 300 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul CEUA, com parecer número 18287. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) (5 ratos por caixa) com livre acesso a água e alimento, em ciclos de claro/escuro de 12 horas (7 – 19h), e ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade monitorada.

Por se tratar de fêmeas, antes de cada experimento comportamental o ciclo estral foi avaliado através de esfregaços vaginais. Somente quando os animais se encontravam nas fases metaestro ou diestro é que seu perfil comportamental foi

avaliado. A variação nos dias de realização dos testes comportamentais foi de ± 1 dia, levando-se em consideração o resultado desses esfregaços.

2.2. Drogas e Tratamentos

Benzo(a)pireno (99% de pureza) e *N*-acetilcisteína foram obtidos da Sigma (Sigma - Aldrich C., St. Louis, MO, USA). BaP foi dissolvido em óleo de amendoim e a NAC em água destilada. A concentração utilizada de BaP (1 mg/kg) foi calculada baseada no teor máximo permitido para alimentos pela legislação brasileira (18) e extrapolada para roedores. A concentração utilizada de NAC (150 mg/kg) foi baseada em estudos com outros compostos tóxicos nos quais NAC apresentou efeito antioxidante (16) e reversão de prejuízos na memória (17).

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6-8/grupo) e a administração foi realizada oralmente via gavagem. O tratamento consistia de duas doses orais diárias com intervalo de uma hora e trinta minutos entre elas (tempo necessário para o BaP chegar à circulação sanguínea e ser metabolizado) (12). O primeiro grupo recebeu primeiramente óleo de amendoim seguido de água destilada, sendo considerado como grupo controle ao tratamento com BaP. O segundo grupo recebeu óleo de amendoim seguido de NAC na dose de 150 mg/kg considerado o grupo controle ao tratamento com NAC. O grupo BaP recebeu 1 mg/kg de BaP seguido de água destilada e por último o grupo BaP+NAC o qual recebeu primeiramente BaP na dose de 1 mg/kg e após NAC na dose de 150 mg/kg. Os animais foram tratados diariamente por 30 dias consecutivos e os sinais de morbidade, toxicidade e mortalidade, assim como o peso corporal foram medidos. No final do estudo os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal e, após terem seu abdômen incisado, o sangue da veia cava caudal foi coletado em tubo contendo heparina. Posteriormente, os ratos

foram eutanasiados por perfuração do diafragma e seus órgãos removidos e limpos de tecidos adjacentes. A avaliação quanto à massa relativa levou em consideração a massa corporal do primeiro dia de tratamento e foi obtida através da seguinte equação: $\text{Peso Relativo} = (\text{Peso do animal} \times 100) / \text{Peso do animal no 1}^\circ \text{ dia}$.

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan.

2.3. Atividade Locomotora

A avaliação da atividade locomotora foi realizada em três períodos distintos: primeiramente antes de iniciar a administração, para termos a atividade locomotora basal dos animais. A segunda avaliação foi realizada no decorrer do experimento (dia 10) e a última ao final dos tratamentos (dia 28). A técnica foi adaptada segundo Creese e colaboradores (19). Os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade locomotora (*Insight Equipamentos Ltda.*), a qual consiste em uma caixa de 50 x 48 x 50 cm, dotada de seis barras, cada uma com 16 sensores de luz infravermelha que detectam a posição relativa do animal na caixa. Os parâmetros monitorados foram a distância percorrida e a velocidade de movimentação dos animais, sendo os 5 minutos iniciais considerados atividade exploratória e os 10 minutos finais a sessão teste. A atividade foi realizada em uma sala escura e sem barulho.

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan.

2.4. Reconhecimento de Objetos

Foi realizado na caixa de atividade locomotora, apresentando como única diferença o fato do chão da caixa ser totalmente recoberto com maravalha. A avaliação locomotora do dia 28 foi utilizada como habituação para o teste de

reconhecimento de objetos. Depois da habituação os animais foram treinados (dia 29) e, após 24 horas do treino, as ratas foram testadas para o teste de reconhecimento de objetos (dia 30). Baseado no teste descrito por Dias e colaboradores (20), os ratos foram individualmente colocados na caixa contendo 2 objetos exatamente iguais (A e B), sendo-lhes permitido explorá-los livremente até totalizar 30 segundos (cronometrados) de exploração dos objetos. Após, os animais foram imediatamente retirados da caixa (“sessão treino”). O teste de retenção foi realizado para avaliar a memória de longa duração. Nestas sessões de teste de 5 min. de duração, os ratos foram individualmente re-introduzidos na caixa de atividade locomotora onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (A e C). O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi cronometrado por mais de um observador e expresso como percentagem do tempo total de exploração. Calculou-se, então, o Índice de Reconhecimento = $T_b / (T_a + T_b)$, onde T_a = tempo gasto explorando o objeto familiar e T_b = tempo gasto explorando o objeto novo.

Os valores encontrados para o Índice de Reconhecimento foram analisados por Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Mann-Whitney.

2.5. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi adaptado do protocolo padrão de preparação e análise de Collins e colaboradores (21). Os slides foram preparados pela mistura de 5 μ L de sangue total com 95 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%). A mistura foi vertida sobre uma lâmina de microscópio fosca revestida com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após solidificação, a lâmina foi removida e os slides foram colocados em uma solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 10 mM de

tampão tris, pH 10-10,5, com adição de 1 mL de Triton X-100 e 10% DMSO), por um período mínimo de 1 hora e máximo de 5 dias. Subsequentemente, os slides foram incubados em tampão alcalino (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH 12,6) por 10 min. A eletroforese de DNA foi de 20 min, a 25 V (0,9 V/cm) em 300 mA em tampão Tris 0,4 M (pH=7,5). Após, o DNA foi corado com nitrato de prata, e as lâminas foram codificadas para análise cega. Foram usados controles internos negativos e positivos para confirmação da eficiência da eletroforese. O controle negativo consistia de sangue total coletado no laboratório, e o controle positivo, este mesmo sangue misturado a metil metanossulfonato na concentração final de 8×10^{-5} M. A mistura foi incubada a 37°C por 2 h. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 de cada slide preparado) foram analisadas a partir de cada amostra. Cada corrida de eletroforese só foi considerada válida se os controles positivos e negativos rendessem os resultados esperados. Os danos foram visualmente pontuados de acordo com o tamanho da cauda em cinco classes: nenhuma cauda (0) e comprimento máximo de cauda (4) resultantes de danos ao DNA. Portanto, o índice de dano (ID) poderia variar de 0 (todas as células sem cauda, 100 células X 0) para 400 (todas as células com caudas extremamente longas, 100 células X 4).

Os resultados foram analisados através do teste de ANOVA de uma via seguida de pós- teste de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação de toxicidade

Durante as observações realizadas diariamente ao longo dos 30 dias de tratamento, não foram observados sinais de morbidade e toxicidade ou mortalidade

(dados não mostrados). Dados contendo os pesos corporais relativos são mostrados na figura 1. Os animais foram pesados diariamente durante os 30 dias de tratamento e depois foi calculado o peso relativo (peso do animal em relação ao primeiro dia de administração). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no peso relativo. O peso relativo dos órgãos (fígado, rins, pulmões, coração, baço, adrenais e cérebro total), calculado em relação ao peso total dos animais no último dia de tratamento, também foi avaliado, não mostrando diferenças estatísticas entre os grupos (dados não mostrados).

3.2. Atividade Locomotora

Os resultados das distâncias totais percorridas e velocidades médias são mostrados nas figuras 2 e 3, respectivamente. Na figura 2A e 3A os dados representam a atividade exploratória relativa aos 5 primeiros minutos. Na figura 2B e 3B os dados representam a média de distância e velocidade percorrida nos 10 minutos seguintes, respectivamente, sendo consideradas medidas de atividade locomotora. Não houve diferença significativa na atividade exploratória e locomotora entre os tratamentos.

3.3. Reconhecimento de Objetos

A figura 4 mostra o efeito da administração de BaP e Nac sobre a memória de reconhecimento nos animais. Não houve diferença estatisticamente significativa na retenção da memória (LTP) entre os grupos, pois tanto os animais controles como os tratados com BaP ou BaP+NAC exploraram igualmente os objetos.

3.4. Ensaio Cometa

Na tabela 1 os índices totais de dano ao DNA são mostrados. Os animais tratados somente com BaP ou BaP+NAC apresentaram maior índice de danos totais

ao DNA quando comparados aos animais controles ou que receberam somente NAC ($p < 0,05$).

Na tabela 2 são mostradas as frequências de danos de cada classe. Dano 0 significa nenhum dano, danos 2 e 3 intermediários e dano 4 graves. Tanto os animais controles como os animais que receberam somente NAC, não apresentaram danos do tipo 4, enquanto BaP induziu a formação destes danos graves ao DNA. Embora haja uma diminuição desta classe de dano nos animais tratados com NAC, esta redução não foi estatisticamente significativa.

4. DISCUSSÃO

Tendo em vista que os mecanismos por meio dos quais o BaP induz toxicidade ainda permanecem pouco esclarecidos, este trabalho avaliou o efeito da administração subcrônica de BaP (1 mg/kg) a ratos Wistar. Nos parâmetros comportamentais avaliados (atividade locomotora e memória de longo prazo), os grupos não apresentaram diferenças significativas. Estes resultados podem estar relacionados, em parte, à curta duração do tratamento (30 dias) e à baixa concentração (1mg/kg) de BaP utilizada, em relação a outros estudos que utilizaram tratamentos por períodos mais longos (90 dias) (13) e doses mais altas (2 mg/kg) e obtiveram resultados significativos em testes comportamentais, inclusive de memória (14).

Com relação aos danos causados ao DNA pelo BaP, nossos resultados demonstraram que BaP causou dano, e em alguns animais este dano foi de classe 4. Em geral, compostos pertencentes a PAH, grupo no qual o BaP é o representante principal, são catalizados pela monooxigenase CYP P450 para formar produtos tóxicos diidrodióis (4,5; 7,8; 9,10-dióis) e produtos não tóxicos hidroxilados (3- e

9[OH] BaP) (22,23). Dentre os produtos mais deletérios destaca-se o B(a)P-7,8-diol o qual pode ser transformado a metabólitos de PAH, tal como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), ou pode ser ativado a catecol através da enzima aldol-ceto-redutase. Como o catecol é instável, prontamente ocorre auto-oxidação a o-quinona, a qual pode reagir com GSH, RNA e DNA e também pode propiciar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Produção de EROs leva, então, a um aumento na cisão do DNA e a um aumento na formação de 8-oxo-dGuo, o qual se acredita ser responsável pela transformação do nucleotídeo G a T na cadeia de DNA, mutação que pode levar à carcinogenicidade (23).

Por conseguinte, BaP pode causar danos ao DNA como consequência da geração de EROs e da ineficiente proteção oferecida pelo sistema antioxidante enzimático ao estresse oxidativo causado pelas EROs, tal como foi demonstrado após tratamento agudo com BaP em camundongos (24). Além disso, genes também são afetados pelo efeito deletério de BaP, como ficou comprovado após administração sub-aguda de BaP através de injeção intraperitoneal a camundongos, onde foi observado que o referido composto causou a modulação da expressão do gene da subunidade NR1, responsável por um subtipo de receptor de glutamato *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Danos neste gene estão associados a prejuízos na função de aprendizagem e memória e também a comprometimento do potencial de longa duração (LTP) (25). Portanto, os danos causados ao DNA podem ser responsáveis, em parte, pelos efeitos tóxicos do BaP.

Nesse contexto, foi avaliado o potencial de NAC (150 mg/kg) em reverter os danos induzidos pelo BaP. A NAC não foi capaz de reverter tais danos, apesar de demonstrar uma tendência de reversão, principalmente dos danos de classe 4. Postula-se que o dano induzido pelo BaP esteja ligado à geração de EROs e ao

estresse oxidativo causado como consequência da proteção ineficaz oferecida pelo sistema antioxidante endógeno (12). Nesse sentido, a NAC fornece mais substrato para a formação de GSH (um dos principais antioxidantes endógenos) e também corrobora na redução de EROs (26). Dessa forma, a NAC pode contribuir para a diminuição dos danos oxidativos causados por substâncias tóxicas e conseqüentemente pode ajudar na prevenção a danos. Sugere-se que o tratamento com doses mais elevadas de NAC, conforme trabalho de Choy e colaboradores (27) ou a administração de NAC prévia à administração de BaP relatada por Jain e colaboradores (28) possam ser estratégias importantes para estudos posteriores.

5. CONCLUSÃO

Embora nossos resultados corroborem com aqueles descritos na literatura, de que o BaP é capaz de induzir dano, mais estudos que avaliem a administração a longo prazo concomitante de BaP e NAC são necessários para elucidar o papel deste na prevenção ou tratamento do dano induzido pelo BaP.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental (INCT) Coordenado pelo Prof Dr Paulo Hilário Nascimento Saldiva (USP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro. Também agradecem às Profas. Dra. Solange Garcia da UFRGS, Dra. Eliane Dallegrove do CIT/RS e Dra. Mirian Salvador da UCS e aos bolsistas Gabriela Becker e Fernando Araújo de Freitas pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Yang Y et al. Ring opening of benzo(a)pyrene in the germ-free rat is a novel pathway for formation of potentially genotoxic metabolites. *Biochemistry* 2000; 39:15585–15591.
- (2) Annas A, Brittebo E, Hellman B. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 2000; 471:145–155.
- (3) ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta: ATSDR, 1995.
- (4) Phillips, DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 1999; 443: 139–147.
- (5) Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53:275–290.
- (6) Das M, Mukhtar H, Seth P. Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull Environ Contam Toxicol* 1985; 35:500–504.
- (7) Yan T, Chengzhi C, Haiyan Y, Baijie T. Distribution of benzo[a]pyrene in discrete regions of rat brain tissue using light microscopic autoradiography and gamma counting. *Toxicol Environ Chem* 2010; 92:1309-1317.
- (8) Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. Depression of locomotor activity in rats after acute exposure to benzo(a)pyrene acute in F-344 rats. *Neurotox Res* 2001; 3:557–579.
- (9) Saunders CR, Ramesh A, Shockley DC. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett* 2002; 129:33–45.

- (10) Wormley DD et al. Inhaled benzo(a)pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell Mol Biol* 2004a; 50:715-721.
- (11) Wormley DD, Ramesh A, Hood DB. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004b; 197:49-65.
- (12) Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol* 2006; 26:427–438.
- (13) Xia Y et al. Effects of subchronic exposure to benzo(a)pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology* 2011; 32:188–198.
- (14) Chengzi C et al. New candidate proteins for Benzo(a)pyrene-induced spatial learning and memory deficits. *J Toxicol Sci* 2011; 36:163-171.
- (15) Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2:191-206.
- (16) Farbiszewski R, Witek A, Skrzydlewska E. N-acetylcysteine or trolox derivative mitigate the toxic effects of methanol on the antioxidant system of rat brain. *Toxicology* 2000; 156:47–55.
- (17) Gonçalves JF et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 2010; 186:53–60.
- (18) Caruso MSF, Alaburda J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2008; 67:1-27.

- (19) Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine-receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976; 192:481-483.
- (20) Dias P et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 2007; 146:1719–1725.
- (21) Collins AR et al. The comet assay: topic issues. *Mutagenesis* 2008; 23:143–51.
- (22) Baird WM, Ralston SL. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. In Bowden GT, Fischer SM. (editor) *Comprehensive Toxicology, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens*. Amsterdam: Elsevier Press, 1997; 12:171–200.
- (23) Palackal NT, Burczynski ME, Harvey RG, Penning TM. The ubiquitous aldehyde reductase (AKR1A1) oxidizes proximate carcinogen trans-dihydrodiols to o-quinones: potential role in polycyclic aromatic hydrocarbon activation. *Biochemistry* 2001; 40:10901–10910.
- (24) Gao M et al. Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo(a)pyrene. *Mut Res* 2011; 719:52–59.
- (25) Grova N, Valley A, Turner JD, Morel A, Muller CP, Schroeder H. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *NeuroToxicology* 2007; 28:630–636.
- (26) Swaran JS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2:191-206.
- (27) Choy KHC, Dean O, Berk M, Bush AI, Buuse M. Effects of N-acetyl-cysteine treatment on glutathione depletion and a short-term spatial memory deficit in 2-cyclohexene-1-one-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 649:224–228.

(28) Jain S, Kumar CHM, Suranagi UD, Mediratta PK. Protective effect of acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:1404–1409.

ANEXOS

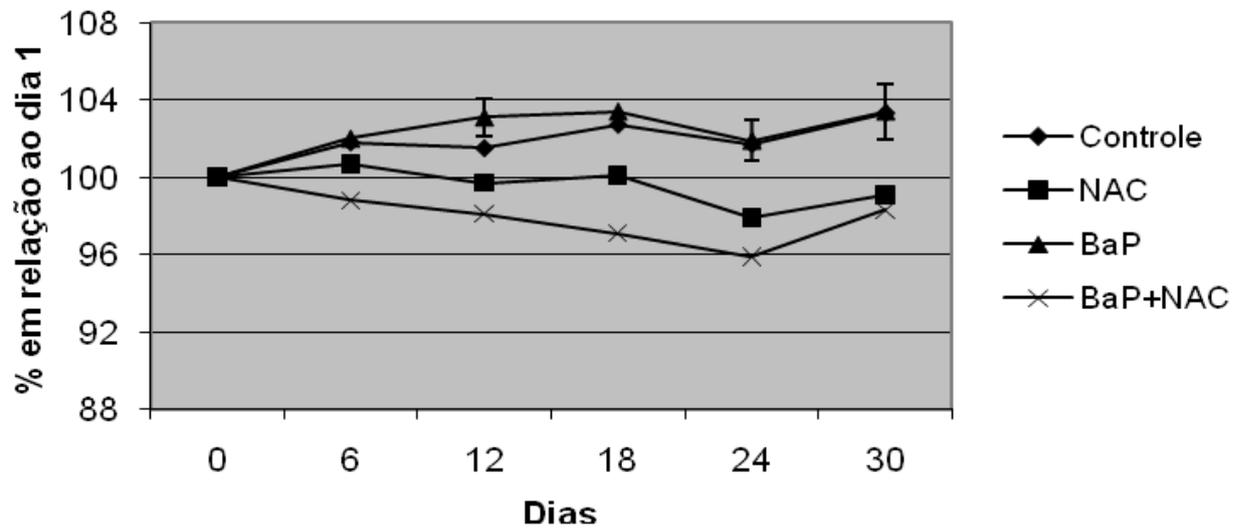


Figura 1. Variação de peso relativo de ratas tratadas via oral com óleo de amendoim + água (controle), N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC), benzo(a)pireno 1 mg/kg (BaP), e benzo(a)pireno 1mg/kg (BaP) + N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC) por 30 dias. Valores representam média \pm erro padrão (N=6-8, ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, $p < 0,05$).

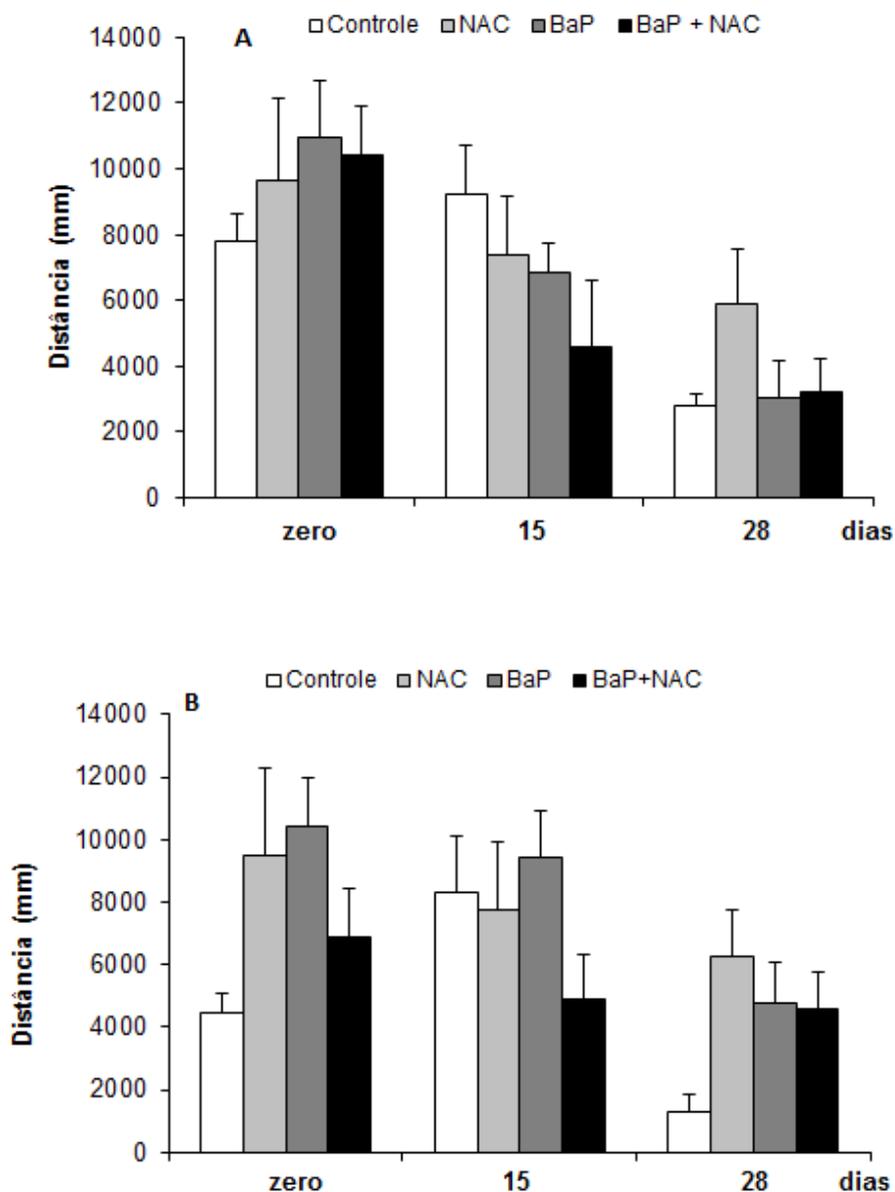


Figura 2. Distância percorrida por ratas tratadas via oral com óleo de amendoim + água (controle), N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC), benzo(a)pireno 1 mg/kg (BaP), e benzo(a)pireno 1mg/kg (BaP) + N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC) por 30 dias. (A) representa a atividade exploratória relativa aos 5 primeiros minutos (B) representa a atividade locomotora nos 10 minutos. Valores representam média \pm erro padrão (N=6-8, ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, $p < 0,05$).

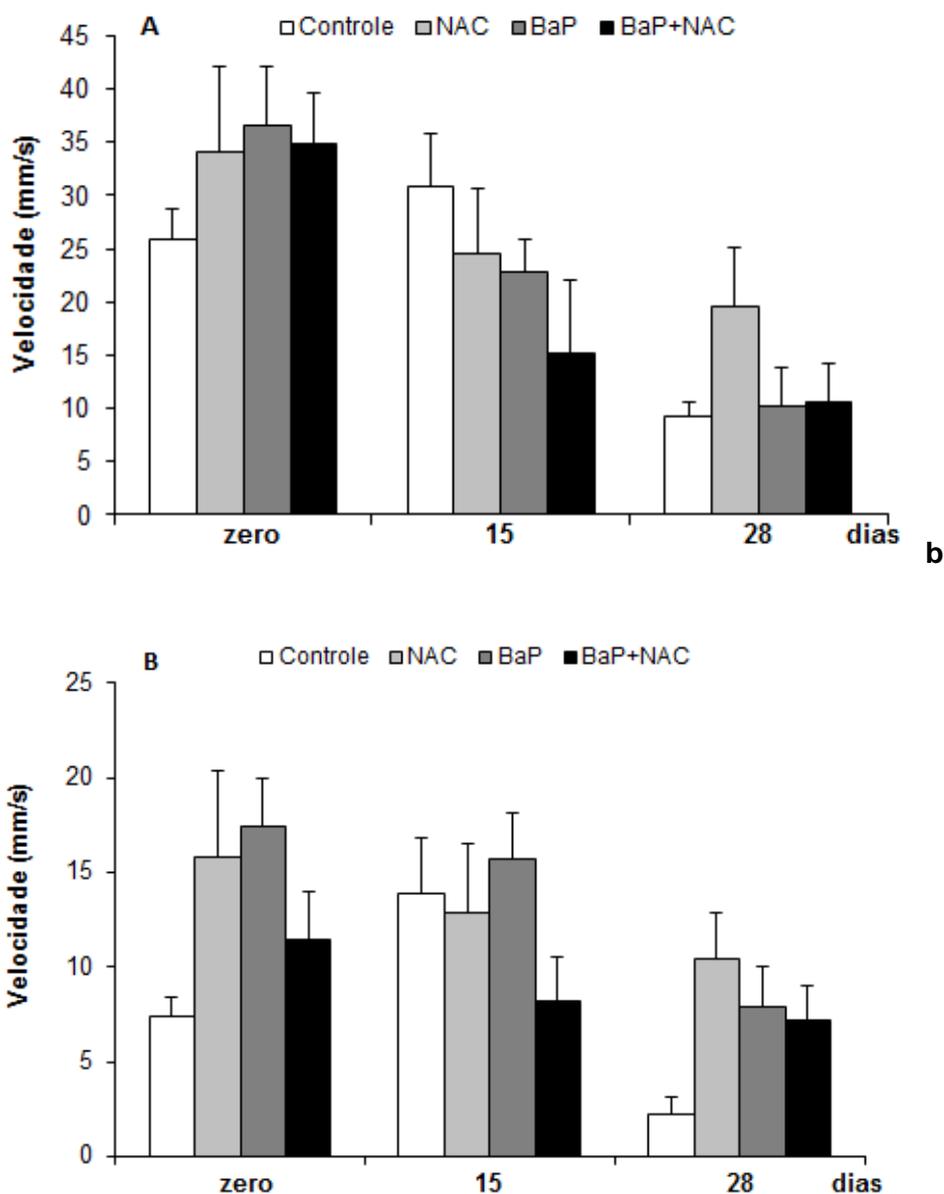


Figura 3. Velocidade adquirida por ratas tratadas via oral com óleo de amendoim + água (controle), N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC), benzo(a)pireno 1 mg/kg (BaP), e benzo(a)pireno 1mg/kg (BaP) + N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC) por 30 dias. (A) representa a atividade exploratória relativa aos 5 primeiros minutos (B) representa a atividade locomotora nos 10 minutos. Valores representam média \pm erro padrão (N=6-8, ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, $p < 0,05$).

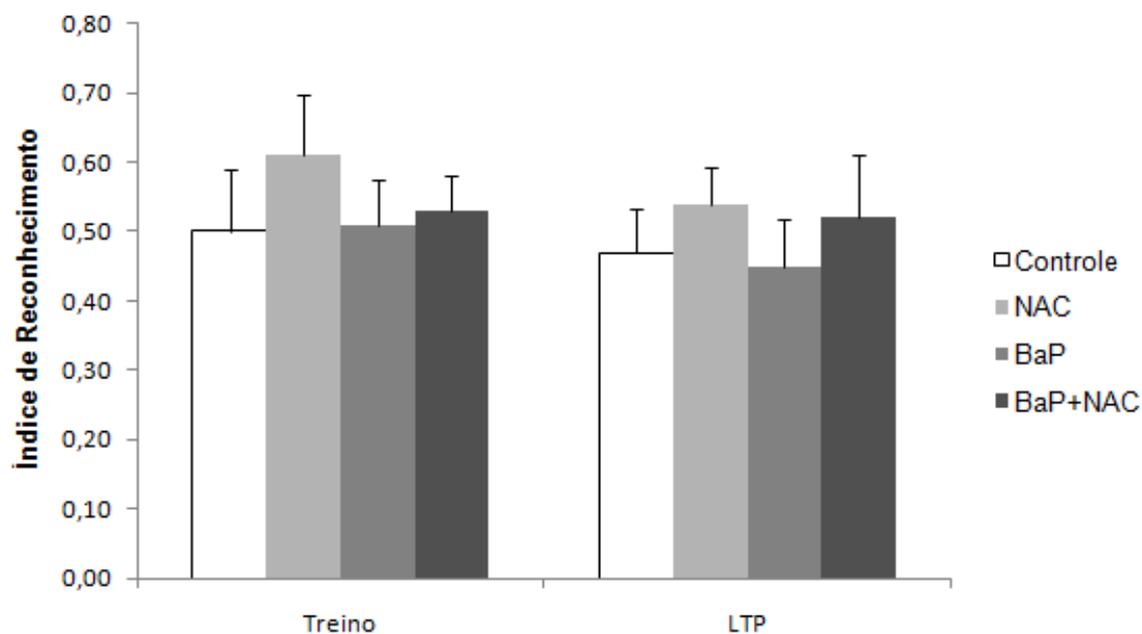


Figura 4. Variação do treino e do teste de reconhecimento de objetos de ratas tratadas via oral com óleo de amendoim + água (controle), N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC), benzo(a)pireno 1 mg/kg (BaP), e benzo(a)pireno 1mg/kg (BaP) + N-acetilcisteína 150 mg/kg (NAC) por 30 dias. (A) representa a atividade exploratória relativa aos 5 primeiros minutos (B) representa a atividade locomotora nos 10 minutos Valores representam média \pm erro padrão (N=6-8, Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Tabela 1. Valores médios do índice de danos ao DNA (Ensaio Cometa) em amostras de sangue total de ratos em diferentes tratamentos*.

GRUPOS	ÍNDICE DE DANOS
Controle	39,00 ± 7,38 ^a
BaP	122,83 ± 32,56 ^b
NAC	44,00 ± 6,24 ^a
BaP+NAC	99,33 ± 28,61 ^b

*Diferentes letras indicam diferença estatística pela análise de variância ANOVA de Uma via seguida de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 6/\text{grupo}$).

Tabela 2. Frequência de danos (%) das diferentes classes de danos ao DNA (0-4) avaliados pelo Ensaio Cometa em amostras de sangue total de ratos*.

	Dano 0	Dano 1	Dano 2	Dano 3	Dano 4
Controle	71,17±6,31 ^{a*}	20,33±7,69 ^a	5,67±1,51 ^a	2,83±1,33 ^a	0,00±0,00 ^a
BaP	31,60±12,04 ^b	29,40±10,73 ^a	23,13±19,38 ^b	5,13±3,85 ^a	5,67±2,16 ^b
NAC	63,67±8,39 ^a	30,33±10,41 ^a	4,33±2,31 ^a	1,67±0,58 ^a	0,00±0,00 ^a
BaP+NAC	38,83±9,99 ^b	31,17±4,45 ^a	24,50±10,29 ^b	5,67±3,37 ^a	4,00±3,01 ^{ab}

*Diferentes letras indicam diferença estatística pela análise de variância ANOVA de Uma via seguida de pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$) ($n = 6/\text{grupo}$).

Revista Brasileira de Toxicologia

Normas para Publicação

A Revista Brasileira de Toxicologia / Brazilian Journal of Toxicology é um periódico especializado, arbitrado e distribuído amplamente no Brasil e em outros países, com periodicidade semestral. Publica pesquisas originais e inéditas, de caráter básico ou aplicado, que contribuam para o conhecimento e desenvolvimento da Toxicologia e Ciências afins. É editada pela Sociedade Brasileira de Toxicologia, aberta à comunidade científica nacional e internacional, e aceita contribuições na forma de artigos originais, comunicações breves e artigos de revisão.

A Revista Brasileira de Toxicologia / Brazilian Journal of Toxicology adota o “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication”, proposto pelo International Committee of Medical Journal Editors, conhecido como “Estilo Vancouver” (<http://www.icmje.org>). O corpo editorial é responsável pela política editorial e a responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é exclusiva dos autores, sendo vedada a submissão simultânea, integral ou parcial, a qualquer outro periódico.

Critérios para a seleção de trabalhos

Cada manuscrito deve ser acompanhado de carta de apresentação assinada pelo autor correspondente. Os editores recebem o manuscrito, verificam seu enquadramento ao escopo da Revista Brasileira de Toxicologia / Brazilian Journal of Toxicology e o encaminham a dois relatores para avaliação. Os relatores são solicitados a opinar pela aceitação, reformulação ou rejeição. As cópias dos pareceres são encaminhadas aos autores, garantindo-se a reciprocidade do anonimato. Os manuscritos não aceitos ficam à disposição do(s) autor(es) por um ano.

Os manuscritos publicados passam a ser de propriedade da Revista e para tanto, todos os trabalhos submetidos devem ser acompanhados de documento de cessão de direitos autorais, assinado por todos os autores (modelo disponível em <http://www.sbtox.org.com.br>).

Instruções para o preparo do manuscrito

Artigos Originais:

Os manuscritos podem ser apresentados em português, espanhol ou em inglês. Devem ser apresentadas três cópias impressas e uma em disquete 3,5" ou CD, arquivo MS Word 6.0 ou superior. A digitação deve ser em uma só face, em papel formato A4 branco, fonte Arial 12, com espaço duplo, todas as margens com 2,5 cm e numerando todas as páginas seqüencialmente. O número de páginas deve se limitar a 20 e o manuscrito deve conter página de identificação, resumo, palavras chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos, referências bibliográficas, figuras, legendas das figuras e tabelas.

- Página de identificação:
 - a) Título do artigo: deve ser conciso e completo, evitando palavras supérfluas, seguido de versão em inglês quando o idioma do texto for português ou espanhol;
 - b) Autores: nome e sobrenome de cada autor
 - c) Afiliação: Identificação da instituição a que cada autor está afiliado
 - d) Autor correspondente: indicar o autor responsável pela correspondência com a Revista, incluindo telefone, fax e E-mail. Sendo aceito o trabalho, endereço será publicado como forma de contato para os leitores.

- Resumos:

O resumo deve conter informações sucintas e claras referentes ao objetivo, métodos, resultados e conclusões, porém sem a divisão em tópicos. Devem ser apresentados no idioma do texto e em inglês (Abstract), com no máximo 200 palavras; artigos em inglês devem também apresentar resumo em português ou espanhol.

- Unitermos (keywords):

Devem representar o conteúdo do artigo, com o máximo de 6 termos indexadores, em inglês e português ou espanhol, após o respectivo resumo.

- Introdução

Deve apresentar o propósito do estudo e uma breve revisão de bibliografia pertinente e atualizada, de modo a destacar os avanços alcançados no tema. Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho, que justifique sua elaboração e importância.

- Material e Métodos

A descrição dos métodos deverá ser breve, porém suficientemente clara e objetiva para possibilitar a perfeita compreensão e reprodução do trabalho, disposta em forma de texto corrido (evitar a forma de itens). Descrever elementos estudados (pacientes, animais, inclusive controles) e critérios de inclusão e exclusão. Descrever precisamente processos, equipamentos e insumos, incluindo, entre parênteses, o nome do fabricante e a origem de materiais e equipamentos. Descrever suficientemente métodos estatísticos e indicar o uso de “softwares”. Processos e técnicas já publicados devem ser apenas referenciados.

- Resultados

Devem ser apresentados em seqüência lógica, com o mínimo possível de discussão ou interpretação. Não devem ser repetidas no texto as informações que estejam contidas em tabelas ou figuras.

- Discussão

Deverá ser restrita ao significado dos resultados obtidos, explorando-os e relacionando-os a dados já registrados na literatura, incluindo somente citações indispensáveis.

- Conclusões

Devem ser fundamentadas nos achados do trabalho apresentado e podem ser incluídas no item “Discussão”.

- Agradecimentos

Devem ser restritos ao necessário. O registro de suporte financeiro deve ser incluído neste item.

- Ética

Os autores devem atentar para as exigências e normas ditadas por órgãos oficiais relativas à Ética em pesquisa com seres humanos e com animais de experimentação. Os trabalhos que envolvam experimentos ou metodologias que necessitem de avaliação por Comitê de Ética em Pesquisa devem ser acompanhados de cópia do parecer favorável.

Comunicações Breves

O texto deve ser breve e direto, correspondendo ao máximo de uma página impressa. A tramitação para publicação é idêntica a de um artigo original, porém a redação não necessita divisão, bastando a apresentação de ao menos três palavras-chave.

Artigo de Revisão

Deve corresponder a revisão crítica de assunto relevante, com base em literatura atual e em resultados do autor. Deve apresentar resumo na língua em que for redigido e em inglês, e não deve exceder 30 páginas no total, correspondendo a cerca de 10 páginas impressas. Os métodos de localização, seleção, extração e síntese das informações deve ser informado, inclusive no resumo.

Tabelas e figuras (gráficos, fórmulas, fotografias, esquemas, etc...)

Tabelas e figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos, na ordem em que aparecem no texto, e devem complementa-lo e não duplica-lo.

As figuras devem ser apresentadas em preto e branco ou em escala de tons cinza, suficientemente claras para permitir reprodução em clichês reduzidos, com o título colocado na parte inferior. Os desenhos devem ser em tinta nanquim preta sobre papel vegetal, não excedendo o tamanho equivalente da página, e as fotografias devem ser em papel brilhante.

As Tabelas devem ter o título no alto, breve e descritivo, digitadas em espaço duplo e, se necessário notas de rodapé, devem ser identificadas por letras sobrescritas. Recomendase, também, não repetir os mesmos dados em figuras.

Tanto as tabelas como as figuras, devem ser apresentadas em folhas separadas e as palavras Tabela e Figura devem aparecer por extenso, com apenas a primeira letra maiúscula, seguidas do respectivo número.

Tabelas ou figuras extraídas de outras publicações devem ser acompanhadas de permissão por escrito para a reprodução das mesmas, cuja obtenção é de responsabilidade dos autores.

Abreviaturas

Deve ser utilizada a forma padronizada. Quando não padronizadas devem ser precedidas do nome completo na primeira citação, e não devem ser utilizadas abreviaturas no título e no resumo.

Referências Bibliográficas

As referências devem restringir-se ao essencial para o conteúdo do artigo e ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. Ao listar as referências, para as publicações com até seis autores citam-se todos e, naquelas com mais de seis, cita-se o primeiro autor seguido da expressão et alii (ou abreviada et al.). Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado pela MEDLINE (lista disponível em <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lisou.html>). Resumos e não devem

ser usados como referência e as comunicações pessoais devem ser evitadas, a menos que se trate de informação essencial e indisponível em fonte pública; neste caso citar no texto a pessoa e a data da comunicação, entre parêntesis. No texto as referências devem ser citadas por numeração arábica entre parêntesis, à direita de qualquer pontuação. Nas referências múltiplas em seqüência podem ser citadas o primeiro e último número (exemplo: 4-8). A citação deve ser apenas pelo número entre parêntesis ou pelo nome do autor seguido do número entre parêntesis, conforme exemplos:

um autor: “Smith (3) observou.....”

dois autores: “Smith e Tompsom (3) observaram....”

mais de dois autores: “Smith et.al. (3) observaram...”.

Exemplos para a lista de referências:

Artigos de periódicos

Chein C, Marriott JL, Ashby K, Ozanne-Smith J. Unintentional ingestion of over the counter medications in children less than 5 years old. *J Paediatr Child Health* 2003; 39:264-9. Pauluhn J. Issues of dosimetry in inhalation toxicity. *Toxicol Lett* 2003; 141: 229 - 238.

Instituição como autor

ACGIH. (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Documentation of threshold limit values and biological exposure indices. 7th ed. Cincinnati: ACGIH, 2001. Pt. A-Z.

Livros

Goodman LS. The pharmacological basis of therapeutics. 2nd. ed. New York: Macmillan; 1955. 1831p.

Capítulo de livro

Bates DV. Standard-setting as an integrative exercise: alchemy, juggling, or science? In: Mohr U. (editor) Inhalation toxicology. New York: Springer Verlag, 1988. 1-10.

Tese e Dissertação

Cerqueira PM. Estereoseletividade no metabolismo do metoprolol em pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica. [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

Documentos legais

Brasil. Projeto de Lei n. 4.841, de 30 de novembro de 1994. Determina a utilização de Embalagem Especial de Proteção à Criança – EEPC – em medicamentos e produtos químicos de uso doméstico que apresentem potencial de risco à saúde. Brasília: Congresso Nacional; 1994.

Software

Epi Info [computer program] Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Website

São Paulo. Secretaria da Saúde. Resolução SS 16, de 18 de janeiro de 1999. Disponível em http://www.saude.sp.gov.br/html/fr_legi.htm. Acessado em 18/fev/2005.

Manuscritos em desacordo com as normas não serão analisados.

Enviar o manuscrito para:

Revista Brasileira de Toxicologia - Corpo Editorial

Sociedade Brasileira de Toxicologia

Rua Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13-B

CEP 05508-900 - São Paulo - SP - Brasil

telefone: (55) (11) 3031-1857