

CHRISTIAN SAVIO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACUPUNTURA EM
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
PROVOCADAS PELO CHUMBO**

BOTUCATU (SP)

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

CHRISTIAN SAVIO SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACUPUNTURA EM
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
PROVOCADAS PELO CHUMBO**

**ORIENTADOR: DR. ANTONIO FRANCISCO GODINHO
TUTOR: PROF. ADJ. WELLERSON RODRIGO SCARANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
de Botucatu - UNESP, como requisito
para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU (SP)
2016**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que há;

A minha família por possibilitar a minha existência e chegada até esse ponto e por todo o suporte desde sempre;

Aos mentores e amigos espirituais, por todo o apoio e ensinamento;

A República Kanta Galo, por tudo que lá vivi e aprendi;

Aos amigos e colegas que compartilharam dos momentos que fizeram da minha jornada o que ela é;

A instituição UNESP e todas as demais escolas que frequentei ao longo da vida por me darem o conhecimento e base necessários para conclusão dos meus objetivos;

Ao Governo Federal do Brasil, por conceder um intercâmbio nos EUA de 1 ano de duração pelo programa Ciência Sem Fronteiras, o qual mudou minha vida para melhor;

Ao orientador Wellerson Rodrigo Scarano pelo direcionamento e auxílio;

Ao supervisor Antonio Francisco Godinho que da mesma forma prestou auxílio e direcionamento;

Ao amigo Daniel Horta, por toda a ajuda;

Aos amigos Fabio Anselmo, Daniel Fraia e Carolina Angelo de Oliveira pelo apoio;

A todos os que fizeram parte da equipe de realização desse projeto de alguma forma;

Ao Centro de Atendimento Toxicológico e seus componentes, por toda a estrutura;

“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos.” - Platão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parte cranial do meridiano Vaso Governador mapeado no cão.....	15
Figura 2 - Arena de campo aberto.....	19
Figura 3 - Labirinto em cruz elevado.....	20
Figura 4 - Tempo de permanência (%) no labirinto em cruz elevado	21
Figura 5 - Escores de entradas no labirinto em cruz elevado	24
Figura 6 - Atividade locomotora na arena de campo aberto.....	26
Figura 7 - Tempo de latência para 1º cruzamento e escores de cruzamentos na arena de campo aberto.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO: HISTÓRICO E USO.....	8
1.2 EXPOSIÇÃO.....	8
1.3 CHUMBO NO ORGANISMO.....	9
1.4 NEUROTOXICIDADE.....	10
1.5 TRATAMENTO - DESINTOXICAÇÃO.....	11
1.6 MEDICINA TRADICIONAL CHINESA: ASPECTOS GERAIS.....	12
1.7 OBJETIVO.....	14

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COMPOSTO UTILIZADO NA EXPOSIÇÃO.....	15
2.2 ANIMAIS.....	15
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	15
2.3.1 PRIMEIRA FASE: PROJETO PILOTO PARA ESCOLHA DA DOSE DE ACETATO DE CHUMBO.....	15
2.3.2 SEGUNDA FASE: EFEITOS DA ACUPUNTURA SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO SUBAGUDA AO CHUMBO.....	16
2.3.2.1 EXPOSIÇÃO A SOLUÇÃO DE ACETATO DE CHUMBO.....	16
2.4 TESTES NEUROCOMPORTAMENTAIS.....	17
2.4.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM ARENA DE CAMPO ABERTO.....	17
2.4.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	18
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	19

3	RESULTADOS	
	3.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	21
	3.2 ARENA DE CAMPO ABERTO.....	26
4	DISCUSSÃO.....	31
5	CONCLUSÃO.....	34
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

O chumbo é um metal inorgânico encontrado na natureza e que vem sendo utilizado de maneira abrangente na indústria como parte da fabricação de produtos de consumo. Devido a esse fato, o chumbo é encontrado como contaminante em água, solo, ar, poeira doméstica e alimentos. Apesar de ser desnecessário para a fisiologia do organismo, atualmente grande parcela da população já teve contato com o chumbo e possui certo nível dele no organismo. A exposição ocupacional ao chumbo é a forma mais deletéria para a saúde e pode levar a quadros de síndrome como o saturnismo. Os efeitos decorrentes da exposição crônica ao metal já tem ampla abordagem na literatura por isso, nesse trabalho, investigamos os possíveis efeitos resultantes da exposição a baixas doses de chumbo de forma subaguda. Em seguida, investigamos os efeitos decorrentes de tratamento por acupuntura logo após terminada a exposição ao metal. Para esse estudo, foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 60 dias de idade para ambos os tratamentos. Referente à exposição ao chumbo foi utilizado o método de ingestão por gavagem e, no caso da acupuntura, cada animal tratado recebeu um implante subcutâneo de uma esfera de cristal radionizada no ponto energético VG20. Após os tratamentos, os animais foram testados por 3 semanas consecutivas nos aparelhos *labirinto em cruz elevado* e *arena de campo aberto* a fim de constataremos possíveis alterações neurocomportamentais decorrentes do procedimento experimental. Os resultados demonstraram que o chumbo teve efeito estimulador da atividade locomotora e exploração dos animais, além de sugerirem também um efeito ansiolítico. Já a acupuntura, segundo os resultados, demonstrou ter amplificado os efeitos do chumbo como estimulador da atividade locomotora e exploração dos animais e diminuindo os indícios de ansiedade, o que ocorreu durante todas as semanas de testes.

Palavras-chave: chumbo; acupuntura; comportamento, ansiedade, locomoção

1. INTRODUÇÃO

1.1. Chumbo: histórico e uso

O chumbo (Pb) é um metal inorgânico encontrado na natureza na forma de diversos minérios, como por exemplo: sulfato de chumbo, fosfato de chumbo, cromato de chumbo, etc. (MERCK - INDEX, 1996). O Pb vem sendo utilizado como parte do processo de fabricação de diversos produtos na indústria moderna, como por exemplo: baterias de automóveis, componente de tintas, encanamentos, proteção contra radiação X, cigarros, defensivos agrícolas, aditivo em gasolina, projéteis de armas de fogo, latas de alimentos, demolição, reparo de radiadores, reciclagem de metais, etc. (SILVA e MORAES, 1987; FISHBEIN et al., 1992; SHIBAMOTO e BJELDANES, 1996; RYBICKI et al., 1997).

1.2. Exposição

Devido a presença do Pb no ambiente, há constante contato e exposição a esse metal ao longo da vida. Nos dias atuais cada pessoa possui certa quantia de chumbo no organismo, a qual deveria ser zero já que ele não é essencial a fisiologia do corpo (ASCIONE, 2001).

Conforme citado acima, o largo uso desse elemento na indústria faz da exposição ocupacional o meio mais grave e acentuado de contato, o que afeta os trabalhadores desses locais e pode levar até ao quadro de saturnismo, que é causado pela intoxicação crônica ao Pb (BUSCHINELLI et al., 1990).

De uma maneira mais velada, esse contato com o metal pode dar-se através de meios mais inusitados, como por exemplo, a poeira doméstica contaminada, que pode contribuir grandemente para o quadro de intoxicação aguda ou crônica (LIVINGSTON, 2000). Além disso, no dia a dia ocorre exposição ao Pb através do consumo de água e/ou alimentos contaminados, ou inalação do ar contaminado e até mesmo do contato com o solo contaminado (WHO, 1977; SHIBAMOTO e BJELDANES, 1996; LANPHEAR et al., 1998; CLARK et al., 2004).

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR - EUA, 2015) classifica o Pb como a segunda substância mais nociva, dentre uma lista das mais perigosas.

Não é só por contato com grandes doses de Pb que se dá qualquer alteração no organismo. Como demonstrado por LANPHEAR (2000) e CANFIELD (2003), o chumbo em baixas concentrações pode prejudicar a cognição e alterar o comportamento em crianças. Concentrações na faixa de 3 a 5 microgramas por decilitro já são capazes de causar declínios no QI em crianças (BELLINGER, 2008). Em adição a isso, outras pesquisas vão ao encontro desse achado e mostram que a toxicidade em baixas concentrações afeta tanto animais quanto humanos, promovendo então alterações no comportamento desses indivíduos (GRANT et al. 1980; NEEDLEMAN et al., 1990; GROVER et al., 1993).

Como ponto de comparação, a faixa de concentração de chumbo descrita por BELLINGER (2008), em um estudo feito no Brasil, demonstrado por PALIELO (1997), encontrou níveis de chumbo sanguíneo em torno de 8 a 9 microgramas por decilitro em população que não é exposta ocupacionalmente e que não possui hábitos intensificadores desse contato, como o consumo de cigarros.

1.3. Chumbo no organismo

O Pb adentra o organismo principalmente através da via respiratória e pelo trato gastrointestinal (JARUP, 2003). Essa absorção dá-se de formas diferentes comparando-se adultos e crianças. Em adultos, pelo trato gastrointestinal, é captado de 5 a 10% do chumbo ingerido (LARINI, 1987). Já em crianças, essa absorção chega a faixa de 40 a 50% do metal consumido.

No entanto, pouco Pb fica retido no organismo. Do total ingerido, 90% do chumbo é excretado pelas fezes, principalmente na forma de sulfeto de chumbo (KLAASSEN, 1998). O restante (10%) dele se liga principalmente aos eritrócitos, o que faz do sangue um importante indicador de exposição aguda e crônica (KLAASSEN, 1998; IARC, 2004). Em seguida, através do sangue, o chumbo passa aos órgãos de troca como o fígado, rins e pulmões e aos órgãos de armazenamento, como os ossos, onde se

armazena em até 90% de forma bastante estável (CONRAD e BARTON, 1978; IARC, 2004).

1.4. Neurotoxicidade

A habilidade em formar complexos de ligação estável com enxofre, oxigênio, nitrogênio e fósforo é o que torna o contato com o Pb tóxico. Esse fenômeno causa interferência prejudicial na fisiologia de enzimas e membranas celulares (MOREIRA e MOREIRA, 2004). O Pb afeta diversos sistemas e órgãos, e a exposição pode levar a alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas como disfunção renal, distúrbios no sistema nervoso central e metabolismo anormal da glicose (WILSON et al. 2000; ERAZI et al. 2010; SANSAR et al. 2010). Os efeitos neurotóxicos ocorridos após contato com o chumbo são considerados problema de saúde pública (TONG et al., 2000), principalmente no caso de crianças e trabalhadores expostos ocupacionalmente (VAGLENOV et al., 1998; MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Os danos ao sistema nervoso central seguidos a exposição crônica ao Pb vem sendo amplamente demonstrados através de estudos (LANPHEAR et al., 2000; ANTONIO et al. 2003; ERAZI et al., 2010; SANSAR et al., 2010). O Pb agindo no cérebro afeta uma variedade de sistemas de neurotransmissores, o que leva a um amplo quadro de efeitos adversos provocados no organismo (LERET et al. 2002; DEVI et al. 2005). O desequilíbrio na homeostase do cérebro é um dos efeitos da exposição a esse metal, o que ocasiona prejuízos do sistema de síntese e secreção de neurotransmissores, na fisiologia do cálcio, na proliferação celular e neurogênese, na morfologia dos dendritos e sinapses e na expressão de fatores neurotróficos (SCHNEIDER et al. 2004; VERINA et al. 2007). Outros tantos trabalhos indicam o Pb como perturbador do sistema monoaminérgico, tanto no sistema nervoso central em desenvolvimento quanto no adulto (ANTONIO et al., 1999; DEVI et al., 2005; BOUYATAS and GAMRANI, 2007; ERAZI et al., 2010; SANSAR et al., 2010). Como parte desse sistema de monoaminas está a serotonina, que é um importante componente e está ligado ao comportamento de ansiedade (LINTHORST, 2005). A serotonina está relacionada à modulação de funções

fisiológicas e neurocomportamentais incluindo, além da ansiedade, os estados afetivos e de respostas ao estresse (TAKASE et al., 2004).

O chumbo é indicado como um fator alterador da normalidade do sistema serotoninérgico em DUBAS (1978) e LERET (2002).

1.5. Tratamento - Desintoxicação

O tratamento clássico de desintoxicação é o uso de agentes quelantes, que são antagonistas dos intoxicantes. Esses quelantes se ligam aos metais de forma estável e facilitam a excreção deles via renal, com o objetivo de reverter o quadro de intoxicação e recuperar a homeostase (HURLBUT, 1992, KLAASSEN, 1998). Um dos quelantes mais usados para a desintoxicação de Pb é o CaNa₂EDTA (edetato cálcico disódico). No entanto, o uso desse quelante causa efeitos colaterais desagradáveis como náusea, febre, mialgia, cefaléia e outros mais. A utilização prolongada do CaNa₂EDTA leva a insuficiência renal devido a sua toxicidade aos rins (GOYER, 1978). Na atualidade tem sido usado de forma crescente o ácido dimercapto succínico (DMSA), o qual possui menos relatos de efeitos colaterais causados após a administração mas mesmo assim ainda leva a náusea, vômito e dor abdominal. É considerado como promissor no tratamento de intoxicação por chumbo por ser mais específico, eficiente e menos tóxico que o CaNa₂EDTA (GRAZIANO et al., 1988, GRAZIANO et al., 1992 I e II; APOSHIAN e APOSHIAN, 1992). Além disso, outro agravante da terapêutica com quelantes é o alto custo dos medicamentos.

Devido aos citados aspectos negativos do tratamento clássico utilizando-se quelantes, é louvável a busca por métodos que minimizem os efeitos neurocomportamentais nos indivíduos expostos ao Pb, em processo ou não de descontaminação. Além disso, o modelo de toxicidade subaguda por intoxicação ao Pb em roedores, estabelece alterações nos padrões de ansiedade, o que permite a introdução de métodos alternativos para o tratamento do estado ansiolítico como por exemplo a acupuntura.

1.6. Medicina Tradicional Chinesa: aspectos Gerais

A acupuntura tem sido a fonte primária no cuidado à saúde na China por mais de 3.000 anos. A teoria geral da acupuntura se baseia no princípio de que as doenças, malformações e alterações emocionais resultam de bloqueios na circulação da energia vital (Qi) e Xue (sangue), ocasionando o desequilíbrio entre o Yin e o Yang, energias opostas e complementares que mantêm o equilíbrio nos seres. Através da remoção desses bloqueios e a restauração do fluxo normal de energia, o corpo é capaz de restabelecer a saúde e melhorar a função dos órgãos (MACIOCIA, 2007).

Através do uso de agulhas metálicas, finas como fios de cabelo, os acupunturistas são capazes de identificar e remover esses bloqueios de Qi e Xue, permitindo que órgãos e tecidos se recuperem sozinhos (CHANG et al., 2002).

Além da acupuntura sistêmica tradicional com a inserção de agulhas metálicas, outros métodos como a auriculopuntura (SHIYING & WANCHENG, 2012), a radiestesia (MENDONÇA, 2010) e a utilização de sementes ou esferas em pontos de acupuntura (FRANCESCHINI, 2013) podem ser utilizados como técnicas eficientes no tratamento pela medicina tradicional chinesa, visando o equilíbrio energético.

Com base na apresentação das doenças e nos Quatro Princípios diagnósticos da medicina chinesa, elaboraram-se oito critérios para a classificação das síndromes. São eles: externo-interno, Frio-Calor, Deficiência-Excesso e Yin-Yang; sendo que a compreensão deles é importante para o diagnóstico energético dos sintomas.

A síndrome de Yin e Yang incorpora em si todas as outras classificações. Tal afirmação se baseia no fato de que as síndromes de Yin correspondem às profundas, de deficiência e Frio, enquanto que as síndromes de Yang compreendem as síndromes superficiais, de Excesso e Calor (WEN, 2008). Os fenômenos científicos são descritos através da observação minuciosa, da repetição de testes, para finalmente ocorrer o desenvolvimento das teorias que os comprovem. Na China antiga, utilizando desse procedimento, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a estrutura básica dos seres vivos era a mesma do universo no qual estava inserido e, portanto, todos os fenômenos qualitativos da natureza podiam ser classificados em Yin e Yang (WEN, 2008). Aquelas alterações que caracterizam aparência agitada, tensa, hiperfunção, quadros agudos são

Yang; enquanto que, aquelas caracterizadas pela aparência calma, fraqueza, hipofunção, quadros crônicos, são Yin (WEN, 2008).

Em condições patológicas há muitos sinais e sintomas que podem indicar diferentes graus de apresentação dos aspectos Yin (negativo) e Yang (positivo). Febre alta, rubor facial, agitação, ansiedade, insônia podem se manifestar em uma síndrome Yang, por excesso de Yang ou por deficiência de Yin. Se houver manifestações como extremidades frias, palidez facial, astenia, tristeza, podem ser indicativas de uma síndrome de Yin por excesso de Yin ou deficiência de Yang (MACIOCIA, 2007; WEN, 2008).

Na superfície do corpo, há muitos pontos sensíveis que estão conectados em trilhas relacionadas às funções de um órgão interno. As linhas formadas pelas conexões desses pontos são denominadas de acordo com o órgão interno a que se referem, são longitudinais e foram chamados de meridianos. O Qi (recentemente chamado por alguns cientistas de bioenergia) circula através do corpo de uma maneira regular, fluindo através dos meridianos principais e extraordinários (WEN, 2008).

Os pontos de acupuntura e os meridianos são utilizados para a harmonização das funções orgânicas, de suas inter-relações e para o reequilíbrio energético. Além dos doze meridianos principais, cujos fluxos de energia estão mais perceptivelmente relacionados aos órgãos internos, há oito outros meridianos chamados de extraordinários (WEN, 2008). Desses oito, somente o Ren Mai e o Du Mai possuem pontos próprios para a circulação de energia.

O meridiano Du Mai (Vaso Governador) começa no períneo, passa pelo cóccix para depois subir pela região sacral, lombar, torácica e cervical para chegar ao crânio. O meridiano Vaso Governador (VG) é responsável por regular a energia dos meridianos Yang do corpo (WEN, 2008).

O ponto VG20 ou Baihui localiza-se partindo perpendicularmente à pele para cima da base posterior da concha acústica para a linha central da abóbada do crânio (Figura 1).

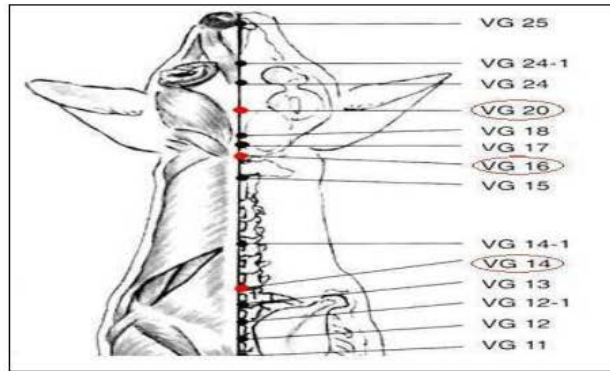


Figura 1: Parte cranial do meridiano Vaso Governador mapeado no cão (Fonte: DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 1997)

O acuponto VG20 é extensamente usado por acupunturistas pois controla a energia dos canais Yang e é capaz de dispersar o excesso de Yang desses canais. Ao dispersar essa energia, acalma a mente (Shen) e as emoções restaurando a consciência (MACIOCIA 2007). Sendo assim, é um dos principais pontos utilizados para quadros de ansiedade, perturbação mental e a falta de concentração (MACIOCIA 2007).

Apesar de várias comprovações científicas sobre a existência dos pontos de acupuntura e da sua ação sobre a melhoria de pacientes humanos e animais sob diversas situações patológicas, muitas pessoas acreditam que o efeito da acupuntura funcione como um “placebo”. Assim, no intuito de colher dados experimentais que comprovem a eficiência da acupuntura como método de tratamento para várias alterações funcionais e emocionais, a utilização de modelos animais minimizariam possíveis efeitos psicossomáticos.

1.7. Objetivo

Testar tratamento de acupuntura nos efeitos comportamentais provocados pela exposição ao chumbo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Composto utilizado na exposição

Acetato de chumbo II [Dinâmica - Química Contemporânea® LTDA - P.M. = 379,3 - $(\text{CH}_2\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]

2.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Câmpus de Botucatu. Os animais foram retirados com 21 dias de idade e, durante toda a fase experimental, permaneceram no biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da UNESP, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão de ar contínua e recebendo água e ração sem restrição, durante o período de aclimação e crescimento, até atingirem a idade desejada para participarem dos experimentos (60 dias).

2.3. Procedimento experimental

O protocolo de experimentação foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Biociências, sob nº.808/2016.

O protocolo experimental foi dividido em duas fases:

2.3.1. Primeira fase: Projeto Piloto para a escolha da dose de chumbo a ser utilizada no experimento principal.

Para a definição da dose de chumbo a ser utilizada, 40 animais com 60 dias de idade e peso médio de 317g, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais ($n=10$), sendo respectivamente:

- GRUPO 1: Controle - Animais receberam solução salina (0,1mL/100g de massa corporal) via gavagem;

- GRUPO 2: Animais receberam solução de acetato de chumbo, na dose de 10mg de Pb/Kg (0,1mL/100g de massa corporal) via gavagem;

- GRUPO 3: Animais receberam solução aquosa de acetato de chumbo, na dose de 30mg de Pb/Kg (0,1mL/100g de massa corporal) via gavagem;

- GRUPO 4: Animais receberam solução aquosa de acetato de chumbo na dose de 70mg de Pb/Kg (0,1mL/100g de massa corporal) via gavagem.

Os animais foram expostos uma vez ao dia, no período da manhã - entre 9am e 12pm - durante 3 dias consecutivos.

Após 48 horas da última exposição, os animais tiveram seus comportamentos avaliados nos aparelhos: arena de campo aberto, para análise da atividade locomotora e exploração, e labirinto em cruz elevado, para análise da ansiedade.

Após a avaliação comportamental foi definida a dose de 30 mg/kg de massa corporal como sendo suficiente para alterar os comportamentos analisados nos aparelhos.

2.3.2. Segunda fase: efeitos da acupuntura sobre o comportamento de animais submetidos a exposição subaguda ao chumbo

2.3.2.1. Exposição ao chumbo:

Para essa etapa, 45 animais com 60 dias de idade, com peso médio de 281g, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=15), sendo respectivamente:

- GRUPO 1: Controle-Sham - animais que receberam simulação da cirurgia porém sem implantação da esfera de cristal na cabeça e solução salina (0,1mL/100g de peso corporal), por gavagem;

- GRUPO 2: Pb-Sham - animais que receberam simulação da cirurgia porém sem implantação da esfera de cristal na cabeça e solução de acetato de chumbo na dose de 30 mg de Pb/Kg (0,1mL/100g de peso corporal), por gavagem;

- GRUPO 3: Pb-Acupuntura - animais que receberam cirurgia com implantação de esfera de cristal radiônico na cabeça e solução de acetato de chumbo na dose de 30 mg de Pb/Kg (0,1mL/100g de peso corporal), por gavagem;

Para o procedimento cirúrgico, animais de todos os grupos foram anestesiados com Xilazina (5mg/Kg) mais Quetamina (80mg/Kg), sendo que os animais dos grupos 1 e 2 receberam uma micro-incisão na cabeça, na região supra-orbital no plano sagital mediano, levemente deslocada para a direita sem a inserção de nenhum elemento estimulador e posteriormente suturada com ponto duplo.

Os animais do grupo 3 sofreram uma incisão infra-orbital no plano sagital mediano, levemente deslocado para a região occipital no ponto de acupuntura Vaso Governador 20 (VG20), onde foram inseridas sob a pele duas esferas de cristal radiônico e, logo em seguida, suturada a região (um a dois pontos duplos). Para a cirurgia Sham ou de implantação da esfera radiônica, a localização do ponto foi confirmada usando o atlas de acupuntura animal (DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 1997).

A distinção entre o local do ponto de cirurgia escolhido para os grupos 1 e 2 em comparação ao ponto escolhido para o grupo 3 foi decidida a fim de evitar a formação de um processo inflamatório no ponto VG20 dos grupos Sham (1 e 2). O possível processo inflamatório poderia causar estimulação involuntária do ponto VG20 dos grupos Sham (1 e 2), a qual é indesejada ao procedimento experimental já que somente o grupo 3 deveria ter esse ponto de acupuntura estimulado a fim de manter a comparação entre os tratamentos.

Os animais receberam os respectivos tratamentos (salina e/ou acetato de chumbo) por 3 dias consecutivos à cirurgia, 1 vez ao dia, pela manhã.

Quarenta e oito horas após a cirurgia e inserção ou não das esferas no ponto de acupuntura VG20, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para as avaliações que se seguem.

2.4. Testes neurocomportamentais

2.4.1. Avaliação comportamental em arena de campo aberto (metodologia descrita por TROMBINI et al. 2001);

Observação direta em aparelho construído conforme especificado por Broadhurst (1960). Após o rato ser colocado no centro da arena, foram avaliados o tempo de latência para o primeiro cruzamento do centro do aparelho e também o número de vezes que esse centro foi cruzado. Além disso, também contabilizou-se a locomoção do animal pelo número de unidades demarcadas no assoalho do aparelho, que foram percorridas pelo animal. Um cruzamento se refere a quando o animal coloca as quatro patas dentro da mesma marcação.

Ao final de cada sessão com cada animal, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.



Figura 2: Foto ilustrativa da arena em campo aberto (arquivo pessoal)

2.4.2. Avaliação do comportamento em labirinto em cruz elevado (metodologia descrita PELLOW e FILE, 1986)

Observação direta em aparelho construído de acordo com especificações de PELLOW e CHOPIM, 1985, na qual foram avaliados o tempo de permanência e o número de entradas nos braços fechados e abertos do aparelho.

Ao final de cada sessão com cada animal, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.



Figura 3: Foto ilustrativa do labirinto em cruz elevado (arquivo pessoal).

2.5. Análise estatística dos resultados

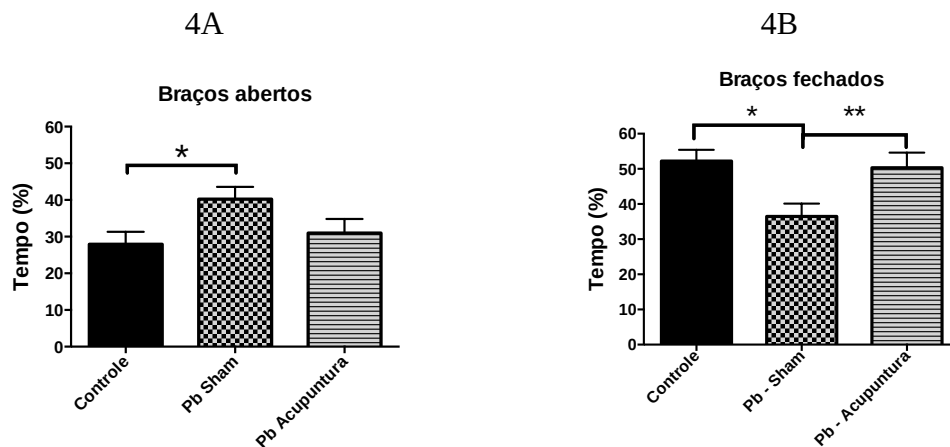
Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (one-way ANOVA), complementada com o teste de Tukey. Os resultados expressos em $\text{médio} \pm \text{erro padrão de média}$ e considerados significantes quando apresentaram erros menores que 5% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism6 (San Diego, Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

Figura 4 - Avaliação do tempo de permanência (%) dos animais nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado, sob os vários tratamentos, através das 3 semanas de testes.

1ª semana:

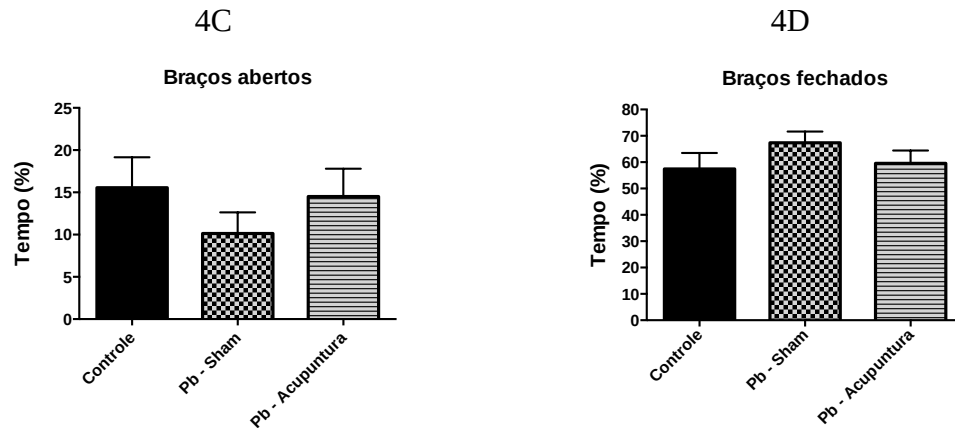


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle. ** $P < 0,05$ do Pb-Sham.

Observa-se na figura 4 que os animais expostos unicamente ao Pb permaneceram significativamente mais tempo (%) nos braços abertos do LCE (Figura 4A) e menos tempo (%) nos braços fechados (Figura 4B), em relação aos animais do grupo controle.

O tratamento de acupuntura não modificou significativamente este comportamento dos animais nos braços abertos do LCE em relação ao grupo controle (Figura 4A), mas preveniu significativamente a diminuição do tempo nos braços fechados do LCE (Figura 4B) em relação ao grupo Pb-Sham.

2ª semana:



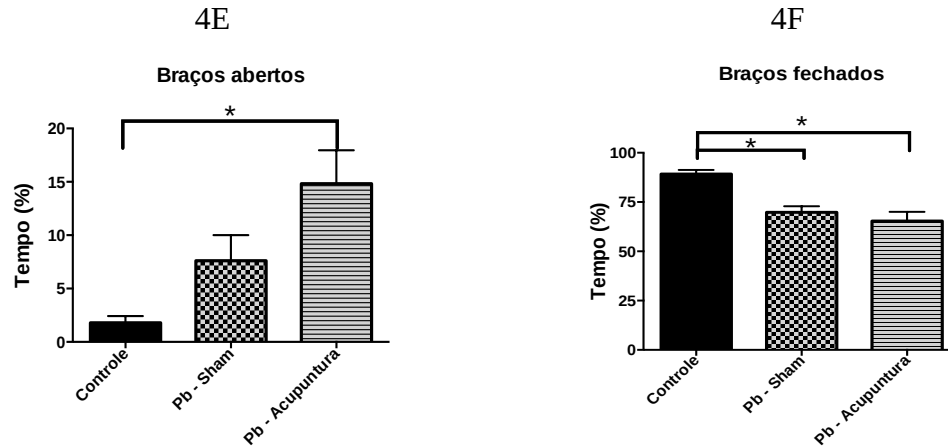
Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA.

Observa-se que embora tenha ocorrido uma diminuição do tempo de permanência nos braços abertos do LCE nos animais expostos ao Pb exclusivamente se comparados aos controles (Figura 4C) e um aumento do tempo de permanência nos braços fechados, comparando-e os mesmos grupos novamente (Figura 4D), estas variações de efeito não foram estatisticamente significantes.

O tratamento de acupuntura não influenciou significativamente a permanência dos animais que receberam Pb tanto nos braços abertos (Figura 4C) quanto nos braços fechados (Figura 4D) do LCE.

Uma observação interessante é a de que tanto os animais controle quanto os animais expostos ao Pb e Pb + acupuntura, permaneceram mais tempo nos braços fechados (Figura 4C) do que nos braços abertos (Figura 4D) do LCE.

3ª semana:



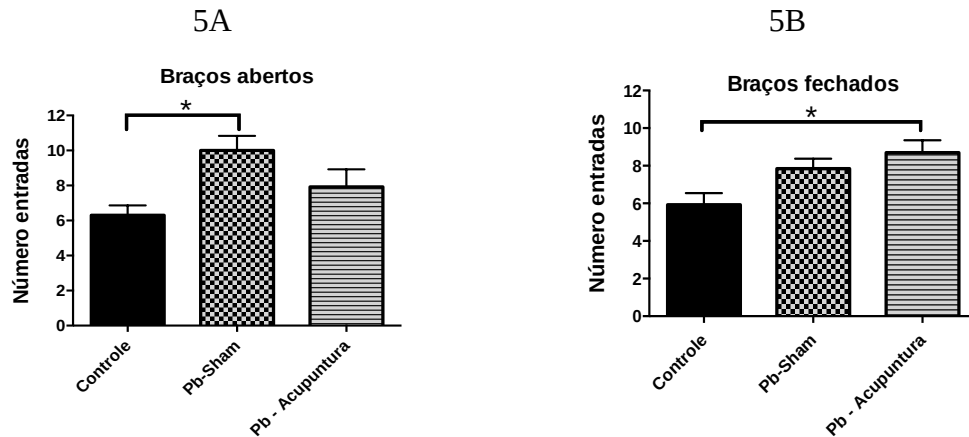
Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle.

A figura 4E mostra que os animais do grupo de exposição exclusiva ao chumbo permaneceram mais tempo (~325%) nos braços abertos do LCE em relação aos controles; também, que os animais expostos exclusivamente ao Pb permaneceram significativamente menos tempo nos braços fechados do LCE (Figura 4F) em relação aos controles.

Observa-se que o tratamento de acupuntura intensificou a maior permanência dos animais expostos ao chumbo, nos braços abertos do LCE (Figura 4E) mas não modificou o efeito do Pb nos animais nos braços fechados do LCE (Figura 4F).

Figura 5 - Avaliação do número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado, dos animais sob os vários tratamentos, através das 3 semanas de testes.

1ª semana

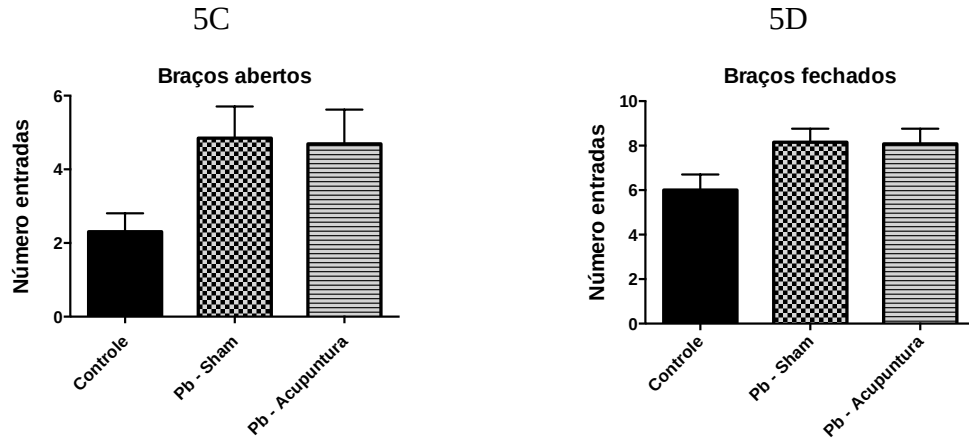


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle.

Com relação ao número de entradas os animais expostos exclusivamente ao Pb entraram mais vezes nos braços abertos do LCE - significativamente - (Figura 5A) e também mais vezes nos braços fechados (Figura 5B) em relação aos controles.

O tratamento de acupuntura não alterou significativamente o efeito exclusivo do Pb nos braços abertos do LCE (Figura 5A) e nem nos braços fechados (Figura 5B) porém, aumentou significativamente o número de entradas nos braços fechados (Figura 5B), em comparação com o grupo Controle.

2ª semana:

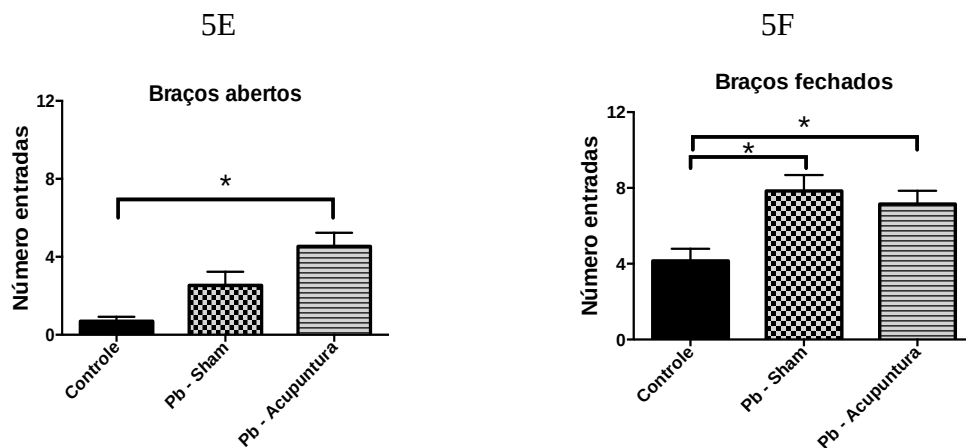


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA.

Observa-se que houve um aumento não significativo do número de entradas tanto nos braços abertos (~100%) (Figura 5C) quanto nos braços fechados (~33%) do LCE (Figura 5D) comparando-se o grupo controle com o grupo Pb-Sham.

O tratamento de acupuntura não interferiu significativamente nos efeitos do Pb sobre o comportamento de entrada dos animais tanto nos braços abertos (Figura 5C) quanto nos braços fechados (Figura 5D) do LCE.

3ª semana:



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle.

A figura 5E mostra que os animais expostos unicamente ao Pb entraram mais (~268%) nos braços abertos em relação aos controles, mas de forma não estatisticamente significativa.

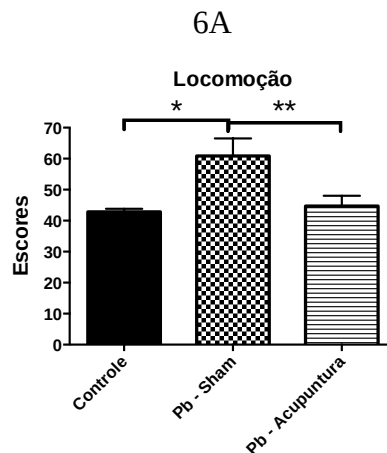
Na figura 5F observa-se que os animais expostos exclusivamente ao Pb entraram significativamente mais também nos braços fechados do LCE, em relação aos controles.

O tratamento de acupuntura intensificou o efeito do Pb no número de entradas dos animais nos braços abertos do LCE (Figura 5E) porém, não interferiu significativamente nos efeitos do Pb sobre o número de entrada dos animais nos braços fechados (Figura 5F).

3.2. Arena de campo aberto (ACA)

Figura 6 - Avaliação da atividade locomotora na arena de campo aberto dos animais sob os vários tratamentos, através das três semanas de teste.

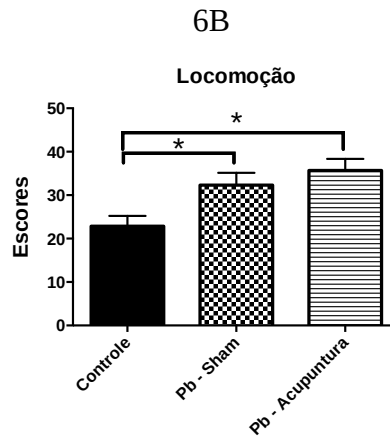
1ª semana:



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle. ** $P < 0,05$ do Pb-Sham.

Observa-se que os animais expostos exclusivamente ao Pb tiveram maior locomoção que os animais controles e, também, que o tratamento de acupuntura rebaixou os valores de efeito do Pb para nível próximo ao do grupo controle, prevenindo as alterações.

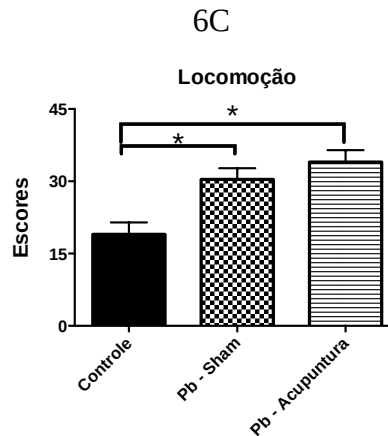
2ª semana:



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle.

Observa-se que o chumbo, por si só, aumentou o número de unidades percorridas pelos animais do grupo Pb-Sham se comparados com o grupo controle. Em complemento, a acupuntura exacerbou esse aumento de locomoção, fato visível pela comparação entre o grupo Pb-Acupuntura e os demais.

3ª semana:

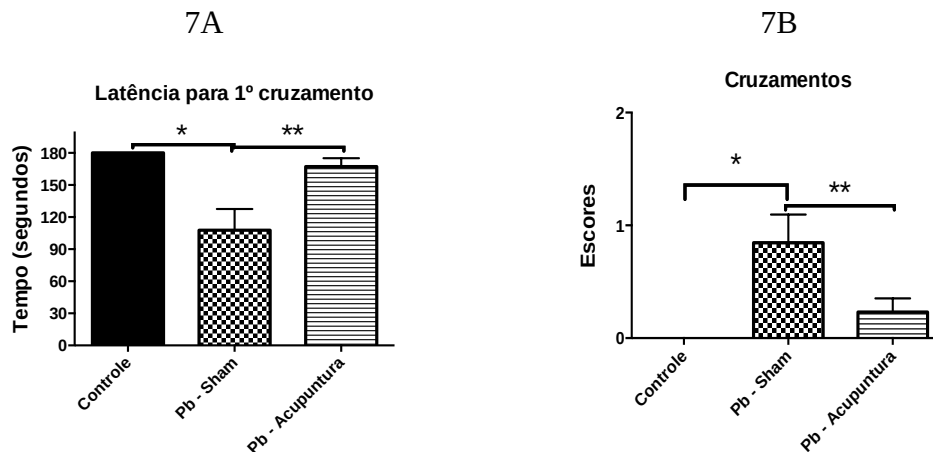


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle.

Observa-se que, referente à locomoção, a exposição ao chumbo levou a um aumento significativo do número de unidades percorridas pelos animais, quando comparado aos controles. Por sua vez, a acupuntura não diferenciou significativamente os efeitos do chumbo nos animais, o que pode ser observado pela comparação entre os valores do grupo Pb-Sham e os do grupo Pb-Acupuntura.

Figura 7 - Avaliação na arena de campo aberto, do tempo de latência para o primeiro cruzamento e do número total de cruzamentos pelo centro da arena, nos animais das três semanas de tratamento.

1ª semana:

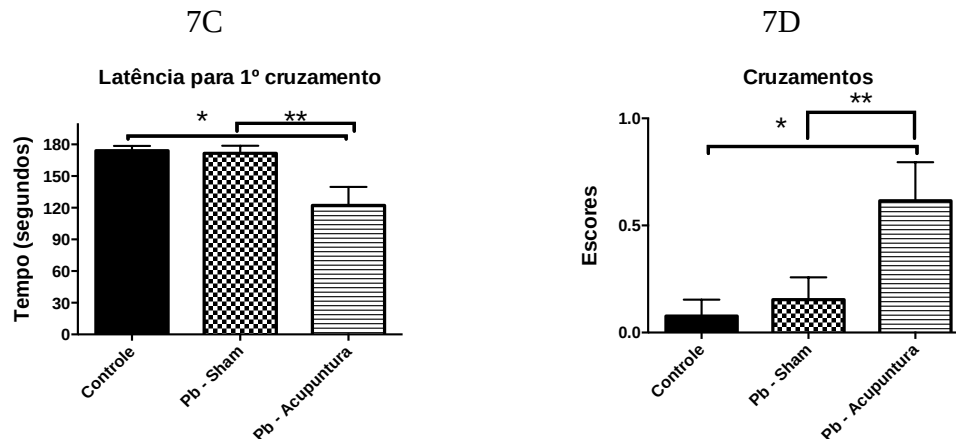


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle. ** $P < 0,05$ do Pb-Sham.

Observa-se na figura 7A que o tratamento por chumbo diminuiu o tempo que os animais levaram para cruzar o centro do aparelho pela primeira vez e, também, que a acupuntura contrapõe o efeito do chumbo e retoma os valores para próximo do que são os dos controles.

Já na figura 7B, vê-se que a exposição ao chumbo causa um aumento no número de cruzamentos feitos pelos animais no aparelho e, por sua vez, o tratamento por acupuntura rebaixa esses valores até próximo dos obtidos pelos controles, antagonizando os efeitos do chumbo.

2ª semana:



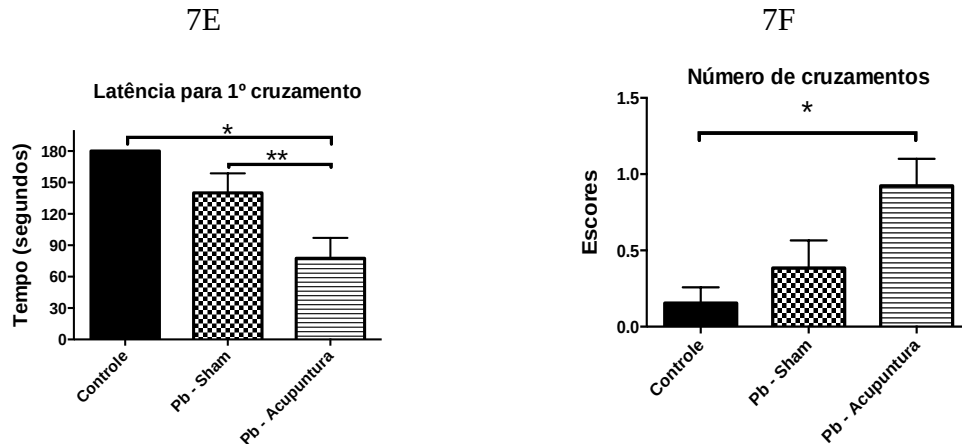
Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle. ** $P < 0,05$ do Pb-Sham.

Em relação à latência (Figura 7C), a exposição ao chumbo não alterou o comportamento dos controles, sendo mantido o tempo levado para cruzar o centro do aparelho pela primeira vez. No entanto, a acupuntura causou uma diminuição significativa no tempo para cruzar o centro do aparelho pela primeira vez quando comparados aos controles e também quando comparados ao grupo Pb-Sham.

Adicionalmente, na figura 7D, observa-se o mesmo fenômeno. O tratamento por Pb não alterou os valores obtidos pelo grupo controle e, por sua vez, a acupuntura

aumentou significativamente o número de cruzamentos, tanto quando comparados aos controles quanto aos expostos unicamente ao chumbo.

3ª semana:



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média dos valores obtidos com 13 animais. As comparações foram feitas usando ANOVA. * $P < 0,05$ do controle. ** $P < 0,05$ do Pb-Sham.

Na figura 7E, observa-se que apenas a acupuntura foi capaz de causar mudanças significativas no comportamento dos animais. Nesse caso, houve uma redução do tempo para cruzar o centro pela primeira vez em comparação ao controle e também em comparação ao Pb-Sham.

Por outro lado, na figura 7F, evidencia-se também o papel da acupuntura causando mudanças significativas, mas nesse caso apenas houve diferença estatisticamente significativa no aumento do número de cruzamentos quando comparados com o grupo controle.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho o chumbo provocou efeito ansiolítico nos animais quando examinados no teste do LCE e efeito hiperlocomotor, quando examinados na ACA.

Os efeitos deléteiros da exposição crônica ao chumbo já são amplamente discutidos na literatura, incluindo a sua neurotoxicidade e consequências no comportamento do indivíduo (LARINI et al., 1987; BUSCHINELLI et al., 1990; ANTONIO et al., 2003; ERAZI et al., 2010; SANSAR et al., 2010). Essa exposição crônica pode causar acúmulo considerável de chumbo no organismo, como no caso da exposição ocupacional (VAGLENOV et al., 2001).

Aqui, investigamos os possíveis efeitos neurocomportamentais de uma exposição sub-aguda a baixas doses de Pb. Escassa é a literatura sobre trabalhos que abordam delineamento similar ao nosso estudo. No entanto, trabalhos como NEEDLEMAN et al. (1990), LANPHEAR et al. (2000) e CANFIELD (2003) descreveram efeitos neurocomportamentais após exposição a baixas doses do chumbo. A investigação das consequências da exposição a baixas doses de Pb é de grande importância na saúde pública (TONG et al., 2000), dado ao fato de que grande parcela da população apresenta algum nível de chumbo no organismo (PALIELO, 1997) e de que especialmente as crianças são mais vulneráveis a essas baixas concentrações do metal, sofrendo distúrbios no quociente de inteligência após exposição (BELLINGER, 2008).

Em RIS (2004) demonstrou-se que a exposição ao chumbo está relacionada com efeitos deletérios da função motora e, esses efeitos podem ser observados mesmo em doses baixas, como demonstrado por Leasure (2008). Já MOREIRA (2001) e SOEIRO (2007) demonstraram que exposição a baixas doses de chumbo induz comportamento de ansiedade em animais.

Na primeira semana de testes realizados, os resultados obtidos indicam que a exposição ao chumbo levou a uma hiperatividade motora dos animais, demonstrada pela maior locomoção na ACA e maior número de entradas nos braços do LCE comparado ao grupo controle. KAHLOULA et al. (2009) relacionou exposição ao chumbo com diminuição na atividade motora porém, outros trabalhos mostraram que os efeitos do chumbo na atividade motora podem ser variados e dependentes da idade dos animais. Em

animais jovens, o metal causou um aumento da atividade motora e em animais adultos, levou à hipoatividade motora (REITER et al., 1975; KRASS et al., 1980).

Nossos resultados também sugeriram que o chumbo teve um efeito ansiolítico, já que levou a um aumento do comportamento de exploração dos braços, abertos e fechados, do LCE. Estudos já demonstraram que o chumbo altera o comportamento e pode levar a um aumento da ansiedade (LERET, 2002; BOUYATAS e GAMRANI, 2007). Nossos resultados com os testes de ansiedade discordam dessas sugestões e, as diferenças neste sentido, possivelmente se devem ao fato de que nos nossos animais expostos ao chumbo, a hiperatividade locomotora observada pode ter mascarado o resultado do teste comportamental, como também foi sugerido por DAWSON et al. (1995). Muitas das diferenças entre resultados obtidos na literatura podem ser devido as distintas doses do metal e via de administração, distintos métodos dos estudos, ou mesmo devido às espécies de animais escolhidas como modelo experimental.

Nas decorrentes duas semanas de testes, os efeitos do Pb seguem a mesma tendência dos resultados predecessores e nota-se que ainda persiste uma ação aparentemente ansiolítica e de estimulação da atividade locomotora dos animais expostos ao Pb, mas em escala decrescente de efeito.

Comparando-se as semanas, observa-se que o chumbo teve um rápido e expressivo efeito, logo em seguida à exposição, mas com o aumento do intervalo de tempo entre a exposição e o teste realizado, observou-se declínio na toxicidade neurocomportamental do Pb. Essa queda na potência de ação do Pb pode ser explicada pela excreção temporal do metal (KLAASSEN, 1998). Devido a baixa dose de Pb usada para a exposição, uma semana de intervalo entre os testes neurocomportamentais já pode representar uma variação substancial e alterar as consequências fisiológicas e comportamentais.

Adicionalmente, analisando-se o desempenho normal dos ratos ao longo das semanas observamos que os animais controles perdem o interesse pela exploração e, aparentemente, ficam mais ansiosos ao longo das três semanas de testes, o que pode ser relacionado à habituação ao aparelho. Já os animais expostos ao metal também apresentam comportamento semelhante porém, em menor escala, e isto pode ser entendido como um possível efeito da estimulação motora sobre os animais, exercida

pelo metal durante o período das três semanas de testes. Esse fato é visível comparando-se os resultados do grupo controle e do grupo Pb obtidos na última semana de avaliação.

O tratamento por acupuntura demonstrou resultados heterogêneos dificultando a interpretação dos resultados. Talvez devido ao tipo das diferentes metodologias empregadas nas avaliações neurocomportamentais ou mesmo pelas diferentes susceptibilidades de respostas dos animais ao tratamento energético. Resultados em seres humanos mostraram que a acupuntura reduz os efeitos ansiolíticos, mas as diferenças entre os pontos de acupuntura utilizados, a susceptibilidade ao tratamento, bem como, o tempo de tratamento podem produzir resultados heterogêneos em diferentes estudos (AU et al., 2016).

Na primeira semana de testes, a acupuntura preveniu as alterações causadas pelo chumbo, indicando uma ação antagônica àquela exercida pelo metal, fazendo o efeito do Pb voltar aos valores do grupo controle. O que chama mais a atenção é o fato de que a acupuntura, apesar de também ter diminuído a exploração e a atividade motora ao longo das três semanas, mesmo assim pareceu favorecer o estímulo do metal sobre a atividade motora e sobre a exploração, como que prevenindo a amplitude da queda da atividade motora observada tanto no grupo controle quanto no grupo Pb.

Estudo realizado em ratos Sprague-Dawley em um modelo experimental para insônia mostrou que a eletroacupuntura foi capaz de reduzir a atividade do sistema medular simpático-adrenal auxiliando no tratamento da insônia, no entanto, foi verificado que os animais tratados com acupuntura nos pontos “*Shenmen*” e “*San-yinjiao*”, pontos de função semelhante ao utilizado no nosso estudo, aumentaram o número de vezes e a permanência no braço aberto do labirinto em cruz, indicando um efeito ansiolítico do protocolo (CHENG et al., 2015).

Parece que o tratamento de acupuntura leva a uma manutenção do interesse dos animais em explorar, ao serem comparados com os outros grupos. Esse fato é extremamente visível avaliando-se a última semana de testes, quando Pb-Acupuntura é comparado com os outros grupos que apresentam valores indicando menor comportamento de exploração. Essa dinâmica pode ser explicada pelo fato de que no tratamento, a inserção permanente da esfera de cristal radionizada subcutaneamente, provocando estímulo contínuo do ponto energético, mantém o efeito sobre as variáveis

neurocomportamentais testadas. Já o efeito do chumbo pode ter variado ao longo das três semanas, simplesmente pelo fato de que, após o tratamento, sua excreção do organismo animal é contínua.

O estímulo contínuo das esferas no ponto de VG20 pode vislumbrar duas situações importantes: uma é a de que o ponto inicialmente faz sua ação específica de acalmar a mente, reduzindo o efeito ansiogênico sistêmico; e a outra é de que esse ponto é capaz de harmonizar a energia dos canais *Yang* (MACIOCIA, 2007). Ao harmonizar a energia dos canais *Yang*, o ponto VG20 não só acalma o indivíduo, mas controla todas as atividades relacionadas ao movimento, dentre elas a capacidade de exploração, gerando com o passar do tempo, o equilíbrio energético entre o *Yin* e o *Yang* (MACIOCIA, 2007; WON, 2008).

É crescente o número de informações acerca do uso da acupuntura para estados ansiogênicos em seres humanos (SHAYESTEHFAR et al., 2016; AU et al., 2016; SAKATANI et al., 2016) evidenciando seu caráter ansiolítico. Apesar dos dados recentemente publicados por Cheng e colaboradores (2015), em modelo experimental de insônia, estarem em concordância com os nossos, a escassez de dados da literatura com relação aos efeitos da acupuntura em diferentes modelos animais, e principalmente, com relação a efeitos comportamentais dificulta uma comparação mais profunda dos nossos resultados.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que o chumbo pode exercer um efeito ansiolítico e, adicionalmente, também um efeito estimulante da atividade locomotora e da exploração nos animais nos testes neurocomportamentais. Além disso, podemos concluir que o estímulo do ponto de acupuntura VG20 foi capaz de aumentar os efeitos ansiolíticos provocados pelo chumbo e também exacerbar a capacidade exploratória dos animais expostos de forma subaguda ao metal.

6. REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR - USA. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, PUBLIC HEALTH SERVICES. The priority list of hazardous substances that will be the candidates for toxicological profiles atsd/epa (priority list for 2015). Acessado em 02 de maio de 2016. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>.

ANTONIO, M.T.; CORPAS, I.; LERET, M.L. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. **Toxicol. Let.**, 104:1–9, 1999.

ANTONIO, M.T.; CORREDOR, L.; LERET M.L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. **Toxicol. Let.**, 43:331–40, 2003.

APOSHIAN, H.V.; APOSHIAN, M.M. 2,3 dimercaptosuccinic acid: Chemical, pharmacology and toxicology properties of an orally effective metal chelant agent. **Rev. Pharmac. Toxicol.**, v.30, p. 279-306, 1992.

ASCIONE, I. Intoxicación por plomo en pediatría. **Arch. Pediatr. Urug.**, 72 (2): 133-138, 2001.

AU, D.W., TSANG, H.W., LING, P.P., LEUNG, C.H., IP, P.K., CHEUNG, W.M. Effects of acupressure on anxiety: a systematic review and meta-analysis. **Acupunct. Med.**, 33(5):353-9, 2015.

BELLINGER, D.C. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. **Curr. Opin. Pediatr.**, 20 (2): 172–177, 2008.

BOUYATAS, M.Y.M.; GAMRANI, H. Effects of lead intoxication, on serotonin system and sub-commissural organ secretion in the meriones shawi. **J. Environ. Neurosci. Biomed.**, 1:34–40, 2007.

BUSCHINELLI, J.T.; BARBOSA, C.Q.; TRIVELATO, G. C. Saturnismo - chumbo x trabalhadores - um jogo lento e fatal. **Rev. Proteção.**, v.2, p. 42-50, 1990.

CANFIELD, R.L.; HENDERSON, C.R.; CORY-SLECHETA, D.A. et.al. Intellectual impairment in children with blood lead concentration below 10 µg/dl n. **Engl. J. Med.**, v.348, p. 1517-26, 2003.

CHENG, C., LIU, P., WU, Q., ZHONG, Z., KOU, J., WEN, P., ZHU, Y. Effects of electroacupuncture on anxiety and sympathetic-adrenal medulla system in rats with insomnia. **Zhongguo Zhen Jiu**, 35(9): 923-6, 2015.

CLARK, S.; MENRATH, W.; CHEN, M.; SUCCOP, P.; BORNSCHEIN, R.; GALKE, W. The influence of exterior dust and soil lead on interior dust lead levels in housing that had undergone lead-based paint hazard control. **J. Occup. Environ. Hyg.**, 1: 273–282, 2004.

CONRAD, M.E.; BARTON, J.C. Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat. **Gastroenterology**, v.74, p. 731-40, 1978.

DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; COLLINSON, N.; IVERSEN, S.D.; TRICKLEBANK, M.D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity, **Psychopharmacology**, v.118, p. 316– 323, 1995.

DEVI, C.B.; REDDY, G.H.; PRASANTHI, R.P.; CHETTY, C.S.; REDDY, G.R. Developmental lead exposure alters mitochondrial monoamine oxidase and synaptosomal catecholamine levels in rat brain. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 23:375–81, 2005.

DUBAS T.C.; STEVENSON A.; SINGHAL R.L.; HRDINA, P. Regional alterations of brain biogenic amines in young rats following chronic lead exposure. **Toxicology**, 9:185–90, 1978.

DRAEHMPAEHL, D., ZOHMANN, A. Acupuntura no cão e no gato: princípios básicos e prática científica. São Paulo: Roca, p. 245, 1997.

ERAZI, H.; SANSAR, W.; AHBOUCHA, S.; GAMRANI, H. Aluminum affects glial system and behavior of rats. **C. R. Biol.**, 333:23–7, 2010.

GOYER, R.A.; CHERIAN, M.G.; DELAQUERRIERE, R.L. Effects of repeated administration of calcium disodium ethylenediaminetetracetate during excessive exposure to lead in rats. **J. Environ. Pathol. Toxicol.**, v.4, p. 403-10, 1978.

GRANT, L.D.; KIMMEL, C.A.; WEST, G.L. et. al. Chronic low-level lead toxicity in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.56, p.42-58, 1980.

GRAZIANO, H.; LOLACONO, N.J.; MEYER, P. Dose-reponse study of oral 2,3dimercaptosuccinic acid in children with elevated blood lead concentrations. **J. Pediatric.**, v.113, p. 751-7, 1988.

I - GRAZIANO, H.; LOLACONO, N.; MOULTON, T. et.al. Controlled study of meso-2,3- dimercaptosuccinic acid for the management of childhood lead intoxication. **J. Pediatric.**, v. 120, p. 133-39, 1992.

II - GRAZIANO, J.H. et al. Controlled study of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid for the management of childhood lead intoxication. **J. Pediatr.**, v.20, p. 133-9, 1992.

GROVER, C.A.; NATION, J.R.; BRATON, G.R. Chronic exposure to lead attenuates cocaine-induced behavioral activation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.44, p. 221- 5, 1993.

HURLBUT, K.; TONG, T.; SULLIVAN, JR.; J. B. et. al. Hazardous materials toxicology: clinical principles of environmental health. Baltimore, Willians & Wilkins, p. 405, 1992.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC): Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – **Inorganic and organic lead compounds**, v. 87, p. 10-17, 2006.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/index.php>. Acessado em Maio de 2016.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **Br. Med. Bull.** 68:167–82, 2003.

KAHLOULA, K.; SLIMANI, M.; AOUES, A. Behavioural and Neurochemical Studies of Perinatal Lead Exposed in Rat Wistar. **Europ. J. Sci. Res.**, v. 35, n.4, p.603-614, 2009.

KLAASSEN, C. D. Metais Pesados e seus Antagonistas. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Goodman, Gilman, v.2., p. 1054-56, 1998.

KRASS, B.; WINNEKE, G.; KRAMER, U. Neurobehavioral and systemic effects in Pb exposed rats after an exposure-free interval of four months duration (author's transl). **Zentralbl. Bakteriол.** 170 (5–6), 353–367, 1980.

LANPHEAR, B.P.; DIETRICH, K.; AUINGER, P. et.al. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations < 10µg/dl in us chidren and adolescents. **Pub. Health Rep.**, v. 115, p.521-28, 2000.

LANPHEAR, B.P.; MATTE, T.D.; ROGERS, J.; CLICKNER, R.P.; DIETZ, B.; BORNSCHEIN, R.L. et al. The contribution of leadcontaminated house dust and residential soil to children's blood lead levels. A pooled analysis of 12 epidemiologic studies. **Environ. Res.** 79 (1): 51–68, 1998.

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

LEASURE, J.L.; GIDDABASAPPA, A.; CHANEY, S.; JOHNSON, J.E.JR.; POTHAKOS, K.; LAU, Y.S. Low-level human equivalent gestational Pb exposure produces sex-specific motor and coordination abnormalities and late-onset obesity in year-old mice. **Environ. Health Perspect.** 116 (3): 355–361, 2008.

LERET, M.L.; GARCIA-ECEDA, F.; ANTONIO, M.T. Effects of maternal lead administration on monoaminergic, gabaergic and glutamatergic systems. **Brain. Res. Bull.**, 58: 469–73, 2002.

LINTHORST A.C. Interactions between corticotropin-releasing hormone and serotonin: implications for the aetiology and treatment of anxiety disorders. **Handb. Exp. Pharmacol.**, 169:181–4, 2005.

LIVINGSTON, D. Maintaining a lead safe home: a do-it-yourself manual for homeowners, property managers, and contractors. **Colortone Press**, Landover, MD. 2000.

MACIOCIA, G. Os Fundamentos da Medicina Chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas. São Paulo: Roca, 2007.

MERCK INDEX. **An Encyc. Chem., Drugs, Bio.** Ed. Merck & co. Inc. USA , p. 922-25, 1996.

MOREIRA, E.G.; VASSILIEFF, I.; VASSILIEFF, V.S. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. **Neurotoxicol. Teratol.**, 23:489–95, 2001.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev. Panam. Salud. Pública.** v.2, p. 119-29, 2004.

NEEDLEMAN, L.H.; SCHELL, A. et al. The lon-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 83-8, 1990.

PALIELO, M.; GUTIERREZ, P.R.; CONCEIÇÃO, A. et. al. Lead reference values in the blood of the urban population. **J. Pub. Health**, v.31, p. 144-8, 1997.

PELLOW, S.; CHOPIN, M. The effect of putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. **Physiol. Behav.**, 35, 587-590, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525-529, 1986.

REITER, L.W.; ANDERSON, G.E.; LASKEY, J.W.; CAHILL, D.F. Developmental and behavioral changes in the rat during chronic exposure to Pb. **Env. Health Perspect.**, 12:119–123, 1975.

RIS, M.D.; DIETRICH, K.N.; SUCCOP, P.A.; BERGER, O.G.; BORNSCHEIN, R.L. Early exposure to Pb and neuropsychological outcome in adolescence. **J. Int. Neuropsychol. Soc.** 10, 261–270, 2004.

RYBICKI, B.A.; JOHNSON, C.C.; PETERSON, E.L.; KORTSHA, G.X.; GORELL, J.M. Comparability of different methods of retrospective exposure assessment of metals in manufacturing industries. **Am. J. Ind. Med.** 31:36–43, 1997.

SAKATANI, K., FUJII, M., TAKEMURA, N., HIRAYAMA, T. Effects of Acupuncture on Anxiety Levels and Prefrontal Cortex Activity Measured by Near-Infrared Spectroscopy: A Pilot Study. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 876: 297-302, 2016.

SANSAR, W.; AHBOUCHA, S.; GAMRANI, H. Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. **Acta Histochem.**, 2010.

SCHNEIDER, J.S.; ANDERSON, D.W.; WADE, T.V.; DECAMP, E.; SMITH, M.G.; ZUCK, L. Inhibition of cell proliferation in the dentate gyrus of rats following postweaning lead exposure. **Neurotoxicology** 26:141–5, 2004.

SHAYESTEHFAR, M., SEIF-BARGHI, T., ZAREI, S., MEHRAN, A. Acupuncture Anxiolytic Effects on Physiological and Psychological Assessments for a Clinical Trial. **Scientifica** (Cairo), doi: 10.1155/2016/4016952, 2016.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. Introducción a la toxicología de los alimentos. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, p. 122-27, 1996.

SILVA, N.R.; MORAES, E.C.F. Papel dos indicadores biológicos na avaliação da exposição ocupacional ao chumbo. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v.15, p. 7-15, 1987.

SOEIRO, A.C.; GOUVÊA, T.S.; MOREIRA, E.G. Behavioral effects induced by subchronic exposure to Pb and their reversion are concentration and gender dependent. **Hum. Exp. Toxicol.**, 26: 733–9, 2007.

TAKASE, L.F.; NOGUEIRA, M.I.; BARATTA, M.; BLAND, S.T.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F., FORNAL, C.A.; JACOBS, B.L. Inescapable shock activates serotonergic neurons in all raphe nuclei of rat. **Behav. Brain Res.**, 153:233–9, 2004.

TONG, S.; MCMICHAEL, A.J.; BAGHURST, P.A. Interactions between environmental pb exposure and sociodemographic factors on cognitive development. **Arch. Environ. Health**, 55 (5): 330–335, 2000.

TROMBINI, T. V. et al. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v.67, p. 743-751, 2001.

VAGLENOV, A.; CARBONEL, E.; MARCOS, R. Biomonitoring of workers exposed to lead. Genotoxic effects, its modulation by polyvitamin treatment and evaluation of the induced radioresistance. **Mut. Res.**, v. 418, p. 79-92, 1998.

VAGLENOV, A.; CREUS, A.; LALCHEV, V.; PETKOVA, S.; PAVLOVA, S.; MARCOS. Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p. 295-98, 2001.

VERINA, T.; ROHDE, C.A.; GUILARTE, T.R. Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. **Neuroscience**, 145:1037–47, 2007.

WEN, T. S. Manual terapêutico de acupuntura. São Paulo: Manole, p. 424, 2008.

WILSON, M.A.; JOHNSTON, M.V.; GOLDSTEIN, G.W.; BLUE, M.E. Neonatal lead exposure impairs development of rodent barrel field cortex. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, 97: 5540–5, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environ. Health Criteria 3 – Lead**, Geneva, p.169, 1977.