

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
UNESP BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE
AGRESSIVIDADE EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO
E SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR IMOBILIZAÇÃO

Simone Galbiati Terçariol

BOTUCATU – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
UNESP BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE
AGRESSIVIDADE EM RATOS EXPOSTOS AO CÁDMIO
E SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR IMOBILIZAÇÃO

Aluna: Simone Galbiati Terçariol

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Co-orientador: Dr. Antonio Francisco Godinho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Terçariol, Simone Galbiati.

Avaliação do comportamento de agressividade em ratos expostos ao cádmio e submetidos ao estresse por imobilização / Simone Galbiati Terçariol. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Co-orientador: Antonio Francisco Godinho

Assunto CAPES: 21007004

1. Toxicologia 2. Metais pesados - Toxicologia

CDD 615.9

Palavras-chave: Agressividade; Cádmio; Estresse; Neurocomportamento; Rato.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho
Presidente e Co-orientador: Titular 1
Centro de Assistência Toxicológica – CEATOX
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli
Membro: Titular 2
Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo
Membro: Titular 3
Departamento de Patologia - TOXICAN
Faculdade de Medicina – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 26/08/08

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Deus,

à Nossa Senhora Aparecida e aos meus pais Vitório e Raquel, pela proteção e por me darem forças para continuar a estudar e superar as dificuldades ocorridas nestes dois anos.

Aos meus pais Vitório e Raquel,

Pelo intenso apoio, amor e paciência, em todos os momentos de
minha vida.

meus irmãos Paula e Vinicius,

Pela amizade, carinho, compreensão e incentivo.

Uli, Mini e Luna

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Obrigada pela oportunidade, paciência, confiança, dedicação e ensinamentos, pois orientar uma pós-graduação como a minha não é fácil!

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Pela oportunidade e confiança.

“Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações”.
Vincent Van Gogh

Agradecimentos

Aos meus amigos de trabalho, pessoas queridas, em especial a Coordenadora Carla Komatsu Machado e ao Vice-Diretor André Luis Ornellas, por terem acreditado e depositado sua confiança em mim, possibilitando a realização deste Mestrado.

A Marisa e Gilberto pelo empréstimo da câmera, muito obrigada, pois sem ela não conseguiria analisar o experimento.

A Livia, Érica pela amizade, carinho e hospedagem.

Aos funcionários do CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica, Alaor, Amauri, Aninha, Denise, Rita e Pardal pela amizade e apoio.

Ao IBB – Unesp Botucatu pela oportunidade de realização deste mestrado.

Aos funcionários da Pós-Graduação por toda ajuda, compreensão e paciência dispensada.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente foram fundamentais para a elaboração deste trabalho,

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	SAIS DE CÁDMIO E A TOXICIDADE DOS SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS	13
-------------------	--	----

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	11
II – CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	13
1 Identificação e fontes de emissão do cádmio.....	13
2 Contaminação Ambiental pelo cádmio	15
2.1 Ar	15
2.2 Água.....	15
2.3 Solo	15
2.4 Alimento	16
3 Toxicocinética	16
3.1 Absorção	16
3.2 Distribuição	17
3.3 Metabolização.....	18
3.4 Excreção	18
4 Cádmio como agente cancerígeno e teratogênico.....	18
5 Cádmio e Sistema Nervoso Central	19
6 Estresse.....	20
7 Comportamento de Agressividade	21
8 Cádmio e Estresse Oxidativo	22
9 Justificativa e objetivos	24
10 Referências.....	26

III – CAPÍTULO II - ARTIGO	34
Título	34
Resumo.....	35
Abstract	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados	42
Discussão	45
Referências.....	50

I - INTRODUÇÃO

Estudos recentes mostram que o metal pesado cádmio (Cd) é um agente cancerígeno para humanos. O cádmio é usado na fabricação de baterias de veículos, pastas de limpeza, pisos, como componente em metalúrgicas, em pigmentos, acabamentos de peças, plásticos e vidros, além de ser encontrado como contaminante dos fertilizantes fosfatados (IARC, 1993).

Como resultado das emissões industriais e por causa da contaminação dos fertilizantes utilizados nas plantações, no século XX tem aumentado bastante a concentração do cádmio no solo, implicando em uma maior retenção pelos vegetais (SATARUG et al., 2003), que serão utilizados pelos animais e/ou homem, inclusive como alimentos. Em regiões de alta concentração, a contaminação de alimentos e água provavelmente causou as primeiras intoxicações (GOODMAN e GILMAN, 2001).

Além destas exposições, fumantes ativos e passivos também estão expostos a altas concentrações de cádmio presente na fumaça do tabaco (LEWIS, 1972; JARUP et al., 1998), sendo um dos componentes importantes para os efeitos tóxicos do cigarro no organismo.

Os metais pesados produzem seus efeitos tóxicos combinando-se com um ou mais grupos reativos essenciais às funções fisiológicas normais.

O cádmio em especial, fica no mesmo patamar do chumbo e do mercúrio como metais importantes no ponto de vista toxicológico. O cádmio ocorre na natureza em combinação com o zinco e chumbo, causando contaminação ambiental. Como menos de 5% desses metais são reciclados, a poluição ambiental é uma preocupação importante.

A meia-vida do cádmio no organismo é de 10-30 anos, por isso, se a exposição ambiental for contínua, as concentrações desse metal nos tecidos aumentam durante toda vida de forma cumulativa (GOERING e KLAASSEN, 1984). Dado sua taxa atual de liberação no ambiente, é provável que o cádmio no corpo humano aumente progressivamente no futuro. Em consequência poderia provocar uma incidência mais alta de doenças.

Fígado e rim são os órgãos principais atingidos pela toxicidade por cádmio (SATARUG et al., 2003). Porém, estudos recentes indicam que exposições crônicas a

baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (LERET et al., 2003; VIAENE et al., 2000). Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração (VIAENE et al., 2000). Experimentalmente, exposição pré e neonatal resultou em hiperatividade (ALI et al., 1990) enquanto que em ratos adultos demonstrou diminuição da atividade locomotora espontânea (ALI et al., 1990; LUKAWSKI et al., 2005).

Pesquisas de Leret et al., (2003) comprovaram a ação do cádmio no sistema nervoso central, pois em estudos feitos com animais foram constatados hiperatividade motora, aumento do comportamento agressivo e prejuízo dos mecanismos de memória social. O comportamento de agressividade é comum na sociedade animal, e é considerada essencial quanto à sobrevivência do indivíduo ou da espécie (HALLER e KRUK, 2006).

Outro aspecto importante da intoxicação por cádmio é a sua ação mutagênica a qual parece ser provocado tanto por inibição do reparo do DNA, quanto por indução das espécies reativas de oxigênio (ERO) (GIAGINIS et al., 2006). Evidências experimentais sugerem que exposição a baixa concentração de cádmio do meio ambiente, induz mutação e dano no DNA, o que diminui a estabilidade genética inibindo o reparo endógeno e exógeno das lesões no DNA o que, em consequência, aumenta a probabilidade de mutações e, por conseguinte, a iniciação do câncer (FILIPIC et al., 2006).

O estilo de vida moderno da sociedade humana hoje, conduz os indivíduos à situações que culminam em estresse. Este por sua vez pode provocar alterações neuroendócrinas e fisiológicas.

Nos animais, o acúmulo de ansiedade gerado no estresse parece ser importante para garantir a perpetuação da espécie (BAÚ, 2002; MENDES, 2008), porém, o estresse pode provocar alterações no comportamento que se tornam permanentes, como por exemplo, a agressividade (TEICHER, 2000; NEWPORT et al., 2002)

CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

1 IDENTIFICAÇÃO E FONTES DE EMISSÃO DO CÁDMIO

O cádmio é um elemento químico, que ocupa, juntamente com o zinco e o mercúrio, o grupo IIB da Tabela Periódica; foi descoberto em 1817, por Friedrich Strohmeyer, professor de metalurgia em Goettingen, na Alemanha (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

O cádmio apresenta várias propriedades físicas e químicas semelhantes ao zinco, o que explica a ocorrência dos dois metais juntos na natureza. É um elemento relativamente raro e não é encontrado na natureza em estado puro. Sua principal fonte mineral é a *greenockita*, rica em sulfeto de cádmio (CdS), que ocorre associada a sulfeto de zinco. O cádmio está associado principalmente a sulfetos em minérios de zinco, chumbo e cobre (CHASIN e CARDOSO, 2003).

Na tabela abaixo (Tabela 1) podem ser observadas as diferentes toxicidades dos sais de cádmio.

Tabela 1: Sais de cádmio e a toxicidade dos seus principais compostos.

SAIS DE CÁDMIO (Cd)	FÓRMULA MOLECULAR	TOXICIDADE DL50 (rato)
ACETATO DE Cd	$\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$	i.p: 14mg/kg v.o: 360mg/kg
BROMETO DE Cd	$\text{CdBr}_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$	-----
CÁDMIO METÁLICO	Cd	v.o: 255mg/kg
CARBONATO DE Cd	CdCO_3	-----
CLORETO DE Cd	CdCl_2 ; $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	v.o: 250mg/L; 88mg/kg
FLUORBORATO DE Cd	CdF_2 ; $\text{Cd}(\text{BF}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	v.o: 250mg/kg
NITRATO DE Cd	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	i.p: 14mg/kg v.o: 300mg/kg
ÓXIDO DE Cd	CdO	v.o: 72mg/kg
SELENETO DE Cd	CdSe	-----
SULFATO DE Cd	CdSO_4	v.o: 225mg/kg

SULFETO DE Cd	CdS	-----
SULFITO DE Cd	CdS	v.o: 225mg/kg

FONTES – GALVÃO e COREY, 1987; WHO, 1992; ATSDR, 1997; CARDOSO e CHASIN, 2001; AZEVEDO e CHASIN, 2003; CETESB, 2008.

Numerosas atividades humanas resultam em lançamentos de significativa quantidade de Cd ao meio ambiente. As fontes individuais de Cd também variam consideravelmente entre países. A emissão de Cd tem origem em duas grandes categorias:

FONTES NATURAIS

O cádmio se origina de rochas sedimentares, rochas fosfáticas de origem marítima, que podem chegar a concentrações de até 500 ppm (WHO, 1992). Condições climáticas e a erosão dessas rochas resultam no transporte, via água dos rios. A atividade vulcânica é considerada a maior fonte natural de lançamento de cádmio para a atmosfera e se estima que seja em torno de 820 toneladas/ano (CADMIUM ASSOCIATION, 2008).

FONTES ANTROPOGÊNICAS

As maiores fontes antropogênicas de cádmio podem ser divididas em duas categorias: a primeira é relativa às atividades envolvendo mineração, produção, consumo e disposição de produtos que utilizam cádmio (baterias de Ni-Cd, pigmentos, estabilizadores de produtos de policloreto de vinila - PVC, recobrimento de produtos ferrosos e não ferrosos, ligas de cádmio e componentes eletrônicos); a segunda categoria consiste de fontes “inadvertidas” na qual o cádmio é um constituinte natural do material que está sendo processado ou consumido (metais não ferrosos, ligas de zinco, chumbo e cobre, emissões de indústrias de ferro e aço, combustíveis fósseis - carvão, óleo, gás e madeira, cimento e fertilizantes fosfatados) (ATSDR, 1997; CARDOSO e CHASIN, 2001; AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Mesmo que os níveis de Cd no solo não alcancem valores alarmantes, o metal permanecerá em uma forma potencialmente disponível, por muitos anos. A estimativa de meia-vida do Cd nos solos varia entre 15 e 1.100 anos. Portanto, há

necessidade de monitorar o comportamento do Cd e outros metais, por um período mais longo (OLIVEIRA, 2003).

2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL PELO CÁDMIO

2.1 AR

As concentrações de cádmio no ar a que estão sujeitas as populações são, geralmente, menores que $5 \times 10^{-6} \text{ mg/m}^3$, porém concentrações de até $5 \times 10^{-4} \text{ mg/m}^3$ foram detectadas no ar de áreas próximas a atividades emissoras. Vários autores avaliaram as concentrações de cádmio em áreas remotas, rurais e urbanas (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

2.2 ÁGUA

Os níveis de valores de cádmio em águas não poluídas variam significativamente. Há referências de que as concentrações em mar aberto variam de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g/L}$, e em águas profundas as concentrações são maiores que nas superfícies devido à captação do metal pelos organismos. Há referências de valores tão altos quantos 1mg/L ou ainda maiores em águas oriundas de locais nas vizinhanças de depósitos de minerais (ATSDR, 1997).

2.3 SOLO

As concentrações do cádmio em solos não-poluídos são variáveis, dependendo das fontes minerais e do material orgânico. Em solo não-vulcânico, as concentrações de cádmio variam de 0,1 a 1 ppm, enquanto naqueles de origem vulcânica atinge-se concentrações de 4,5 ppm. A contaminação dos solos podem se dar a partir de resíduos sólidos (CHASIN e CARDOSO, 2003).

No Brasil não existem estatísticas da extensão da contaminação dos solos, mas é possível encontrar substâncias tóxicas em todo o território nacional. No estado de São Paulo já existem aproximadamente 2000 locais potencialmente contaminados com substâncias orgânicas e inorgânicas (ALLOWAY, 1990).

2.4 ALIMENTOS

As concentrações de cádmio em diferentes alimentos variam muito com a origem do mesmo, com as concentrações deste no solo e com a disponibilidade do metal no meio em condições de ser incorporado pela planta.

A contaminação dos alimentos se dá através da contaminação do solo, que, por sua vez, pode ser contaminado através das águas de irrigação, de deposição originária da poluição atmosférica e de adubações através de fertilizantes fosfatados ou fertilizantes de origem de esgotos (VAZ e LIMA, 2003).

3 TOXICOCINÉTICA

3.1 ABSORÇÃO

DÉRMICA

Os estudos sobre absorção dérmica sugerem que, embora a absorção por esta via seja lenta, pode atingir proporções relevantes nas situações onde soluções concentradas de cádmio estejam em contato com a pele por várias horas (CARDOSO e CHASIN, 2001).

RESPIRATÓRIA

Dados oriundos de animais de experimentação atestam que a absorção pulmonar é maior que a absorção gastrointestinal e que é dependente da especiação química (tamanho e da solubilidade da partícula) (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Investigações demonstram que o hábito de fumar pode aumentar consideravelmente a retenção e a assimilação pulmonar do cádmio. Um cigarro contém, em média, 1,4 μg de cádmio, sendo que desta quantidade de 0,1 μg pode ser inalado, representando para um fumante de 20 cigarros diários uma entrada de 2 a 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (LARINI, 1987).

GASTROINTESTINAL

A exposição oral assume importantes proporções devido à bioacumulação do cádmio na cadeia alimentar (CARDOSO e CHASIN, 2001; VAZ e LIMA, 2003).

A nível gastrointestinal existe substanciais evidências de que os níveis de absorção de cádmio estão em torno de 5%. Esta absorção é influenciada pelo tipo de dieta e pelas condições nutricionais (LARINI, 1987; WAALKES et al., 1992).

A absorção intestinal parece ocorrer em duas fases: do lúmen para mucosa e transferência para a circulação. Dentre os fatores que afetam a absorção do cádmio estão as interações metal-metal (ex: ferro, cálcio, cromo, magnésio) e metal-proteína (metalotionina, glutatona) presentes tanto nos alimentos como no organismo (CARDOSO e CHASIN, 2001).

Dietas com baixos níveis de cálcio e proteínas aumentam aproximadamente três vezes a absorção de cádmio no trato gastrointestinal. Animais deficientes de ferro, assim como o homem, absorvem mais cádmio (OGA, 2003).

3.2 DISTRIBUIÇÃO

Qualquer que seja a via de absorção, o Cd se deposita principalmente no fígado e nos rins, onde mais da metade da carga corpórea se armazena e também no músculo, pulmão, pâncreas e sistema nervoso.

Aproximadamente, 80 a 90% da quantidade de cádmio do organismo estão ligados à metalotionina. Isto faz com que os níveis de cádmio circulante diminuam, afetando, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. O cádmio no sangue ocorre principalmente nos eritrócitos, e as concentrações plasmáticas são muito baixas (WHO, 1992).

O cádmio é altamente cumulativo. A sua concentração no organismo cresce rapidamente nos primeiros anos de vida, mesmo após cessar a exposição ao metal, ele continua acumulando no organismo, sendo eliminado muito lentamente (LARINI, 1987; HART et al., 1989).

3.3 METABOLIZAÇÃO

Após a absorção, o cádmio transportado para o fígado é ligado à metalotioninas, forma na qual volta à circulação (CHASIN e CARDOSO, 2003).

3.4 EXCREÇÃO

A excreção é normalmente lenta e se dá igualmente pela urina e fezes. Grande parte do cádmio ingerido é excretado pelas fezes, devido a não absorção pelo trato gastrointestinal (ATSDR, 1997; WHO, 1992; AZEVEDO e CHASIN, 2003). A excreção urinária do cádmio torna-se significativa apenas depois que tiver ocorrido nefrotoxicidade significativa (KLAASSEN, 2001).

4 CÁDMIO COMO AGENTE CANCERÍGENO E TERATOGENICO

Vários agentes reguladores concluem por evidências de que o cádmio possa ser um cancerígeno humano. Apesar disto a evidência de carcinogenicidade do Cd em humanos ainda é fraca, porém consistente em estudos com animais. A controvérsia sobre os dados provenientes dos estudos epidemiológicos se reflete na classificação de carcinogenicidade observada nas diversas agências.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) classificou o cádmio como provável cancerígeno para o homem, por inalação, com base no que considerou “limitada evidência em humanos, mas suficientes evidências em animais”. O “Programa Nacional de Toxicologia Americano – NTP” classificou-o como carcinogênico baseado em evidência limitada de câncer em humanos. Em contraposição, a “Agência Nacional de Pesquisa de Câncer – IARC” classificou o cádmio como sendo um agente carcinogênico pertencente ao grupo 1, ou seja, dentre aqueles que, comprovadamente provocam o aparecimento de câncer em animais de experimentação e em humanos (WHO, 1992; IARC, 1993; ATSDR, 1997).

Muitos metais cancerígenos podem produzir espécies reativas de oxigênio, tais como, níquel e cromo, os quais podem tornar-se fonte indireta de genotoxicidade após ataque sobre o DNA. Entretanto, o cádmio, diferentemente de outros metais cancerígenos, não participa nas reações químicas tipo Fenton, as quais produzem

espécies reativas de oxigênio capazes de atacar o DNA, porém, induz estresse oxidativo, incluindo peroxidação lipídica (YANG et al., 1997; KASPRZAK, 2002; WAALKES, 2002).

Pesquisas de Waalkes (2003) indicam que células epiteliais da próstata podem ser transformadas malignamente com cádmio *in vitro*, sugerindo que o epitélio prostático pode direcionar o alvo dos efeitos oncogênicos do metal.

Recentemente, evidências experimentais sugerem que a exposição à baixa concentração de cádmio do meio ambiente, induz mutação e dano no DNA, o que diminui a estabilidade genética inibindo o reparo endógeno e exógeno das lesões no DNA levando, em consequência, ao aumento da probabilidade de mutações e, por conseguinte a iniciação do câncer (FILIPIC et al., 2006).

Com relação à exposição ocupacional, os dados para o cádmio indicam uma probabilidade muito alta de associação entre o metal e o câncer de pulmão, de próstata, pâncreas e rins (VALKO et al., 2006).

Apesar das pesquisas apontarem que o cádmio pode potencializar todos os efeitos de vários estágios do processo de carcinogênese, incluindo iniciação, promoção e progressão (WAALKES, 2003), os mecanismos considerados para a ação molecular da carcinogênese por cádmio excluem um efeito direto sobre o DNA e incluem inibição do sistema de reparo do DNA, interação com regulação de proto-oncogenes e indução de necrose celular e apoptose (NZENGUE et al., 2008)

O cádmio é teratogênico, tendo sido comprovado o aparecimento de exencefalia, hidrocefalia, fenda palatal e labial, microftalmia e outras malformações congênitas em animais de experimentação. O efeito teratogênico foi observado com doses próximas à DL50 (WHO, 1992).

5 CÁDMIO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Experimentalmente, exposição pré e neonatal resultou em hiperatividade, enquanto que em ratos adultos demonstrou uma diminuição da atividade locomotora espontânea (ALI et al., 1990). Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração (VIAENE et al., 2000).

Estudos recentes indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo

quando nenhum dano renal for descoberto (VIAENE et al., 2000; LERET et al., 2003). Pesquisas de Leret et al. (2003) comprovaram a ação do cádmio no sistema nervoso central, pois em estudos feitos com animais que foram expostos no período perinatal foram constatados aumento do comportamento agressivo, hiperatividade motora e prejuízo dos mecanismos de memória social.

6 ESTRESSE

A primeira teoria capaz de fornecer os elementos necessários à compreensão do estresse surgiu na década de 1930, nos trabalhos do fisiologista austríaco Hans Selye, que publicou uma teoria, onde propôs que estresse é a resposta não específica do organismo frente a agentes ameaçadores de sua integridade. Selye introduziu e popularizou o termo “estresse” na literatura científica e médica, embora, tivesse declarado, posteriormente, a interpretação errônea que fez do termo físico *stress*, que significa pressão (SELYE, 1946; 1956).

O estresse é o acúmulo de ansiedade que gera os mais variados sintomas, mas não é considerado uma doença em si, por isso é difícil de ser diagnosticado, causando assim, várias doenças (BAÚ, 2002). A reação de estresse existe para garantir a sobrevivência e a perpetuação da espécie (MENDES, 2008).

Chrousos e Gold (1992) redefiniram estresse como o estado de desarmonia ou ameaça a homeostasia, promovendo adaptação fisiológica e comportamental, podendo ser específica para determinado estressor ou generalizada e inespecífica. Somente quando a ameaça a homeostasia excede o limiar, ocorre a síndrome não específica do estresse. Selye (1956), também introduziu o termo “Síndrome Geral de Adaptação” (SGA), que se desenvolve em três fases: fase de alerta, fase de resistência e de exaustão. A primeira fase representa a resposta inicial do organismo frente a qualquer situação ameaçadora. O cérebro identifica a ameaça e produz uma substância denominada fator de produção no córtex. Essa substância, por sua vez aciona a hipófise para que ela produza o hormônio adrenocorticotrófico. Todo esse mecanismo neuroendócrino age na fase de alerta e se caracteriza por aumento das capacidades orgânicas em responder ao estressor, com resposta fisiológica dos órgãos e sistemas a elevação da concentração plasmática das catecolaminas e dos glicocorticóides.

Em seguida, mantido o estímulo, ocorreria a fase de resistência, caracterizada pela ativação de mecanismos adaptativos. Caso a adaptação não seja

possível, instala-se a fase de exaustão, caracterizada por um esgotamento generalizado que diminui as defesas orgânicas podendo desenvolver patologias (SELYE, 1936; 1946; MEERSON, 1984; GRIFFIN, 1989; VAN DER KAR et al., 1991; FRANKS, 1994).

O estresse pode ser dividido em dois tipos: o negativo (*distresse*), e o positivo (*eustresse*). O *distresse* pode ser definido como o estresse causado pelas frustrações e situações diárias que fogem ao controle e são percebidas como ameaça. Os sinais e sintomas do *distresse* incluem: distúrbios do sono; irritação; agressividade; agitação; aumento da frequência cardíaca e respiratória (MENDES, 2008).

Pesquisas de estresse em humanos reconhecem o fato de que o estresse é uma patologia mal difundida. Recentemente, pesquisas em animais experimentais têm ligado o estresse a variações do sistema neuroendócrino e ao comportamento (KOOLHAS et al., 2007).

Várias técnicas podem ser utilizadas para provocar estresse em animais, destas a imobilização é uma das mais usadas para induzir estresse em ratos (BAJKOVA, 1988; BHARIHOKE et al., 2000; ALMEIDA et al., 2000; RAI et al., 2003).

Assim sendo, é de muito interesse o conhecimento dos efeitos adversos provocados pelo estresse, especialmente em relação ao comportamento (BELTRAME et al., 2006).

7 COMPORTAMENTO DE AGRESSIVIDADE

Atualmente, há um aumento na prevalência de agressividade, violência e terrorismo na sociedade humana, constituindo-se esta no principal problema social e de saúde. Agressividade é o sintoma chave de um grande número de desordens psiquiátricas, incluindo desordens de humor (depressão, desordens de estresse pós-traumático) e desordens de personalidade (conduta anti-social, desordem de personalidade) (HALLER e KRUK, 2006). O maior desafio na clínica e pré-clínica da agressividade é identificar qual o mecanismo neural que está por trás (VEENEMA e NEUMANN, 2007).

O cérebro do “mamífero inferior” é caracterizado pelo sistema límbico (córtex límbico, hipocampo, hipotálamo e amígdala). Esta zona de fronteira entre o córtex e as estruturas subcorticais configura um aparelho neuroendócrino envolvido na regulação do comportamento de acordo com as exigências do ambiente. Na literatura, não há homogeneidade quanto às estruturas que compõem o sistema límbico.

Entretanto, existe consenso a respeito dos componentes principais: hipotálamo, hipocampo, córtex límbico e amígdala.

Os efeitos da estimulação da amígdala, por exemplo, causa no animal e no homem: defecação, micção, dilatação da pupila e piloereção (GUYTON e HALL, 2002).

A relação entre a amígdala e o hipotálamo na organização neural do comportamento agressivo, tem sido bastante investigada. Como a amígdala recebe informações corticais através do lobo temporal, tem sido postulado que estas estruturas funcionam como entrada para o sistema límbico, no qual um estímulo potencialmente gerador de agressão será avaliado. Em termos neuroquímicos, a depleção de serotonina e GABA, bem como o aumento de catecolaminas, facilita o comportamento agressivo (KAPEZINSKI e DRACU, 1996).

O comportamento de agressividade é comum na sociedade animal, e é considerada essencial quando está em jogo a sobrevivência do indivíduo ou da espécie (HALLER e KRUK, 2006).

Estudos em animais indicam que perturbações, durante período de cuidados maternos com a ninhada, produzem impactos deletérios e persistentes no comportamento da prole. Fatores estressantes, incluindo separação materna, produzem no animal comportamento característico de ansiedade e de desordem afetiva. Segundo NEWPORT et al. (2002), esses resultados são notavelmente similares aos observados nas doenças relacionadas ao estresse em seres humanos. Crianças que sofreram estresse durante a infância, devido a alterações no comportamento dos pais, demonstram alterações permanentes no comportamento (TEICHER, 2000).

8 CÁDMIO E ESTRESSE OXIDATIVO

O desequilíbrio entre a produção de ERO e sua remoção pelos sistemas de defesa antioxidantes é denominado estresse oxidativo (DRÖGE, 2002). Portanto, estresse oxidativo seria um desequilíbrio celular no qual os oxidantes predominariam sobre os antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo (AUGUSTO, 2006).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo, vascular e cerebral. No entanto, o

efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (DRÖGE, 2002).

Um grande número de condições clínicas tem sido relacionado ao estresse oxidativo. A geração de espécies oxidantes é a causa ou consequência de uma determinada doença. Existem evidências de que, em alguns casos, as espécies reativas é a causa primária da lesão. Em relação aos tumores, foi demonstrado que as lesões em DNA por radicais livres são importantes na fase de iniciação da carcinogênese, embora se considere que as espécies reativas de oxigênio possam ser importantes também na fase de promoção tumoral (ABDALLA, 2003).

Apesar do número de estudos que sugerem danos oxidativos envolvido pelo cádmio induzindo citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade, o mecanismo não está totalmente elucidado. É proposto que o cádmio inicia o dano oxidativo direto de duas formas: 1) depleção de antioxidantes tal como glutathione e proteína do grupo sulfidril e, 2) aumento da produção de ERO (YANG et al., 1997).

As alterações induzidas por cádmio sobre a homeostase celular dos segundos mensageiros tais como as ERO e Ca^{2+} resultando em expressão aumentada da proto-oncogênese, pode representar um maior mecanismo epigenético para transformação celular e geração de tumores induzidos por cádmio. Isto explica o alto potencial carcinogênico do cádmio apesar de sua fraca força genotóxica (JOSEPH et al., 2001).

Experimentos de Poliandri et al. (2006) demonstraram que o óxido nítrico (um radical livre com muitas funções biológicas, exercendo tanto função citoprotetora quanto citotóxica) protege a cadeia de elétron transporte mitocondrial por diminuir a geração de ERO e também outras células por reduzir o estresse oxidativo gerado pelo cádmio.

O zinco é um antioxidante que nas células diminui a formação de ERO por interagir com elementos essenciais como o ferro e o cobre, diminuindo seu conteúdo nos tecidos e retardando o processo oxidativo. Muitos efeitos tóxicos do cádmio resultam da interação com elementos essenciais como o zinco, em vários estágios (absorção, distribuição e excreção), bem como afetando a função biológica destes elementos (JEMAI et al., 2007). Estudos destes autores observaram que o Cd diminui a atividade de Zn/Cu-superóxido dismutase (SOD) e catalase em células vermelhas, bem como aumentou a concentração de peróxidos lipídicos (TBARS) no plasma, sem afetar a atividade da glutathione peroxidase. Quando o cádmio foi administrado a animais com

dieta suplementada de zinco, este protege a atividade da SOD, mas não da catalase e diminui TBARS no plasma. Jemai e colaboradores concluíram que o Cd causou estresse oxidativo e a suplementação pelo zinco protege desse efeito danoso.

López et al. (2006) demonstraram em cultura de neurônios corticais que o cádmio induziu morte celular de duas formas: morte apoptótica, mediada por estresse oxidativo, através da formação de ERO a qual poderia ser induzida por disfunção da membrana mitocondrial e, morte necrótica, mediada por peroxidação lipídica induzida pelo Cd, indiretamente, através de formação aumentada de ERO. Observaram ainda que o Cd diminuiu os níveis de glutatona e induziu ativação de catalase e superóxido dismutase nas células sobreviventes do experimento.

Muito recentemente Nzungue et al. (2008) estudando o efeito do cádmio em uma linhagem de queratinócitos humanos observaram que o radical hidroxil é o maior radical envolvido no estresse oxidativo gerado pelo metal e, que a glutatona possui um papel importante na citotoxicidade do cádmio.

O sistema nervoso central, por possuir poucas defesas antioxidantes além de ser rico em lipídeos facilmente oxidáveis e de conter alto teor de metais de transição envolvidos na formação de radicais livres (TORRES et al., 2007), é um local que pode ser seriamente afetado pelo cádmio. Apesar disto, poucos estudos tem relatado toxicidade por cádmio neste tecido.

9 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Nos últimos anos exposição a metais pesados como o cádmio, devido à poluição industrial e ambiental, tem sido reconhecida como um importante fator para o aparecimento e o agravamento de doenças. Outros fatores, como por exemplo, o estresse parece ser importante e também podem contribuir para agravar este problema.

Estudos recentes indicam que a exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (VIAENE et al., 2000; LERET et al., 2003). Recentemente, pesquisas de Leret et al. (2003) comprovaram a ação do cádmio no sistema nervoso central, pois em estudos feitos com animais foram constatados aumento do comportamento agressivo, hiperatividade motora e prejuízo dos mecanismos de memória social.

Possivelmente, as conseqüências dos problemas comportamentais provocados pelo cádmio incluindo o aumento da agressividade, podem ser mais graves se a exposição for ainda associada ao estresse.

Considerando a ausência de estudos em longo prazo das conseqüências tóxicas ao organismo humano, da exposição a esse agente químico simultaneamente ao estresse, tornam-se necessários estudos para verificar possíveis efeitos de interação entre ambos.

O presente trabalho teve como objetivos:

Geral - avaliar aspectos da neurotoxicidade do cádmio em ratos estudando a agressividade.

Específicos - avaliar, em animais expostos ao cádmio e submetidos concomitantemente ao estresse por imobilização, os seguintes parâmetros:

- Agressividade, baseada no paradigma do animal Intruso/Residente;
- Curva de crescimento;
- Ingestão de líquido (para efetuar cálculo de dose);
- Níveis teciduais de cádmio (sangue e cérebro).

10 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D.S.P. Radicais livres e Antioxidantes. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 14, p. 38-55.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta: ATSDR, 1997. 347 p.
- ALI, M. M.; MATHUR, N.; CHANDRA, S. V. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 653, 1990.
- ALMEIDA, A.S.; KEMPINAS, W.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Sexual and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1105-1109, 2000.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1990. p. 339.
- AUGUSTO, O. Conceito de estresse oxidativo. In: _____ **Radicais livres bons, ruins e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. p. 60-61.
- AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003, 554 p.
- BAJKOVA, O.V. Cyto-Physiologic indicators of the status of the reproductive organs of male rats after 7-days of immobilization stress and 7-days of hypokinesia. **Kosmicheskaia Biologiia I Aviaakosmicheskaia Meditsina**, v.22, p.55-59, 1988.
- BAÚ, L.M. Patologias do trabalho. In : _____ **Fisioterapia do trabalho**. Curitiba : Clã dos Silva, 2002. cap.6, p. 209-218.

BELTRAME, F.L.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. Análise histomorfométrica e estereológica de testículos em ratos pré-púberes submetidos ao estresse induzido por imobilização. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.8, p.139-146, 2006

BHARIHOKE, V.; GUPTA, M.; GOHIL, H. Bronchopulmonary changes after repeated exposure to cold & restraint stress. **Journal of the Anatomical Society of Índia**, v.49, p.49-51, 2000.

CADMIUM ASSOCIATION. **All the information on Cadmium**. Disponível em:<
<http://www.cadmium.org>>. Acesso em: 08 jan. 2008.

CARDOSO, L. M. N.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2001, v. 6, p. 121 (Cadernos de referência Ambiental).

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br>. Aceso em: 16 jun. 2008.

CHASIN, A.A.M.; CARDOSO, L.M.N. Cádmio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.10, p. 263-298.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v.267, p.1244–1252, 1992.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FILIPIC, M.; FATUR, T.; VUDRAG, M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. **Humam and Experimental Toxicology**, v. 25, p. 67-77, 2006.

FRANKS, B. D. **What is stress?** Quest, v. 46, p. 1-7, 1994.

GALVÃO, L.A.C.; COREY, G. **CÁDMIO**. Série Vigilância Sanitária. México: Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, 1987.

GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; TEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.213, p.282-290, 2006.

GOERING, P.L.; WAALKES, M.P.; KLAASSEN, C.D. Toxicology of cadmium. In: GOYER, R.A.; CHERIAN, M.G. (Eds.), handbook of experimental pharmacology: **Toxicology of metals, biochemical effects**. New York: Springer-Verlag, 1994. p.189-214.

GOODMAN & GILMAN; WILSON, J. D. As Bases farmacológicas da terapêutica. In: _____KLAASSEN, C. D. (Eds.). **Metais pesados e Antagonistas dos metais pesados**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2001. p. 1389-1407.

GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: an unifying concept. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.20, p. 263-312, 1989.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Mecanismos comportamentais e motivacionais do cérebro – o sistema límbico e o hipotálamo. In: _____ **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 632-641.

HALLER, J.; KRUK, M.R. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 292-303, 2006.

HART, R.P.; ROSE, C.S.; HAMEER, R.M. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v.11, p. 933-943, 1989.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. **Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry.** Lyon: IARC, 1993. v.58, 444p.

JARUP, P.; BERGLUND, J.; ELINDER, C.G; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure – A review of the literature and a risk estimate. **Environ. Health**, v.24, p.1- 51, 1998.

JEMAI, H.; MESSAOUDIB, I.; CHAOUCHC, A; KERKENI, A. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. **Journal Trace Elements Medical Biology**, v.21, p. 269-273, 2007.

JOSEPH, P.; MUCHNOK, T. K.; KLISHIS, M. L.; ROBERTS, J. R.; ANTONINI, J. M.; WHONG, W. Z.; ONG, T. M. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc* Proto-Oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**, v. 61, p. 295-303, 2001.

KAPEZINSKI, F.; DRACTU, L. Aspectos do funcionamento do Sistema Nervoso Central. In: **Manual de Psiquiatria.** ALMEIDA, O.P.; DRACTU, L.; LARANJEIRA, R. (Eds.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap.3, p.32-42.

KASPRZAK, K. S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. **Free Radical Biological Medicine**, v. 32, p. 958-967, 2002.

KLAASSEN, C. D. Metais pesados e antagonistas dos metais pesados. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** MOLINOFF, P.B. and RUDDON, R.W. (Eds.) Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2001. cap. 67, p. 1389-1407.

KOOLHAAS, J.M.; BOER, S.F.; BUWALDA, B.; REENEN, K.V. Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 70, p. 218-226, 2007.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1987. 142-143 p.

LERET, M. L.; MILLÁN, J. A. S.; ANTONIO, M. T. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. **Toxicology**, v. 186, p. 125-130, 2003.

LEWIS, G.P.; COUGHLIN, L.L.; JUSKO, W.L.; HARTZ, S. Contribution of cigaret smoking to cadmium accumulation in man. **The Lancet**, v.299, p.291-2, 1972 .

LÓPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M.J.; CAÑADAS, S.; GONZÁLEZ, M.P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radical Biology Medicine**, v.40, p.940-951, 2006.

LUKAWSKI, K.; NIERADKO, B.; SIEKLUCKA-DZIUBA, M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.27, p.575-584, 2005.

MEERSON, F. Z. Adaptation, stress and prophylaxis. **Metabolism Clinical North America**, v.30, p.695–728, 1984.

MENDES, R.A.; LEITE, N. **Ginástica Laboral. Princípios e Aplicações práticas**. 2ªed. Barueri: Manole, 2008. p.122.

NEWPORT, J.D.; STOWED, Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse life event. **Am. J. Psychiatry**, v.159, p.1265-83, 2002.

NZENGUE, Y.; STEIMAN, R.; GARREL, C.; LEF`EBVRE, E.; GUIRAUD, G. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCat cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium. **Toxicology**, v.243, p.193-206, 2008.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 416.

OLIVEIRA, R. C. **Avaliação do movimento de cádmio, chumbo e zinco em solo tratado com resíduo-calcário.** Lavras, 2003. 13 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA, Universidade Federal de Lavras, 2003.

POLIANDRI, A.H.B.; MACHIAVELLI, L.I.; QUINTEROS, A.F.; CABILLA, J.P.; DUVILANSKI, B.H. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. **Free Radical Biology Medicine**, v.40, p.679-688, 2006.

RAI, J.; PANDEY, S.N.; SRIVASTAV, R.K. Effect of immobilization stress on spermatogenesis of albino rats. **Journal of the Anatomical Society of Índia**, v.52, p.55-57, 2003.

SATARUG, S.; BAKER, J. R.; URBENJAPOL, S.; HASWELL-ELKINS, M.; REILLY, P.; WILLIAMS, D. J.; MOORE, M. R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicology Letters**, v. 137, p. 65-83; 2003.

SELYE, H. The general adaptive syndrome and disease of adaptation. **Journal Clinical Endocrinology**, v.6, p.117-230, 1946.

SELYE, H. **The stress of life.** New York: McGraw-Hill Books Inc., 1956. 324 p.

TEICHER, M. H. Wounds that time won't heal: the neurobiology of child abuse. **Cerebrum**, v. 2, p. 50-67, 2000.

TORRES, L. H. L.; MOREIRA, W. L.; ANNONI, R.; MAUAD, T.; MARCOURAKIS, T. Efeitos da inalação da fumaça do cigarro sobre o estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos jovens. **Revista Brasileira de Toxicologia**. São Paulo: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, v. 20, n.3, p. 318. nov. 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p.1-40, 2006.

VAN DE KAR, L. D.; RICHARDSON-MORTON, K. D.; RITTENHOUSE, P. A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Archives Experiment Pathology**, v.14, p. 133-173, 1991.

VAZ, A. J.; LIMA, I. V. Imunotoxicologia dos Metais. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 13, p. 407.

VEENEMA, A.H.; NEUMANN, I.D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 70, p. 274-285, 2007.

VIAENE, M. K.; MASSACHELEIN, R.; LEENDERS, L.; DE GROOF, M.; SWERTS, L. J.; ROELS, H. A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. **Occupational Environmental Medicine**, v. 57, p. 19-27, 2000.

WAALKES, M.P.; WAHBA, Z.Z.; RODRIGUEZ, R.E. Cadmiun. In: **Hazardous Materials Toxicology – Clinical Principles of Environmental Health**. Sullivan, Jr, J.B.; Krieger, G.R. (Eds.). Baltimore. Willians & Wilkins, 845-852, 1992.

WAALKES, M. P. Metal carcinogenesis. In: SARKAR, B. (Ed.). **Handbook of heavy metals in the environment**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 121-146.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. Review. **Mutation Research**, v. 533, p. 107-120, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. **Cadmium**. Geneva: WHO, 1992. (Environmental Health Criteria, 134).

YANG, C. F.; SHEN, H. M.; SHEN, Y.; ZHUANG, Z. X.; ONG, C. N. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). **Environmental Health Perspectives**, v.105, p.712-716, 1997.

CAPÍTULO III – ARTIGO

Este artigo está escrito segundo as normas do periódico Life Sciences, ao qual será submetido para publicação.

Immobilization stress enhance aggression in cadmium exposed rats.

Simone Galbiati Terçariol¹; José Ricardo de Arruda Miranda²; Antônio Francisco Godinho¹.

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu/ Instituto de Biociências/ Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu – SP.

²Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu/ Instituto de Biociências/ Departamento de Física e Biofísica, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu – SP.

Enviar correspondência para: Dr. Antônio Francisco Godinho, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu/ Instituto de Biociências/ Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu – SP. telefone/fax: +55 14 38154340, E-mail: godinho@ibb.unesp.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a agressividade de ratos expostos concomitantemente ao cádmio (Cd) e ao estresse por imobilização (EI). Ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Unesp, foram divididos em 2 grupos experimentais: A- animais intrusos (sem tratamento) e B- animais residentes, os quais receberam um dos seguintes tratamentos: acetato de sódio (controle); acetato de cádmio (solução a 50 ppm de Cd na água de beber); submetidos ao estresse por imobilização (30 minutos, 3 vezes ao dia, 5 dias por semana, durante 4 semanas); expostos ao Cd e concomitantemente submetidos ao estresse por imobilização. O comportamento de agressividade dos animais residentes foi avaliado ao final da última semana do experimento, baseando-se no paradigma do animal intruso/residente, segundo os seguintes parâmetros: número total de ataques (NTA), tempo de latência para a 1ª mordida (TLM), tempo total de manifestações de ataques (TTMA) e escore de agressão composta (EAC). Após a avaliação do comportamento de agressividade, o sangue e o cérebro dos animais foram coletados para dosagem de Cd por espectrometria de absorção atômica. O nível de cádmio no sangue não se alterou, mas no cérebro foi aumentado. Observou-se que exposição ao Cd ou estresse por imobilização sozinhos, não modificaram o NTA, TLM, TTMA ou EAC, porém, exposição ao Cd e EI concomitantemente aumentou significativamente o NTA, TTMA e o EAC. Esses resultados sugerem que exposição dos ratos à baixa dose de Cd associado ao estresse por imobilização pode causar interação e provocar aumento da agressividade dos animais. Um possível papel da serotonina (5-HT) e nível aumentado de cádmio no cérebro, como mecanismos responsáveis pela agressividade anormal observada, é discutido.

Palavras-Chave: Agressividade; Cádmio; Estresse; Neurocomportamento; Rato.

Abstract

The aim of this study was to assess the aggressiveness in rats concomitantly exposed to cadmium (Cd) and stress by immobilization (EI). Male Wistar rats, 70 days old, from the Biotério Central – UNESP, Botucatu - SP, were allocated into 2 experimental groups: A-intruder animals (without treatment) and B-resident animals, which received one of the following treatments: sodium acetate (control); Cadmium acetate (50 ppm Cd in drinking water); stress by immobilization (30 min, three times per day, five days per week, during four weeks); Cd exposure and concomitant stress by immobilization. The aggressive behavior of resident rats was evaluated at the end of the last experimental week based on the intruder/resident animal paradigm, according to the following parameters: total number of attacks (TNA), latent time for the first bite (LTB), total time of attack manifestations (TTAM), and composed aggression score (CAS). After aggressive behavior assessment, blood and brains were collected to determine Cd through atomic absorption spectrometry. Cd level was not altered in the blood but increased in the brain. Cd exposure or EI, alone, did not modify TNA, LTB, TTAM or CAS but Cd exposure and EI, concomitantly, increased significantly TNA, TTAM and CAS. These results suggest that rat exposure to low Cd level associated with stress by immobilization may lead to interaction with consequent increased animal aggressiveness. A possible paper of serotonin (5-HT) and increased brain Cd levels as responsible mechanisms by the observed abnormal aggressiveness is discussed.

Keywords: Aggressiveness; Cadmium; Stress; Neurobehavior; Rat.

Introdução

Cádmio é um metal tóxico que vem recebendo atenção aumentada pelos cientistas interessados em delinear os riscos de saúde associados com riscos ambientais. Em adição aos problemas documentados no setor industrial (Winter, 1982), a toxicidade ao cádmio é um assunto importante para a sub-população de usuários do tabaco que inclui milhões de pessoas por todo o mundo. Cádmio se acumula nas folhas de tabaco e mesmo fumando um único cigarro diário o indivíduo pode incrementar sua carga corporal do toxicante (Klaassen, 1990; Yve, 1992; Kalcher et al., 1993).

Dado que a meia vida biológica do Cd é medida em décadas nos sistemas dos mamíferos (Klaassen, 1990; Winter, 1982), uma extensiva agenda de pesquisa focalizando-se sobre o potencial de perigo deste contaminante xenobiótico parece ser justificada.

Cádmio é tóxico para vários órgãos; após exposição aguda, produz apoptose e necrose em fígado (Dudley et al., 1982; Habeebu et al., 1998), edema nos pulmões (Bus et al., 1978) e necrose hemorrágica nos testículos (Chiquoine and Suntzeff, 1965). Exposição crônica ao Cd prejudica primariamente os rins (Kotsonis and Klaassen, 1978), mas é também tóxico ao fígado (Habeebu et al., 2000a), ossos (Habeebu et al., 2000b) e sistema hematopoiético (Liu et al., 1999). Cádmio também é teratogênico (Holt and Werb, 1987; Nayak et al., 1989) e carcinogênico (Waalkes, 2000).

Menos satisfatoriamente descritos são os efeitos neurotóxicos do Cd (Cary et al., 1997). Dos riscos associados com exposição ao cádmio, desordens do sistema nervoso central (SNC) têm sido relatadas no caso da doença Itai-Itai e em vários estudos clínicos sobre crianças e trabalhadores expostos ocupacionalmente (Shukla and Singhal, 1984). Sintomas de efeitos sobre o SNC tais como dores de cabeça e vertigens têm sido observados também em trabalhadores expostos ao Cd (Shukla and Singhal, 1984).

Exposição crônica ao Cd em humanos tem sido relacionada a anosmia (Friberg, 1950; Kilburn and McKinley, 1996), prejuízos ao sistema nervoso autônomo (Bjorklund et al., 1981) e neuropatia periférica (Sato et al., 1978; Blum, et al., 1989; Viaene et al., 1999), incluindo perda da percepção de vibração, temperatura e da discriminação ao toque de uma agulha afiada-rombuda.

Vários estudos têm demonstrado uma correlação negativa entre níveis de cádmio em cabelos, inteligência e o desempenho escolar de crianças (Pihl and Parkes, 1977; Marlowe et al., 1983). Além disso, exposição ocupacional ao cádmio em adultos e exposição iatrogênica em crianças levam a efeitos neurocomportamentais (Gilberg et al., 1982), incluindo diminuição da capacidade de cognição (atenção e memória) e função psicomotora (Hart et al., 1989), da velocidade visuomotor e habilidade de concentração, e tempo de reação aumentado (Viaene et al., 2000).

Em estudos com animais, formas de comportamento anormal foram observadas em peixes expostos ao Cd através da água (Cearley and Coleman, 1974). Interessantemente, a via de exposição ao Cd na população em geral é por ingestão de água e alimentos contaminados. Pfisher et al. (1978), relataram que o comportamento de ratos é alterado por uma única injeção intraperitoneal de cádmio, porém não encontraram nenhuma alteração comportamental em ratos expostos cronicamente por 3-12 meses. Exposição crônica ao cádmio causou alterações comportamentais em ratos recém-nascidos expostos perinatalmente (Baranski, 1984; Ali et al., 1986; 1990), em ratos juvenis (Holloway and Thor, 1988) e em ratos adultos (Arito et al., 1981; Nagymajtenyi et al., 1997), incluindo o comportamento de agressividade.

Entre os efeitos de neurotoxicidade provocados pelo Cd, um ainda bem pouco estudado é o de aumentar a agressividade. Porém, poucos estudos em animais têm sido feito neste

sentido e quase nada ainda foi descoberto em humanos expostos de modo acidental ou ocupacional (Viaene, et al., 2000).

Além da exposição a fatores ambientais químicos como o cádmio, o estilo moderno de vida atual da população em geral faz com que os indivíduos estejam sujeitos a grande número de outros fatores, como por exemplo, os sócio-econômicos os quais são geradores de estresse. O estresse geralmente é acompanhado de alterações neuroendócrinas as quais podem contribuir para o aumento da ansiedade e da agressividade humana em geral (Veenema and Neumann, 2007).

Neste trabalho foi avaliada a agressividade de ratos expostos concomitantemente ao cádmio e ao estresse por imobilização, utilizando-se o paradigma do animal residente/intruso.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 64 ratos Wistar, machos, 70 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração ad libitum. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com as normas institucionais para animais de experimentação.

Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: um grupo de animais denominados intrusos (N=32) e outro de residentes (N=32). Os animais intrusos foram mantidos agrupados, no máximo quatro animais por gaiola. Os animais residentes foram

mantidos individualizados (um animal por gaiola) e divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- a) Grupo controle (N = 8): animais que receberam acetato de sódio na mesma concentração molar que o acetato de cádmio;
- b) Grupo cádmio (N = 8): animais que receberam acetato de cádmio, solução a 50 ppm de cádmio, pela água de beber;
- c) Grupo submetido ao estresse por imobilização (N = 8): animais que foram colocados em caixas acrílicas medindo 21 x 7,5 x 6,5 cm, por de meia hora, três vezes ao dia, com um intervalo de no mínimo 3 horas, 5 dias por semana, durante 4 semanas;
- d) Grupo cádmio mais estresse por imobilização (N = 8): animais que foram expostos ao cádmio e simultaneamente submetidos ao estresse por imobilização.

Avaliação do comportamento de agressividade

Este teste comportamental foi descrito por Long et al. (1996) para se avaliar o comportamento agressivo em ratos expostos a agentes químicos e é baseado no paradigma do animal intruso/residente. Este método permite a observação da interação social e do comportamento ofensivo do animal residente, bem como os elementos defensivos por parte do intruso refletindo a agressão intra-específica (Koolhaas and Bohus, 1991). O paradigma intruso/residente é um bom teste preditivo para validar a agressão humana (Oliver and Young, 2002). Este modelo tem a vantagem de detectar agressividade moderada envolvendo injúria mínima ao animal. Para o desenvolvimento do teste, os animais residentes foram colocados individualmente nas gaiolas e assim permaneceram por todo o período de tratamento e avaliações. Os animais intrusos foram colocados naturalmente agrupados nas gaiolas, não recebendo nenhum

tratamento; foram utilizados uma única vez ao dia para os testes e nunca voltaram ao mesmo animal residente. O período de isolamento dos residentes e duração dos experimentos foi de 4 semanas. Neste período, as gaiolas dos animais residentes não foram lavadas nem trocadas e, na última semana de experimento, a forração da gaiola não foi trocada. Para a avaliação da agressividade, um animal intruso foi colocado na gaiola de um residente e durante 15 minutos foram observados: tempo de latência para a primeira mordida, número total de ataques, tempo total de manifestações de ataque (compreendendo desde a piloereção, explosões de mordida, ameaças laterais e limpeza mais intensa). Um escore de agressão composta foi construído a partir de: $NTA + 0,2 \times TLM + 0,2 \times TTMA$. Durante o teste, o encontro entre os pares de animais foi filmado para posterior avaliação.

Curva de crescimento

O ganho de peso corporal dos animais foi avaliado através de pesagem semanal (em dia prefixado - último dia da semana) durante o período de tratamento.

Ingestão de líquido

Para permitir o cálculo da dosagem de Cd recebida por cada animal, foi medido uma vez por semana o volume de líquido ingerido pelos animais durante um período de 24 horas (solução de acetato de sódio ou de cádmio), em dia pré-fixado (último dia de cada semana, concomitantemente com pesagem dos animais).

Dosagem tecidual do cádmio

Após a avaliação comportamental, 5 animais residentes pertencentes a cada grupo de tratamento foram anestesiados com pentobarbital sódico para a coleta de sangue por punção cardíaca e em seguida eutanasiados em guilhotina. O cérebro total foi retirado,

pesado e utilizado para a dosagem de cádmio tecidual. A dosagem de cádmio foi feita utilizando-se espectrometria de absorção atômica, através de espectrofotômetro E.A.A. – GBC 932 AA (Athanasopoulos, 1994).

Drogas

Acetato de sódio (Synth) e acetato de cádmio (Synth).

Análise estatística dos resultados

Os resultados experimentais obtidos em cada grupo de tratamento foram comparados utilizando teste *t* de Student's e análise de variância (ANOVA). Resultados foram considerados significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) (Snedecor and Cochran, 1980).

Resultados

Concentração tecidual de cádmio no sangue e cérebro.

Na Tabela 1 pode-se observar que não houve variação nos níveis sanguíneos de cádmio entre os grupos Cd e Cd+EI, porém, a concentração de cádmio no cérebro dos animais expostos simultaneamente ao Cd e ao EI foi significativamente maior que a dos animais expostos somente ao Cd ($p < 0,021$), sugerindo que o estresse por imobilização pode ter alterado a cinética do metal pelo organismo dos animais favorecendo um acúmulo no cérebro.

Volume de líquido ingerido

Figura 1 mostra o volume de líquido ingerido (solução de acetato de sódio ou de cádmio) pelos animais, durante um período de 24 horas, medido uma vez por semana. Observa-se que houve uma diminuição significativa do volume de líquido ingerido, pelo

grupo Cd ($p<0,05$), na 4ª semana e pelo grupo EI ($p<0,01$), na 3ª semana, em relação ao grupo Ct. Com relação aos animais do grupo Cd+EI, a figura 1 mostra que houve uma diminuição significativa, do volume de líquido ingerido em todas as quatro semanas do experimento, em relação ao grupo Ct ($p<0,05$ na 1ª, 2ª. e 4ª. semanas e $p<0,001$ na 3ª. semana) e na primeira semana, em relação ao grupo Cd ($p<0,05$). Estes resultados parecem reforçar a sugestão de que o estresse por imobilização pode ter alterado a cinética do cádmio no organismo dos ratos favorecendo um acúmulo no cérebro, uma vez que, mesmo ingerindo uma quantidade menor de solução contendo Cd, os animais apresentaram maior quantidade do metal no tecido cerebral (tabela 1).

Dose média calculada de cádmio recebida pelos animais

A dose média de Cd, recebida pelos animais dos grupos Cd e Cd+EI é mostrada na figura 2. Observa-se que a dose média de Cd recebida pelos animais do grupo exposto simultaneamente ao Cd e ao EI foi menor que a recebida pelo grupo de animais expostos somente ao Cd ($p<0,077$).

Efeitos do cádmio sobre o NTA

Os efeitos do Cd, EI e Cd+EI sobre o número total de ataques estão apresentados na tabela 2. Cádmio ou EI sozinhos não modificaram significativamente o NTA; Cd+EI causou um aumento estatisticamente significativo do NTA, em relação ao controle ($p<0,05$) e também em relação ao ($p<0,05$) Cd e ao EI sozinhos.

Efeitos do cádmio sobre o TLM

Na tabela 2 observa-se que Cd, EI e Cd+EI não modificaram significativamente o tempo de latência para a 1ª mordida em relação ao grupo de animais que receberam solução de acetato de sódio.

Efeitos do cádmio sobre o TTMA

Os efeitos do Cd, EI e Cd+EI sobre o tempo total de manifestações de ataques são apresentados na tabela 2. Observa-se que cádmio ou estresse por imobilização sozinhos não modificaram o TTMA; Cd+EI causou um aumento estatisticamente significante do TTMA em relação ao controle ($p<0,05$) e também em relação ao EI ($p<0,05$) sozinhos.

Efeitos do cádmio sobre o EAC

Os efeitos do Cd, EI e Cd+EI sobre o escore de agressão composta são apresentados na tabela 2. Observa-se que cádmio ou estresse por imobilização sozinhos não modificaram o EAC; animais expostos simultaneamente ao Cd e ao EI tiveram um aumento significativo do EAC em relação ao grupo de animais controle ($p<0,05$) e também em relação ao grupo recebendo EI ($p<0,05$).

Curva de crescimento

Durante o experimento, os animais de todo os grupos (Ct, Cd, EI e Cd+EI), não apresentaram variações no ganho de peso corporal (dados não mostrados).

Discussão

O presente estudo examinou o comportamento agressivo de ratos submetidos concomitantemente ao estresse por imobilização e exposição ao cádmio.

Efeitos neurocomportamentais por metais pesados têm sido mostrados em humanos expostos e em animais experimentais e, durante o passar de vários anos, tem havido um renovado interesse pelos mecanismos através dos quais estes agentes desorganizam a função cerebral.

O comportamento de agressividade por si só nunca tem sido considerado como algo anormal na sociedade animal, uma vez que este comportamento está ligado ao desenvolvimento e à sobrevivência do indivíduo e da espécie (Haller and Kruk, 2006).

Em humanos, a maioria dos problemas ocorre quando a agressividade está associada a desordens psicológicas (Moran, 1999; Ohayon and Shapiro, 2000). Além disso, povos sofrendo de diferentes desordens se tornam agressivos de diferentes maneiras e, por isso, os estudos experimentais sobre agressividade anormal deveriam ser baseados em dois passos principais: (1) mimetizar as condições humanas que estão associadas com formas anormais de comportamentos agressivos e, (2) estudar os aspectos anormais da resposta comportamental e os mecanismos envolvidos (Haller and Kruk, 2006).

Um bem estabelecido e etiologicamente válido modelo de agressão ofensiva usado rotineiramente para testar o comportamento agressivo em ratos é o paradigma do animal intruso/residente (Oliver and Young, 2002). Sob este paradigma, o presente trabalho apresenta evidências de que baixa dose de cádmio ingerido cronicamente por ratos através da água de beber não tem influência sobre o nível de agressividade animal.

Embora alguns trabalhos existentes apontem o cádmio como um agente capaz de provocar agressividade anormal, os dados ainda são insuficientes e os mecanismos permanecem não identificados. Arito et al. (1981) encontraram aumento do

comportamento agressivo de ratos pela administração repetida de cádmio; Baranski (1984), Holloway and Thor, (1988) e Leret (2003) observaram agressividade em ratos juvenis; Desi et al. (1998) observaram agressividade em ratos em desenvolvimento.

Um circuito neural composto de várias regiões do córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, área pré-óptica medial, hipotálamo, córtex anterior cingulado, córtex insular, estriado ventral e outras estruturas interconectadas parecem ser implicadas na regulação da emoção (Davidson, 2000). Recentemente, estudos farmacológicos e genéticos têm expandido dramaticamente a lista de neurotransmissores, hormônios, citocinas, enzimas, fatores de crescimento, e moléculas sinalizantes que influenciam a agressão. Apesar desta expansão, serotonina (5-HT) permanece como o determinante primário na agressão entre machos enquanto que as outras moléculas parecem agir indiretamente através desta via (Nelson and Chiavegatto, 2001).

Toxicantes ambientais como metais pesados podem interagir organicamente, afetando negativamente a molécula sinalizante 5-HT (Leret et al., 2003). Considerando que ligeiras modulações dos níveis, turnover ou metabolismo de 5-HT, ou na ativação, densidade e afinidade de ligação ao receptor pode, por sua vez, afetar a agressividade por diferentes formas (Kruk, 1991), este poderia ser um mecanismo molecular através do qual o Cd influenciaria o comportamento de agressividade. Uma explicação para o fato do cádmio sozinho não ter modificado a agressividade dos animais no presente experimento, seria que como somente cerca de 5% do Cd ingerido é absorvido por via gastrointestinal (Waalkes et al., 1992), talvez o baixíssimo nível de dose de Cd recebido pelos ratos tenha sido insuficiente para alterar os mecanismos neurofisiológicos controladores da 5-HT.

Chiavegatto et al. (2001) ainda propõem uma ligação entre a molécula sinalizante óxido nítrico (NO) e a função da 5-HT em áreas cerebrais relacionadas à agressão, de tal

forma que um aumento do NO diminuiria os níveis de 5-HT e aumentaria a agressão. Não é possível afirmar com certeza que nossos resultados mostrando nenhum efeito do cádmio sozinho sobre a agressividade poderiam contrariar esta hipótese uma vez que o Cd, além de inibir enzimas responsáveis pela detoxificação de radicais livres (Jemai et al., 2007.), está implicado na geração de ERO incluindo o óxido nítrico (Galan et al., 2001; Lopez et al., 2006).

Adicionalmente, um número de estudos recentes, direcionados para alterações específicas quanto ao local ou quanto à atividade do receptor envolvido, lançam dúvida sobre o efeito regulatório inibitório da 5-HT sobre a agressão (de Almeida et al., 2005; de Boer and Koolhaas, 2005; Summers and Winberg, 2006; Veenema and Neumann, 2007). Isto sugere que ainda existe conflito entre os resultados que procuram explicar os mecanismos neurais envolvidos na agressão anormal.

De acordo com Koolhaas et al., 2007 os sinais e sintomas do estresse incluem distúrbios do sono, irritação, aumento da frequência cardíaca e respiratória, agitação e agressividade. Em humanos, o estresse também provoca ansiedade a qual está associada às pessoas com desordens de personalidade agressiva anti-social (Sareen et al., 2004). Em nossos experimentos, animais recebendo apenas estresse por imobilização não tiveram agressividade aumentada, sugerindo uma ineficácia do estresse em provocar agressividade anormal. Por outro lado, animais recebendo Cd cronicamente e que foram expostos ao EI, tiveram um aumentado nível de agressividade. Como é sabido que o Cd afeta negativamente a molécula da 5-HT (Leret et al, 2003) e o estresse reduz fortemente o turnover de 5-HT na região do hipocampo e córtex dorsal de ratos (Konstandi et al., 2000), ambos podendo levar ao aumento da agressão, os resultados obtidos no presente experimento com exposição simultânea ao Cd e ao estresse por imobilização, sugerem ocorrência de efeito aditivo dos dois tratamentos, levando à

expressão de agressividade anormal nos animais. Estes achados por sua vez reforçam a hipótese serotoninérgica na agressividade anormal, defendida por Nelson e Chiavegatto (2001).

Uma das manifestações neuroendócrinas do estresse é o aumento do nível de glicocorticóides o qual parece favorecer a agressão normal. Entretanto, já foi demonstrada uma consistente associação entre agressividade e baixo nível plasmático de glicocorticóides em crianças com distúrbios de conduta (Haller and Kruk, 2006) e também várias formas de agressão violenta exibidas por ratos deficientes em glicocorticoides (Halasz et al., 2002). Adicionalmente, estresse repetido ou crônico aplicado durante a puberdade acelerou a progressão do desenvolvimento de comportamento agressivo em hamsters machos (Delville et al., 2003) acompanhada de alterações neuroendócrinas em regiões cerebrais semelhantes à amígdala medial, que são ativas em ambos, estresse e agressão (Wommack et al., 2004).

Nossos resultados mostrando que o cérebro dos animais recebendo cádmio e submetidos ao EI contêm mais Cd que o dos animais que foram expostos somente ao cádmio, reforçam achados prévios (Clark et al., 1985; Murphy, 1997; Viaene et al., 2000) sugerindo que na exposição crônica o Cd é capaz de provocar alterações na barreira hemato-cerebral e se acumular no cérebro. Neste mesmo sentido, dados de Esposito et al., (2001) demonstraram que uma ativação dos mastócitos do cérebro devido ao estresse aumenta a permeabilidade da barreira hemato-cerebral.

Como no presente experimento, nos animais expostos simultaneamente ao Cd e ao EI o estresse pode ter favorecido de um modo importante a toxicocinética do metal, provocando distribuição e acumulação característica, um aumento da concentração do Cd em áreas importantes facilitadoras da agressão poderia ser o responsável pelo efeito de interação observado, com conseqüente aumento do comportamento de agressividade.

Em conclusão, baixa dose de cádmio oral ou estresse por imobilização sozinhos não alteram a agressividade em ratos, mas quando associados podem provocar agressividade aumentada. Este efeito aditivo pode ser provocado pelo aumento dos níveis de Cd no cérebro e estar relacionado com modificações do turnover da 5-HT ou de sua ação em receptores cerebrais específicos.

A extrapolação destes dados para o homem deve suscitar importantes questões para o tratamento psiquiátrico, das desordens caracterizadas pelo comportamento agressivo e impulsivo, as quais podem estar associadas a doenças, fatores ambientais e as várias formas de estresse a que os indivíduos estão submetidos.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Dr. Alaor Aparecido Almeida do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) pelas dosagens de cádmio.

Referências

- Ali, M. M.; Mathur, N.; Chandra, S. V., 1986. Developmental and long-term neurobehavioral toxicity of low levels in uterus cadmium exposure in rats. *Neurobehavior Toxicology Teratology* 8, 463-468.
- Ali, M. M.; Mathur, N.; Chandra, S. V., 1990. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 28, 653.
- Arito, H.; Sudo, A.; Suzuki, Y., 1981. Aggressive behavior of the rat induced by repeated administration of cadmium. *Toxicology Letters* 7, 457-461.
- Athanasopoulos, N., 1994. Flame methods: Manual GBC for atomic absorption. Victoria, Australia, 1-11.
- Baranski, B., 1984. Behavioural alterations in offspring of female rats repeatedly exposed to cadmium oxide by inhalation. *Toxicology Letters* 22, 53-61.
- Bjorklund, H.; Hoffer, B.; Olson, L.; Seiger, A., 1981. Differential morphological changes in sympathetic nerve fibers elicited by lead, cadmium, and mercury. *Environmental Research* 26, 69-80.
- Blum, L.W.; Mandel, S.; Duckett, S., 1989. Peripheral neuropathy and cadmium toxicity. *Pa. Medicine* 92, 54-56.
- Bus, J.S.; Vinegar, A.; Brooks, S.M., 1978. Biochemical and physiologic changes in lungs of rats exposed to a cadmium chloride aerosol. *American Review Respiratory Disease* 118, 573-580.
- Cary, R., Clarke, S., Delic, J., 1997. Effects of combined exposure to noise and toxic substances – Critical review of the literature. *The Annals of Occupational Hygiene* 41, 455-465.

Cearley, J.E.; Coleman, R.L., 1974. Cadmium toxicity and bioconcentration in large mouth bass and bluegill. *Bulletin Environmental Toxicology* 11, 146-151.

Chiavegatto, S.; Dawson, V.L.; Mamounas, L.A.; Koliatsos, V.E.; Dawson, T.M.; Nelson, R.J., 2001. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *PNAS* 98, 1277-1281.

Chiquoine, A.D.; Suntzeff, V., 1965. Sensitivity of mammals to cadmium necrosis of the testis. *Journal of Reproduction Fertilization* 10, 455-457.

Clark, D.E.; Nation, J.R.; Bourgeois, A.J., 1985. The regional distribution of cadmium in the brains of orally exposed adult rats. *Neurotoxicology* 6, 109-114.

Davidson, R.J., 2000. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation: a possible prelude to violence. *Science* 289, 591-594.

De Almeida, R.M.; Ferrari, P.F.; Parmigiani, S.; Miczek, K.A., 2005. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *European Journal Pharmacology* 526, 51-64.

De Boer, S.F.; Koolhaas, J.M., 2005. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *European Journal Pharmacology* 526, 125-139.

Delville, Y.; David, J.T.; Taravosh-Lahn, K.; Wommack, J.C., 2003. Stress and the development of agonistic behavior in golden hamsters. *Hormonal Behavior* 44, 263-270.

Desi, I.; Nagyrájtényi, L.; Schulz, H., 1998. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *Journal of Applied Toxicology* 18, 63-70.

Dudley, R.E.; Svoboda, D.L.; Klaassen, C.D., 1982. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicology Applied Pharmacology* 65, 302-312.

Esposito, P.; Gheorghe, D.; Kandere, K.; Pang, X.; Connolly, R.; Jacobson, S.; Theoharides, T.C., 2001. Acute stress increase permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Research* 888, 117-127.

Friberg, L., 1950. Health hazards in the manufacture of accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Medicine Scandinavica Supplement* 138, 240.

Galan, A.; Garcia-Bermejo, L.; Troyano, A.; Vilaboa, N.E.; Fernandez, C.; de Blas E.; Aller, P., 2001. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *European Journal of Cell Biology*, v.80, p.312-320.

Gilberg, C.; Noren, J.G.; Wahlstrom, J.; Rasmussen, P., 1982. Heavy metals and neuropsychiatric disorders in six-year-old children. Aspects of dental lead and cadmium. *Acta Paedopsychiatric* 48, 253-263.

Habeebu, S.S.; Liu, J.; Klaassen, C.D., 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicology Applied Pharmacology* 149, 203-209.

Habeebu, S.S.; Liu, J.; Liu, Y.; Klaassen, C.D., 2000a. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicology Sciences* 55, 223-232.

Habeebu, S.S.; Liu, J.; Liu, Y.; Klaassen, C.D., 2000b. Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂ – induced bone injury. *Toxicology Sciences* 56, 211-219.

Halasz, J.; Liposits, Z.; Kruk, M.R.; Haller, J., 2002. Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of far- and stress-related structures. *European Journal of Neurosciences* 15, 561-569.

Haller, J.; Kruk, M.R., 2006. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30, 292-303.

Hart, R.P.; Rose, C.S.; Hameer, R.M., 1989. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 11, 933-943.

Holloway, W.R.; Thor, D.H., 1988. Cadmium exposure in infancy affects activity and social behaviour of juvenile rats. *Neurotoxicology Teratology* 10, 135-142.

Holt, D.; Werb, M., 1987. Teratogenicity of ionic cadmium in the wistar rat. *Archive Toxicology* 59, 443-447.

Jemai, H.; Messaoudib, I.; Chaouch, A.; Kerkeni, A., 2007. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *Journal Trace Elements Medical Biology* 21, 269-273.

Kalcher, K.; Kern, W.; Pietsch, R., 1993. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Science Total Environmental* 128, 21-35.

Kilburn, K.H.; McKinley, K.L., 1996. Persistent neurotoxicity from a battery fire: Is a cadmium the culprit? *Journal Southern Medicine* 89, 693-698.

Klaassen, C.D., 1990. Heavy metals and heavy metal antagonists. In: Goodman, A. (Eds.), *The pharmacology basis of therapeutics*. Elms-ford: New York/Pergamon, 1592-1614.

Konstandi, M.; Johnson, E.; Lang, M.A.; Malamas, M.; Marselos, M., 2000. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. *Pharmacological Research* 41 (3), 341-346.

Koolhaas, J.M.; Boer, S.F.; Buwalda, B.; Reenen, K.V., 2007. Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution* 70, 218-226.

Koolhaas, J.M., Bohus, B., 1991. Animal models of human aggression. In: *Animal models in Psychiatry II*, Alan A. Boulton, et al. (Eds.), p.249-271, Humana Press, Clifton, New Jersey.

Kotsonis, F.N.; Klassen, C.D., 1978. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicology Applied Pharmacology* 46, 39-54.

Kruk, M.R., 1991. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neuroscience Biobehavior Review* 15, 527-538.

Leret, M.L.; Millan, J.A.S.; Antonio, M.T., 2003. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology* 186, 125-130.

Liu, J.; Liu, Y.; Habeebus, S.S.; Klaassen, C.D., 1999. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl₂ exposure. *Toxicology Applied Pharmacology* 159, 98-108.

Long, S.F.; Wilson, M.C.; Sufka, K.J.; Davis, W.M., 1996. The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 20, 839-856.

Lopez, E.; Arce, C.; Oset-Gasque, M.J.; Cañadas, S.; Gonzáles, M.P., 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology & Medicine* 40, 940-951.

Marlowe, M.; Errera, J.; Jacobs, J., 1983. Increased lead and cadmium burdens among mentally retarded children and children with borderline intelligence. *American Journal Mental Deficient* 87, 477-483.

Moran, P., 1999. The epidemiology of antisocial personality disorder. *Society Psychiatric Epidemiology* 34, 231-242.

Murphy, V.A. Cadmium: acute and chronic neurological disorders. In: Yasui, M.; Strong, M.J.; Ota, K. (Eds.) *Mineral and metal: neurotoxicology*. Boca Raton: CRC, 1997: 229-240.

Nagymajtenyi, L.; Schulz, H.; Desi, L., 1997. Behavioural and functional neurotoxicological changes caused by cadmium in a three-generational study in rats. *Human Experimental Toxicology* 16, 691-699.

Nayak, B.N.; Ray, M.; Persaud, T.V.; Nigli, M., 1989. Embryotoxicity and *in vivo* cytogenetic changes following maternal exposure to cadmium chloride in mice. *Experimental Pathology* 36, 75-80.

Nelson, R.J.; Chiavegatto, S., 2001. Molecular basis of aggression. *Neurosciences* 24, 713-719.

Ohayon, M.M.; Shapiro, C.M., 2000. Sleep disturbances and psychiatric disorders associated with posttraumatic stress disorder in the general population. *Comprehensive Psychiatry* 41, 469-478.

Oliver, B.; Yong, L.J., 2002. Animal models of aggression. In: Davis, K.L.; Charney, D.; Coyle, J.T.; Nemeroff, C. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. USA: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), cap. 118, 1699-1708.

Pfischer, W.R.; Pelligrino, L.J.; Yim, G.K.W., 1978. Behavioral aspects of cadmium toxicity in rats. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 37, 395.

Pihl, R.O.; Parkes, M., 1977. Hair element content in learning disable children. *Science* 198, 204-206.

Sareen, J.; Stein, M.B.; Cox, B.J.; Hassard, S.T., 2004. Understanding comorbidity of anxiety disorders with antisocial behavior: findings from two large comorbidity surveys. *Journal Nervous Mental Disorders* 192, 178-186.

Sato, K.; Iwamasa, T.; Tsutu, T.; Takeuchi, T., 1978. Na ultrastructural study of chronic cadmium choride-induced neuropathy. *Acta Neuropathology* 41, 185-190.

Shukla, G.S.; Singhal, R.L., 1984. The present status of biological effects of toxic metals in the environment: lead, cadmium and manganese, can. *Journal Physiological Pharmacology* 62, 1015-1031.

Snedecor, G.W.; Cochran, W.G., 1980. *Statistical Methods*. 7th ed. Iowa: Iowa State University Pres, 593.

Summers, C.H.; Winberg, S., 2006. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *The journal of Experimental Biology* 209, 4581-4589.

Veenema, A.H.; Neumann, I.D., 2007. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain, Behavior and Evolution* 70, 274-285.

Viaene, M. K.; Roels, H.A.; Leenders, J.; De Groof, M.; Swerts, L. J.; Lison, D.; Masschelein, R., 1999. Cadmium: a possible etiological factor in peripheral polyneuropathy. *Neurotoxicology* 20, 7-16.

Viaene, M. K.; Massachelein, R.; Leenders, L.; De Groof, M.; Swerts, L. J.; Roels, H. A., 2000. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occupational Environmental Medicine* 57, 19-27.

Waalkes, M.P.; Wahba, Z.Z.; Rodriguez, R.E., 1992. Cadmium. In: Hazardous Materials Toxicology – Clinical Principles of Environmental Health. Sullivan, Jr., J.B.; Krieger, G.R. (Eds.). Baltimore. Williams & Wilkins, 845-852.

Waalkes, M. P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 241-244.

Winter, H., 1982. The hazards of cadmium in man and animals. *Journal Applied Toxicology* 2, 61-67.

Wommack, J.C.; Salinas, A.; Melloni, R.H.; Jr and Delville, Y., 2004. Behavioural and neuroendocrine adaptations to repeated stress during puberty in male golden hamsters. *Journal Neuroendocrinology* 16, 767-775.

Yve, L., 1992. Cadmium in tobacco. *Biomedicine Environmental Science* 5, 53-56.

Tabela 1 – Concentração tecidual de cádmio (sangue e cérebro) em animais controle, expostos ao cádmio, submetidos ao estresse por imobilização e expostos ao cádmio e submetidos ao estresse por imobilização.

Tratamentos	Sangue total ($\mu\text{g/dl}$)	Cérebro total ($\mu\text{g/g}$)
Ct	ND	ND
Cd	$28,87 \pm 0,97$	$45,50 \pm 4,30$
EI	ND	ND
Cd + EI	$31,00 \pm 3,37$	$59,75 \pm 3,37^a$

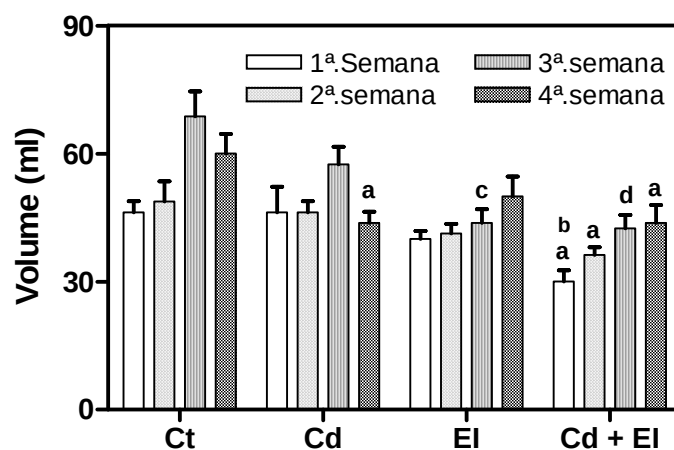
Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N = 8 animais). ^a $p < 0,021$ de Cd (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; EI=estresse por imobilização. ND= Não detectado (limite de detecção do aparelho = 0,009ppm).

Tabela 2 – Avaliação do comportamento de agressividade de ratos expostos ao cádmio e submetidos ao estresse por imobilização.

Avaliações	CT	Cd	EI	Cd + EI
NTA	70,25 ±2,28	79,62 ±2,18	74,00 ±2,69	93,5 ^{a,b,c} ±3,71
TLM	29,29 ±1,91	35,87 ±3,50	36,15 ±2,01	32,43 ±1,41
TTMA	244,14 ±13,72	257,37 ±13,21	221,00 ±15,60	299,75 ^{d,e} ±12,36
EAC	131,79 ±3,36	138,25 ±5,65	125,42 ±3,64	154,90 ^{f,g} ±5,74

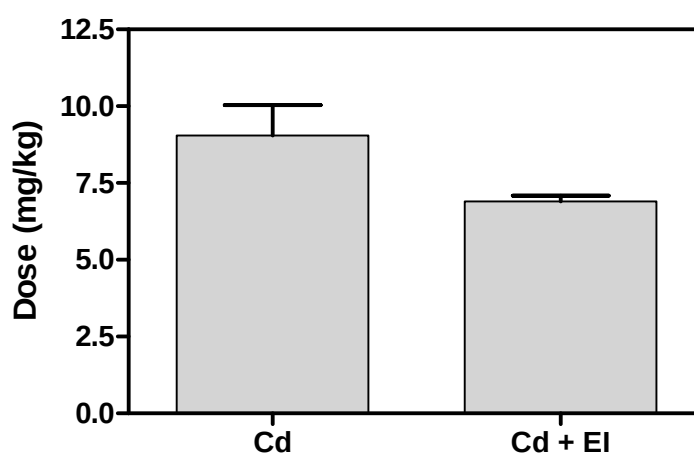
Os valores representam a média ± E.P.M. (N = 8 animais). ^a $p < 0,001$ de Ct ^b $p < 0,01$ de Cd ^c $p < 0,001$ de EI ^d $p < 0,05$ de Ct ^e $p < 0,01$ de EI ^f $p < 0,01$ de Ct ^g $p < 0,001$ de EI (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; EI=estresse por imobilização; NTA=número total de ataques; TLM=tempo de latência para a primeira mordida; TTMA=tempo total de manifestações de ataque; EAC=escore de agressão composta.

Figura 1: Quantidade do volume de líquido ingerido por animais expostos ao cádmio e submetidos ao estresse por imobilização.



Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N=8 animais). ^a $p < 0,05$ de Ct ^b $p < 0,05$ de Cd ^c $p < 0,01$ de Ct ^d $p < 0,001$ de Cd (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; EI=estresse por imobilização.

Figura 2: Dose média calculada de cádmio recebida pelos animais expostos ao cádmio e expostos ao cádmio e submetidos ao estresse por imobilização.



Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. (N = 8 animais). Comparação utilizou teste *t* de Student's. Cd=cádmio; EI=estresse por imobilização.