



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ISABELE FABRICIA TAKEDA MARIANO DA SILVA

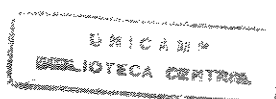
ANÁLISE DAS DIFERENTES CLASSES DA FOSFATASE ÁCIDA E
ESTUDO MORFOHISTOPATOLÓGICO EM ÓRGÃOS DE RATOS
INTOXICADOS POR CHUMBO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Isabele Fabricia Takeda
Mariano da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.
28/01/00

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular na área
de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga

2000



UNIDADE	B. C.
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	Si 38a
V.	Ex.
TOMBO PD/	40858
PREÇO	278/00
C	D ☒
PREÇO	311,00
DATA	04/04/00
N.º CPD	

CM-00139657-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38a **Silva, Isabele Fabricia Takeda Mariano da**
 Análise das diferentes classes da fosfatase ácida e estudo
 morfohistopatológico em órgãos de ratos intoxicados por chumbo/
 Isabele Fabricia Takeda Mariano da Silva. – Campinas, SP: [s.n.],
 2000.

116f:ilus.

Orientador: Eulázio Mikio Taga
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Fosfatase ácida. 2. Chumbo. 3. Rato. I. Taga, Eulázio Mikio.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Data da Defesa: 28/01/2000

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr Eulázio Mikio Taga (Orientador)

Prof. Dr. José Camillo Novello

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Suplentes:

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais *Marcondes e Maria José*,
pelo amor e cuidado que sempre me dedicaram,
pela confiança e investimento no meu
desenvolvimento intelectual, psíquico e
espiritual.

Aos meus irmãos *Marcondes e Marcos* pela
amizade e apoio.

A minha avó *Alba* pelo carinho, confiança e
dedicação.

Ao meu esposo *Maury* pela paciência,
dedicação, carinho, amizade e incentivo durante
esta caminhada e, principalmente, pelo seu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga, meu orientador, que acreditou e me incentivou na realização deste trabalho, na mesma área que hoje ele tanto se destaca. Mestre e Pesquisador incansável, que oculta atrás de sua sabedoria uma grande pessoa.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, profissional dedicado e competente, agradeço a amizade e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, incansável pesquisador, agradeço a amizade, os conselhos e observações que foram muito importantes na execução e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cícero Meneguette, pela amizade, dedicação e colaboração, que foram essenciais para a realização e conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Marília A. R. Buzalaf pelo apoio e estímulo dedicados.

À Tânia Cestari pela colaboração e dedicação, que foram de grande importância na realização deste trabalho.

À amiga e companheira Thelma Lopes Silva pela amizade, apoio e estímulo dedicados.

À Carmem e Patrícia pelo apoio e companheirismo.

Ao Ovídio pela amizade e atenção.

À todos os colegas do curso de pós-graduação em Bioquímica, pelo agradável convívio.

Ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À todos do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica, I.B./UNICAMP.

À CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURA	I
--------------------------	----------

LISTA DE FIGURAS	II
-------------------------------	-----------

LISTA DE GRÁFICOS	V
--------------------------------	----------

RESUMO	VI
---------------------	-----------

ABSTRACT	VII
-----------------------	------------

1 INTRODUÇÃO	1
---------------------------	----------

2 REVISÃO DE LITERATURA	4
--------------------------------------	----------

2.1 FOSFATASE ÁCIDA	4
---------------------------	---

2.1.1 Mecanismo de Reação	4
---------------------------------	---

2.1.2 Distribuição da Fosfatase Ácida	5
---	---

2.1.3 Formas Isoenzimáticas	7
-----------------------------------	---

2.1.4 Proteína Tirosina Fosfatase e Proteína Tirosina Quinase	9
---	---

2.2 CHUMBO	13
------------------	----

2.2.1 Histórico	13
-----------------------	----

2.2.2 Absorção	14
----------------------	----

2.2.3 Distribuição no Organismo	17
---------------------------------------	----

2.2.4	Eliminação	21
2.2.5	Ação Tóxica	22
2.2.5.1	Sistema Hematopoiético	23
2.2.5.2	Sistema Nervoso	24
2.2.5.3	Sistema Auditivo	28
2.2.5.4	Sistema Renal	29
2.2.5.5	Sistema Gastrointestinal	30
2.2.5.6	Fígado	31
2.2.5.7	Sistema Reprodutor	31
2.2.5.8	Carcinogenicidade	32
2.2.5.9	Sistema Cardíaco	33
2.2.5.10	Sistema Imunológico	33
2.2.6	Parâmetros de Controle de Exposição ao Chumbo	34
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAL	38
4.1.1	Animais	38
4.1.2	Reagentes e Soluções	38
4.2	MÉTODOS	39
4.2.1	Tratamento	39
4.2.2	Obtenção dos Órgãos	39
4.2.3	Obtenção do Extrato para Análise Enzimática	40
4.2.4	Determinação da Atividade Enzimática	40
4.2.5	Determinação das Isoenzimas da Fosfatase Ácida	42
4.2.6	Determinação de Proteínas	42
4.2.7	Análise Morfohistopatológica	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Efeito Do Chumbo Sobre O Desenvolvimento Ponderal Dos Ratos	45
5.2	Efeito Do Chumbo Na Atividade Da Fosfatase Ácida Total , <i>AMr</i> e de <i>BMr</i>	47
5.3	Efeito Do Chumbo Sobre a Histoarquitetura Dos Órgãos Dos Ratos	54
5.3.1	Testículo	54
5.3.2	Intestino	57
5.3.3	Rim	60
5.3.4	Baço	63
5.3.5	Fígado	66
5.3.6	Estômago	69
5.3.7	Coração	73
5.3.8	Pulmão	76
5.3.9	Cérebro	81
5.3.10	Cóclea	84
6	DISCUSSÃO	88
7	PERSPECTIVAS	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AE	Atividade Específica
ALA	Ácido Aminilevulínico
ALA-D	δ -Ácido Aminolevulínico Desidratase
ALA-S	δ -Ácido Aminolevulínico Sintetase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AMr	Alta Massa Molecular Relativa
AR	Atividade Relativa
ATP	Adenosina Trifosfato
BMr	Baixa Massa Molecular Relativa
COPRO-U	Coproporfirina Urinária
FEP	Porfirina Eritrocitária Livre
FMN	Flavina Mono Nucleotídeo
GTP	Guanosina Trifosfato
IMr	Intermediária Massa Molecular Relativa
NADP⁺	Nicotinamida Adenina Difosfato
PBG	Porfobilinogenio
pHMB	p-Hidroximercuribenzoato
pNPP	p-Nitrofenil Fosfato
PTK	Proteína Tirosina Quinase
PTPP	Proteína Tirosina Fosfatase
Py-5-N	Pirimidina-5-Nucleotidase
SNC	Sistema Nervoso Central
Tyr-P	Tirosina Fosfato

FIGURAS

FIGURA 1 - Contaminação por chumbo através das vias cutânea, digestiva e respiratória	15
FIGURA 2 - Efeito do chumbo na Biossíntese do Heme	25
FIGURA 3 - Testículo	55
FIGURA 4 - Testículo	56
FIGURA 5 - Intestino	58
FIGURA 6 - Intestino	59
FIGURA 7 - Rim	61
FIGURA 8 - Rim	62
FIGURA 9 - Baço	64
FIGURA 10 - Baço	65
FIGURA 11 - Fígado	66

FIGURA 12 - Fígado	67
FIGURA 13 - Fígado	68
FIGURA 14 - Estômago	70
FIGURA 15 - Estômago	71
FIGURA 16 - Estômago	72
FIGURA 17 - Coração	74
FIGURA 18 - Coração	75
FIGURA 19 - Pulmão.	77
FIGURA 20 - Pulmão.	78
FIGURA 21 - Pulmão.	79
FIGURA 22 - Pulmão.	80
FIGURA 23 - Cérebro	82
FIGURA 24 - Cérebro	83

FIGURA 25 – Cóclea 85

FIGURA 26 – Cóclea 86

FIGURA 27 – Cóclea 87

GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Variação Ponderal dos Ratos Controles e Tratados	46
GRÁFICO 2 - Efeito do Chumbo na atividade da Fosfatase Ácida Total em Diferentes Órgãos de ratos	49
GRÁFICO 3 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade da Fosfatase Ácida na Presença de Tartarato	50
GRÁFICO 4 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade da Fosfatase Ácida na Presença de pHMB	51
GRÁFICO 5 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade Relativa da Fosfatase Ácida na Presença de Tartarato	52
GRÁFICO 6 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade Relativa da Fosfatase Ácida na Presença de pHMB	53

RESUMO

O chumbo é o metal tóxico mais ubiquamente distribuído e detectável em praticamente todas as fases inertes do meio ambiente e em todos os sistemas biológicos. O efeito tóxico do chumbo envolve vários sistemas orgânicos e atividades bioquímicas. Nesse trabalho foi estudado o efeito do chumbo na atividade da fosfatase ácida e as alterações morfológicas resultantes.

Nesta pesquisa foram utilizados 45 ratos “*Wistar*” machos albinos, com dois meses de idade, sendo 15 do grupo controle e 30 do grupo tratado. Para o grupo tratado foi dado, diariamente, 0,5 ml de acetato de chumbo (45 mg/Kg), intragastricamente, enquanto que o grupo controle recebia apenas água (0,5 ml). Após 06 semanas (42 dias), os animais foram decapitados e os órgãos (testículo, intestino, rim, baço, fígado, estômago, coração, pulmão, cérebro e cóclea) removidos para análises. A atividade enzimática no extrato foi determinada em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 à 37°C, por dois minutos, usando 5mM de pNPP como substrato. Tartarato (0,1M) e pHMB (10mM) foram utilizados como inibidores da fosfatase ácida de *AMr* e *BMr*, respectivamente. No grupo tratado as fosfatases de *AMr* e *BMr* foram similarmente inibidas (70%) em todos os órgãos, em relação ao grupo controle.

Várias alterações foram encontradas nos diversos tecidos (analisados por microscopia óptica), como degeneração e desorganização celular, grânulos de pigmentos enegrecidos intra-citoplasmáticos, hiperemia, aumento da basofilia no osso coclear, etc.

ABSTRACT

Lead is the most ubiquitous toxic metal and is detectable in practically all phases of the inert environment and in all biological systems. The toxic effects of lead involve several organs systems and biochemical activities. In this work we studied the effect of lead on acid phosphatase activity and the morphologic changes.

Male albino *Wistar* rats (2-months years old) were used at the experiments. To the treated group were given 0.5 ml lead acetate (45 mg/Kg weight daily), intragastrically, while the control group received water (0.5 ml). After six weeks (42 days), the animals were decapitated and the organs (testicle, intestine, kidney, spleen, liver, stomach, heart, lung, brain and cochlea) removed for analyses. The enzyme activity in the extract was determined in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, 37°C, for 2 minutes, using 5 mM pNPP as substrate. Tartrate (0.1 M) and pHMB (10 mM) were used as inhibitors of high and low *Mr* acid phosphatases, respectively. In the treated group the high and low *Mr* acid phosphatase were similarly inhibited (70%) in all organs, in relation to the control group.

Several changes were found in the tissue (analyzed by light microscopy) as cellular degeneration and disorganization, intracitoplasmic pigment granules, hyperemia, increase of basophilic in the cochlea bone, etc.

1. INTRODUÇÃO

A fosfatase ácida é uma enzima que catalisa e hidrolisa uma variedade de ésteres ortofosfato e está amplamente distribuída na natureza (reino animal, vegetal e em microorganismos). Essa enzima existe sob diversas formas em um mesmo tecido, diferindo quanto ao peso molecular, localização celular, especificidade ao substrato, sensibilidade a inibidores, ponto isoeletrico (pI), presença e número de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica (FUJIMOTO et al, 1984). A atividade alterada da fosfatase ácida (quer aumentada, quer diminuída) está associada com vários processos patológicos, especialmente infecções, inflamações e tumores (TAGA, 1979; GRANJEIRO, 1994).

Existe na literatura uma grande quantidade de informações sobre as fosfatases ácidas, porém há muito a se pesquisar sobre sua implicação nos mais diversos processos celulares e sobre sua(s) função(ões) fisiológica(s). Os estudos e conhecimentos de suas características em situações normais ou durante determinados processos é de fundamental importância no estudo de seu papel fisiológico .

As fosfatases ácidas, mais especificamente as de *BMr*, devido a sua sensibilidade a metais pesados, vem sendo utilizada como um marcador, correlacionando a diminuição da sua atividade com o nível de contaminação. Portanto estudos deste tipo são extremamente importantes uma vez que a exposição

a metais pesados ainda é uma constante no mundo atual e as conseqüências dessa exposição ainda não são completamente conhecidas a nível de atividade enzimática.

Dentre os metais pesados a que o ambiente está exposto, o chumbo é um metal usado em muitos materiais e produtos, o seu consumo é alto nas indústrias e sua ação tóxica múltipla. Quando absorvido dentro do organismo ataca vários órgãos e sistemas. O chumbo quando absorvido em teores elevados, provoca diversas alterações bioquímicas, todas elas deletérias, não existindo evidências de uma função essencial do mesmo no organismo humano. Esse metal, apresenta uma configuração eletrônica que lhe confere valência dois e uma orbital 6p livre, permitindo formar ligações covalentes principalmente com átomos de enxofre de compostos biológicos e, também, com grupos amínicos, carboxílicos e imidazólicos. Nestas circunstâncias, o chumbo pode provocar alterações nas estruturas terciárias das proteínas e ao mesmo tempo, alterar ou destruir a função bioquímica normal.

O conhecimento da fisiopatogenia da intoxicação, bem como a identificação de um biomarcador sensível a detecção precoce da intoxicação pelo chumbo, é de suma importância para o desenvolvimento de programas de prevenção e tratamento das futuras lesões que o chumbo pode causar no organismo. Porém há poucos trabalhos sobre a ação tóxica do chumbo na fosfatase ácida total e nenhum sobre a sua influência na fosfatase ácida de AMr e/ou de BMr “*in vivo*”. O mesmo foi constatado com relação a influência do chumbo na histoarquitetura de diferentes órgãos de animais. Foram encontrados, somente, estudos sobre alterações morfohistopatológica dos testículos, rim, baço, coração e cérebro e nada sobre o intestino, fígado, estômago, pulmão e cóclea. O que existem, são estudos sobre a sintomatologia nos casos de intoxicações por este metal.

Nesta pesquisa foi possível observar, que além da escassez de trabalhos específicos com fosfatase ácida, chumbo e suas possíveis alterações morfohistopatológicas, a maioria (70%) dos trabalhos existentes sobre chumbo são anteriores a década de 90.

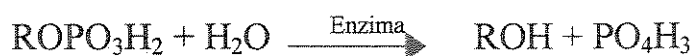
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fosfatase Ácida

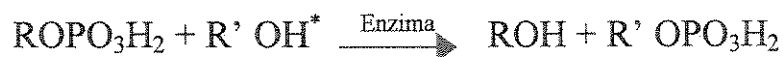
2.1.1 Mecanismos de reação

As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) se caracterizam pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transforilação (SAEED et al, 1990), como esquematizado a seguir:

Hidrólise:



Transforilação:



* Aceptor do Fosfato

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos, sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e

monoalquilfosfato em pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase de glóbulos brancos que catalisa essa reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0. Inicialmente a diferença entre as fosfatases ácida e alcalinas era baseada somente no pH ótimo para a atividade enzimática. NEUMAN (1968) observou que o mecanismo de reação era diferente para as duas enzimas, onde a fosfatase ácida requer para a sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. CHAIMOVICH e NOME (1970) relataram a atividade das fosfatases ácidas com ausência de cátions mono e divalentes no meio de reação, enquanto as fosfatases alcalinas requerem metais, principalmente Mg^{2+} , para sua atividade.

2.1.2 Distribuição da Fosfatase Ácida

A fosfatase ácida é amplamente distribuída na natureza, tanto no reino animal (ZHANG e VAN ETTEN, 1991; BUZALAF et al., 1998; GRANJEIRO et al., 1997; DA Silva, 1999), vegetal (PANARA et al., 1990), em microorganismos (OSTANIN et al., 1995; LI e STROHL, 1996; HENGGE et al., 1997). No interior celular as fosfatases ácidas são encontradas nos lisossomos, nos microsossomos (LIN e FISHMAN, 1972), aparelho de Golgi (COLEMAN et al., 1980) e membrana celular (HIMENO et al., 1989).

No reino vegetal, existem muitos relatos sobre a identificação e purificação de fosfatase ácida em tecidos de plantas (MIERNYK, 1992).

Em plantas, sabe-se que o fosfato está envolvido em uma variedade de reações durante o desenvolvimento celular, com a formação de ácidos nucleicos, fosfolípidos, açúcares fosfatados, entre outras. BASHA (1984) relata a possível participação desta enzima no metabolismo do fósforo, elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento normais dos órgãos das plantas. As fosfatases ácidas em plantas têm sido detectadas em formas moleculares múltiplas e algumas delas apresentam-se como glicoproteínas.

TAGA (1979) destaca a ocorrência da fosfatase ácida em diversos tecidos animais, tais como: próstata, placenta, corpo lúteo, testículo, útero, cérebro, fígado, tireóide, coração, rim, baço, glândulas salivares, osso, dente, periodonto, gengiva, pele, nervo e gânglios nervosos. No sangue, em eritrócitos e leucócitos, como no plasma onde pode ser utilizado para o diagnóstico de algumas doenças. Nos músculos esqueléticos e cardíaco, no pâncreas e na mucosa do intestino delgado são encontradas em pequenas quantidades. De modo geral, é encontrada nos fluidos corporais: plasma e líquido intersticial, líquido sinovial, líquido amniótico, fluido uterino, nas secreções, como saliva, sêmen e mecônio, no leite.

Células de origem mesenquimal, que estão ativamente envolvidas na digestão intra e/ou extra celular, bem como células epiteliais, contêm elevados níveis de atividade da fosfatase ácida. A distribuição e propriedades da fosfatase ácida de células de origem mesenquimal, indicam uma inter-relação entre células mononucleares e multinucleares ativamente envolvidas em algum processo digestivo (EGGERT e GERMAIN, 1980). No interior celular são encontradas invariavelmente nos lisossomos (DE DUVE et al., 1955), no citoplasma (DE ARAÚJO et al., 1976),

nos microssomos (LIN e FISHMAN, 1972), aparelho de Golgi (JONESCU e JONESCU, 1970) e membrana celular (HIMENO et al., 1989).

A fosfatase ácida foi utilizada como ferramenta para estudo histoquímico dos tecidos, como na identificação de osteoclastos (HERMANN, 1987), fibroblastos secretando ou reabsorvendo colágeno (YAJIMA, 1988), em células espermáticas de *Ceratis capitata*, onde a enzima estaria, possivelmente, envolvida no metabolismo do fosfato (BÁO e DOLDER, 1990) e como marcador no processo de mielinização em cérebros de ratos em desenvolvimento (NG; CHAN e TAM, 1993).

2.1.3 Formas Isoenzimáticas

Existem diversas classes de fosfatase ácida em um mesmo tecido, formas estas distintas quanto à massa molecular (*Mr*), especificidade quanto aos substratos, sensibilidade a inibidores, ponto isoelétrico (*pI*), presença e número de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica. As fosfatases ácidas de *AMr*, maior que 100 kDa, encontram-se geralmente na fração lisossomal das células; as fosfatases ácidas de *BMr*, menos que 20 kDa, encontra-se no citossol juntamente com as fosfatases ácidas de massa molecular intermediária (*IMr*), ao redor de 40 kDa. Outro fator que permite diferenciar as fosfatases ácidas, está relacionado aos seus inibidores, onde as formas de *AMr* são fortemente inibidas por tartarato e fluoreto (DI PIETRO e ZENGERLE, 1967), enquanto as de *BMr* são altamente sensíveis ao pHMB, e as de *IMr* são pouco sensíveis ao tartarato e pHMB e íons metálicos

(HAYMAN et al., 1989). Com relação a especificidade de substratos, a fosfatase ácida de *BMr* é mais restrita que a de *AMr*, hidrolizando preferencialmente pNPP e FMN e Tyr-P (TAGA e VAN ETTEN, 1982; DA Silva, 1999), enquanto a de *AMr* catalisa a hidrólise de muitos fosfo monoesteres (DE ARAÚJO et al., 1976). Já as de *IMr* apresentam alta afinidade por nucleosídeos di e trifosfatos e são fortemente inibidas por molibdato (KETCHAM et al., 1985).

Diversos autores associam a atividade enzimática alterada (aumentada ou diminuída) à diversos estados patológicos, especialmente aqueles envolvendo processos infecciosos, inflamatórios ou tumorais. Exemplificando podemos citar que os níveis ou a atividade da fosfatase ácida de *AMr* e *IMr* encontram-se aumentadas no extrato de tecido gengival de pacientes com periodontopatias (KINA, 1987), no soro de pacientes com câncer de próstata (KONTTURI, 1991), de pacientes com alterações renais (KUMAR e GUPTA, 1971), na leucemia retículo-endotelial (YAM et al., 1972), no fluido uterino humano, podendo ser um índice de infertilidade (SINGH, 1991).

De maneira geral, as fosfatases ácidas de animais podem ser classificadas em 4 classe, de acordo com a *M_r* e sua localização subcelular, a saber: fosfatase ácida-I, 200 kDa, associada à fração microssomal, fosfatase ácida-II, 100 kDa, de origem lisossomal, fosfatase ácida-III, 40 kDa e fosfatase ácida-IV, de 8 a 18 kDa, ambas solúveis no citoplasma (DE ARAÚJO et al., 1976).

Porém, quanto às características físico-químicas e cinéticas, podem se enquadrar em 3 grupos, como já foi descrito acima. As fosfatases ácidas de *AMr* (maior que 100 kDa), que são inibidas por tartarato e fluoreto, são insensíveis a

agentes bloqueadores de grupos -SH e ao formaldeído e apresentam ao menos uma histidina essencial à catálise, localizada próxima ao sítio ativo (TAGA, 1979). As fosfatases ácidas de *BMr* (menor que 20 kDa), apresentam grupos -SH reduzidos próximos ou no sítio ativo, implicados no mecanismo de catálise (BALDIJÃO, 1972). São apontadas como isoenzimas importantes no metabolismo de células diferenciadas não proliferantes do tecido nervoso (CHAIMOVICH e NOME, 1970), em eritrócitos (WHITE e BUTTRWORTH, 1971) e em células musculares (BAXTER e SUELTER, 1984). Apresentam marcante inibição por agentes bloqueadores de grupos -SH, metais pesados e são insensíveis ao tartarato e fluoreto (BALDIJÃO, et al., 1975). Suas atividades são independentes de metais e exibem uma maior especificidade quanto ao substrato (FILBURN e VANABLE Jr., 1973). Uma terceira classe de fosfatase ácidas compreende as enzimas de *IMr* (entre 30 e 60 kDa) que apresentam uma baixa especificidade quanto ao substratos embora possa-se identificar uma atividade significativa sobre nucleosídeos fosfatados, pirodoxal-5-fosfato, β -glicerofosfato, e NADP^+ . A sensibilidade a tartarato e fluoreto é variável, mas íons metálicos e pHMB interferem fracamente (VICENT e AVARILL, 1990).

2.1.4 Proteína Tirosina Fosfatase e Proteína Tirosina Quinase

A fosforilação e defosforilação de resíduos de tirosina em proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos, é a chave na regulação do metabolismo, expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (JOHNSON e BARFORD, 1993; ZHANG, 1998).

O nível de fosforilação em qualquer momento, reflete a atividade relativa de proteínas quinases e fosfatases que catalisam o processo de interconversão (RAMPONI e STEFANI, 1997).

Muito embora a presença do fósforo nas proteínas seja conhecida há cerca de 100 anos, sua importância tem crescido desde a descoberta da regulação de enzimas pela fosforilação reversível. O interesse atual remonta aos trabalhos de KREBS, FISHER e LARNER no período de 1955 a 1970, quando descobriram que o controle neural e hormonal do metabolismo do glicogênio nos músculos esqueléticos era mediado por mudanças no estado de fosforilação das enzimas glicogênio fosforilase, fosforilase quinase e glicogênio sintase. Estas permaneceram como os únicos exemplos deste fenômeno até os anos 60 quando a situação mudou rapidamente após a descoberta da proteína quinase dependente do AMP-cíclico.

As estruturas e funções de algumas proteínas quinases e seus mecanismos de regulação são bem conhecidos. Algumas são específicas para determinado substrato enquanto outras fosforilam uma variedade de proteínas intracelulares. A atividade de proteínas quinases são controladas por diversos meios, mais freqüentemente por segundo mensageiros e efetores alostéricos e por fosforilação (COHEN, 1992).

Nas células normais, muitos receptores de fatores de crescimento possuem domínios intracelulares com atividade proteína tirosina quinase (PTK). Um grande número de produtos de oncogenes tem estruturas semelhantes a estes receptores porém, permitem uma atividade PTK desregulada, caracterizada pela

fosforilação inadequada em tirosina com conseqüente proliferação descontrolada e oncogênese (RAMPONI e STEFANI, 1997).

Para que o sistema de fosforilação da tirosina sirva como um importante mecanismo fisiológico de regulação, o processo deve ser reversível, isto é, o processo de remoção do fosfato do resíduo de tirosina tem que existir. A atividade enzimática responsável pela desfosforilação de proteínas fosforiladas em tirosina é desempenhado pelas fosfotirosina proteínas fosfatases (PTPP). É razoável esperar que o nível de proteínas fosforiladas em tirosina na célula, resulte do balanço da atividade tanto de PTK quanto das PTPP (WALTON e DIXON, 1993).

Bioquimicamente, estas fosfatases podem ser identificadas pela sensibilidade ao vanadato, insensibilidade ao ácido ocadáico, independência de íons metálicos, habilidade em defosforilar p-nitrofenilfosfato (pNPP) e total perda de atividade após mutação da cisteína do sítio ativo por serina. Todas estas fosfatases parecem preferir peptídeos contendo fosfotirosina, apesar de um subgrupo apresentar uma atividade dupla, também hidrolisando fosfotreonina e fosfoserina. Com base na função, estrutura e seqüência, estas fosfatases podem ser agrupadas em quatro famílias principais: *i*) as proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) específicas; *ii*) as fosfatases com dupla especificidade tipo VH1; *iii*) as cdc25; *iv*) as proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular relativa ($BM_r < 20$ kDa) (JIA, 1997).

As proteínas tirosina fosfatase específicas são as enzimas melhor estudadas na superfamília das PTPs, apresentam alta massa molecular relativa ($AM_r > 100$ kDa) e estão envolvidas em uma grande gama de vias de sinalização (JIA, 1997).

As fosfatases com dupla especificidade tipo VH1 são capazes de hidrolizar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo tanto fosfotirosina como fosfoserina/treonina, estas enzimas regulam a transdução de sinais mitogênicos e desempenham um importante papel no controle do ciclo celular e as fosfatases cdc25 são enzimas relacionadas com o controle da divisão celular (JIA, 1997).

Recentes estudos levaram à identificação de um grupo de PTPs citoplasmáticas, as proteínas tirosina fosfatases de *BMr*, caracterizadas pela reduzida massa molecular (~18 kDa). Estas enzimas não compartilham qualquer homologia de seqüência com qualquer das outras PTPs, exceto pelo padrão do sítio ativo e do mesmo mecanismo de catálise. As PTPs de *BMr* diferem das fosfatases ácidas clássicas pelo mecanismo catalítico, o qual procede via formação de um fosfointermediário envolvendo uma cisteína altamente conservada. As PTPs de *BMr* foram identificadas em procariotos, leveduras e mamíferos, embora os genes para as outras PTPs não tenham sido encontrados em procariotos (RAMPONI e STEFANI, 1997; DA Silva, 1999). O primeiro relato sobre o papel fisiológico das fosfatases ácidas de *BMr* ocorreu em 1989, quando RAMPONI et al. observaram que a PTP de *BMr* do fígado bovino defosforilava eficientemente *in vitro* o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-r). Posteriormente, utilizando peptídeos sintéticos contendo fosfotirosina, STEFANI et al., (1993) relataram uma atividade hidrolítica preferencial sobre o peptídeo derivado de um sítio de fosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-r).

2.2 Chumbo

2.2.1 Histórico

O chumbo foi o metal que os antigos mais utilizaram, pela facilidade de mineração, pelo reduzido consumo de energia (calor) exigido para sua fusão e pelo pouco trabalho necessário para dar forma ao mesmo. Seu uso é citado desde longa data (4200 anos a.C.).

No passado foi usado principalmente como recipiente para alimentos ácidos, vinhos, xaropes de uva e frutas em conserva, porque não alterava a aparência e o gosto dos mesmos. O fato de sua ação tóxica não ser aguda, onde os sintomas surgiam à longo prazo e de maneira incipiente, não levantava suspeitas quanto à sua ação deletéria no organismo. Segundo relatos da história, a intoxicação saturnina teria arruinado a aristocracia romana precedendo o declínio da cultura grega, que já utilizava o chumbo como recipiente para a conservação e fermentação de alimentos (GILFILAN, 1965).

Hipócrates descreveu a cólica saturnina em 370 a.C., e Ramazzini, o pai da Medicina Industrial, descreveu em 1913 a doença dos ceramistas que trabalhavam com chumbo (GILFILAN, 1965).

2.2.2 Absorção

.....

O chumbo é o metal tóxico mais onipresente e detectável em praticamente todas as fases do meio inerte e em todo o sistema biológico, portanto, é considerado um poluente ambiental e um risco ocupacional (Figura 1). A intoxicação pelo chumbo foi adequadamente denominada de “epidemia silenciosa”, onde o metal acumula-se no corpo e, assim, pequenos incrementos diários podem alcançar níveis tóxicos que provocam alterações silenciosas. O interesse específico à sua toxicidade varia com a idade e circunstâncias do hospedeiro, e o maior risco é para o sistema nervoso, portanto, crianças, neonatos e fetos são a população mais suscetível (GOYER, 1996).

As principais vias de contaminação são cutânea, respiratória e digestiva. Cada uma delas tem maior ou menor importância, dependendo do estado físico-químico em que o chumbo se apresenta como contaminante. Entretanto, na prática médica diária em serviços de medicina do trabalho, dificilmente é encontrado uma única via de penetração do chumbo no organismo, pois independentemente da forma física ou química em que o metal se apresenta, duas ou mais vias de penetração estão envolvidas.

.....

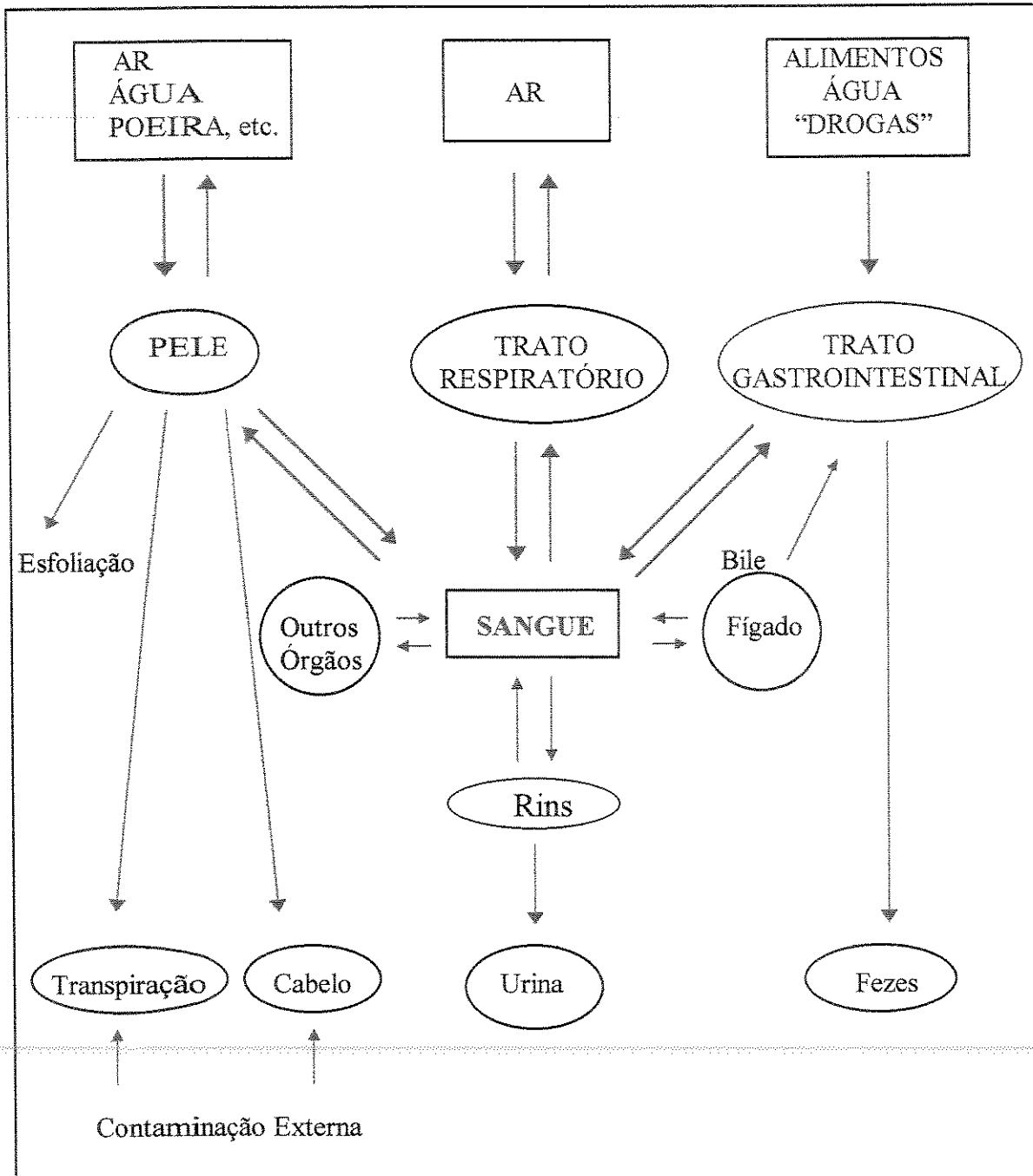


Figura 1 - Contaminação por Chumbo através das vias Cutânea, Digestiva e Respiratória.

Estreita relação entre as fontes de contaminação, transporte e distribuição aos vários órgãos e meios de excreção.

A via cutânea assume importância principalmente nas exposições ocupacionais e a absorção depende das propriedades físico-químicas do agente tóxico, tais como o tamanho da molécula, hidro e lipossolubilidade, grau de ionização e hidrólise do composto nas condições de pH da epiderme e derme (LUKEY e VENUGOPAL, 1977). Ela é aceita como uma importante via de penetração dos derivados orgânicos do chumbo (por exemplo o chumbo tetraetila e chumbo tetrametila), que são absorvidos através da pele intacta devido a sua alta lipossolubilidade. Já os compostos inorgânicos do chumbo não são praticamente absorvidos pela pele intacta, pois a epiderme possui camadas extremamente densas, constituídas por queratina e que apresentam cargas negativas que repelem os ânions e impedem a penetração profunda dos cátions, constituindo-se, assim, numa barreira eficiente do tecido cutâneo na absorção de compostos metálicos. A não-absorção de compostos metálicos hidrossolúveis se deve a existência de um “filme” lipídico na pele.

A deposição, retenção e absorção de partículas no trato respiratório são muito complexas e difíceis de serem avaliadas devido às diferenças existentes no tamanho, densidade, solubilidade, natureza higroscópica, ritmo respiratório e duração da exposição. Calcula-se que 39 a 47% do chumbo inalado seja retido nos pulmões (MEHANI, 1966). Segundo ADAMIS et al. (1999), o chumbo nos pulmões induz a reações de inflamações agudas, em ratos tratados com nitrato de chumbo através de instilação intratraqueal.

Quanto a via digestiva, estudos mostram que o chumbo, quando incorporado à dieta, é absorvido em cerca de 10%. Muito pouco se sabe a respeito do mecanismo pelo qual o chumbo é transportado através da mucosa intestinal para

a circulação sistêmica. Esta absorção é dependente, além das propriedades físico-químicas dos compostos de chumbo, dos níveis de cálcio, magnésio, ferro, fósforo e vitamina D presentes na dieta (HAYASHI, et al., 1993).

Adultos absorvem 5 a 15% do chumbo ingerido e geralmente retêm menos que 5% do que é absorvido. As crianças apresentam uma maior absorção do chumbo que os adultos, a qual aumenta quando associada a uma dieta pobre em ferro e cálcio. Estudos relatam uma média de absorção de 31,8 para 41,5% em dietas regulares.

Enfim, a contaminação se faz por meio da alimentação, tintas de casas antigas, combustíveis (gasolina com chumbo), pó de chumbo de fontes ambientais, águas contaminadas, emissão de resíduos por indústrias, crianças que vivem em ambientes poluídos e que levam a mão à boca constantemente, o chumbo trazido das indústrias para o lar nas roupas dos trabalhadores, cerâmicas, decalques decorativos em artigos de vidro e o papel de jornal.

2.2.3 Distribuição no Organismo:

O mecanismo pelo qual o chumbo passa do meio externo para o meio interno não está bem esclarecido. Admiti-se que esse metal é transportado pelo sangue periférico, após ser absorvido pela via respiratória e/ou digestiva, acumulando-se no fígado, baço, rins, coração, pulmões, cérebro, músculos, sistema esquelético e outros órgãos (JOHNSTONE e MILLER, 1960). Sendo a absorção

continua e elevada, como acontece em determinadas operações industriais, após o transporte inicial do chumbo pela corrente sangüínea e impregnação nos tecidos moles, o metal volta à circulação novamente, aumentando a plumbemia. O chumbo que penetra via trato gastrointestinal é excretado pelas fezes e somente uma pequena quantidade é absorvida.

ONG e LEE (1980), usando Pb^{203} , estudaram a distribuição do chumbo no sangue periférico “in vitro”, obtendo os seguintes resultados, com uma concentração de $50\mu g Pb^{203}/100ml$ sangue:

Distribuição do Pb^{203} no sangue:

Hemoglobina	79,9%
Membrana do Eritrócito	14,1%
Plasma	6,0%

De acordo com os dados acima, é possível observar que uma vez na corrente sangüínea, 94% do Pb^{203} é incorporado pelo eritrócito. Na membrana do eritrócito (14,1%), o Pb^{203} combina-se com proteínas de alto peso molecular (130.000 à 230.000). Dentro do eritrócito (79,9%) o Pb^{203} , encontra-se combinado com a hemoglobina na sua quase totalidade (90%). No plasma (6%), o Pb^{203} encontra-se combinado em 88,2% à albumina e 11,8% à globulina. Quanto aos grupos químicos associados à combinação do Pb^{203} , o grupo carboxila é responsável por 68% na membrana, e o grupo thiol (SH) por 18%. Uma vez absorvido e transportado pelo sistema circulatório, o chumbo inicia sua ação tóxica no organismo.

Segundo LAWERYYS (1975), a concentração de chumbo no sangue é de fundamental importância na avaliação da exposição a esse metal, e os valores de chumbo sangüíneos são indicativos para o diagnóstico de quadros de intoxicações agudas, como índice para avaliar as condições de risco em indivíduos expostos ocupacionalmente e para o controle da população em geral

Valores abaixo de $40\mu\text{g}/100\text{ml}$ de sangue em população não ocupacionalmente exposta são referidos por diversos autores como sendo normais. Já valores entre 40 e $80\mu\text{g}/100\text{ml}$ de sangue, resultante de exposição ocupacional ou anormal é tido como aceitável; entre 80 e $120\mu\text{g}/100\text{ml}$, excessivo e acima de $120\mu\text{g}/100\text{ml}$ de sangue como perigoso, existindo sinais e sintomas leves, como também severos e não raramente permanência de seqüelas (SALGADO, 1977).

Na distribuição do chumbo no organismo, dois compartimentos são de fundamental importância: o chamado compartimento de permuta, constituído pelo sangue e tecidos moles, e o chamado compartimento de armazenamento, constituído principalmente pelos ossos. Uma grande parte do chumbo presente na circulação sangüínea é depositado nos ossos e ao serem libertadas, contribuem para os níveis sangüíneos (ROBBINS, et al., 1986). O chumbo (grupo IV da tabela periódica) tem muitas propriedades semelhantes àquelas do cálcio (grupo II), e o organismo não distingue claramente entre eles, então o chumbo é depositado na parte mineral do osso, especialmente nas crianças em crescimento. O esqueleto serve como o maior reservatório para o chumbo ingerido, acumulando cerca de 75 - 95% do total de chumbo do corpo, servindo como um seqüestrador deste metal, um importante desintoxicador, removendo-o da circulação sangüínea e diminuindo sua ação sobre o sistema nervoso central, função renal e síntese do Heme. O acúmulo de chumbo nos

ossos pode iniciar durante o período de osteogênese fetal e continuar através da vida. O chumbo é incorporado dentro da matriz óssea durante a calcificação, onde torna-se um componente permanente do osso até subsequente reabsorção por osteoclastos. A meia vida do chumbo esquelético é estimada em 20 anos ou mais.

Recentes estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais indicaram que os depósitos de chumbo nos ossos podem ter importantes efeitos no esqueleto, como atraso no crescimento ósseo e dos dentes decíduos em crianças, além de contribuir para os níveis de chumbo no sangue. Pesquisas com crianças expostas ao chumbo, demonstraram que estas apresentam redução no crescimento e em coelhos há uma inibição na formação óssea, ou seja há uma inibição no processo de calcificação e de reabsorção de depósitos de cálcio (HASS, et al., 1964; KLEIN e WIREN, 1993;).

Estudos recentes revelam que o esqueleto contribui com 40 a 70 % do chumbo presente no sangue, isto sugere que os níveis de chumbo no sangue não refletem somente exposições exógenas recentes, mas, também a liberação do mesmo acumulado no ósseo (SMITH, et al., 1996; HU, RABINOWITZ e SMITH, 1998).

Estudos com cultura de células demonstraram uma inibição na atividade da fosfatase alcalina, que tem como função introduzir a hidroxiapatita ao colágeno da matriz óssea, e uma redução dos níveis de RNAm, promovendo uma alteração na expressão gênica da regulação osteoblástica (KLEIN e WIREN, 1993).

BARRY (1975), em um estudo comparativo dos níveis de chumbo em tecidos humanos de indivíduos com exposição não ocupacional, observou-se

uma diferença entre os sexos e entre crianças e adultos. Em homens foram encontrados uma maior concentração de chumbo que nas mulheres, e em ambos os sexos os ossos mostraram um maior acúmulo com a idade. A nível de tecidos moles foi encontrado uma concentração de chumbo menor e essa concentração, em ordem decrescente foi: aorta, fígado, ligamentos, rim, pâncreas, próstata, ovário, pele, baço, pulmão, tireóide, sangue, supra-renal, cérebro, gordura, intestino, estômago, testículos, coração e músculos.

2.2.4 Eliminação

Cerca de 90% do chumbo ingerido não sofre absorção no organismo humano, sendo excretado nas fezes e urina, sob a forma de sulfetos insolúveis. É importante ressaltar que o teor de chumbo na urina não representa com fidelidade o grau de absorção, e este fato é explicado em função de variações individuais que ocorrem, como por exemplo, alterações da função renal, quantidade de líquido ingerido e densidade específica da urina. Os rins excretam quantidades elevadas de chumbo somente quando a concentração sangüínea é elevada. A excreção renal do chumbo é por meio de filtração glomerular, com alguma reabsorção renal tubular. Na presença de níveis elevados de chumbo no sangue, a excreção pode ser aumentada por transporte transtubular. Todavia a determinação do teor urinário do chumbo pode ser útil na indicação de exposição, quando acompanhada de outros parâmetros mensuráveis (GOYER, 1996).

2.2.5 Ação Tóxica

GOYER (1996) relata os efeitos tóxicos do chumbo e o nível mínimo deste metal no sangue e seus respectivos efeitos à saúde (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração de Chumbo no Sangue e seus Efeitos Tóxicos.

Efeito	Concentração de Chumbo no Sangue ($\mu\text{g/dL}$)	
	Crianças	Adultos
NEUROLÓGICO		
Encefalopatia	80 - 100	100 - 120
Perda de Audição	20	ND
Déficit de QI	10-15	ND
Efeitos Intrauterinos	10 - 15	ND
Neuropatias Periféricas	40	40
HEMATOLÓGICO		
Anemia	80 - 100	80 - 100
ALA-U	40	40
ALA (inibição)	10	10
Py-5-N (inibição)	10	ND
RENAL		
Nefropatia	40	ND
Metabolismo da Vitamina D	<30	ND
PRESSÃO SANGUÍNEA	ND	30
SISTEMA REPRODUTIVO	ND	40

As principais ações tóxicas do chumbo no organismo humano, quando da sua absorção, estão descritas a seguir:

2.2.5.1 Sistema Hematopoiético

A intoxicação pelo chumbo tem como efeito hematológico a anemia, onde os glóbulos vermelhos se apresentam microcísticos e hipocrômicos.

Há uma deficiência de ferro e também um aumento no número de reticulócitos com forma basófila, resultado da inibição da enzima Pirimidina-5-nucleotidase (Py-5-N) (PAGLIA et al., 1975). A anemia que ocorre no envenenamento por chumbo resulta de duas deficiências básicas: diminuição do tempo de vida dos eritrócitos e da biossíntese do Heme. O efeito do chumbo na síntese do Heme é acompanhado pela inibição da δ -ácido aminolevulínico desidratase (ALA-D), e pela diminuição da atividade da ferroquelatase que catalisa a incorporação do ferro ferroso na protoporfirina IX, formando o Heme (DORWARD e YAGMINAS, 1994; GOYER, 1996).

O chumbo interfere em várias etapas da biossíntese do heme e estas alterações enzimáticas provocadas resultam na redução da síntese do heme, provocando anemia (Figura 2). Ainda, além da depressão na biossíntese do heme, ocorre interferência na síntese da globina e hemólise dos eritrócitos. Este metal inibe a enzima δ -ácido aminolevulínico desidratase (ALA-D), enzima que catalisa a reação de desidratação de duas moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) para produzir água e porfobilinogênio (PBG) e a enzima hemesintetase (HAYASHI et al.,

1993; DORWARD e YAGMINAS, 1994; PORRU e ALESSIO, 1996; ALEXANDER et al., 1998). Já a enzima δ -ácido aminolevulínico sintetase (ALA-S), essencial na formação dos δ -ácido aminolevulínico a partir da glicina e succinil CoA, tem sua atividade aumentada. A combinação do aumento da atividade da ALA-S e da inibição da ALA-D resulta no aumento dos níveis de ALA no sangue e urina. A enzima coproporfirinogênio descarboxilase, também sofre inibição pelo chumbo, provocando uma eliminação excessiva de coproporfirina na urina (COPRO-U) (PORRU e ALESSIO, 1996).

2.2.5.2 Sistema Nervoso

No sistema nervoso, a ação tóxica do chumbo ocorre tanto na porção central como periférica.

No sistema nervoso periférico, as manifestações mais evidentes dos efeitos tóxicos do chumbo incluem uma debilidade muscular, hiperestesia, analgesia e anestesia da área afetada. A neurite periférica é comum em pintores de casas e outros trabalhadores com exposição ocupacional excessiva ao chumbo (CHIA, et al., 1996). Na neurite periférica há uma desmielinização segmental com possível degeneração axonal, seguida da degeneração das células de Schwann (PORRU e ALESSIO, 1996). Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, 1986), a disfunção do nervo motor ocorre com níveis de chumbo no sangue abaixo de 40 $\mu\text{g/dL}$.

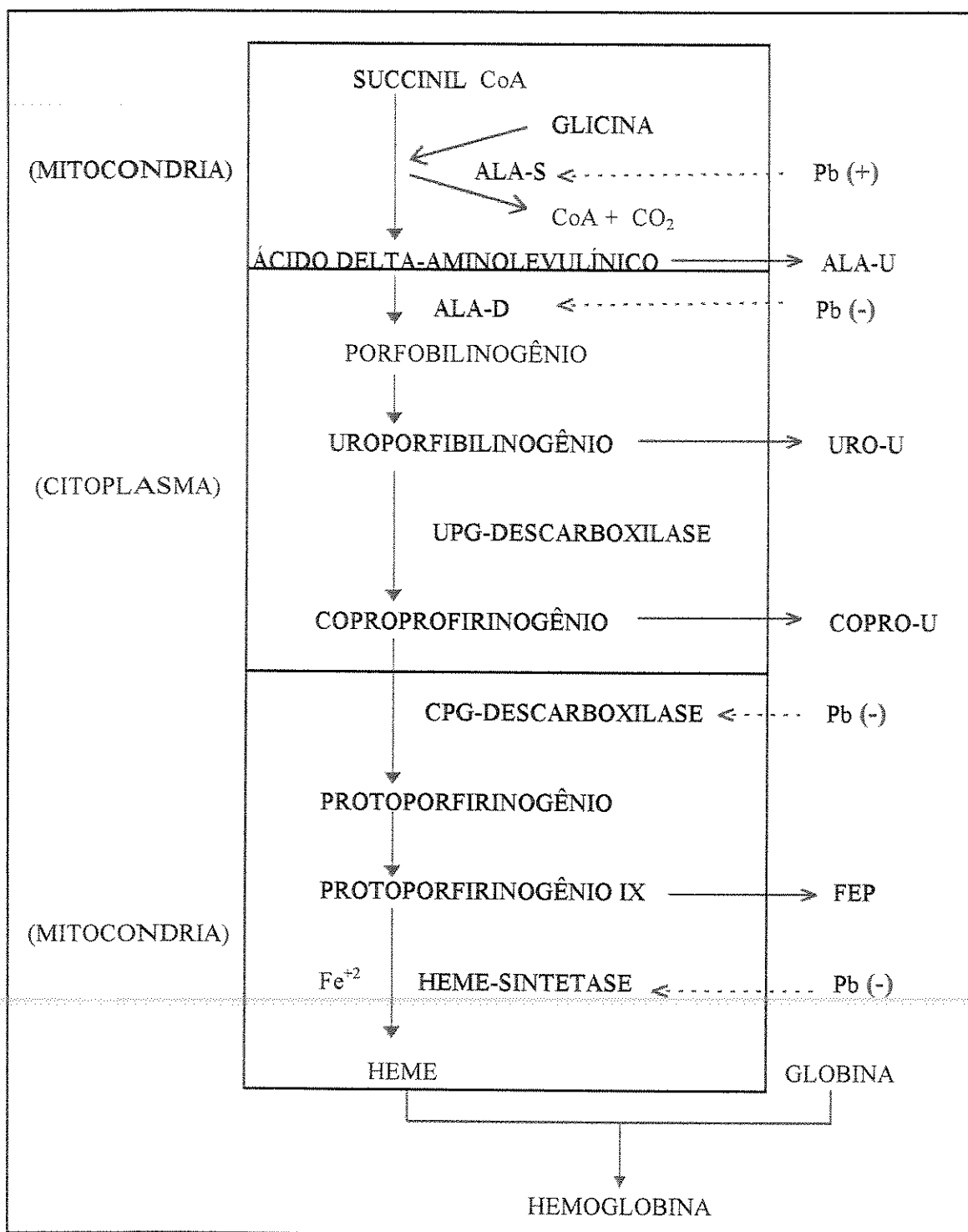


Figura 2 - Efeito do Chumbo na Biossíntese do Heme.

As interferências do chumbo nas diversas etapas da biossíntese do heme, resultando em um quadro de anemia. (-) inibição e (+) ativação.

No sistema nervoso central o chumbo concentra-se na substância cinzenta e núcleos. A concentração também é alta no hipocampo, seguido do cerebelo, córtex cerebral e medula e na substância branca é encontrada uma concentração bem menor (RÖNNBÄCK e HANSSON, 1992; GOYER, 1996).

SANDHIR, JULKA e GILL (1994), em experimento com ratos tratados intragastricamente com chumbo, durante 08 semanas, apresentaram um acúmulo significativo de chumbo em toda região do cérebro, principalmente no hipocampo. O aumento dos níveis de chumbo foi acompanhado por um aumento na peroxidação lipídica, o que pode induzir a uma diminuição da integridade da membrana e finalmente a morte celular.

BOULDIN e KRIGMAN (1975) sugerem que as encefalopatias em humanos se devem a uma toxicidade neuronal ou a uma disfunção primária da barreira cerebral sangüínea e que, possivelmente, ambos os mecanismos são operados e determinados pela suscetibilidade individual dos capilares e dos neurônios.

Em crianças, níveis de chumbo no sangue igual ou superior a 80µg/dL, leva ao desenvolvimento de encefalopatias (alterações neurológicas, de conduta e de desenvolvimento). Os sintomas de encefalopatias pelo chumbo iniciam com letargias, vômitos, irritabilidade, perda de apetite, vertigens, progredindo para uma ataxia evidente, redução do nível de consciência que pode progredir para o coma ou até mesmo morte. A recuperação pode ser acompanhada de seqüelas, incluindo epilepsia, retardo mental e em alguns casos neuropatia óptica e cegueira (HASS, et al., 1964; BOULDIN e KRIGMAN, 1975; SALGADO, 1977)

Estudos morfohistopatológicos revelam vários edemas cerebrais com derrame de fluídos dos capilares, associado a uma diminuição das células neuronais e um aumento das células da glia. Essa perda neuronal é atribuída à inibição da fosforilação oxidativa induzida pelo chumbo (BALESTRA, 1991; RÖNNBÄCK e HANSSON, 1992).

Os estudos também revelam uma diminuição do nível intracelular de AMPc no cérebro de animais tratados com chumbo, sugerindo que o sistema mensageiro do AMPc pode vir a ser um indicador da neurotoxicidade do chumbo (SANDHIR e GILL, 1994).

BELLINGER e NEEDLEMAN (1992), referem que níveis de chumbo maiores que 10µg/dL estão relacionados com problemas de aprendizado e alteração cognitiva em crianças. Os efeitos deletérios do chumbo no sistema nervoso central, que ocorrem em baixas concentrações, podem ser explicadas em parte, pelos efeitos nos processos que envolvem o cálcio, pois o chumbo possui propriedades semelhantes a este metal (valência dois e uma orbital 6p livre) e o organismo não distingue claramente entre eles (BRESSLER, et al., 1994).

Em estudos com a atividade da proteína kinase C em eritrócitos humanos, baixas concentrações de chumbo podem substituir o cálcio, aumentando a fosforilação de proteínas de membrana e a quantidade de proteína kinase C - α . Sabe-se que proteínas similares a estas estão presentes no SNC, portanto problemas de aprendizagem podem estar relacionados com o nível de fosforilação dessas, em crianças intoxicadas por chumbo (BRESSLER, et al., 1994).

O efeito do chumbo no metabolismo do AMPc, pode afetar vários processos metabólicos e eletrofisiológicos regulados pelo AMPc, como transmissão sináptica, ação de neurotransmissores e hormônios, crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, citoesqueleto celular, fosforilação protéica, etc.

Segundo SANDHIR e GILL (1994), alterações de memória e aprendizado devido ao chumbo, podem ser explicadas pelo decréscimo dos níveis intracelulares de AMPc e inibição da adenil ciclase no cérebro. Em pesquisa, onde ratos machos e albinos receberam doses diárias de acetato de chumbo (50 mg/Kg), intragastricamente, durante oito semanas, foi possível observar alterações no metabolismo do AMPc nos cérebros dos animais tratados.

Segundo RÖNNBÄCK e HANSSON (1992), muitas vezes as encefalopatias não vem acompanhadas de alterações morfohistopatológicas evidentes, pois os sintomas como neurastenia, fadiga, labilidade, déficit cognitivo e de memória, intolerância ao stress e insônia, se devem mais a aspectos subjacentes aos mecanismos celular e molecular

2.2.5.3 Sistema Auditivo

Crianças, adolescentes e adultos com níveis de chumbo sanguíneo maiores que 20 µg/dL apresentam alterações dos limiares auditivos, intolerância a sons de forte intensidade, diminuição da velocidade e aumento do tempo de condução central dos potenciais auditivos (SCHWARTZ e OTTO, 1991; RÖNNBÄCK e HANSSON, 1992; COUNTER et al., 1997; OSMAN et al., 1999).

DISCALZI et al., 1993 e OSMAN et al., 1999 avaliaram os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo nos potenciais auditivos centrais de trabalhadores, através do registro dos potenciais auditivos evocados do tronco cerebral. Neste estudo o nível médio de chumbo sanguíneo foi de 47,5 µg/dL. Os resultados demonstraram um aumento significativo no tempo de latência das ondas I e V que se originam, respectivamente, no nervo auditivo e colículo inferior e um aumento entre os intervalos destas ondas, o que significa que o tempo de condução central do impulso nervoso está aumentado. Com esse estudo foi possível demonstrar que os potenciais auditivos do tronco cerebral, também, podem ser utilizados como instrumento na detecção de uma neurotoxicidade central subclínica causada pelo chumbo.

2.2.5.4 Sistema Renal

A nefropatia por intoxicação ao chumbo é uma das mais antigas alterações de saúde devido ao chumbo. A nefropatia possui dois estágios, um agudo (reversível) e um crônico (irreversível). A nefrotoxicidade aguda se limita as alterações morfológicas e funcionais das células do tubo proximal. A acidose tubular proximal renal (Síndrome de Fanconi) pode tornar-se evidente devido aos defeitos de transporte secundários à função alterada das enzimas da membrana. Morfologicamente são observadas reduções glomerular, danos vasculares, fibrose e inclusões intranucleares ácido resistentes, principalmente nas células epiteliais dos túbulos proximais. Essas inclusões são, pelo menos, parcialmente compostas de complexos de chumbo-proteínas (GOYER, 1990 e 1996).

Segundo SALGADO (1977), a nível renal, a ação do chumbo seria manifesta por um quadro crônico, induzido por exposição prolongada e a uma taxa elevada de chumbo. Essa nefropatia crônica levaria, em alguns casos à hipertensão arterial.

Já para alguns pesquisadores, o efeito crítico mais sensível para os adultos é a hipertensão. A hipertensão e o aumento na incidência de acidente vascular cerebral estão associados a um aumento da concentração de chumbo no sangue, devido a influência deste metal sobre os rins, musculatura lisa dos vasos sangüíneos e nas funções ativadas pelo cálcio nas células vasculares, devido à diminuição da atividade ATPase - Na^+/K^+ e da estimulação da bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nas membranas eritrocitárias (ASSENATO et al., 1986; LANDRIGAN, 1989; BALESTRA, 1991; PORRU e ALESSIO, 1996; HU et al., 1998).

2.2.5.5 Trato Gastrintestinal

Segundo SALGADO (1977), a sintomatologia dos distúrbios digestivos é rica e inespecífica, não havendo ainda explicação do mecanismo de ação tóxica do chumbo a esse nível, especialmente quanto às cólicas saturninas. A “cólica” de chumbo, caracterizada por dores abdominais extremamente intensas e pouco localizadas, está freqüentemente associada com espasmos e rigidez da parede abdominal. Contudo, o único achado morfológico no tubo digestivo é a “linha de chumbo”, decorrente do sulfeto de chumbo precipitado ao longo das margens gengivais, sendo rara em crianças e não observadas em indivíduos desdentados.

Outros sintomas gastrintestinais, tais como: perda de apetite, distúrbios estomacais, diarreia e constipação, também são observados.

2.2.5.6 Fígado

O feito tóxico do chumbo sobre o fígado de humanos e animais é pouco conhecido. Sabe-se apenas que a exposição ao chumbo resulta em uma variedade de alterações bioquímicas e que muitos desses efeitos são resultados da capacidade do metal ligar-se aos sítios nucleofílicos das células, devido aos grupos SH livres (NEHRU e KAUSHAL, 1992).

Os transtornos hepáticos são mais evidentes somente nas intoxicações severas, porém a ausência de informações sobre uma possível influência da dieta, hábitos pessoais e infecções, dificulta uma conclusão definitiva quanto à etiologia desta alteração (SALGADO, 1977).

2.2.5.7 Sistema Reprodutor

Há evidências da associação da toxicidade do chumbo com a esterilidade. Os efeitos gametotóxicos são demonstrados em animais de ambos os sexos, expostos a altas doses de chumbo. Em trabalhadores de fábricas de baterias, com níveis de chumbo no sangue igual a 40µg/dL, apresentaram redução na contagem de espermatozóides, alteração de sua mobilidade e morfologia anormal (ASSENATO et al., 1986; ALEXANDER, 1998).

Outro sintoma presente em indivíduos expostos ao chumbo é a impotência sexual, que pode desaparecer com o tratamento (BALESTRA, 1991).

Na mulher, o aumento do nível de chumbo no sangue materno também pode contribuir para a redução do período de gestação e para a redução do peso do feto. Com relação a fertilidade, pode levar a irregularidade da menstruação e aumento da incidência de aborto espontâneo (BORSCHNEIN et al., 1989).

2.2.5.8 Carcinogenicidade

A potencialidade do chumbo em provocar neoplasias em animais e no homem tem merecido atenção de diversos autores desde a década de 60 (GOYER, 1996). Os estudos indicam que os tumores produzidos pelo chumbo inorgânico em animais de laboratório somente ocorrem quando da administração de doses elevadas. Os tumores encontrados, mais comuns, foram do sistema respiratório e digestivo (GOYER, 1990). Casos de adenocarcinoma renal em trabalhadores com exposição ocupacional ao chumbo também é relatado (LILIS, 1981).

Compostos de chumbo estimulam a proliferação de células epiteliais do túbulo renal (CHOICE e RICHTER, 1980) e efeitos similares foram relatados em fígados de ratos por COLUMBANO et al. (1983). Em *hamster Syrian* foi observado transformação celular induzida por composto de chumbo em células embrionárias (ZELIKOFF et al., 1988).

ANETOR e ADENIYI (1998), referem que a exposição ao chumbo provoca uma depressão do sistema imunológico, predispondo o sujeito ao câncer.

2.2.5.9 Sistema Cardíaco

Alterações cardíacas são relatadas em vários casos de intoxicação pelo chumbo, acompanhada de dispnéia, dor na região do tórax e fadiga (BALESTRA, 1991). O mesmo autor, também relata alterações morfológicas no coração de pacientes com níveis de chumbo sanguíneo igual à 40 µg/ml, como aumento de tamanho das mitocôndrias das células do miocárdio, aumento do número dos canais de cálcio e degeneração celular.

2.2.5.10 Sistema Imunológico

Estudos com animais indicam um efeito imunossupressor do chumbo numa variedade de sistemas biológicos, e que pode ser utilizado como um indicador sensível da exposição ao chumbo. Mas há poucos estudos específicos que têm determinado os componentes celulares responsáveis por esta supressão. É sugerido que macrófagos ou células fagocitárias possam ser os marcadores de chumbo (BLAKLEY, 1981). É relatado também uma diminuição significativa na população de células “T” e “B” e na habilidade fagocitária dos macrófagos em cobaias intoxicadas por metais pesados (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+}) com ascaridíase experimental (*Ascaris suum*), quando comparado com o grupo de cobaias não intoxicadas (BOROSKOVÁ, 1993).

Há estudos que relatam a depressão significativa do sistema imunológico (IgA e IgT) em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao chumbo, predispondo-os a doenças infecciosas, inflamatórias e ao câncer (ANETOR e ADENIYI, 1998).

Segundo os estudos de COOK et al. (1974), além do chumbo induzir a uma alteração na função das células hepáticas, há também uma inabilidade dos macrófagos em inativar endotoxinas.

2.2.6 Parâmetros de Controle de Exposição ao Chumbo

As alterações na síntese do heme, podem ser utilizadas como parâmetros de controle da exposição ao chumbo. Segundo SALGADO (1977), os exames mais requisitados para controle da intoxicação pelo chumbo são:

- plumbemia (Pb-S);
- plumbinúria (Pb-U);
- coproporfirina urinária (COPRO-U);
- ácido δ -aminolevulínico na urina (ALA-U);
- atividade enzimática do ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D).

Outro índice que pode ser utilizado é o teor de chumbo na urina, mas como sua variação é grande, seus valores não representam o grau de absorção, pois

o rim excreta quantidades elevadas de chumbo, somente quando a concentração sangüínea é elevada, exceto para o chumbo orgânico. Portanto, em indivíduos expostos por longos períodos a concentrações relativamente baixas, os valores de plumbinúria estarão sempre dentro dos valores considerados normais (MORGAN, 1975).

A determinação do teor de chumbo na urina após a administração de quelantes (*Dimercaprol*, *D-Penicilamine*, *CaNa₂EDTA*, 2,3-ácido Dimercaptosuccínico), fornece dados significativos. Se o nível de chumbo na urina aumentar após a administração de quelantes, trata-se de uma exposição excessiva e de armazenamento de chumbo pelo organismo (MORGAN, 1975; PORRU e ALESSIO, 1996).

O valor da medida de chumbo no sangue e urina constitui um valioso parâmetro para o diagnóstico da intoxicação aguda, porém a determinação de chumbo no sangue, como teste único, é insuficiente para relevar o índice de exposição e de absorção. Desta forma, tornam-se necessárias medidas complementares como as decorrentes da ação tóxica do chumbo na biossíntese do heme. A determinação da atividade enzimática da ALA-D é uma medida altamente sensível e específica. Sua alta sensibilidade tem sido usada como monitor biológico para trabalhadores expostos ao chumbo, apesar da variação individual na sua atividade basal. Devido a sua alta sensibilidade, a diminuição da atividade da ALA-D se constitui na primeira alteração bioquímica provocada pela absorção do chumbo, permitindo assim, através de teste rápido e pouco dispendioso, concluir se existe exposição ou não. Resultados falsos positivos podem ocorrer quando houver à

deficiência de ferro e moléstia hepática provocada pelo álcool. (DORWARD e YAGMINAS, 1994).

A determinação quantitativa da COPRO-U é um outro método utilizado para o controle do saturnismo, sendo no entanto, uma alteração tardia e variável, fornecendo valores, mais elevados somente quando os teores de chumbo ultrapassam 80µg/100ml. Às vezes acusa normalidade na existência de valores elevados de chumbo no sangue. Além disso, a COPRO-U não é específica para o saturnismo, pois não o diferencia da anemia férica, febre reumática, poliomielite, cirrose hepática e de alcoolemia elevada (SALGADO, 1977).

Segundo SALGADO (1977) a concentração de porfirina eritrocitária livre (FEP) pode ser útil na confirmação clínica de casos assintomáticos de exposição anormal ao chumbo, desde que o quadro de anemia férica seja descartado.

3. PROPOSIÇÃO

Neste trabalho objetivamos o estudo da relação entre a toxicidade do chumbo, a atividade da fosfatase ácida e a análise morfohitopatológica nos diversos tecidos (testículo, intestino, rim, baço, fígado, estômago, coração, pulmão, cérebro e cóclea) de ratos, “*in vivo*”, o que contribuirá para um maior esclarecimento sobre a função biológica da fosfatase ácida e sobre a toxicidade do chumbo ao organismo.

Como já foi destacada na introdução e revisão de literatura desta Dissertação, a fosfatase ácida é uma enzima amplamente distribuída na natureza em diversas classes e em um mesmo tecido. Este fato associado a trabalhos que relatam a atividade desta enzima, quer aumentada ou diminuída a diversos estados patológicos, a escassez de trabalhos sobre o efeito do chumbo na atividade da fosfatase ácida e sabendo-se que o chumbo é potencialmente tóxico a vários órgãos e tecidos, este estudo reveste-se de grande importância.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

A pesquisa foi realizada com 45 ratos "*Wistar*" machos albinos, com aproximadamente 02 meses de idade, sendo 15 do grupo controle e 30 do grupo tratado.

4.1.2 Reagentes e Soluções

O substrato (pNPP) e inibidores (pHMB e Tartarato) foram da Sigma Chemical Co, Acetato de Chumbo Neutro ($C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$) (Synth May e Baker). Os Reagentes utilizados para o preparo das soluções e tampões possuíam grau analítico e todos foram preparados com água deionizada.

4.2 Métodos

4.2.1 Tratamento

Os animais do grupo tratado receberam ,diariamente, durante 42 dias, 0,5 ml de acetato de chumbo 3% em glicerol 2% através de entubação gástrica. Os animais foram anestesiados com éter etílico em câmara de vidro fechada, para serem entubados. O grupo controle foi submetido ao mesmo tratamento, substituindo o acetato de chumbo por água deionizada.

Os ratos foram colocados em gaiolas plásticas, adequadamente identificadas e divididos aleatoriamente em grupos de 05. Os mesmos foram marcados na orelha, utilizando bisturi e tinta nanquim preta. A alimentação foi a base de ração Purina e água deionizada “*ad libitum*” e suas gaiolas eram limpas a cada dois dias.

Os animais foram pesados semanalmente, durante todo o período de tratamento, após serem anestesiados e antes de serem entubados. Foi utilizada balança eletrônica Mettler H-20.

4.2.2 Obtenção dos Órgãos

Os animais foram anestesiados com éter etílico em câmara de vidro fechada e sacrificados por decapitação, sendo os órgãos (baço, cérebro, coração,

cóclea, estômago, fígado, intestino delgado, rim, pulmão e testículos) imediatamente dissecados, removidos e colocados em uma placa de Petri contendo soro fisiológico gelado. Em seguida, as massas dos órgãos foram medidas em balança eletrônica Mettler H-20 com sensibilidade 0,1 g, e imediatamente armazenados a - 20°C, para posterior análise enzimática e de proteínas.

4.2.3 Obtenção do Extrato para Análise Enzimática

Foi homogeneizado 0,5g de cada órgão em 5,0 ml de tampão maleato HCl, 0,1 M, pH 7,0, na proporção 1:10 (m/v). Em seguida, o homogenado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Desprezado o precipitado, coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado através de 3 camadas de gaze. O efluente obtido constituiu o extrato límpido.

4.2.4 Determinação da Atividade Enzimática

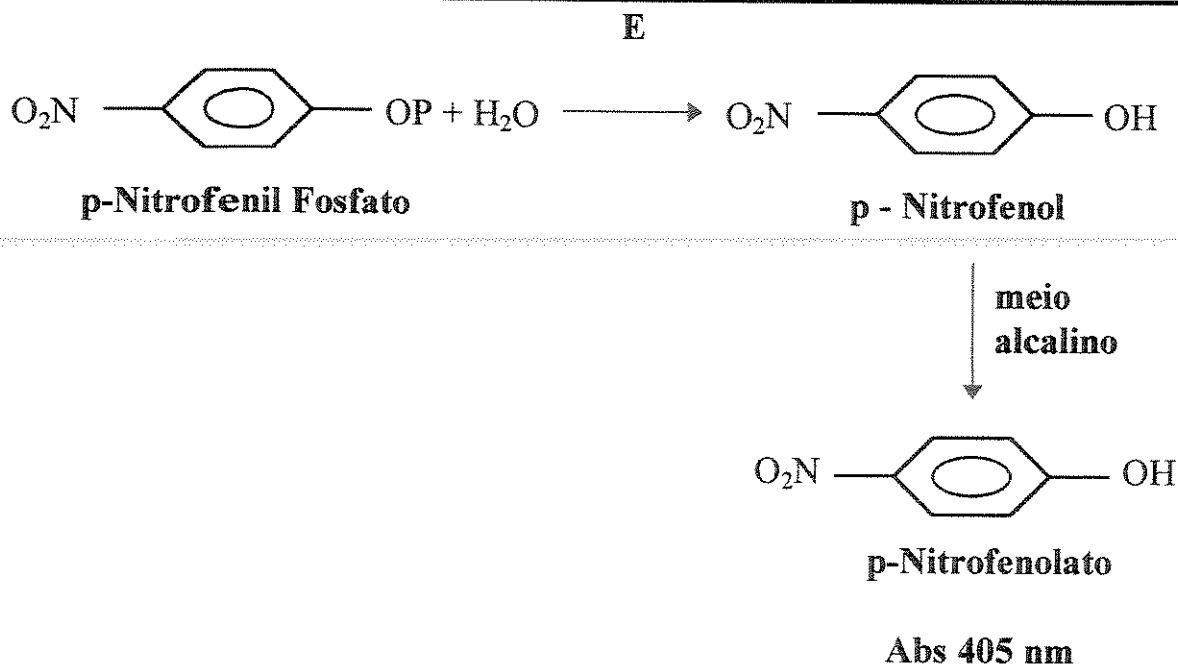
A atividade enzimática foi quantificada pela hidrólise do p-nitrofenil fosfato (pNPP) em um meio de reação tamponado com acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, para um volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição do extrato ao meio de reação e 5mM de pNPP. A reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0N, após incubação por 2 minutos à uma temperatura de 37°C. E nos tubos controles o extrato foi adicionado após a colocação do NaOH (TAGA e VAN ETTEN, 1982).

A formação do p-Nitrofenol foi determinada espectrofotometricamente (*Espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 - Pharmacia Biotech*), pela leitura da absorção a 405 nm (coeficiente de extinção molar da forma p-nitrofenóxido: $18.000 \text{ (mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1})$) (CHAIMOVICH e NOME, 1970).

A Unidade Enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de p-Nitrofenol (pNP) por minuto.

A Atividade Enzimática Específica (AE) é expressa como Unidade de Atividade Enzimática por miligrama de proteína ($\text{AE} = \text{EU}/\text{mg}$).

Essa reação ocorre segundo o seguinte esquema:



4.2.5 Determinação das Isoenzimas da Fosfatase Ácida:

As isoenzimas foram detectadas e quantificadas, realizando-se a determinação da atividade em meios de reação contendo Tartarato (0,1M), inibidor da fosfatase ácida de *AMr*, e pHMB (10mM), inibidor da forma de *BMr* (TAGA e VAN ETEN, 1982).

4.2.6 Determinação de Proteínas

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por HARTREE (1972), utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão.

A reação foi iniciada pela adição de 3,0 ml do reagente C à 0,2 ml do extrato e após 10 minutos adicionou-se 0,3 ml de Folin-Ciocalteau (1:1). Nos controles o extrato foi substituído por 0,2 ml de H₂O.

A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm após 30 minutos da adição do reagente de Folin-Ciocalteau à temperatura ambiente.

4.2.7 Análise Morfohistopatológica

Após a retirada dos órgãos, os mesmos foram submetidos ao seguinte processamento standardizado, para análise morfológica, segundo (LUNA, 1968).

- fixação em solução de formol tamponado a 10% por 7 dias a temperatura ambiente;
- lavagem em água corrente por 24 horas;
- 30 minutos em etanol 80%;
- 30 minutos em etanol 90%;
- dois banhos, de 30 minutos cada, em etanol 95%;
- três banhos, de 30 minutos cada, em etanol 100%;
- três banhos em xilol até a completa diafanização;
- dois banhos, de 60 minutos cada, em Paraplast fundida a 58°C;
- inclusão em Paraplast fundida nova.

De cada bloco foram obtidos 2 a 3 cortes histológicos semi-seriados e seriados com 6µm de espessura, que foram corados pela técnica da hematoxilina e Eosina (Hematoxilina de Harris e a Eosina de Lison), e analisados por microscopia óptica comum. Foram estudados os órgãos de 10 ratos do grupo tratado e 5 do grupo controle para se realizar o diagnóstico comparativo. Após a análise microscópica, as lâminas foram fotografadas com o Fotomicroscópio *Carl Zeiss Germany*.

Com relação a cóclea, antes de ser processada, a mesma passou por descalcificação em solução de Morse (citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% na proporção 1:1), durante um período de 20 dias, sendo que na primeira semana a solução foi trocada diariamente.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do Teste-t Independente de Student, que visa testar a diferença de duas médias. A teoria da distribuição “t” de Student exige que se suponha que duas variáveis básicas X_1 e X_2 possuam distribuições normais independentes com desvios padrão iguais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do Chumbo sobre o Desenvolvimento Ponderal do Ratos

Durante o período de tratamento dos ratos (Métodos 4.2.1) foi observado que os animais que receberam acetato de chumbo 3% apresentaram-se mais irritados que os do grupo controle. Observou-se também, queda de pêlos. Contudo a variação ponderal foi similar nos dois grupos de animais, havendo um ganho de peso da ordem de 23 % (Gráfico 1). Já MODAK, et al. (1975) relatam inibição significativa no crescimento de ratos recém nascidos tratados com acetato de chumbo 1%, diluído na água durante 60 dias.

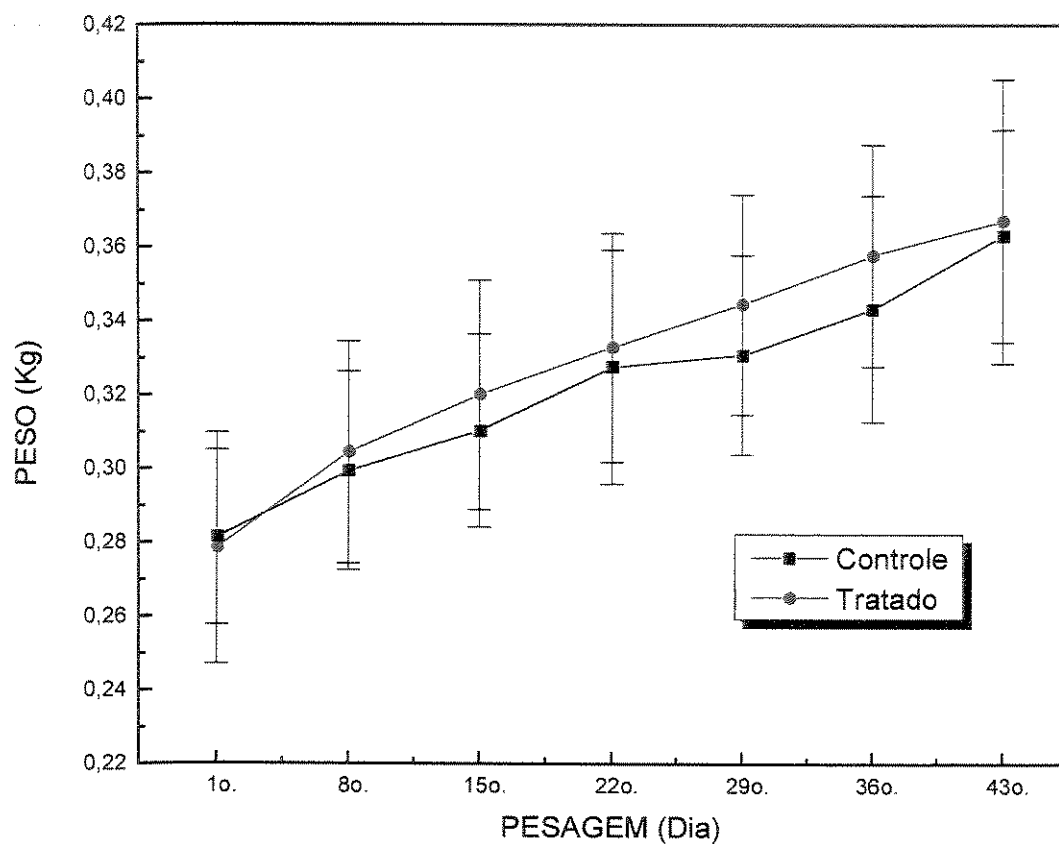


GRÁFICO 1 - Variação Ponderal dos Ratos Controle e Tratados.

As pesagens foram realizadas a cada 07 dias (1º, 8º, 15º, 22º, 29º, 36º e 43º dia), como descrito no Material e Métodos 4.2.1

5.2 Efeito do Chumbo na Atividade da Fosfatase Ácida Total, de *AMr* e de *BMr*.

A atividade da fosfatase ácida total diminuiu em todos os órgãos do grupo tratado. Os órgãos mais afetados pelo chumbo, em ordem decrescente foram: estômago, intestino, coração, pulmão, cérebro, testículo, fígado, baço e rim (Gráfico 2). A diminuição da atividade da fosfatase ácida total (*AMr* e *BMr*), após o tratamento com acetato de chumbo foi semelhante e girou em 70%, exceto para o estômago, onde a inibição foi mais intensa (85%). No rim o efeito do chumbo sobre a atividade da fosfatase ácida total não foi estatisticamente significativa ($P=0,01$) (Gráfico 2). Este último dado foi contrário ao encontrado por SASTRY (1979), onde relata inibição significativa da atividade da fosfatase ácida total e da alcalina nos rins de peixes (*Channa punctatus*) expostos durante 30 dias em água contaminada com nitrato de chumbo.

O estudo do efeito do chumbo na atividade específica (AE) da fosfatase ácida na presença de compostos inibidores (Tartarato, 0,1M e pHMB, 10mM), como descrito nos Métodos 4.2.4 e 4.2.5, permitiu observar o efeito tóxico do chumbo sobre as fosfatases ácidas de *BMr* e de *AMr* respectivamente, já que o Tartarato inibe as fosfatases de *AMr* e o pHMB as de *BMr*.

Na dosagem da AE da fosfatase ácida na presença de Tartarato (inibidor da Fac. de *AMr*), foi possível observar uma diminuição da AE da fosfatase de *BMr*, estatisticamente significativa ($P=0,01$), em todos os órgãos do grupo tratado em relação ao grupo controle (Gráfico 3). Além da diminuição da AE, houve

uma diminuição da atividade relativa (AR) desta mesma fosfatase ácida. Porém, a variação da proporção da atividade relativa da Fac. de *BMr*, entre o grupo tratado e controle, não foi estatisticamente significativa no testículo, coração e cérebro (Gráfico 5).

Na presença de pHMB (inibidor da Fac. de *BMr*), a AE da Fac. de *AMr*, no grupo tratado, apresentou diminuição significativa ($P=0,01$) em todos os órgãos analisados, exceto no rim e baço, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 4). Já a AR dessa mesma Fac. apresentou um aumento significativo no estômago e intestino, e uma diminuição significativa no fígado. Nos demais órgãos a variação da proporção relativa da atividade não foi estatisticamente significativa (Gráfico 6).

A atividade relativa da fosfatase ácida, na presença dos compostos inibidores (Tartarato e pHMB), foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto inibidor, para cada órgão e grupo. Os valores foram analisados estatisticamente conforme o descrito em Métodos (4.2.8).

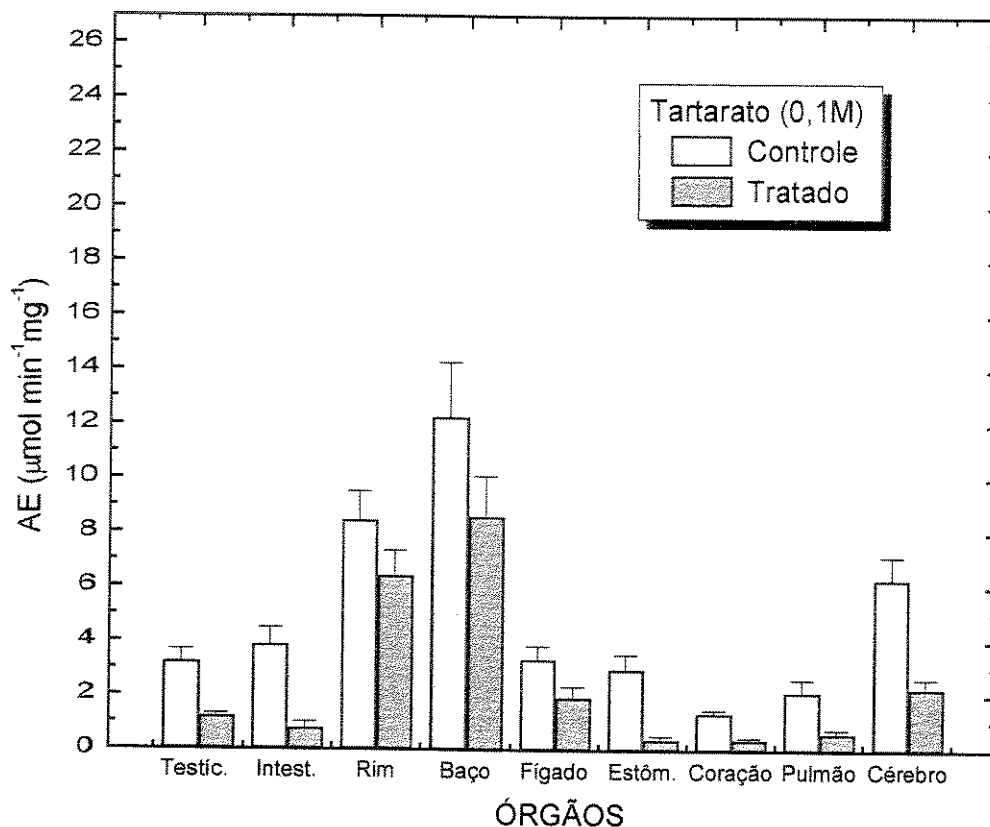


GRÁFICO 3 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade da Fosfatase Ácida na Presença de Tartarato.

As barras representam o desvio padrão (sd) da média das medidas das AEs da fosfatase ácida na presença de Tartarato (inibidor da Fac. de *AMr*), nos órgãos de ratos do grupo controle e do tratado. Em todos os órgãos a variação foi estatisticamente significativa (Teste-t Independente, $P=0,01$). As dosagens da AE foram realizadas como descrito no Material e Métodos 4.2.4 e 4.2.5.

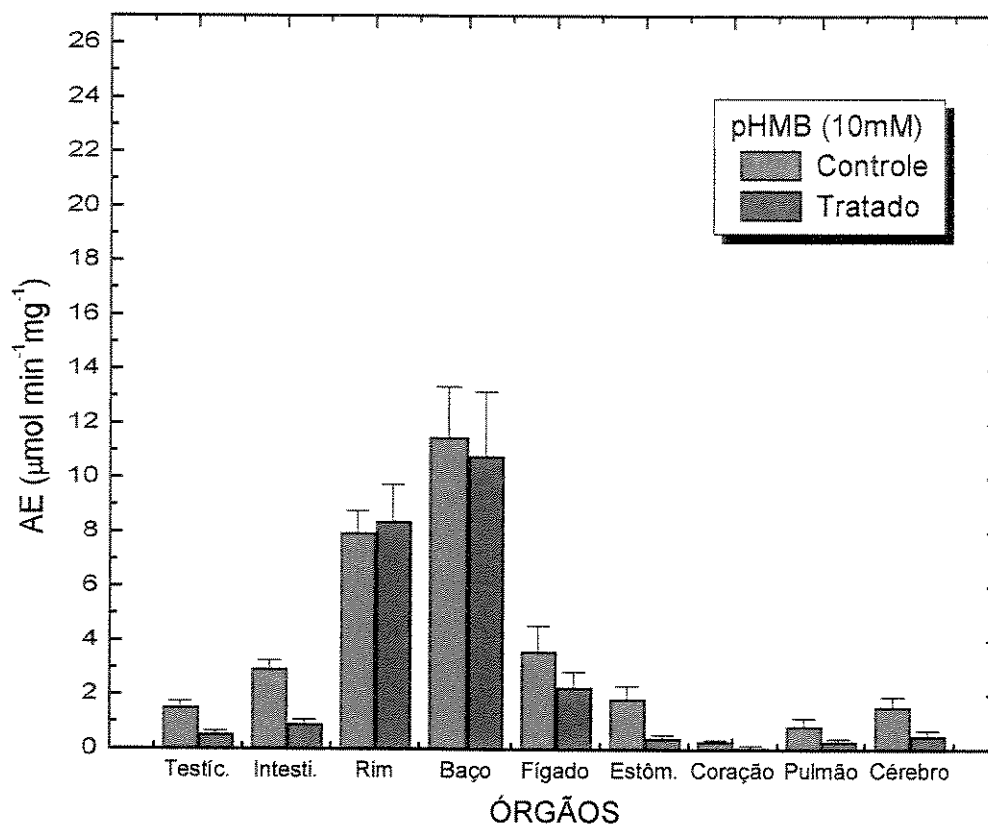


GRÁFICO 4 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade da Fosfatase Ácida na Presença de pHMB.

As barras representam o desvio padrão (sd) da média das medidas das AEs da fosfatase ácida na presença de pHMB (inibido da Fac. de BMr), nos órgãos de ratos do grupo controle e do tratado. A variação não foi estatisticamente significativa (Teste-t Independente, $P=0,01$), apenas para o rim e baço.

As dosagens da AE foram realizadas como descrito no Material e Métodos 4.2.4 e 4.2.5.

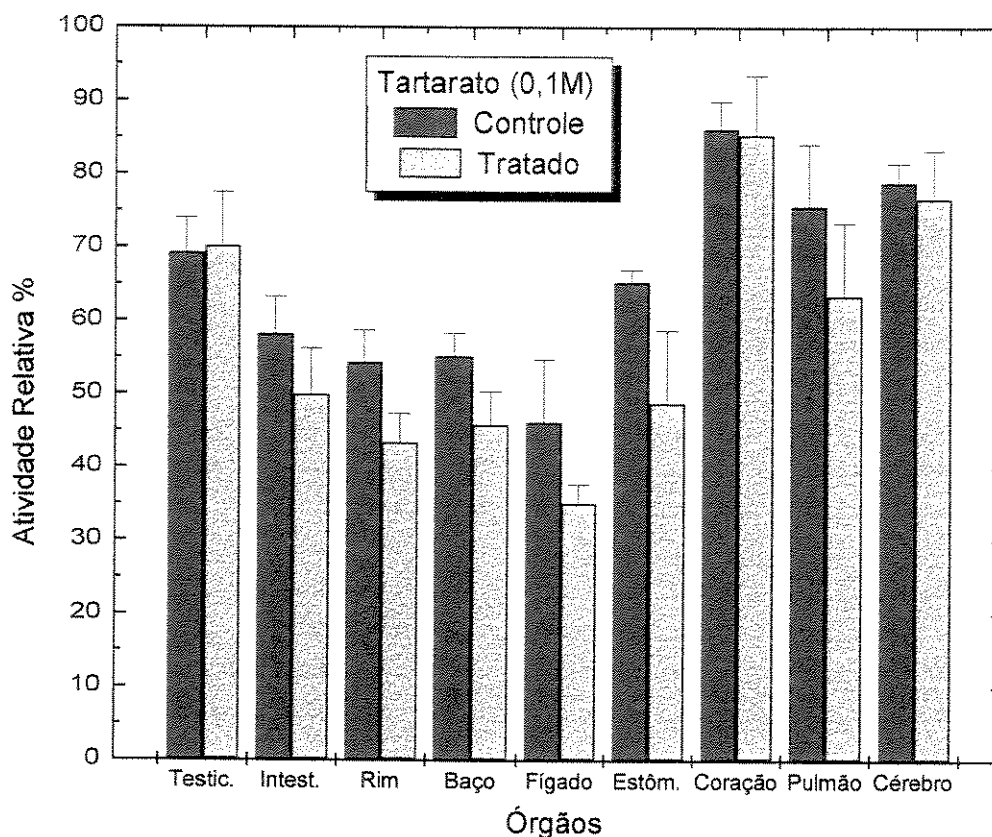


GRÁFICO 5 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade Relativa da Fوسفatase Ácida na Presença de Tartarato.

A atividade relativa foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto (Tartarato). A atividade foi determinada como descrito em Métodos (4.2.4 e 4.2.5). As barras representam o desvio padrão (sd) da média das Atividades Relativas da fوسفatase ácida na presença do Tartarato (inibidor da Fac. de *AMr*) nos órgãos de ratos do grupo controle e do tratado. A variação da proporção da AR não foi estatisticamente significativa (Teste-t Independente, $P=0,01$) para o Testículo, Coração e Cérebro.

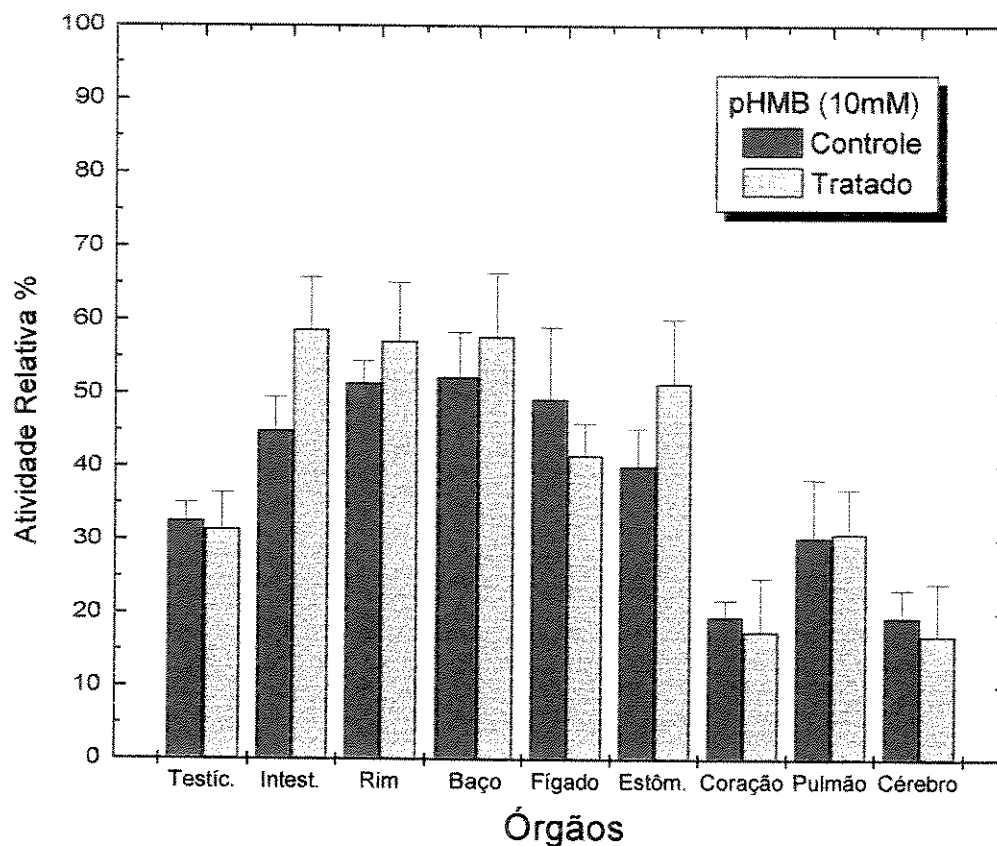


GRÁFICO 6 - Efeito da Intoxicação por Chumbo na Atividade Relativa da Fosfatase Ácida na Presença de pHMB.

A atividade relativa foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto (pHMB). A atividade foi determinada como descrito em Métodos (4.2.4 e 4.2.5). As barras representam o desvio padrão (sd) da média das Atividades Relativas da fosfatase ácida na presença do pHMB (inibidor da Fac. de *BMr*) nos órgãos de ratos do grupo controle e do tratado. A variação da proporção da AR foi estatisticamente significativa (Teste-t Independente, $P=0,01$), apenas para o Intestino, Fígado e Estômago.

5.3 Efeito do Chumbo sobre a Histoarquitetura dos Órgãos dos Ratos

5.3.1 Testículo

No testículo dos ratos do grupo controle foram observados os seguintes aspectos: os túbulos seminíferos com espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides enchendo a luz do ducto. As células intersticiais sem particularidades, bem como a cápsula externa (Albuginea). A espermatogênese apresenta duas a três camadas de espermatócitos por túbulos seminíferos, por vezes presença de material seminal eosinófilo escasso na luz dos túbulos seminíferos (Figura 3). No grupo tratado, foram observadas perdas de estratificação das camadas de espermatogônias e espermatócitos, com uma a duas camadas por túbulos seminíferos. As luzes dos túbulos apresentam-se com menos espermatozóides e mais material seminal eosinófilo. Vasos ectásicos, congestos e cápsula adelgada (Albuginea) (Figura 4). ASSENATO et al. (1986) relatam a diminuição do número e mobilidade dos espermatozóides em trabalhadores de fábrica de baterias, que estão expostos ao pó de chumbo, durante 08 horas diárias.



FIGURA 3 - Testículo. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de ratos do grupo controle sem particularidades: (1) Espermatócitos com 1 à 3 camadas; (2) Espermatogônias e (3) Espermatozóides na luz dos túbulos. Coloração HE. Aumento 160 x.

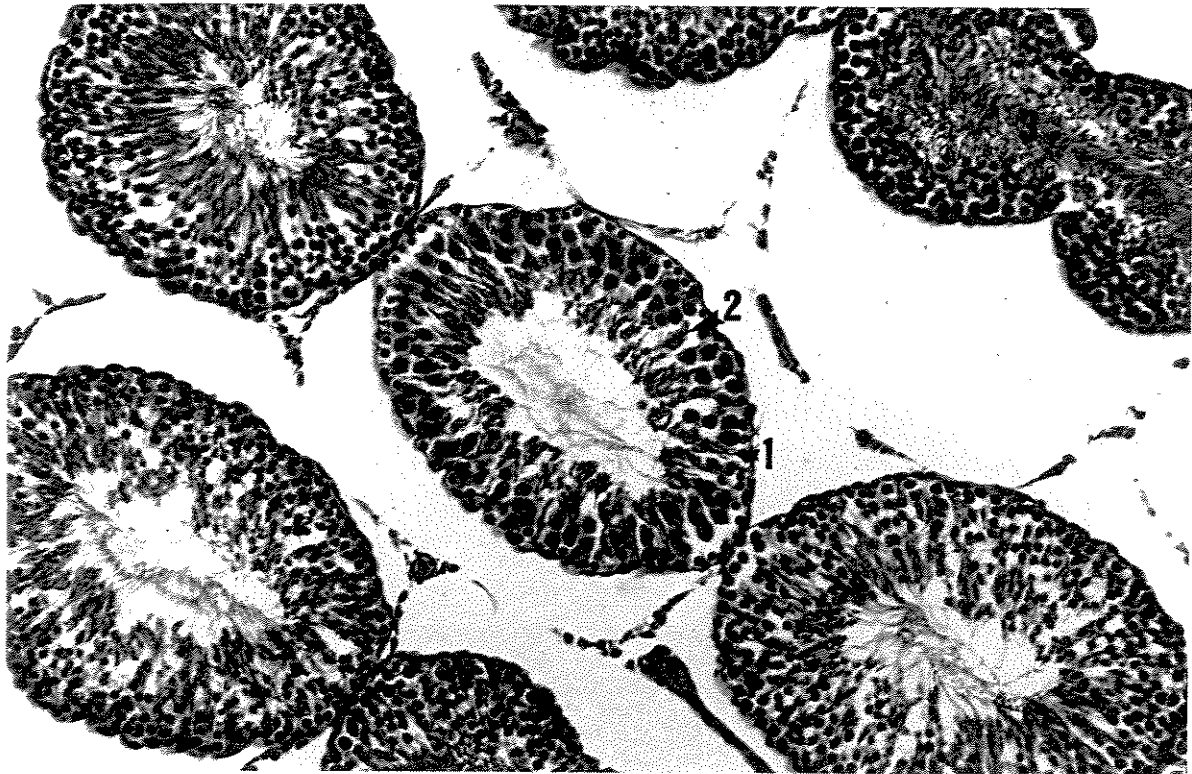


FIGURA 4 - Testículo. Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de ratos do grupo tratado com perda de estratificação das camadas de (1) Espermatogônias e (2) Espermatócitos; (3) material seminal denso com menos espermatozóides. Coloração HE. Aumento 160 x.

5.3.2 Intestino

Nos órgãos do grupo controle, a mucosa intersticial exibe glândulas apresentando células colunares com polaridade mantida, células caliciformes sem particularidades, bem como a camada muscular e a serosa. Vasos pouco dilatados. Histoarquitetura mantida (Figura 5). No grupo tratado, a mucosa do intestino dos ratos , apresentam glândulas de formato mais papilares que os do controle, com maior espaçamento entre elas apresentando aparentemente maior número de células caliciformes. A parte apical das papilas das glândulas da mucosa apresenta degeneração e descamação de células. A musculatura e a serosa não apresentam alterações dignas de nota (Figura 6).

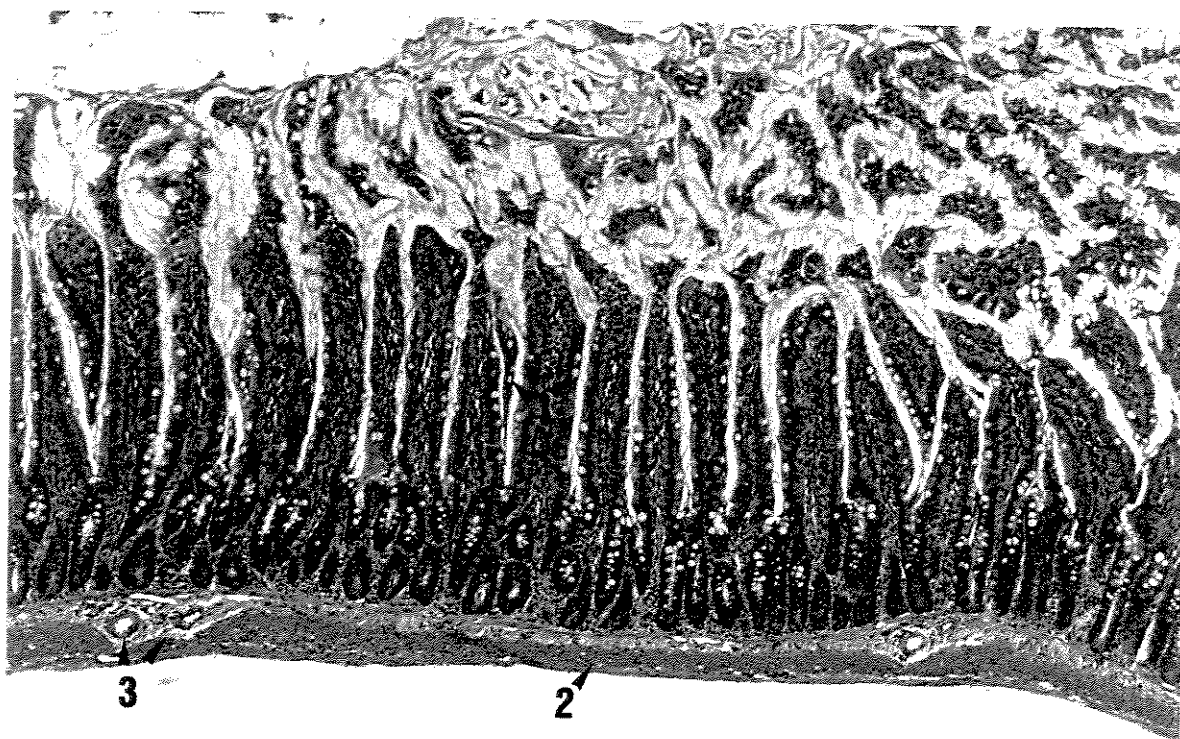


FIGURA 5 - Intestino. Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa do intestino delgado de ratos do grupo controle. (1) células caliciformes; (2) camada muscular e serosa sem particularidades; (3) vasos pouco dilatados. Coloração HE. Aumento 64 x.

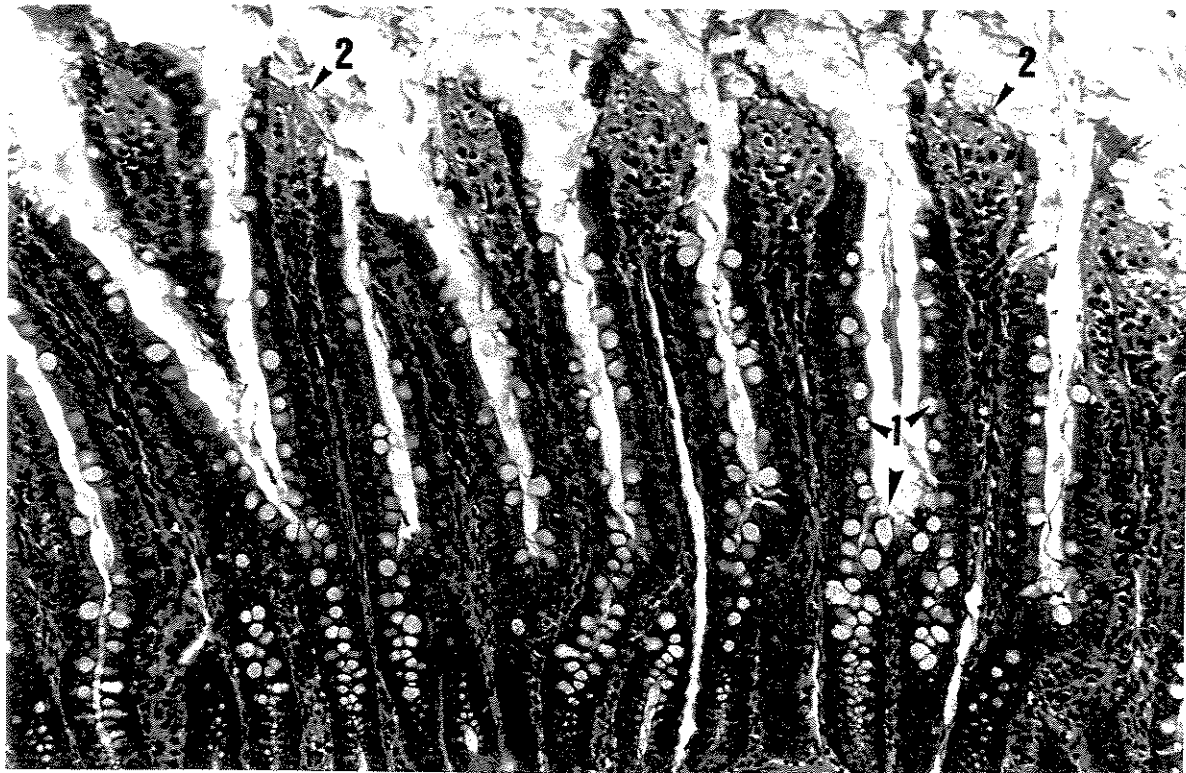


FIGURA 6 - Intestino. Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa do intestino delgado de ratos do grupo tratado. (1) glândulas mais papilares, mais espaçadas e com maior número de células caliciformes; (2) degeneração e descamação celular nas papilas; Coloração HE. Aumento 160 x.

5.3.3 Rim

No grupo controle os néfrons e as células do epitélio dos túbulos apresentam-se preservados. Os glomérulos bem constituídos. O espaço de Bowman presente, ducto proximal (túbulo), ducto de néfron, ducto distal e coletor preservados, com sua histoarquitetura sem particularidades. Glomérulos com celularidade mantida, capilares glomerulares preservados bem como as arteríolas (Figura 7). Nos rins dos animais tratados foi observado degeneração turva das células que formam os túbulos proximais, distais e coletores. Os glomérulos apresentam aumento da celularidade (proliferação) com estreitamento do espaço de Bowman. Os rins apresentam, ainda, capilares medulares congestionados e presença de cilindros hemáticos (Figura 8). SALGADO (1977) e GOYER (1996) relataram em suas pesquisas a presença de nefropatias em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo, com presença de vasos congestionados e aumento de celularidade nos túbulos renais. HASS et al. (1964) em uma pesquisa com coelhos intoxicados com acetato de chumbo, através da sua dieta, apresentaram citomegalia e degeneração celular em túbulos renais. FOWLER et al. (1980) pesquisou a influência do chumbo em ratos expostos a acetato de chumbo (0,5 a 250 ppm) diluído na água, durante 6 meses e encontrou evidência de citomegalia e cariomegalia em células do túbulo renal proximal.

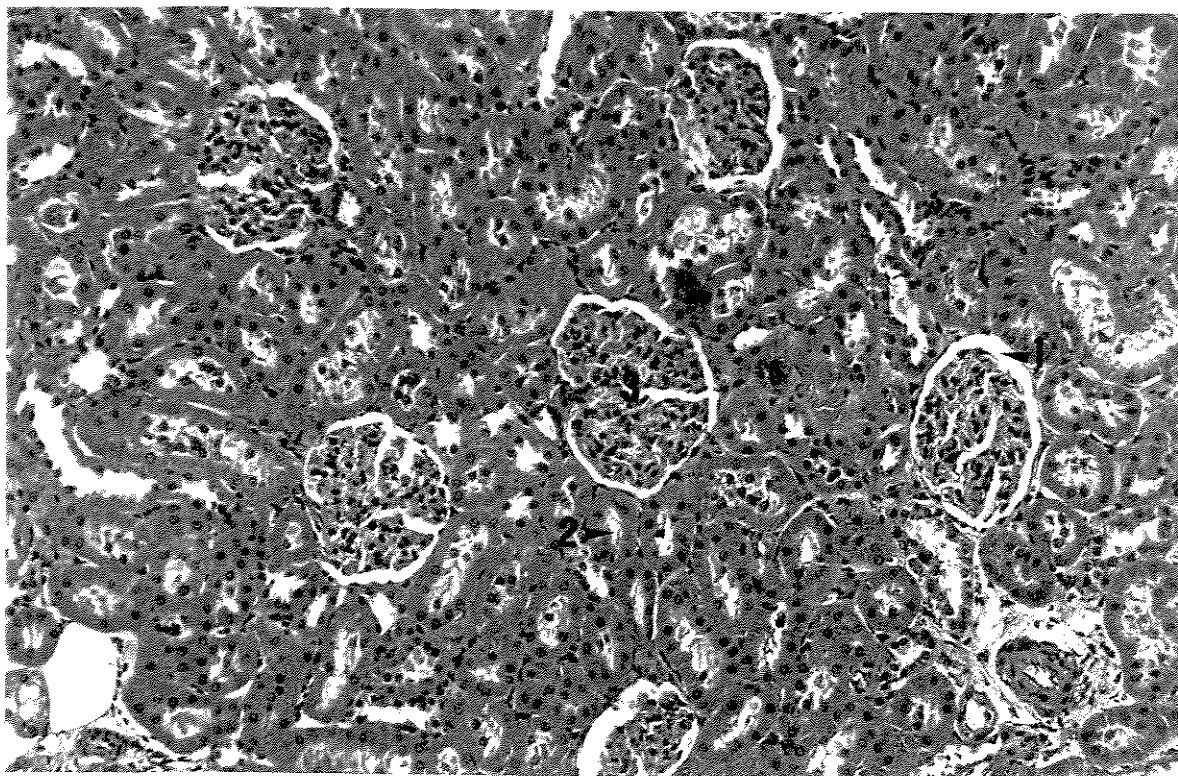


FIGURA 7 - Rim. Fotomicrografia de corte da camada cortical do rim de rato do grupo controle. (1) espaço de Bowman preservados; (2) ducto proximal, distal e coletor preservados; (3) glomérulos com celularidade mantida. Coloração HE. Aumento 160 x.

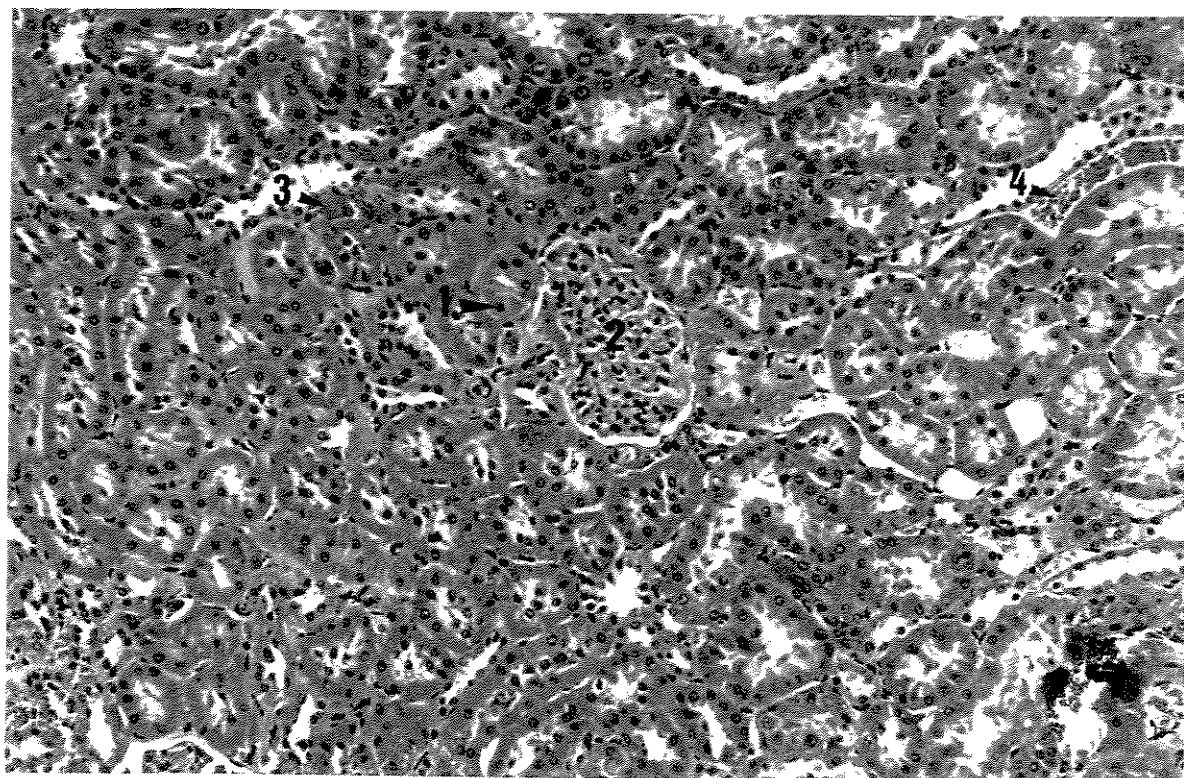


FIGURA 8 - Rim. Fotomicrografia de corte da camada cortical do rim de rato do grupo tratado com acetato de chumbo. (1) células dos túbulos proximais, distais e coletores com sinais de degeneração turva; (2) glomérulos com aumento de celularidade e estreitamento do espaço de Bowman; (3) vasos congestionados; (4) cilindros hemáticos. Coloração HE. Aumento 160 x.

5.3.4 Baço

O baço dos animais controle apresentam-se com polpa branca representada pelos corpúsculos de Malpighi com sua arteríola e linfócitos da zona cortical sem particularidades dignas de nota. Seios venosos e vasos congestos, ao lado cordões de Biboth preservados (Figura 9). No grupo tratado, os sinusóides estão alargados e congestos. A zona cortical dos corpúsculos de Malpighi mais paucicelular que os dos controles. Vasos ectásicos e congestos. As áreas centro foliculares mostram-se aumentadas as custas das células reticulares e os centros germinativos fusionados (Figura 10). FOWLER et al. (1980) em sua pesquisa com ratos expostos a acetato de chumbo (0,5 a 250 ppm), não encontraram lesões histopatológicas no baço desses animais, apenas alterações renais.

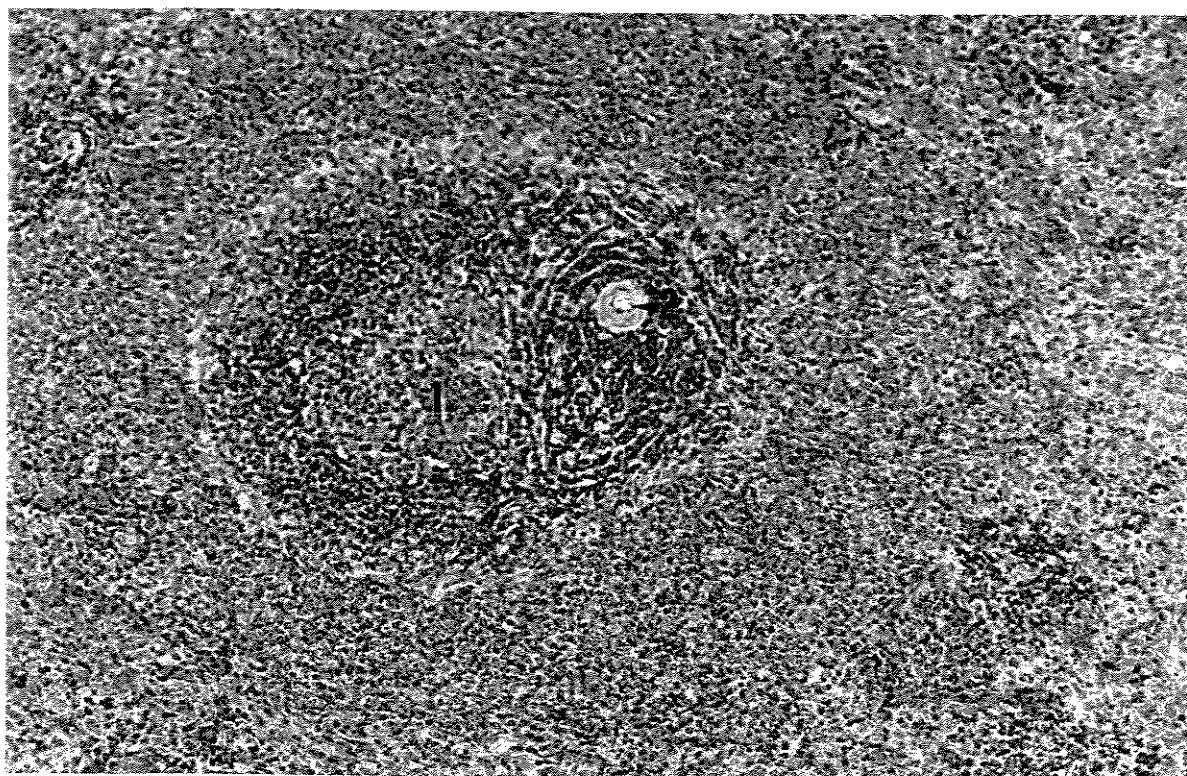


FIGURA 9 - Baço. Fotomicrografia de corte de Baço de rato do grupo controle. (1) corpúsculos de Malpighi (polpa branca) e (2) arteriola central preservados; (3) polpa vermelha com seus seios venosos e vasos congestionados. Coloração HE. Aumento 160 x.

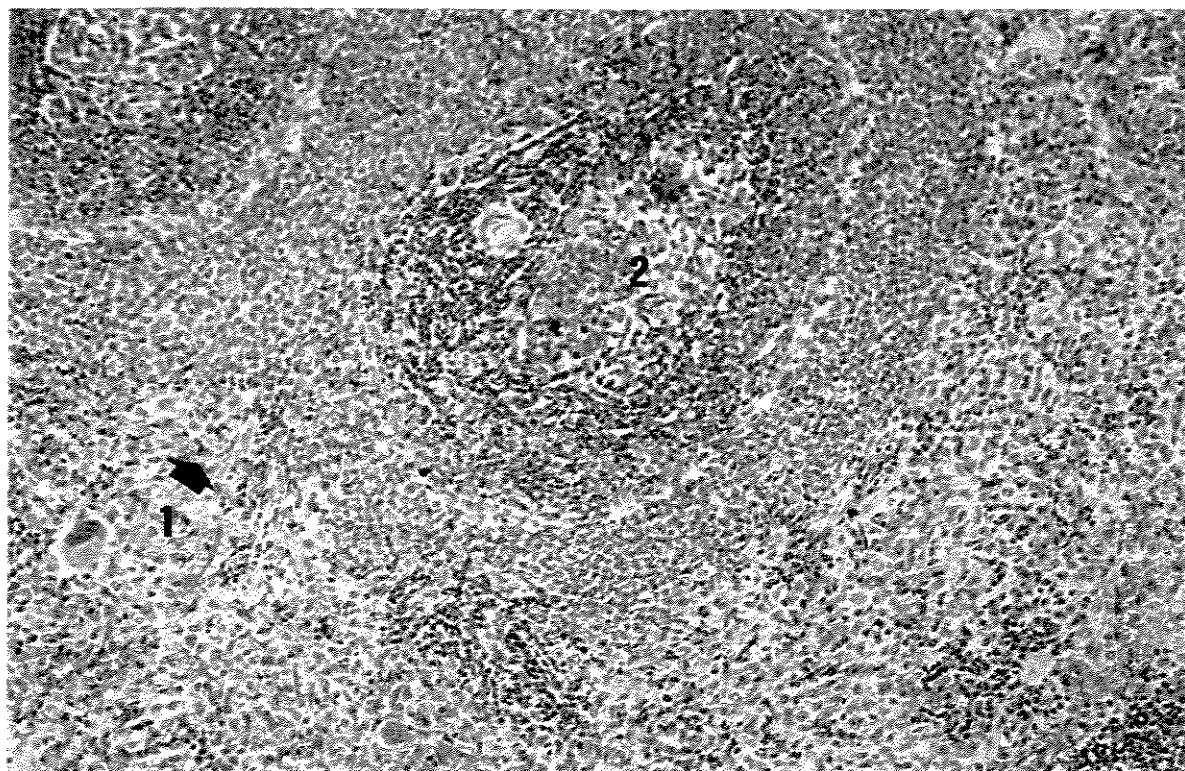


FIGURA 10 - Baço. Fotomicrografia de corte de Baço de rato do grupo tratado com acetato de chumbo. (1) centros germinativos fusionados; (2) corpúsculos de Malpighi mais paucicelulares em relação aos controles. Coloração HE. Aumento 160 x.

5.3.5 Fígado

No grupo controle, o lóbulo hepático apresenta a veia central do lobo sem particularidades; as traves de Remack, os capilares sinusóides preservados bem como os espaços porta com canalículos biliares, arteríola e veia hepática com histoarquitetura mantida (Figura 11). No grupo tratado, a veia central do lóbulo do fígado, mostra-se congesta, bem como as do espaço porta que se apresentam ectásicas e congestionadas (Figura 12). Alguns hepatócitos apresentam nítida degeneração turva, própria das de intoxicação (Figura 13).

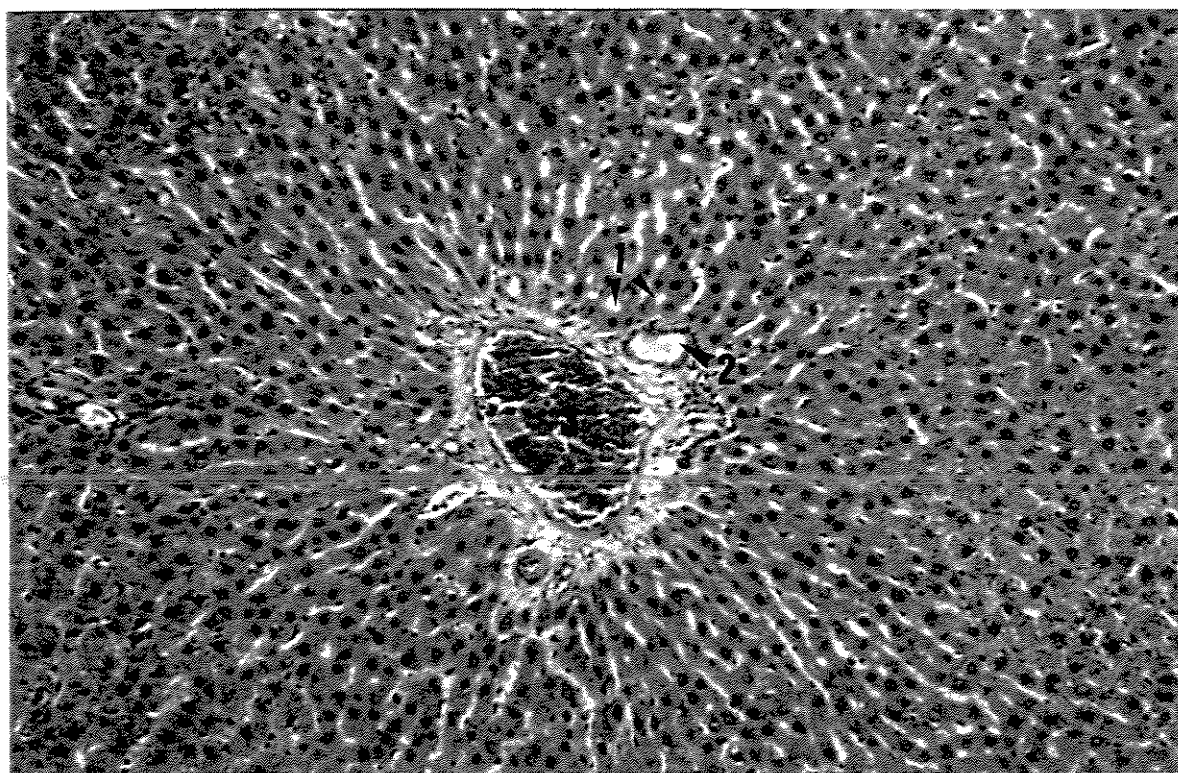


FIGURA 11 - Fígado. Fotomicrografia de corte de fígado de rato do grupo controle, mostrando Espaço Porta com (1) canalículos biliares, (2) arteríola e (3) veia hepática com histoarquitetura preservada. Coloração HE. Aumento 160 x.

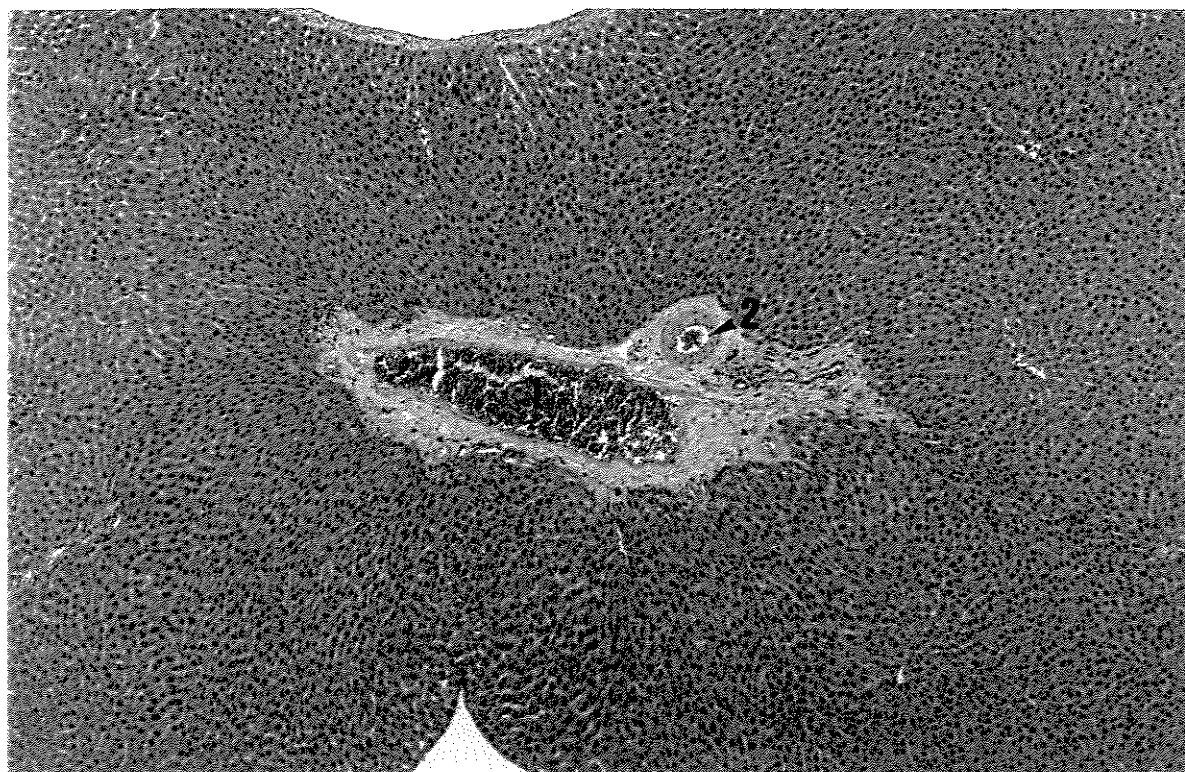


FIGURA 12 - Fígado. Fotomicrografia de corte de fígado de rato tratado com acetato de chumbo. Espaço Porta com: (1) veia central e (2) arteríola ectásicas e congestionadas. Coloração HE. Aumento 64 x.

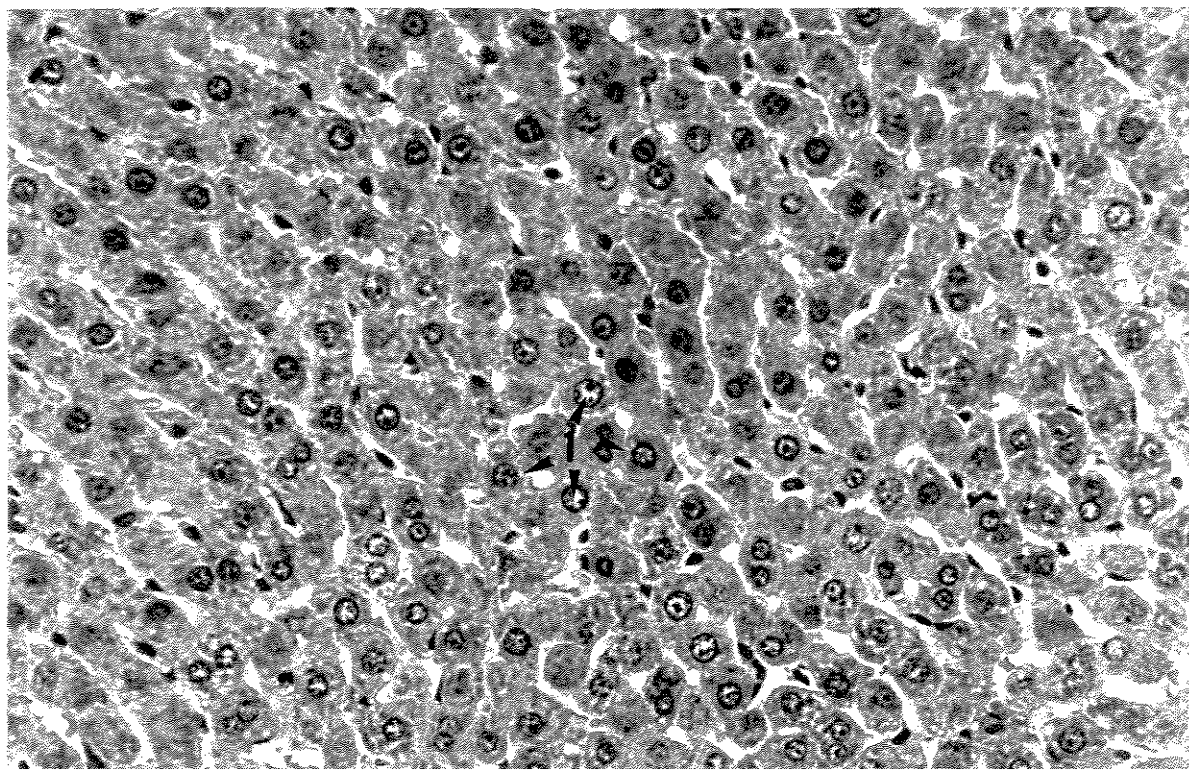


FIGURA 13 - Fígado. Fotomicrografia de Hepatócito do lóbulo hepático do fígado de ratos intoxicados por chumbo. (1) sinais de degeneração turva. Coloração HE. Aumento 400 x.

5.3.6 Estômago

No grupo controle, os estômagos dos ratos apresentam glândulas do tipo tubular, bem constituídas, com células do epitélio glandular tubular apresentando polaridade preservada e raras figuras de mitoses típicas. As glândulas, cortadas de maneira oblíqua ou transversal, apresentam-se de maneira regulares e com luzes preservadas. A musculatura própria da parede do estômago apresenta-se sem particularidades dignas de nota. O epitélio superficial da mucosa do estômago mostra-se preservado (Figura 14). Nos animais tratados, o epitélio superficial da mucosa do estômago, encontra-se desfeito. O epitélio tubular apresenta áreas mais superficiais com degeneração e descamação. As células do epitélio glandular tubular com sinais evidentes de degeneração vacuolar (Figura 15). Ectasia e congestão vascular em vasos da submucosa (Figura 16).

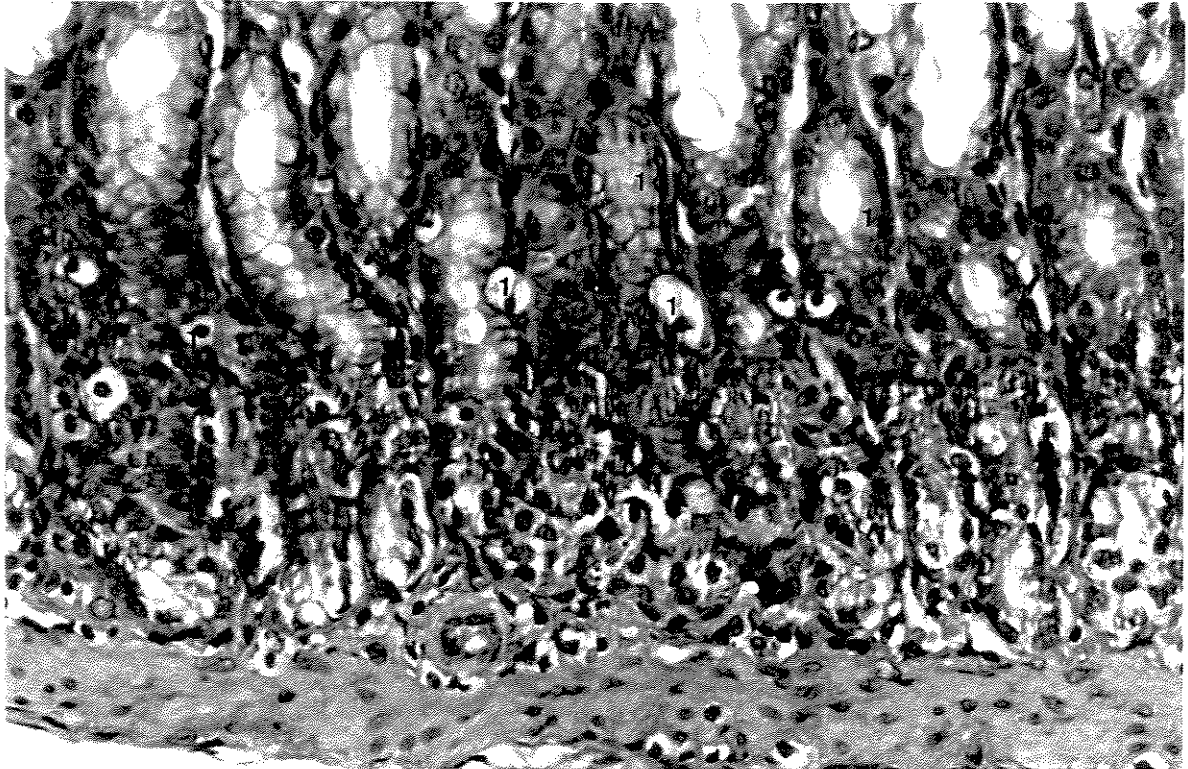


FIGURA 15 - Estômago - Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa do estômago de ratos tratados, intragastricamente, com chumbo. (1) células do epitélio glândular com sinais de degeneração turva.. Coloração HE. Aumento 400 x.

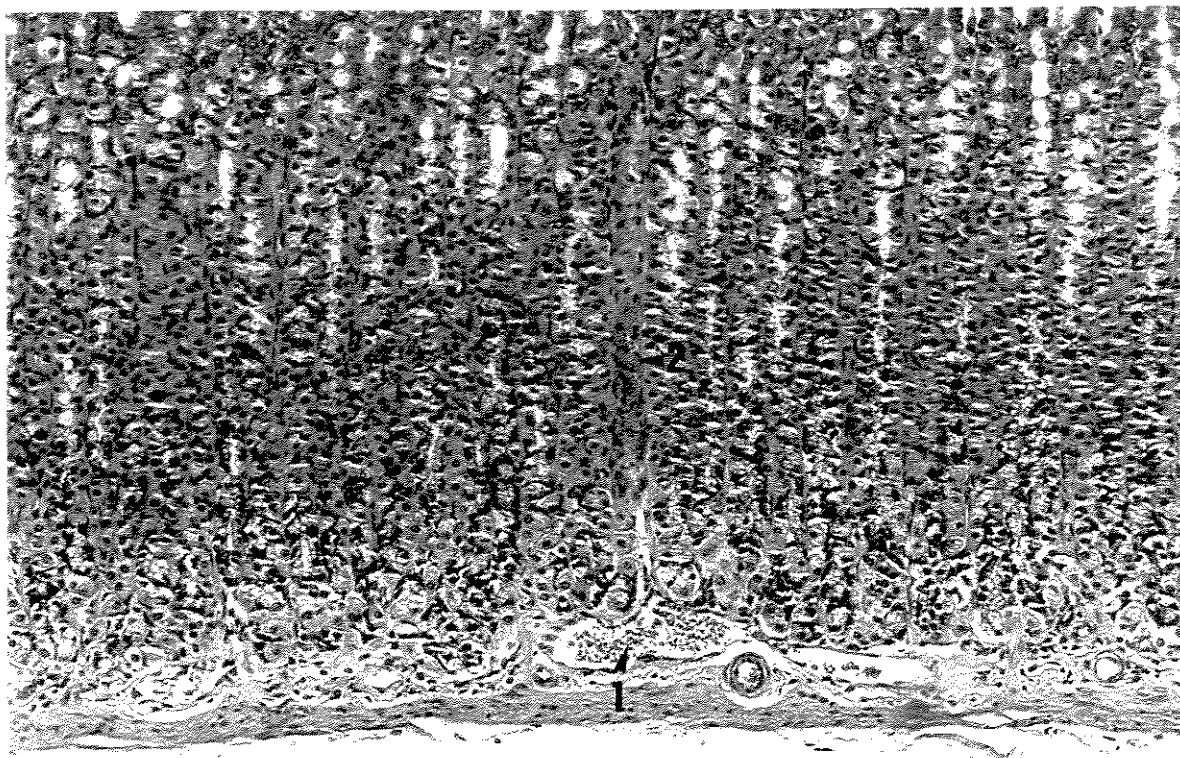


FIGURA 16 - Estômago - Fotomicrografia de corte longitudinal da mucosa de estômago de ratos tratados, intragastricamente, com chumbo. (1) cilindros hemáticos e (2) vasos congestos e ectásicos. Coloração HE. Aumento 160 x

5.3.7 Coração

O coração, no grupo controle, apresenta miocardio com musculatura esquelética estriada cardíaca sem particularidades, bem como o pericárdio e endocárdio. O coração mostra capilares preservados e pouco congestos (Figura 17). O coração tratado apresenta um aumento da celularidade no pericárdio e edema, separando as fibras do miocardio. As fibras do miocardio mostram-se vacuoladas. Capilares ectásicos e congestos (Figura 18). A presença de edema, vasos e capilares congestos são relatados em estudos com animais expostos ao chumbo intragastricamente e por inalação (ASSENATO et al.,1986; LANDRIGAN, 1989; GOYER, 1996). BALESTRA (1991) relatou que pacientes com nível de chumbo igual à 40 µg/100ml de sangue apresentaram cardiopatia com aumento do tamanho das mitocôndrias nas células do miocardio e degeneração celular.

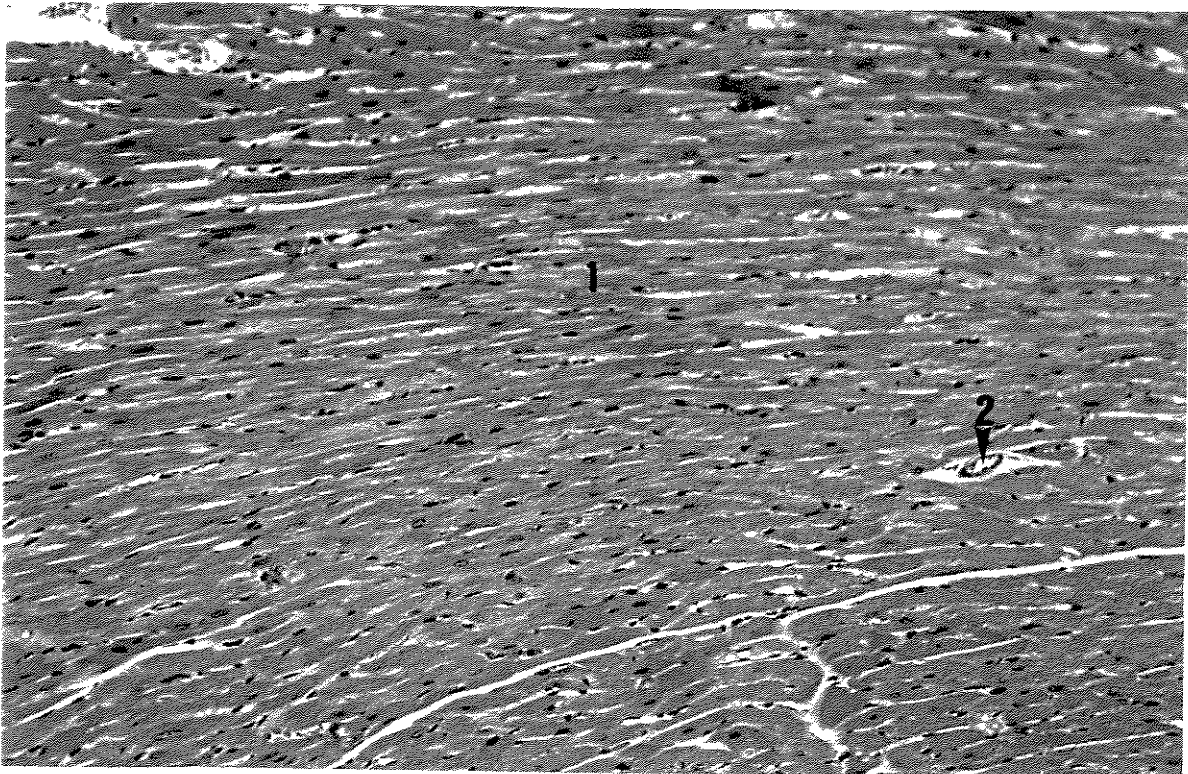


FIGURA 17 - Coração - Fotomicrografia de corte longitudinal do miocárdio de ratos do grupo controle. (1) Fibras musculares preservadas e agrupadas em feixes e com núcleo oval; (2) artérias e capilares preservados e pouco congestionados. Coloração HE. Aumento 160 x.

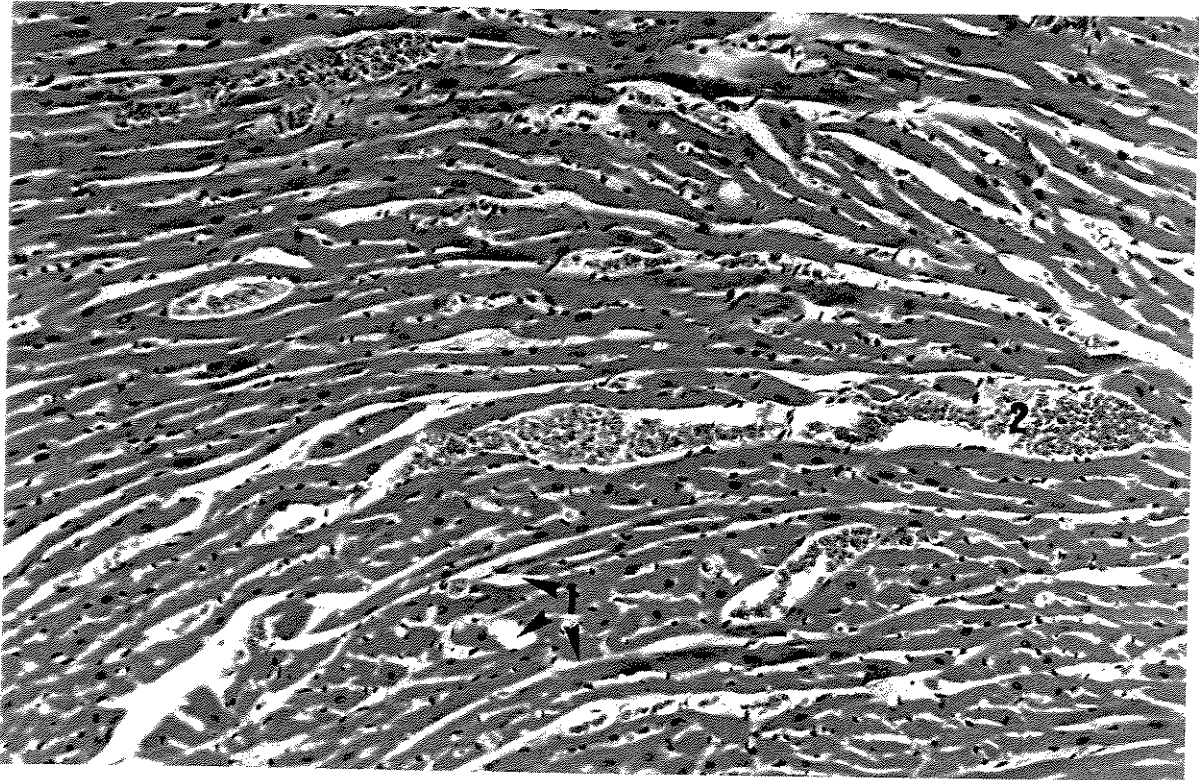


FIGURA 18 - Coração - Fotomicrografia de corte longitudinal do miocárdio de ratos intoxicados por chumbo. (1) Edema separando os feixes de fibras musculares; (2) capilares e vasos ectásicos e congestos. Coloração HE. Aumento 160 x.

5.3.8 Pulmão

Nos pulmões do grupo controle, os brônquios e alvéolos apresentam histoarquitetura preservada, espaços peribronquiolares escassos (Figura 19). Não há edema e nem congestão capilar e não há extravasamento de hemácias dos capilares. A luz dos brônquios e bronquíolos não apresentam inflamações e/ou ectasias. Em algumas áreas, nota-se celularidade de septo alveolar próprio dos ratos, com células cuboidais, núcleos ovalares e cromatina uniforme formando uma ou duas camadas de células. Espaços capilares conservados e com hemácias. Os brônquios e bronquíolos com células colunares, núcleos polares de cromatina uniforme, sem particularidades. A sua luz é perveia, mostrando por vezes células descamadas (Figura 20). Nos pulmões tratados há deposição de pigmento enegrecido na serosa que envolve o pulmão (pleura) em uma área formando reação crônica granulomatosa. Presença de intensa hiperemia ativa em capilares de septos, por vezes com extravasamento de hemáceas. Os septos apresentam-se muitas vezes rotos formando “esporões” próprios dos de enfisema (Figura 21). Os brônquios e bronquíolos apresentam luzes ectásicas, contendo grande quantidade de hemáceas em seu interior. Os vasos estão ectásicos e congestos. Na luz dos alvéolos vê-se em algumas áreas líquido róseo próprio dos de edema pulmonar (Figura 22). Apresenta, ainda na maioria dos pulmões dos animais tratados, no polo mais distal área de hiperinsuflação alveolar, de origem tóxica.

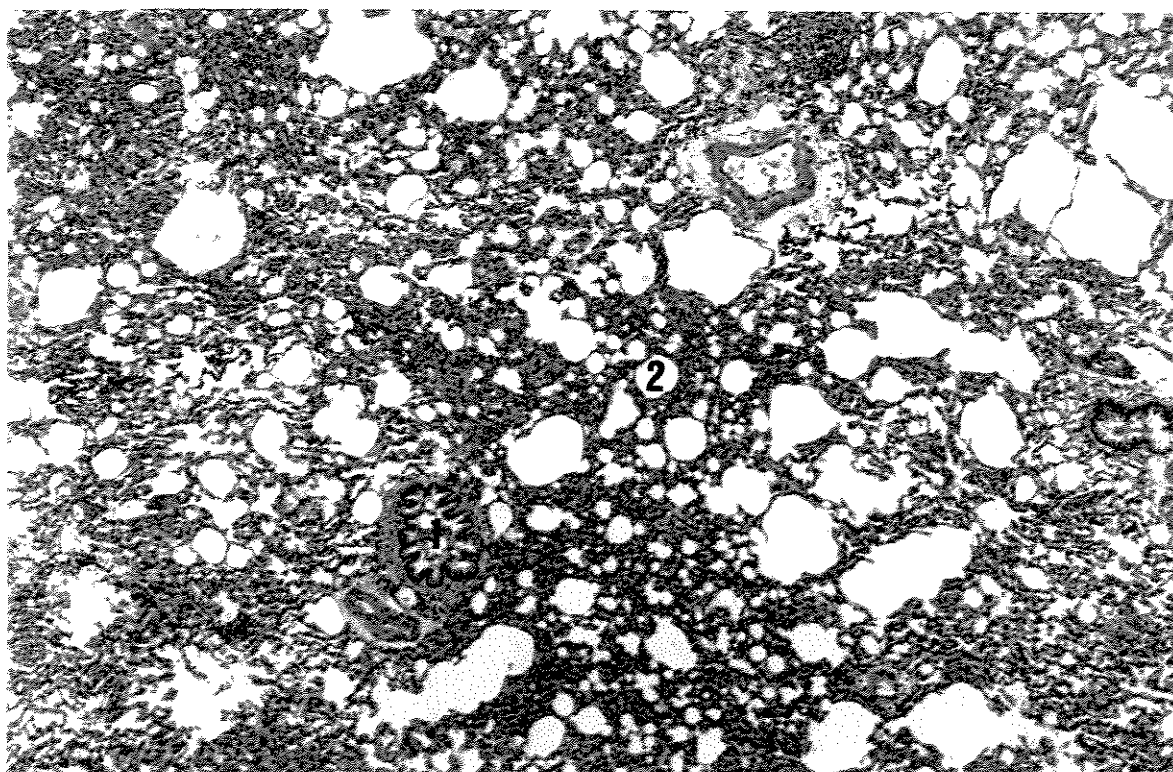


FIGURA 19 - Pulmão - Fotomicrografia do pulmão de ratos do grupo controle. (1) Brônquios e (2) alvéolos preservados, com espaços peribronquiolares escassos. Coloração HE. Aumento 40 x.

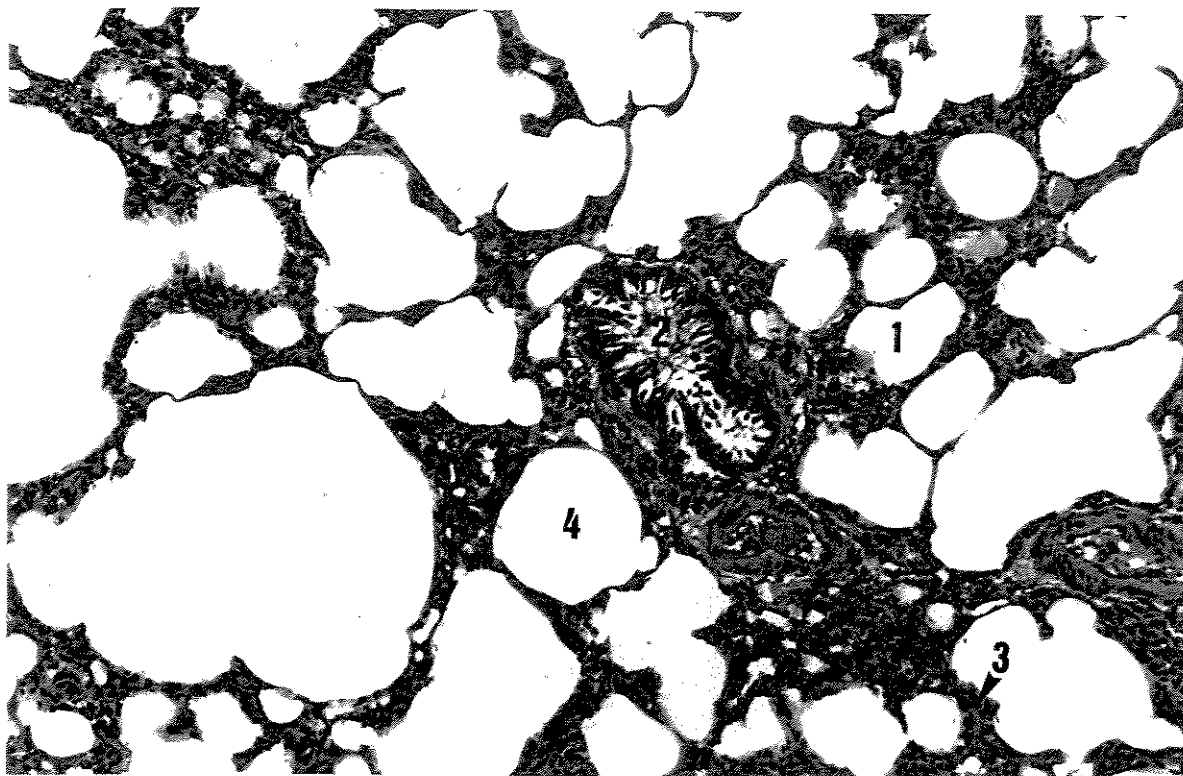


FIGURA 20 - Pulmão - Fotomicrografia do pulmão de ratos do grupo controle. (1) Alvéolos e (2) brônquios com histoarquitetura preservadas; (3) espaços capilares conservados e com hemáceas; (4) luz dos alvéolos pérvea e ausência de edema. Coloração HE. Aumento 100 x.

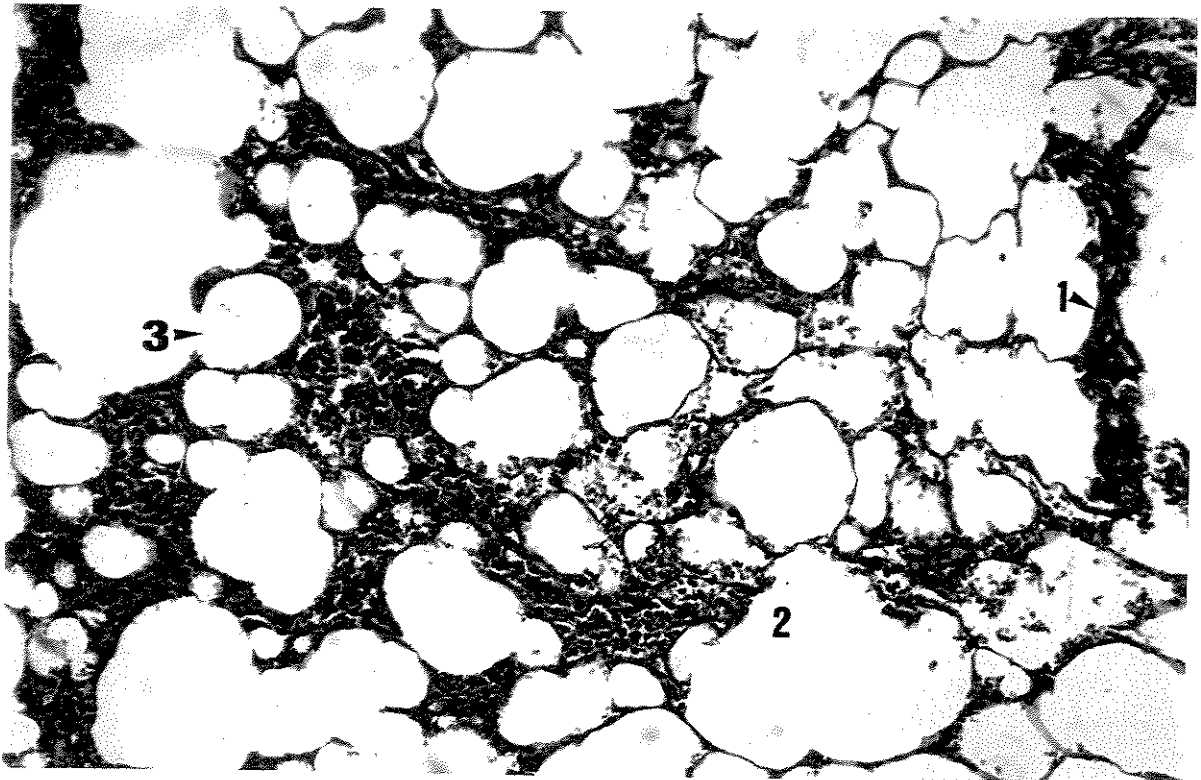


FIGURA 21 - Pulmão - Fotomicrografia do pulmão de ratos intoxicados por chumbo. (1) Deposição de pigmentos enegrecidos na pleura; (2) capilares congestionados e extravasamento de hemáceas; (3) septos alveolares rotos. Coloração HE. Aumento 160 x.

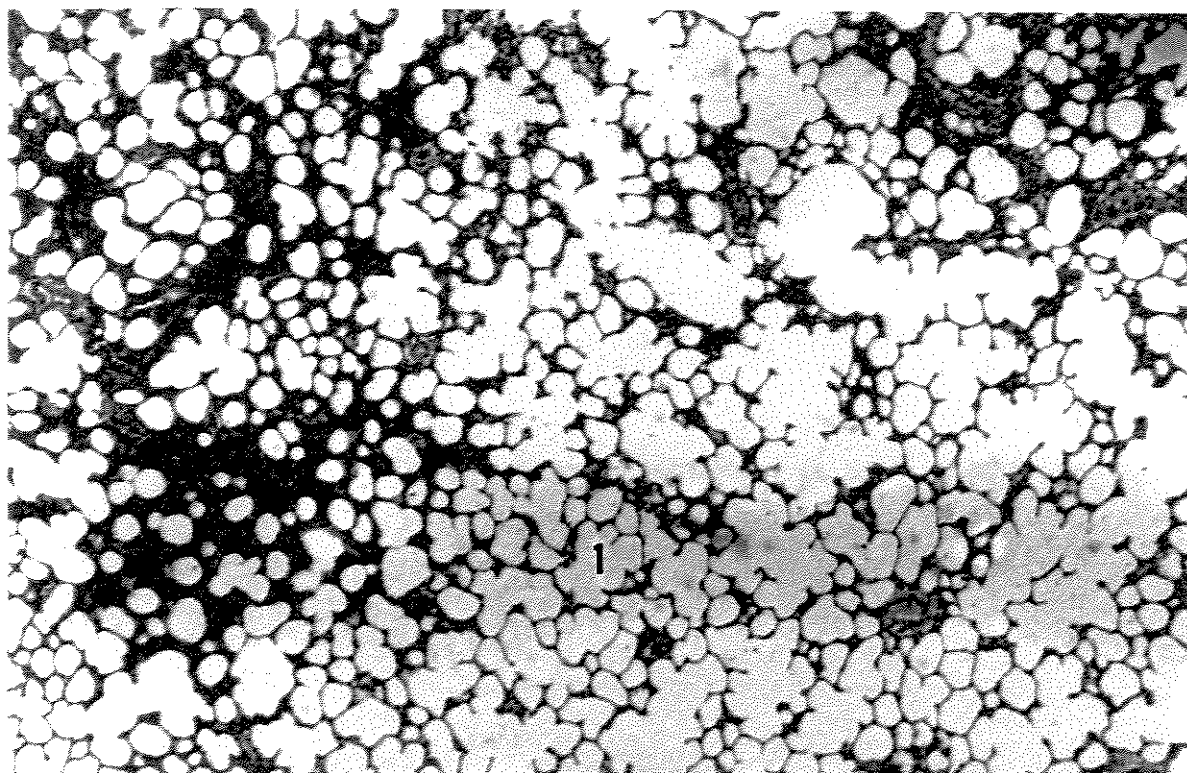


FIGURA 22 - Pulmão - Fotomicrografia do pulmão de ratos intoxicados por chumbo. (1) edema pulmonar (presença de líquido róseo); (2) vasos ectásicos e congestos. Coloração HE. Aumento 64 x.

5.3.9 Cérebro

No grupo controle, os neurônios apresentam corpos celulares estrelados e seus feixes de dendritos sem particularidades (Figura 23), bem como as células da glia, cuja quantidade e disposição apresentam histoarquitetura preservada. Vasos pouco congestionados. Substância Branca não apresentou nada digno de nota. Capa molecular sem particularidades, bem como a pia mater e o plexo coróide. No grupo tratado, os neurônios apresentam em áreas mais distantes de vasos, cariólise e cariorrex (alterações degenerativas). Presença de vasos ectásicos e congestionados na pia mater, bem como no plexo coróide. A camada molecular aparentemente preservada, porém a capa granulosa apresenta-se mais paucicelular, quando comparada ao controle. Nota-se, ainda, edema cerebral, representado pelo aumento do espaço pericelular (Figura 24).

BOULDIN e KRIGMAN (1975) induziram um quadro de encefalopatia aguda por chumbo em cobaias adultas, onde receberam doses diárias de carbonato de chumbo (155mg), em capsulas de gelatina, e após sacrificadas por decapitação após 24 horas, 2, 3, 5, e 6 dias de tratamento. Os capilares cerebrais foram analisados por microscopia eletrônica. Não foram encontradas alterações capilares em nenhuma cobaia intoxicada. Porém GOLDSTEIN et al. (1974) relata em seus estudos com animais intoxicados por chumbo a presença de alterações capilares, hemorragias e edema cerebral.

SANDHIR et al. (1994) analisaram o Sistema Nervoso Central de ratos machos tratados, intragastricamente, com acetato de chumbo (50 mg/Kg). Os

mesmos foram tratados durante oito semanas e após foram sacrificados por decapitação e os cérebros dissecados. Os resultados desse estudo revelaram uma inibição significativa da atividade da Adenil-ciclase e um decréscimo dos níveis de AMPc e por conseqüência uma alteração dos sistemas regulados pelo AMPc, como por exemplo transmissão sináptica, ação de hormônios e neurotransmissores, diferenciação e crescimento celular, expressão gênica, fosforilação de proteínas, etc.

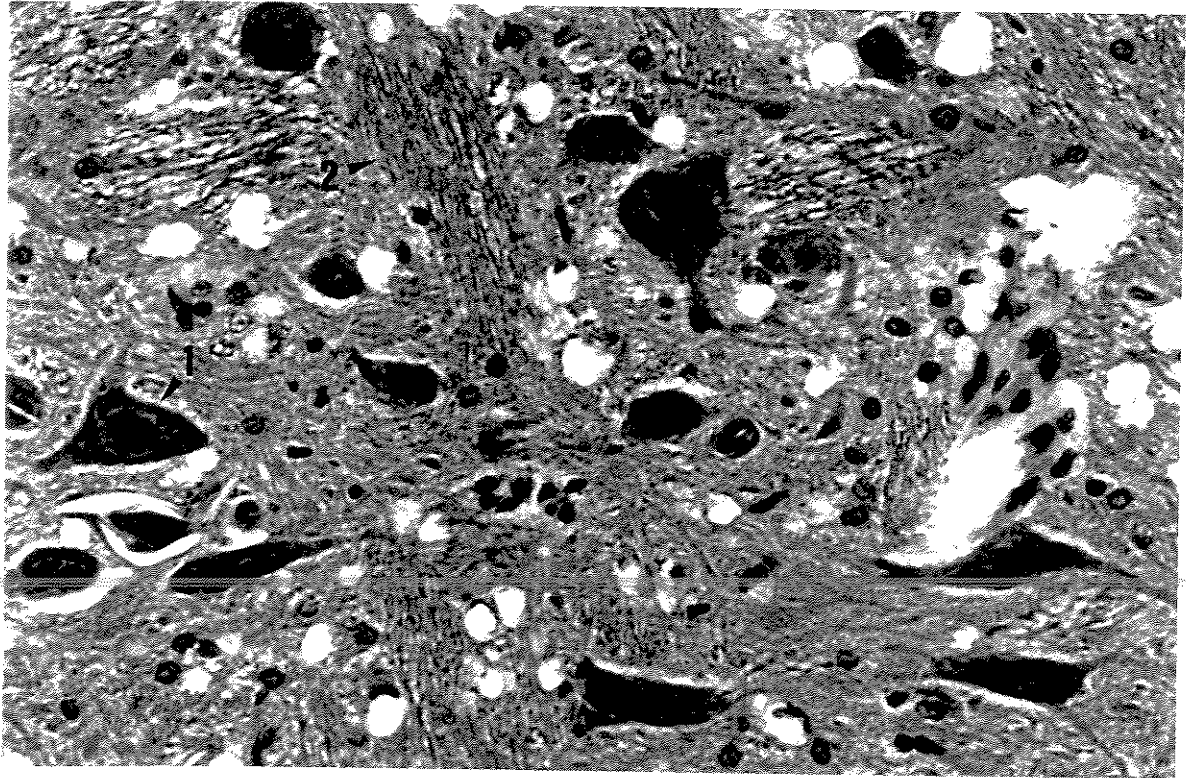


FIGURA 23 - Cérebro - Fotomicrografia do cérebro de ratos do grupo controle. Neurônios com : (1) corpo celular estrelado e (2) feixes de dendritos sem particularidades. Coloração HE. Aumento 400 x.

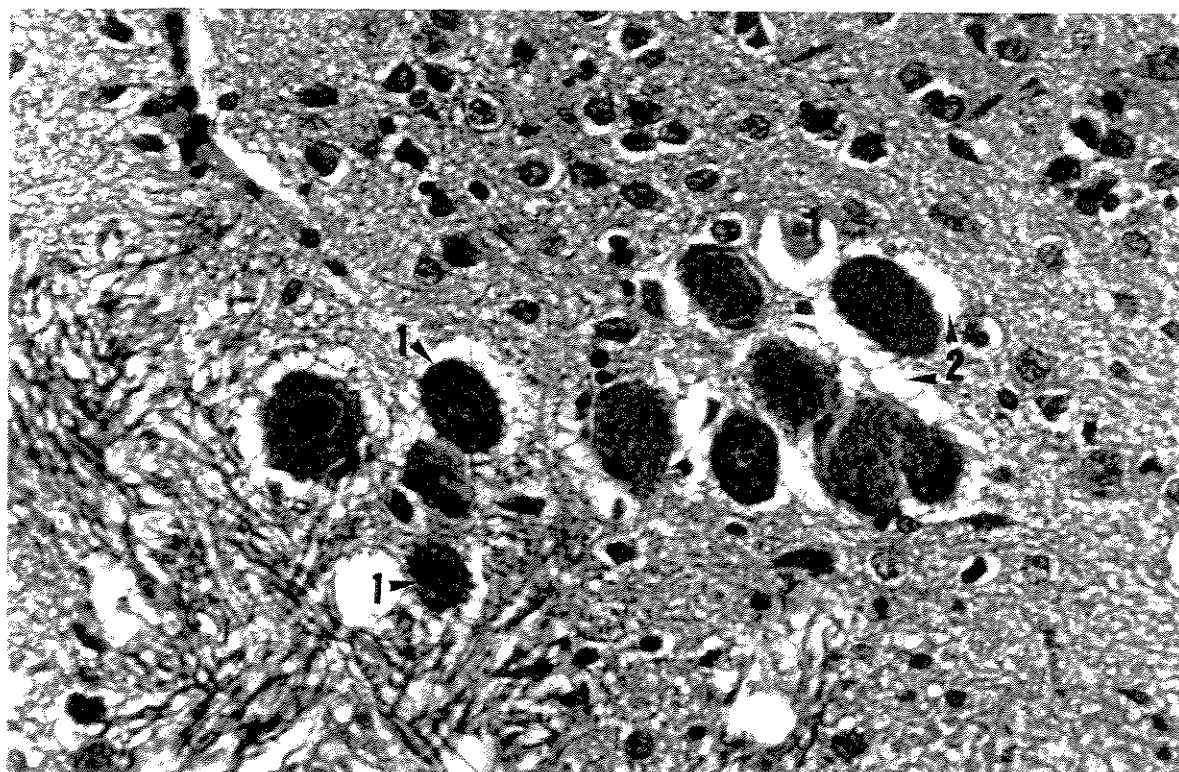


FIGURA 24 - Cérebro - Fotomicrografia do cérebro de ratos intoxicados por chumbo. Neurônios com alterações degenerativas: (1) ausência e/ou fragmentação do núcleo (cariólise e/ou cariorrex); (2) edema cerebral, presença de espaço pericelular. Coloração HE. Aumento 400 x.

5.3.10 Cóclea

Os cortes histológicos do grupo controle apresentam as lâminas ósseas do contorno formando a cóclea óssea, sem particularidades. No seio da columela correm as fibras do nervo coclear e de trecho em trecho vê-se diminutos aglomerados de células nervosas (pertencendo ao gânglio espiral). Ao nível dos cortes do gânglio espiral, partindo do modíolo, projetando-se a lamina espiral óssea que se dirige para o labirinto membranoso. Este ducto coclear contém a endolinfa. A delgada membrana vestibular (Reissner) representa a parede superior do ducto coclear, cuja parede inferior consiste principalmente da lamina espiral membranosa. A parede externa, conhecida como estria vascular, é tida como a produtora de endolinfa. Vê-se em sobre a superfície superior da membrana basilar o órgão de Corti, que é o receptor auditivo sensorial. Este órgão constituído de diversos tipos celulares de sustentação e de células sensoriais ciliadas. A lâmina espiral, pela incidência de alguns cortes, exhibe sua cobertura por um epitélio colunar que forma a parede interna do sulco espiral. A superfície do limbo espiral e uma formação cuticular se continuam com a membrana tectória se estendendo sobre o órgão de Corti. Nota-se que no grupo controle, tanto a celularidade como a constituição das lâminas ósseas, apresentam-se com aspecto eosinofílico, íntegras e sem particularidades dignas de nota (Figura 25). No grupo tratado, vasos ectásicos e congestos (Figura 26), área de escurecimento e de basofilia nas lâminas ósseas das cócleas dos ratos (característico de intoxicações). Proliferação conjuntiva na área da estria vascular e discreta proliferação de tecido fibro-conjuntivo na área do ligamento espiral (Figura 27).

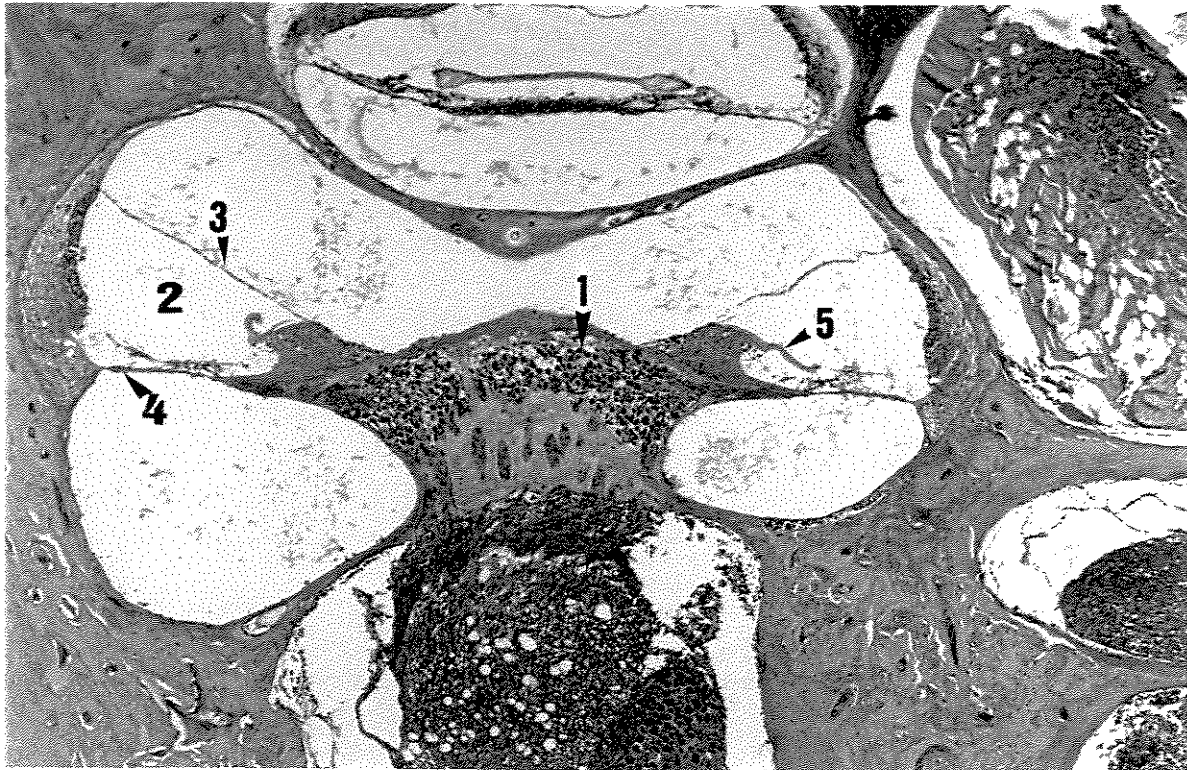


FIGURA 25 - Cóclea - Fotomicrografia do corte transversal da cóclea de rato do grupo controle. Histoarquitetura mantida: (1) fibras do nervo coclear; (2) ducto coclear preservado; (3) membrana de Reissner; (4) membrana Basilar; (5) membrana Tectorial sobre o órgão de Corti; (6) lâmina óssea com aspecto eosinófilo, sem particularidades. Coloração HE. Aumento 64 x.

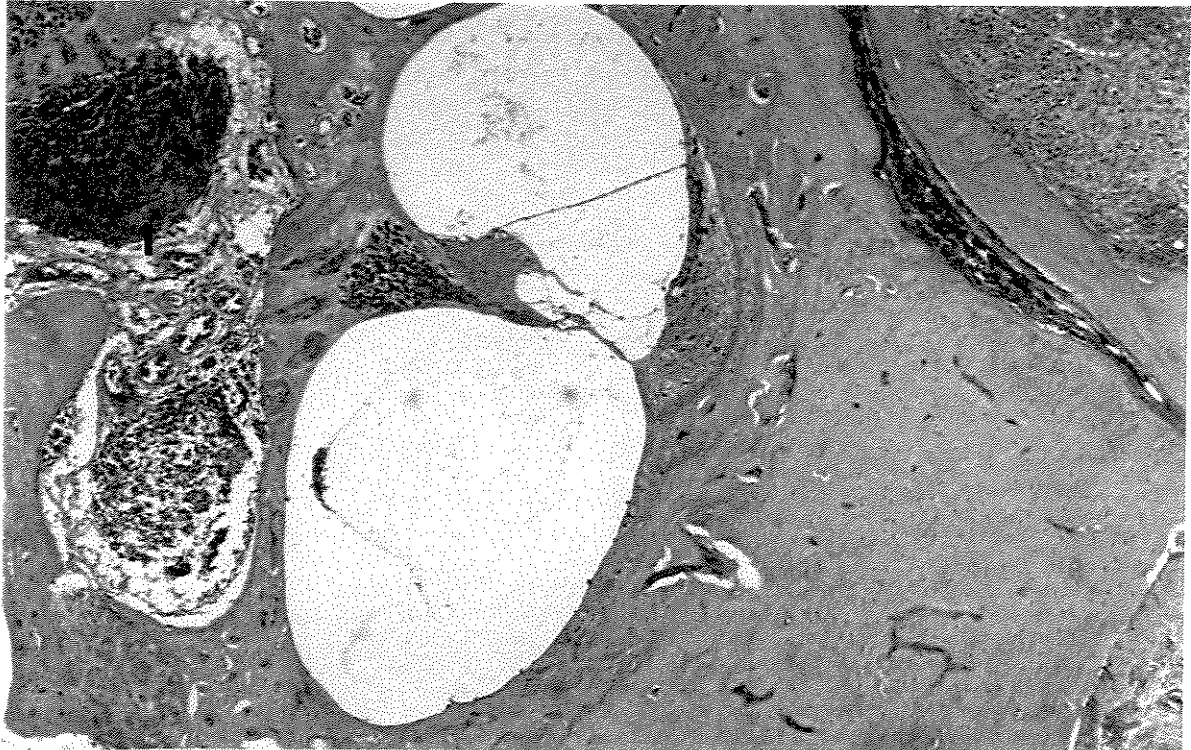


FIGURA 26 - Cóclea - Fotomicrografia do corte transversal da cóclea de rato intoxicado por chumbo. Presença de (1) vasos congestos e ectásicos na região do gânglio espiral. Coloração HE. Aumento 64 x.

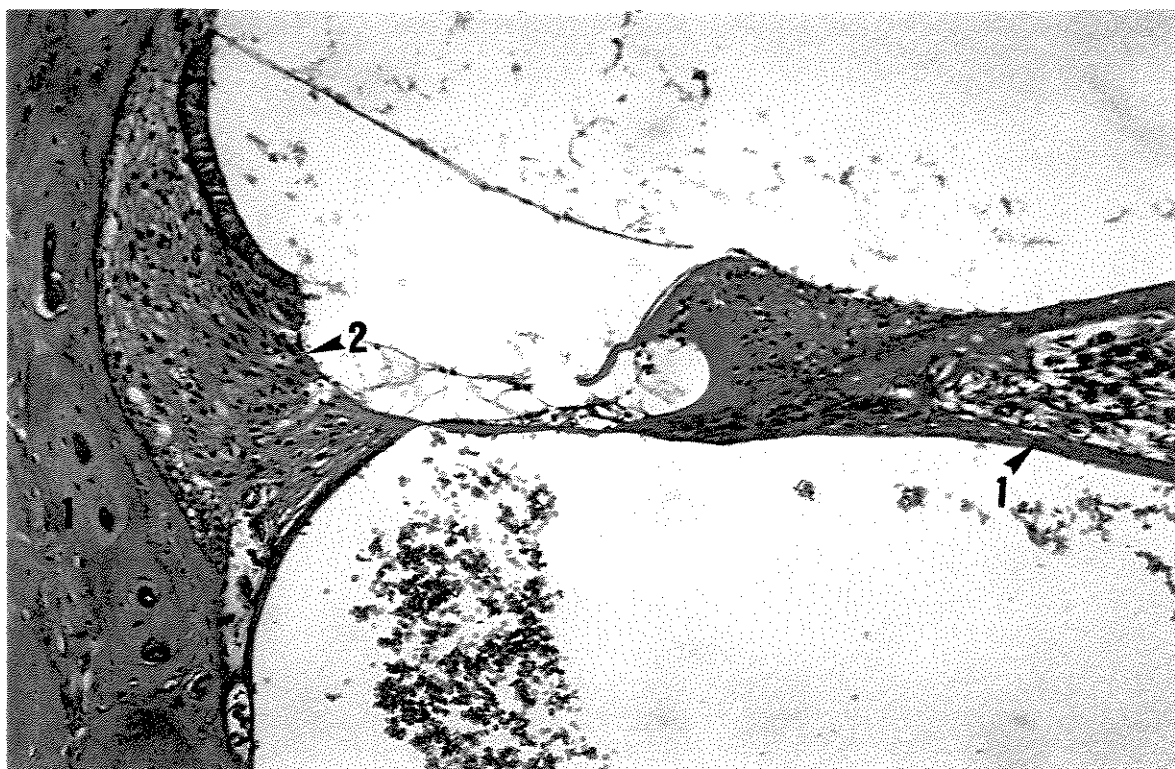


FIGURA 27 - Cóclea - Fotomicrografia do corte transversal da cóclea de rato intoxicado por chumbo. (1) Área de escurecimento e de basofilia nas lâminas ósseas (característico de intoxicação); (2) proliferação fibroconjuntiva na área do ligamento espiral. Coloração HE. Aumento 160 x.

6. CONSTATAÇÕES

Neste estudo, a influência do chumbo na AE da Fac. total, só não foi significativa nos rins dos ratos tratados, contrário aos dados encontrados por SASTRY (1979) em peixes expostos a nitrato de chumbo, onde a inibição foi significativa. Porém, a sensibilidade de cada espécie animal, tipo de composto de chumbo e métodos utilizados na pesquisa, para tratamento dos animais, devem ser considerados.

Segundo BALDIJÃO et al. (1975) a fosfatase ácida de *BMr* são inibidas por metais pesados (bloqueadores do grupo -SH), o que justifica a inibição significativa da atividade da fosfatase ácida de *BMr*, constatado neste estudo, em todos os órgãos do grupo tratado (Gráfico3).

A fosforilação e desfosforilação de resíduos de Tirosina em proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos, como a regulação do metabolismo, expressão gênica, contração muscular, transporte e locomoção celular, aprendizado e memória (JOHNSON e BARFORD, 1993; ZHANG, 1998). O nível de fosforilação em qualquer momento, reflete a atividade relativa de proteínas quinases e fosfatases que catalisam o processo de interconversão (RAMPONI e STEFANI, 1997). Frente a estas citações, não se pode ignorar o fato da existência da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (*BMr* <20 kDa) e nem o fato do chumbo ser um metal pesado (bloqueador de grupos -SH), interferindo na sua atividade e nos processos biológicos que ela participa. Segundo ZHANG

(1998), os processos de aprendizado e memória são um dos eventos biológicos que esta fosfotirosina fosfatase está envolvida, portanto não podemos ignorar os achados de BELLINGER e NEEDLEMAN (1992) e os de SANDHIR e GILL (1994), que relatam alterações cognitivas, de aprendizado e memória em crianças com níveis de chumbo maiores que 10µg/dL de sangue e nem os achados deste estudo, onde a AE da Fac de *BMr* está, estatisticamente, diminuída nos cérebro dos ratos intoxicados por chumbo.

Segundo TAGA (1979) as fosfatases ácidas de *AMr* são insensíveis a agentes bloqueadores de grupos -SH, porém neste estudo foi observado uma inibição significativa da AE dessa fosfatase no Testículo, Intestino, Fígado, Estômago, Coração, Pulmão e Cérebro dos animais tratados com chumbo (Gráfico 4). Esta inibição pode ser devido a interação do chumbo com enzimas que afetam a atividade da fosfatase ácida de *AMr* ou pela ação direta do metal na expressão gênica dessa fosfatase.

A AE da Fac. de *AMr*, do estômago e intestino do grupo tratado, apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo controle (Gráfico 4). Porém a AR desta fosfatase foi significativamente maior nestes dois órgãos do grupo tratado (Gráfico 6). Esse aumento da AR da Fac. de *AMr*, que corresponde a fosfatase lisossomal, ocorreu, justamente, nos dois órgãos que primeiro “receberam” o acetato de chumbo (estômago e intestino), pois a administração do mesmo foi por entubação gástrica. Além deste fato, estes mesmos órgãos apresentaram sinais de degeneração e descamação celular, além de vasos congestionados e ectásicos na análise morfohistopatológica.

O chumbo, além de interferir na atividade enzimática da fosfatase ácida (total, *BMr* e/ou *AMr*) de todos os órgãos analisados neste estudo, também influenciou na histoarquitetura dos mesmos. Estas constatações vêm a confirmar a potencialidade tóxica deste metal ao organismo.

Mesmo frente a constatação de que o chumbo interferiu na histoarquitetura dos órgãos dos ratos tratados, não se pode deixar de enfatizar o fato de que muitas alterações, como as encefalopatias, se devem a aspectos subjacentes aos mecanismos celular e molecular e portanto não serem acompanhadas de alterações morfohistopatológicas evidentes, como relata RÖNNBÄCK e HANSSON (1992) em revisão de literatura.

Neste estudo, de todos os órgãos analisados a cóclea foi o único órgão submetido apenas ao estudo morfohistopatológico e não ao enzimático, devido a sua anatomia. Trata-se de um órgão membranoso e microscópico inserido firmemente a uma cápsula óssea denominada cóclea, composto por duas partes (vestibular e auditiva), dificultando assim o seu processamento para análise enzimática.

As técnicas existentes para dosagem de chumbo no sangue são da década de 70 e apresenta muitas dificuldades. Neste estudo, não foi possível determinar a concentração de chumbo no sangue dos animais, devido a necessidade de equipamentos e técnicas específicas e que não estavam disponíveis para análise de amostras biológicas não humanas. Apesar dessa medida indicar a concentração do metal nos tecidos moles e a proporção de chumbo absorvido pelo organismo, ela não leva em consideração o armazenamento e os sinais clínicos da intoxicação.

7. PERSPECTIVAS

O chumbo é um metal pesado potencialmente tóxico ao organismo vivo, portanto a existência de um método mais acessível e rápido para controle e prevenção de sua toxicidade é de extrema importância. Como a fosfatase ácida está presente no sangue, em eritrócitos, leucócitos e plasma (TAGA, 1979) e como foi constatado nesta pesquisa que a fosfatase ácida é sensível ao chumbo, seria interessante verificar o efeito deste metal na atividade desta enzima no sangue, tanto em animais como em indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo.

Segundo KLEIN e WIREN (1993), crianças expostas ao chumbo apresentam uma inibição no desenvolvimento ósseo devido a uma inibição no processo de calcificação e de reabsorção de depósitos de cálcio. Estes mesmos autores, em pesquisas com cultura de células, relatam inibição na atividade da fosfatase alcalina, que tem como função introduzir a hidroxiapatita ao colágeno da matriz óssea e redução dos níveis de RNAm, promovendo uma alteração na expressão gênica da regulação osteoblástica. Frente a esses dados seria interessante verificar a influência do chumbo nos enxertos ósseos, para prevenir complicações em indivíduos que estão expostos ao chumbo e que podem vir a precisar deste tipo de intervenção.

Outro aspecto importante a ser estudado é o efeito “*in vitro*” do chumbo sobre a fosfatase ácida de AMr, em órgãos de animais, a fim de verificar a influência ou não do chumbo na expressão gênica da fosfatase ácida de AMr.

Pesquisas sobre o efeito do chumbo na atividade de outras enzimas, além da fosfatase ácida, “*in vivo*” e “*in vitro*”, devem ser realizadas, a fim de obter uma melhor compreensão sobre a sua toxicidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamis, Z.; Tatnai, E.; Honma, K. and Ungvary, G. (1999) **Effect of lead (II) nitrate and dithiocarbamate fungicide on the rat lung.** *J. Appl. Toxicol*, 19 (5): 347 - 350.
2. Alexander, B. H.; Checkoway, H.; Costa-Mallen, P.; Faustman, E. M.; Woods, J. S.; Kelsey, K. T.; Netten, C. V. and Costa L. G. (1998) **Interaction of blood lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on marker of heme synthesis and sperm production in lead smelter worker.** *Environ. Health Perspec.* 106 (4): 213 -216.
3. Anetor, J. I. and Adeniyi, F. A. (1998) **Decreased immune status in Nigerian workers occupationally exposed to lead.** *Afr. J. Med. Med. Sci.*,27(3-4): 169 - 172.
4. Assenato, G.; Pacifi, C. and Molinini, R. (1986) **Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead - exposed men.** *Arch. Environ. Health*, 41: 387 - 390.
5. Baldijão, C. E. M.. (1972) **Fosfatase ácida de cérebro de boi. Mecanismo de catálise.** *Tese de Doutorado, Instituto de Química/USP.*
6. Baldijão, C. E. M.; Guija, E.; Bittencourt, H. M. S. and Chaimovich, H. (1975) **Steady state kinetics and effect of SH inhibitors and acid phosphatase from bovine brain.** *Biochem. Biophysys. Acta*, 391: 316-325.
7. Balestra, D. J. (1991) **Adult Chronic lead Intoxication: a review.** *Arch. Intern. Med.*, 151:1718-1720.
8. Bão, S. N. and Dolder, H. (1990) **Ultrastructural localization of acid phosphatase in spermatid cells of *Ceratitis capitata* (Diptera).** *Histochemistry*, 93: 439-442.
9. Barry, P. S. I.. (1975) **A comparison of concentrations of lead in human tissues.** *British J. Ind. Med.*, 32: 119-139.
10. Basha, S. M. (1984) **Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed.** *Can. J. Bot.*, 62: 385-391.
11. Baxter, J. H. and Suelter, C. H. (1984) **Multiple acid Phosphatases in avian pectoral muscle. The postmicrosomal supernatant acid phosphatase is elevated in avian dystrophic muscle.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 228: 397-406.

12. Bellinger, D. and Needleman, H. L. (1992) **Human Lead Exposure.** *Needleman, H. L., Ed.* CRC Press, Boca Ratons F. L., 191- 208.
13. Blakley, B. R. and Archer, D. L. (1981) **The effect of lead acetate on the immune response in mice** *Tox. Appl.Pharma.*, 61: 18-26.
14. Borosková, Z., Benková, M., Soltýs, J., Krupicer, I. and Simo, K. (1993) **Effects of heavy metals imission on the cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariosis.** *Veteri. Parasit.*, 47;245-254.
15. Borschein, R. L., Grote, J. and Mitchell, T. (1989) **Effects of prenatal lead exposure on infant size at birth, in Smith MA, Grant L.D.: Lead Exposure and Child Development.** Boston: K. *Academic. Publishers*, pp: 307-319.
16. Bouldin, T. W. and Krigman, M. R. (1975) **Acute lead encephalopathy in the guinea pig.** *Acta Neuropath.*, 33: 185 - 190.
17. Bressler, J. Forman, S. and Goldstein W. (1994) **Phospholipid metabolism in neural microvascular endothelial cells after exposure to lead in vitro.** *Toxicology Appl. Pharmacol.*, 126: 352 - 360.
18. Buzalaf, M. A. R; Taga, E. M.; Granjeiro, J. M.; Ferreira, C. V.; Lourenção, V. A.; Ortega, M. M.; Poletto, D. W. and Aoyama, H. (1998) **Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weigght protein tyrosine phosphatase.** *Exp. Lung Res.*, 24: 269-272.
19. Chaimovich, H. and Nome, F. (1970) **Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
20. Chia, S. E., Chia, H. P., Ong, C. N. and Jeyaratnam, J. (1996) **Cumulative blood lead levels and nerve conduction parameters.** *Occup. Med.*, 46: 59-64.
21. Choice, D. D., Richter, G. W. (1980) **Effect of lead on the Kidney, in Singhal R.O. Thomas J.A. (eds): Lead toxicity.** Baltimore: *Urban and Schwarzenberg.*
22. Cohen, P. (1992) **Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.** *Trends Biochem. Sci.*, 17: 408 - 413.
23. Coleman, R. A, Schofield, B. H. and Mc Donald, D. F. (1980) **Selective localization of a Golgi apparatus acid phosphatase isoenzyme in bone using pyrodoxal-5'-phosphate.** *J. Histochem. Citochem.*, 28: 115- 123.
24. Columbano, A.; Ledda, G. M.; Siriqu, P. et alii. (1983) **Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate.** *Am. J. Pathol.* 110: 83 - 88.

25. Cook, J. A. ; Marconi, E. A. and Di Luzio, N. R. (1974) **Cadmium endotoxin iteration. Effect on mortality and hepatic function.** *Toxicology Appl. Pharmacol.*, 28: 292 - 302.
26. Counter, S. A., Vahter, M., Laurell, G. Buchanan, L. H., Ortega, F., Skerfving, S. (1997) **High lead exposure and auditory sensory-neural function in Andean children.** *Environ Health Perspect*, 105(5): 522-526.
27. Da Silva, T. L. (1999) **Caracterização cinética da fosfotirosina proteína fosfatase de baixa massa molecular relativa do rim de carneiro. Estudo de Inibidores.** Tese De Mestrado, Instituto De Biologia - UNICAMP.
28. De Araújo, P. S., Mies, V. and Miranda, O. (1976) **Subcellular distribution of low-molecular-weight acid phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta*, 452: 121-30.
29. De Duve, C. (1955) **Tissue fractionation studies. VI Intracellular distribution patterns of enzyme in rat liver tissue.** *Biochem. J.*, 60: 604 - 617.
30. Di Pietro, D. L. and Zengerle, F. S. (1967) **Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta.** *J. Biol. Chem.* 242: 3391-3396.
31. Discalzi, G., Fabbro, D., Meliga, F., Mocellini, A., Capellaro, F. (1993) **Effects of occupational exposure to mercury and lead on brainstem auditory evoked potentials.** *Int. J. Psychophysiol.* 14(1): 21-25.
32. Dorward, A. and Yagminas, A. P. (1994) **Activity of erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in the female cynomolgus monkey (macaca fascicularis): kinetic analysis in control and lead-exposed animals.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 108b(2): 241-252.
33. Eggert, F. M. and Germain, J. P. (1980) **Stable acid phosphatase: i demonstration and distribution.** *Histochemistry*, 66: 307 - 317.
34. EPA (Environmental Protection Agency): **AIR QUALITY CRITERIA FOR LEAD**, (1986) - Vol. I- IV, EPA-600/8-83/02aF. Washington. DC: U. S.
35. Filburn, C. R. and Vanable Jr, J. W. (1973) **Acid phosphatase isoenzymes of *Xenopus laevis* tadpole tails. II. Changes in activity during tail regression.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 159: 694 - 703.
36. Fujimoto, S., Urata, Y., Nakagawa, T. and Ohara, A. (1984) **Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex.** *J. Biochem.*, 96: 1079 - 1088.
37. Fowler, B. A.; Kimmel, C. A.; Woods, J. S.; McConnell, E. E. and Grant, L. D. (1980) **Chronic low-level lead toxicity in the rat.** *Toxicology Appl. Pharmacol.* 56: 59 - 77.

38. Gilfillan, S. C. (1965) **Lead poisoning and the fall of Rome.** *J. Occup. Med.*, Chicago, 7(2): 53-60.
39. Goldstein, G. W.; Asbury, A. K.; Diamond, I. (1974) **Pathogenesis of lead encephalopathy: uptake of lead and reaction of brain capillaries.** *Arch. Neurol. (Chic.)*, 31: 382-389.
40. Gomes, J. R. (1977) **Tratamento da intoxicação pelo chumbo.** *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, 18: 35 - 38.
41. Gonzales, L. W. and Neisel, S. (1973) **Acid phosphatase of rabbit spermatozoa. II. Partial purification and biochemistry characterization of the multiple forms of rabbit spermatozoa acid phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta*, 321: 184 - 194.
42. Goyer, R. A. (1990) **Lead Toxicity: from overt to subclinical the subtle health effects.** *Environ. Health Perspect.*, 86: 177-181.
43. Goyer, R. A. (1996) **Toxic effects of metals.** In: *Toxicology: The basic sciences of poisons.* Ed. Curtis D. Kassen Int. Ed. McGraw-Hill - Health Professions Division 6ª. Ed., Cap 23, p.691 - 736.
44. Granjeiro, J. M. (1994) **Purificação e Caracterização da fosfatase ácida do rim bovino, Tese de mestrado,** Instituto de Biologia / UNICAMP.
45. Granjeiro, J. M.; Taga, E. M. and Aoyama, H. (1997) **Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase.** *An Acad. Bras. Ci.*, 69: 451-460.
46. Hartree, E. F. (1972) **Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometry response.** *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
47. Hass, G. M., Brown, D. V. L.; Eisenstein, R. and Hemmens, A. (1964) **Relations between lead poisoning in rabbit and man.** *The American J. Pathol.*, 45: 691-727.
48. Hayashi, M., Yamamoto, K., Yoshimura, M., Kishimoto, T. and Shitara, A. (1993) **Effects of fasting on distribution and excretion of lead following long-term lead exposure in rats.** *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 24: 201- 205.
49. Hayman, A. R., Warburton, M. J., Pringle, J. A. S., Coles, B. and Chambers, T. J. (1989) **Purification and characterization of a Tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclasts.** *Biochem. J.*, 261: 601-609.
50. Hengge, A. C.; Zhao, Y.; Wu, L. and Zhang, Z. Y. (1997) **Examination of the transition state of the low-molecular mass small tyrosine phosphatase 1. Comparisons with other protein phosphatases.** *Biochemistry*, 36: 7928-7936.

51. Hermanns, W. (1987) **Identification of osteoclasts and their differentiation from mononuclear phagocytes by enzyme histochemistry.** *Histochemistry*, 86: 225 - 227.
52. Himeno, M. et al., (1989) **Acid phosphatase in rat liver lysosomal membranes: purification and characterization.** *J. Biochem.*, 105: 449 - 456.
53. Hu, H.; Rabinowitz, M. and Smith, D. (1998) **Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: Conceptual Paradigms: a review.** *Environ. Health Persp.*, 106 (1): 01 - 08.
54. Jia, Z. (1997) **Protein phosphatases: structures and implicacions.** *Biochem. Cell Biol.*, 75: 17-26.
55. Johnson, L. N. and Barford, D. (1993) **The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins.** *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22: 199 - 232.
56. Johnstone, R. T. and Miller, S. E. (1960) **The metals and metalloids-lead, In: Occupational diseases and industrial medicine.** *Saunders*, Philadelphia, 286 - 304.
57. Jonescu, M. D. and Jonescu, V. M. (1970) **Submicroscopic localization of acid phosphomonoesterase in the Golgi apparatus of multifid glands of *Helix - Pomatia*.** *Stud. Cerat. Biol. Sew. Zoo.*, 22: 489 - 491.
58. Ketchan, C. M., Baumbach, G. A., bazer, F. W. and Roberts, R. M. (1985) **The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia.** *J. Biol. Chem.*, 260: 5768 - 5776.
59. Kina, J. R. (1987) **Periodontopatias: alterações no nível da fosfatase ácida, da b-hexosaminidase e arilsulfatase com progressão da doença.** *Tese De Mestrado, Departamento De Bioquímica Da Faculdade De Odontologia De Bauru - USP.*
60. Klein, R. F. and Wren, K. M., (1993) **Regulation of osteoblastic gene expression by lead.** *Endocrinology*, 132: (6) : 2531-2537.
61. Kontturi, M. (1991) **Is acid phosphatase (PAP) still justified in the management of prostatic cancer.** *Acta Oncologica*, 30: 169-170.
62. Kumar, M. and Gupta, R. K. (1971) **Evaluation of serum acid phosphatase activity in Kidney disease.** *J. Indian Med. Assoc.*, 56: 89-94.
63. Landrigan, P. J., (1989) **Toxicity of lead at low dose - a Editorial.** *British J. Ind. Med.*, 46: 593- 596.
64. Lauwerys, R. R. (1975) **Biological Criteria for selected industrial toxic chemicals a review.** *Scandinavian Journal of Work environment and Health*, Helsinki, 1(13): 139 - 172.

65. Li, Y. and Strohl, W. R. (1996) Cloning, purification and properties of a **phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* (A3(2))**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 2003-2007.
66. Lilis, R. (1981) **Long-term occupational lead exposure: Chronic nephropathy and renal cancer: A case report**. *Am. J. Ind. Med.* 2: 293 - 297.
67. Lin, C. W. and Fishman, W. H. (1972) **Microsomal and Lysosomal acid phosphatase isoenzymes of mouse kidney. Characterization and separation**. *J. Histochem. Cytochem.*, 20: 487-498.
68. Luckey, T. D. and Venugopal, B. (1977) **Metal toxicity in mammals**. *Plenum Press*, New York, 1: 83 - 84.
69. Luna, L. G. (1968) **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of pathology**. 3^a. ed. New York, *McGraw-Hill Book Company*, p.36-38.
70. Mehani, S. (1966) **Lead retention by the lungs of lead-exposed workers**. *Ann. Occupational Hygiene*, Oxford, 9: 165 - 171.
71. Miernyk, J. A. (1992) **Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures**. *Phytochemistry*, 31: 2613 -2616.
72. Modak, J. A. (1975) **Effect of chronic ingestion of lead on the central cholinergic system in rat brain regions**. *Toxicol. Appl. Pharmac.*, 34: 340-347.
73. Morgan, J. M. (1975) **Problems in the diagnosis of lead poisoning**. *Clin. Med.*, Northfield, 82 (6); 14 - 18.
74. Nakamura, R. et al. (1970) **Purifications and propeties of acid phosphatase from human parotid saliva**. *J. Dent. Res.*, 49: 561 - 566.
75. Nehru, B. and Kaushal, S. (1992) **Effect of lead on hepatic microsomal enzyme activity**. *J. Appl.Toxicology*, 12(6): 401-405.
76. Neuman, H. (1968) **Substrat selectivity in the action of alkaline and phosphatase**. *J. Biol. Chem.*, 243: 4671-4676.
77. NG, T.B., Chan, W, Y. and Tamp, P. P. L. (1993) **Correlation of acid phosphatase but not alkaline phosphatase activity with myelination in the developing mouse brain**. *Int. J. Biochem.*, 25: 247-251.
78. Ong, C. N. and Lee, W. R. (1980) **Distribution of lead-203 in human peripheral blood in vitro**. *British J. I. Medicine*, London, 37(1): 78 -84.

79. Osman K., Pawlas, K., Schutz, A., Gazdzik, M., Sokal, J. A. and Vahter, M. (1999) **Lead exposure and hearing effects in children in Katowice, Poland.** *Environ. Res.*, 80(1): 1 -8.
80. Ostanin, K.; Pokalsky, C.; Wang, S. and Van Etten, R. L. (1995) **Cloning and characterization of a *Sccharomyces cerevisiae* gene encoding the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, 270: 18491-18499.
81. Paglia, D. E., Valentine, W. N. and Dahlgner, J. G. (1975) **Effects of low level lead exposure on pyrimidine-5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes.** *J. Clin. Invest.*, 56: 1164-1169.
82. Panara, F.; Pasqualini, S. and Antonielli, M. (1990) **multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme,** *Biochim Biophys. Acta*, 1037: 73 -80.
83. Porru, S. and Alessio, L. (1996) **The use of chelating agents in occupational lead poisoning.** *Occup. Med.*, 46 (1): 41 - 48.
84. Ramponi, G.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ruggiero, M. and Bottaro, B. P. (1989) **The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor.** *FEBS Lett.*, 250: 469-473.
85. Ramponi, G. and Stefani, M., (1997) **Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 279 - 292.
86. Robbins, S. L., Cotran, R. S. and Kumar, V. (1986) - **Patologia Estrutural e Funcional.** Ed. Guanabara, 3ª. Ed., Cap. 10, Pp: 417-459.
87. Rönnbäck, L. and Hansson, E. (1992) **Chronic encephalopathies induced by mercury or lead aspects of underlying cellular and molecular mechanisms.** *Br. J. Of Industrial Medicine*, 49: 233-240.
88. Saeed, A., Tremori, E., Manao, G., Camici, G., Capuggi, G. and Ramponi, G. (1990) **Bovine brain low Mr, acid phosphatase: purification and properties.** *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 22: 81-94.
89. Salgado, P. E. T., (1977) **Diagnóstico laboratorial da intoxicação pelo chumbo.** *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, 18: 21-34.
90. Sandhir, R. and Gill, K. D. (1994) **Lead perturbs calmodulin dependent cyclic AMP metabolism in rat central nervous system.** *Bioch. Molec. Biol. Inter.*, 33(4): 729-742.

91. Sandhir, R.; Julka, D. and Gill, K. D. (1994) **Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and implications on membrane bound enzymes.** *Pharmacol .and Toxicol.*, 74: 66 - 71.
92. Sastry, K. V. and Agrawal, M. K. (1979) **Effects of lead nitrate on the activities of a few enzymes in the kidney and ovary Heteropneustes fossilis.** *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 22 (1-2); 55 - 59.
93. Schwartz, J. and Otto, D. (1991) **Lead and menor hearing impairment.** *Arch. Health*, 46: 300-306.
94. Smith, D. R.; Osterioh, J. D. and Flegel, A .R. (1996) **Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton.** *Environ. Helth Perspec.*, 104: 60 - 66.
95. Singh, V. N. (1991) **Acid phosphatase activity in human uterine fluid in relation to in fertility.** *Horm. Metab. Res.*, 23:615-616.
96. Stefani, M.; Caselli, A.; Bucciantini, M; Pazzagli, L.; dolfi, F.; Camici, G.; Manao, G. and Ramponi, G. (1993) **Dephosphorylation of tyrosine phosphotylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzyme.** *FEBS Lett.*, 326: 131-134.
97. Taga, E. M. (1979) **Fosfatase ácida de fígado de cobaia: purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades.** *Tese De Doutorado*, Instituto De Química-USP.
98. Taga, E. M. and Van Etten, R. L. (1982) **Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes.** *Arch. Biochem. Biphys.*, 214: 505- 515.
99. Vicent, J. B. and Averill, B. A. (1990) **Na enzyme with a double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase.** *FASEB J.*, 4: 3009 -3014.
100. Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993) **Protein tyrosine phosphatases.** *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 101 - 120.
101. White, I. N. H. and Butterwoth, P. J. (1971) **isoenzyme of human erythrocytes acid phosphatase.** *Biochim. Biophys. Acta*, 229: 193-201.
102. Yajima, T. (1988) **Localization of acid phosphatase activity in collagen-secreting and collagen-resorbing fibroblasts.** *Histochemistry*, 90: 245-253.
103. Yam, L. T., Li, C-Y. and Finkel H. E. (1972) **Leukemic reticuloendotheliosis: the role of Tartrate-resistant acid phosphatase in diagnosis and splenectomy in treatment.** *Arch. Intern. Med.*, 130: 248-256.

104. Zelikoff, J. T.; Li, J. H. and Hartwing, A. (1988) Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*, 9: 1727 - 1732.
 105. Zhang, Z.-Y. and Van Etten, R. L. (1991) Leaving group dependence and proton inventory studies of the phosphorylation of a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. *Biochemistry*, 31: 8954 - 8959.
 106. Zhang, Z.-Y. (1998) Protein-Tyrosine Phosphatases: Biological Function, Structural Characteristics and Mechanism of Catalysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33(1): 1-52.
-