



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas

Caroline Ferezin Pinto

**INVESTIGAÇÕES MINERALÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E
ULTRAESTRUTURAIS USANDO O MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERZINCEMIA NA GLÂNDULA PINEAL DE RATAS JOVENS**

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Caroline Ferezin Pinto

INVESTIGAÇÕES MINERALÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS USANDO O MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERZINCEMIA NA GLÂNDULA PINEAL DE RATAS JOVENS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez

Co-orientadora:

Profa. Dra. Elenice Maria Correa

Rio de Janeiro
2010

Ferezin-Pinto, Caroline
Investigações mineralógicas, histopatológicas e
ultraestruturais usando o modelo experimental de
hiperzincemia na glândula pineal de ratas jovens / Caroline
Ferezin Pinto - Rio de Janeiro: UFRJ/ICB/PCM, 2010.
xi, 118 f.: il.;31cm

Orientadora: Ana Maria Blanco Martinez
Co-orientadora: Elenice Maria Correa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de
Janeiro/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfológicas, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 96 - 118

1. Glândula Pineal. 2. Amiloidose. 3. Zinco – Tese.
I. Ana Maria Blanco Martinez. II. Elenice Maria Correa
III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências
Biomédicas, PCM. Janeiro. IV. Investigações mineralógicas,
histopatológicas e ultraestruturais usando o modelo
experimental de hiperzincemia na glândula pineal de ratas
jovens.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com o apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro
2010

Caroline Ferezin Pinto

**INVESTIGAÇÕES MINERALÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E
ULTRAESTRUTURAIS USANDO O MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERZINCEMIA NA GLÂNDULA PINEAL DE RATAS JOVENS**

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez, UFRJ (orientadora)

Profa. Dra. Elenice Maria Correa, UFRJ (co-orientadora)

Profa. Dra. Cláudia dos Santos Mermelstein, UFRJ

Profa. Dra. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio, UFRJ

Profa. Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos, UERJ

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas, UFRJ (Revisor)

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2010

Aos meus pais Fany (*in memoriam*) e Carlos Alberto, por todo o seu carinho, dedicação, amor e cuidados que transcendem esse plano espiritual.

Agradecimentos

Agradeço aos meus guias espirituais por toda proteção, garra e energia ministradas em minha vida, que me deram força para chegar até ao final.

Agradeço a minha orientadora Dr. Elenice Maria Correa por todos os ensinamentos, dedicação, orientações na minha vida profissional e na minha formação não só como Bióloga, mas também como pessoa.

Agradeço a minha amiga Nice, por todos os momentos risonhos, todas as conversas intermináveis na hora do almoço, por todas as palavras de carinho, conselhos, ombro amigo nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu pai, por toda a dedicação a mim e a essa nova fase de nossas vidas.

Agradeço a toda a minha família, principalmente ao meu Tio Fausto, por todo apoio, almoços maravilhosos, carinho, amor e por acreditarem sempre no meu sucesso.

Agradeço ao meu amor amigo Ibson por toda dedicação, incentivo, paciência, amizade, companheirismo, por me dar colo nos momentos que mais preciso e por não me deixar desistir nunca dos meus sonhos.

Agradeço as minhas amigas, todas elas, pelos momentos inesquecíveis, pelo apoio e pela paciência em me ouvir falar do meu mestrado.

Agradeço a minha amiga Sylvania, pelo companheirismo, risadas, fofocas e desabafos nesses 7 anos de UFRJ.

Agradeço aos meus novos companheiros de trabalho em Bio-Manguinhos, especialmente a Vanessa, por serem tão amigos em tão pouco tempo e compreenderem e me ajudarem nos momentos finais do meu mestrado.

Agradeço a Renata Serpa por toda ajuda e colaboração para a realização desse trabalho.

Agradeço a Professora Ana Martinez pelo auxílio no meu mestrado.

Agradeço ao Célio (*in memoriam*) por toda a gentileza, paciência e pelos auxílios prestados na obtenção dos animais para a realização deste trabalho.

Agradeço a Sonia Oliveira pela amizade e apoio técnico.

Agradeço a Deus por me fazer entender, compreender e aceitar suas resignações.

“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

Lista de Ilustrações

Figura 1A: Esquema ilustrativo do desenvolvimento da Glândula Pineal em ratos.....	03
Figura 1B: Fotografia do encéfalo de rato mostrando a localização anatômica da glândula pineal.....	03
Figura 2: Fotomicrografia do parênquima da glândula pineal de ratos	05
Figura 3: Estrutura folha β -pregueada de uma cadeia polipeptídica	11
Figura 4: Estrutura de uma fibrila de amilóide.....	12
Figura 5: Esquema representativo de uma serie de três dedos de zinco.....	17
Figura 6: Esquema ilustrativo do transporte de zinco para dentro do cérebro.....	23
Figura 7: Esquema ilustrativo dos procedimentos para obtenção do material que foi analisado pela técnica TXRF	32
Figura 8: Molécula de vermelho congo	36
Figura 9: Esquema ilustrativo dos procedimentos usados nos testes de labirinto.....	40
Figura 10: Gráficos representativos dos elementos químicos da glândula pineal que apresentaram diminuição na sua concentração.....	43
Figura 11: Gráficos representativos dos elementos químicos da glândula pineal que apresentaram aumento nas suas concentrações.....	43
Figura 12: Gráficos representativos dos elementos químicos do soro sanguíneo que apresentaram diminuição nas suas concentrações.....	46
Figura 13: Gráficos representativos dos elementos químicos do soro sanguíneo que apresentaram aumento nas suas concentrações.....	46
Figura 14: Gráfico representativo da excreção do elemento químico zinco.....	48
Figura 15: Gráfico representativo da média da ambulação dos animais do grupo controle e grupo TAD, nas sessões testes submetidos.....	49
Figura 16: Gráfico representativo das médias da quantidade de <i>Rearing</i> efetuada pelos animais do grupo controle e grupo TAD, nas sessões testes submetidos.....	50
Figura 17: Gráfico representativo da tendência da ambulação e <i>rearing</i> , representando a atividade motora dos animais do grupo TAD	51
Figura 18: Fotomicrografias do aspecto do parênquima da glândula pineal.....	53
Figura 19: Fotomicrografias do parênquima da glandula pineal dos animais do grupo controle e grupo TAD, coradas por hematoxilina e eosina.....	55
Figura 20: Fotomicrografias dos vasos da glândula pineal dos animais do grupo controle e grupo TAD, coradas por hematoxilina e eosina.....	56
Figura 21: Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo TAD, coradas pelo vermelho congo e pré tratadas com permanganato de potássio.....	58

Figura 22: Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle grupo TAD, coradas pela Tioflavina T.....	60
Figura 23: Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle de grupo TAD, coradas pelo TSQ.....	62
Figura 24: Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo TAD, coradas pelo Neo-Timm.....	64
Figura 25: Eletrofotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle e grupo TAD.....	66
Figura 26: Eletrofotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle e grupo TAD.....	67
Figura 27: Eletrofotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle e do grupo TAD.....	68
Figura 28: Eletrofotomicrografias do parênquima da glândula pineal dos animais do grupo controle e do grupo TAD.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fatores neuroquímicos da glândula pineal.....	07
Tabela 2: Algumas funções relacionadas a melatonina.....	08
Tabela 3: Nomenclatura e classificação dos amilóides	10
Tabela 4: Concentrações normais de zinco no organismo.....	16
Tabela 5: Alguns papéis do zinco no organismo humano.....	16
Tabela 6: Indicadores dos níveis de zinco em humanos.....	18
Tabela 7: Concentração de zinco (mg) nos alimentos.....	19
Tabela 8: Recomendação da ingestão de zinco em humanos.....	19
Tabela 9: Principais transportadores de zinco e suas funções e localizações.....	25
Tabela10: Relação entre o peso do animal e a dose administrada.....	30
Tabela11: Relação entre o peso e dose administrada por animal.....	34
Tabela12: Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na glândula pineal de ratas Wistar.....	42
Tabela13: Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{Ml}^{-1}$) nas amostras do soro sanguíneo de ratas Wistar.....	45
Tabela14: Concentração elementar média ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dos elementos químicos nas amostras de fezes frescas de ratas Wistar.....	47
Tabela15: Média das distâncias percorridas no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar.....	49
Tabela16: Quantidade de <i>Rearing</i> efetuada no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar do grupo controle e do grupo TAD nas sessões teste 1 a 3.....	50
Tabela17: Ração ingerida pelos animais durante o experimento.....	51
Tabela18. Peso corporal (g) das ratas Wistar do grupo controle e do grupo TAD.....	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

- A β 2M** - Amilóide derivado de β_2 -microglobulina
- AA** - Proteína associada a amilóide – amiloidose secundária
- AAC** - Angiopatia amilóide cerebral
- AANF** - Amilóide derivado do fator natriurético auricular
- AApoAL** - Amilóide derivado da cadeia leve da apolipoproteína
- AApoAII** - Amilóide derivado da cadeia leve da apolipoproteína de murinos
- Abri** - Amilóide derivado da proteína precursora de amilóide Bri
- ACal** - Amilóide derivado de calcitonina
- ACys** - Amilóide derivado de cistatina c
- AFib** - Amilóide derivado de cadeia α do fibrinogênio
- AGel** - Amilóide derivado de gelsolina
- AH** - Cadeia pesada de amilóide
- AIAPP** - Polipeptídeo amilóide dos ilhéus pancreáticos
- AIEA** - Agência internacional de energia atômica
- AKer** - Amilóide derivado de cerato-epitelina
- AL** - Cadeia leve de amilóide
- Alns** - Amilóide derivado de insulina em murinos
- ALys** - Amilóide derivado de lisozima
- AMed** - Amilóide derivado de medina
- AMPA** – α amino-5-metil-4-isoxalona propionato
- AMPc** – Adenosina monofosfato cíclica
- APro** – Amilóide derivado da prolactina
- APP** - Proteína precursora de amilóide
- ATTR** – Amilóide derivado de transtirretina
- AXIL** - Sistema de análise quantitativa de raio x
- A β** - Beta amilóide
- BHE** - Barreira hematoencefálica
- BHL** - Barreira hematoliquórica
- CLE** – Compartimento de líquido extracelular
- Cys** - Cisteína
- DA** - Doença de Alzheimer
- DH** - Dose hiperzincêmica
- GABA** - Ácido gama-aminobutírico
- GC** - Grupo controle
- GCN** - Grupo controle neutro

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
GP - Glândula pineal
GTAD - Grupo terapia de alta dose
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HE - Hematoxilina Eosina
His - Histidina
HPGe - Detector de germânio hiperpuro
IL - Interleucina
LCA-NEuro - Labirinto de campo aberto do laboratório de neurobiologia
LIN - Laboratório de Instrumentação Nuclear
LMD - Limite mínimo de detecção
ME - Microscopia eletrônica
MT - Metalotioneína
NMDA - N-metil D-Aspartato
NOEL - Níveis que não se observa efeito tóxico
NPT - Nutrição parenteral total
PBS - Tampão fosfato
PT - Proteoglicanos
PrP - Proteína priônica
PrP^{sc} - Isoforma anormal e patogênica da proteína priônica
RI - Ração ingerida
ROS - Espécie reativa de oxigênio, reactive oxygen species
SAA - Proteína amilóide sérica
SAM - Sessão ambientação
SNC - Sistema nervoso central
ST - Sessão teste
TAD - Terapia de alta dose
TNF - Factor de necrose tumoral
TSQ - N-(6-metoxi-8-quimolil)-p-toluenosulfonamida
TXRF - Fluorescência de raio X por reflexão total
U.V. - Raio ultra violeta
V.O. - Vira oral
Z - Número atômico
ZEN - Neurônios ricos em zinco , zinc-enriched neurons

Sumário

Lista de Ilustrações.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviações e Siglas.....	x
1. Introdução.....	01
1.1. Aspectos Gerais.....	01
1.2. Glândula Pineal.....	02
1.3. Amiloidose.....	08
1.3.1. Características gerais.....	09
1.3.2. Natureza física do amilóide.....	11
1.3.3. Amiloidose sistêmica.....	12
1.3.4. Amiloidose localizada.....	13
1.4. Íons Metálicos.....	14
1.4.1. Metabolismo mineral.....	14
1.4.2. Zinco.....	15
1.4.2.a. Zinco no organismo humano.....	15
1.4.2.b. Sistemas de absorção, excreção e determinação dos níveis de zinco em humanos.....	17
1.4.2.c. Biodisponibilidade do zinco.....	18
1.4.2.d. Ação antioxidante do zinco.....	20
1.4.2.e. Histoquímica do zinco.....	21
1.4.2.f. Compostos de zinco.....	21
1.4.2.g. Uptake de zinco no cérebro.....	22
1.4.2.h. Toxicidade do zinco.....	23
1.4.2.i. Toxicidade do zinco e sua contribuição a doenças neurodegenerativas.....	24
2. Objetivos.....	27
Objetivos Gerais.....	27
Objetivos Específicos.....	27
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Animais utilizados.....	28
3.2. Administração das doses de zinco.....	29
3.3. Análise pela técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF).....	29
3.3.1. Perfusão e retirada do material.....	30
3.3.2. Procedimento para a digestão química em meio ácido.....	31

3.3.3. Utilização de amostras certificadas.....	32
3.3.4. Instrumentação.....	32
3.3.5. Análises estatísticas.....	33
3.4. Análise da glândula pineal pelas técnicas histológicas, histoquímicas e ultraestruturais.....	33
3.4.1. Administração das doses.....	33
3.4.2. Perfusão e retirada do material.....	35
3.4.3. Inclusão em parafina e microtomia.....	35
3.4.4. Colorações.....	35
a) Técnica de Hematoxilina-Eosina.....	35
b) Método Vermelho Congo Romhányi.....	35
b.1) Mecanismo de coloração.....	36
c) Tioflavina T.....	36
d) Técnica de pré-tratamento com permanganato de potássio.....	36
e) Técnicas Histoquímicas para evidenciar o Zinco.....	37
e.1) TSQ -N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-toluenosulfonamida.....	37
e.2) Método do Neo-Timm.....	37
3.5. Microscopia eletrônica.....	38
3.5.1. Perfusão e retirada do material.....	38
3.5.2. Inclusão em eppon.....	39
3.6. Avaliação da atividade motora em animais submetidos à terapia de alta dose (TAD).....	39
3.6.1. Testes comportamentais.....	39
3.6.2. Parâmetros considerados para a avaliação da atividade motora.....	40
3.6.3. Procedimentos para análises em relação ao comportamento alimentar e variação de peso dos animais submetidos à TAD.....	41
3.6.4. Análises estatísticas.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. Análise quantitativa por TXRF.....	42
4.1.1. Glândula pineal.....	42
4.1.2. Soro sanguíneo.....	45
4.1.3. Fezes.....	47
4.2. Resultados de análises da atividade motora e do comportamento alimentar.....	48
4.2.1. Ambulação.....	48
4.2.2. <i>Rearing</i>	49
4.2.3. Resultados sobre a atividade motora.....	50

4.2.4. Ração ingerida.....	51
4.2.5. Peso corporal (Kg).....	52
4.3. Análises histopatológicas na glândula pineal.....	52
4.3.1. Aspectos normais da glândula pineal (GP).....	52
4.3.2. Hematoxilina Eosina.....	54
4.3.3. Vermelho Congo.....	57
4.3.4. Tioflavina T	59
4.3.5. TSQ.....	61
4.3.6. Neo-Timm.....	63
4.3.7. Microscopia eletrônica.....	65
5. Discussão.....	71
6. Conclusões.....	94
7. Bibliografias.....	93

Resumo

Neste trabalho foi utilizado o modelo experimental de hiperzincemia já desenvolvido em ratas com 90 dias pós-natal que recebiam dose oral equivalente a 600 mg/kg $ZnSO_4$, e que desenvolveram amiloidose. Foi feita a determinação das concentrações de zinco em amostras biológicas (sangue, fezes) e na glândula pineal destes animais através da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF). Outros enfoques associados a este trabalho permitiram avaliar por microscopia eletrônica a localização dos depósitos amilóides e verificar a sua natureza através de método histoquímico específico (permanganato de potássio), caracterizar na glândula pineal as áreas positivas para zinco usando histoquímica para zinco (TSQ e Neo-Timm), e confirmar resultados anteriores que apontavam para o comprometimento da atividade motora na situação de hiperzincemia. Com os resultados foi possível concluir que a concentração aumentada do zinco na glândula pineal caracteriza um desequilíbrio homeostático desse elemento traço, mas não no soro sanguíneo e fezes favorecendo a hipótese de que o zinco em excesso está sendo absorvido pelos tecidos, especialmente pela glândula pineal. De modo semelhante, a hiperzincemia gerou desequilíbrio homeostático nas concentrações de ferro, cálcio, potássio, cloro, manganês, titânio, enxofre (em correlação direta com o aumento de zinco) e fósforo e níquel (em correlação inversa). Pela microscopia eletrônica foi possível evidenciar nos espaços perivasculares da glândula pineal estruturas fibrilares com as características descritas na literatura para fibrilas amilóides. A análise pelo permanganato de potássio mostrou que os depósitos amilóides não eram do tipo AA (proteína associada a amilóide - amilóide secundário). Pelo TSQ e Neo-Timm foi mostrado que o zinco estava presente nas áreas positivas para amilóide. A diminuição na atividade motora dos animais reforçou a hipótese da hiperzincemia causar esta alteração, porém esta não afetou o comportamento alimentar e não provocou alteração de peso corporal.

Abstract

An Experimental Model of Hiperzincemia was developed in rats (female Wistar in postnatal age 90) who received oral dose equivalent to 600 mg / kg ZnSO₄ (inorganic sulfate), and these animals developed amyloidosis. The present study used this model to determine the concentration of the zinc in the biological samples (blood, feces) and in the pineal gland (PG) of rats by the total reflection X-ray fluorescence (TXRF). This work also allowed us to evaluate by electron microscopy the localization of the deposits of amyloid. With optical microscopy the possible nature of this amyloid was evaluated through the histochemical method of the potassium permanganate (specific for amyloid AA). Histochemical techniques for zinc (TSQ and Neo-Timm) were used to demonstrate the zinc positives areas. Maze test were realized to confirm previous results that pointed to the impairment of motor activity in the condition of the hiperzincemie observed. The results made it possible to conclude that in conditions of hiperzincemia the increased concentration of zinc cause homeostatic imbalance only in the GP (it does not occur in the sanguineous serum and nor in excrements) favoring the hypothesis that zinc excess is being absorbed by tissues. Similarly, the hiperzincemie generated imbalances in the concentration of other trace elements: Fe, Ca, K, Cl, Mn, Ti, and S, in direct correlation with the increase of zinc and, P and Ni in inverse correlation. The electron microscopy showed in the perivascular space of PG several fibrillar structures with features described in the literature as amyloid fibrils. The analysis by potassium permanganate showed that the amyloid observed is not type AA. For the TSQ and neo-Timm has been shown that zinc was present in areas positive for amyloid deposits. The reduction in the motor activity of the animals strengthened the hypothesis of the hiperzincemia to cause this alteration, however this did not affect the alimentary behavior and it did not provoke alteration of corporal weight.

1.INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

O modelo experimental de hiperzincemia começou a ser desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia em 2002, com o objetivo de encontrar dados sob o ponto de vista histológico que representasse possíveis danos para órgãos e tecidos devido à administração de um excesso de zinco. A idéia de usar o zinco em excesso tinha como embasamento relatos da literatura que mostravam um aumento na concentração de zinco em regiões cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer, e, em estudos *in vitro* que relatavam que o zinco em excesso era neurotóxico para células nervosas. Vários experimentos pilotos foram realizados no laboratório usando diferentes sais de zinco e diferentes vias de administração, e ainda, usando animais (ratos e ratas Wistar) em diferentes idades pós-natais a fim de se obter uma dose de excesso de zinco que implicasse em algumas alterações histopatológicas possivelmente prejudiciais. Várias doses foram criadas e consideradas como uma Terapia de Alta Dose. Dos resultados obtidos optou-se por utilizar o sulfato de zinco (este possui melhor absorção pelo organismo e é o composto mais utilizado por seres humanos), e a nova Terapia de Alta Dose passou a ser testada com este composto. A opção pela via oral mostrou-se também mais adequada fisiologicamente, e os melhores resultados foram obtidos em ratas adultas jovens (PN 90). Estes animais apresentaram, com uma dose total de 600 mg/kg ZnSO₄ a 0,1 M, comprometimento histopatológico evidente (presença de amiloidose, principalmente vascular) e alterações comportamentais bastante intrigantes. Deste modo este experimento foi considerado como um Modelo Experimental de Hiperzincemia desenvolvido no laboratório (FEREZIN-PINTO e CORREA-GILLIERON, 2005, 2007 e 2009).

O presente estudo utilizou animais tratados do mesmo modo que aqueles usados para desenvolver o modelo de hiperzincemia, com o propósito de ampliar o conhecimento sobre a ação do zinco na glândula pineal, através de técnica de quantificação para elementos traço e análises ultraestruturais.

Na literatura as referências que analisam metais como o zinco, não o fazem usando a técnica TXRF (HACKER et al., 1996; TAROHDA et al., 2004; DAMANTE et al., 2008; MAYNARD et al., 2009). A aplicação desta técnica de análise de metais

pesados pelo feixe *Síncrotron* tem sido usada na avaliação do tecido nervoso de ratos e humanos (autopsias) (TOMIK, 2006 ; McCREA et al., 2008; SERPA et al., 2008) no entanto, foram feitas em ratos de espécies distintas, ou usando um tipo diferente de abordagem, nenhuma se referia à glândula pineal, ou a amostras de sangue e fezes de animais submetidos ao excesso de zinco por via oral. Principalmente no caso da glândula pineal, dados quantitativos do conteúdo de zinco são escassos (WONG e FRITZE, 1969; AWAD et al., 1988; ZATTA et al., 2006). Outra vantagem da técnica TXRF para determinar a concentração regional elementar de metais pesados, diz respeito a sua capacidade de analisar diminutas quantidades de amostras (na ordem de μl para amostras líquidas e μg para amostras sólidas), o que torna a técnica ideal para análise de materiais muito pequenos, como a glândula pineal.

Não há citações na bibliografia sobre a pesquisa ao nível de microscopia eletrônica para detectar amiloidose na pineal. Dados da literatura trazem apenas informações sobre a disfunção da pineal em casos de uma amiloidose familiar (HIGA et al., 2005). Outros estudos ou relatos são pouco claros sobre a existência de depósitos amilóides em áreas cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica (BOHL et al., 1989) como a pineal.

1.2. GLÂNDULA PINEAL

A Glândula Pineal (GP) de mamíferos é uma glândula neuroendócrina que secreta melatonina (REITER, 1981; SUGDEN, 1989; PANDI-PERUMAL et al., 2006). Em humanos, a glândula inicia o seu desenvolvimento no segundo mês embrionário (36º dia) atingindo as dimensões adultas próximo aos sete anos de idade, quando apresenta atividade marcante que vai até os quatorze anos (MOORE e PERSAUD, 2000; KIERSZENBAUM, 2004).

Em ratos adultos, a glândula pineal (2-3 mm) repousa no sulco formado pelos corpos quadrigêmeos e embriologicamente, o seu primórdio é visto por volta do décimo terceiro dia do desenvolvimento, como uma evaginação do teto diencefálico. Até o décimo sétimo dia a glândula pineal sofre espessamentos e dobramentos (CALVO e BOYA, 1981; MOORE e PERSAUD, 2000; KIERSZENBAUM, 2004) e a partir daí torna-se um órgão sólido. Assim, a comunicação (recesso pineal) do interior da glândula com o terceiro ventrículo desaparece, por volta do vigésimo dia (**Fig.1**). O mecanismo de formação de um parênquima sólido, decorrente dos

dobramentos de sua parede, possivelmente ocorre devido à limitação de espaço em relação às estruturas vizinhas.

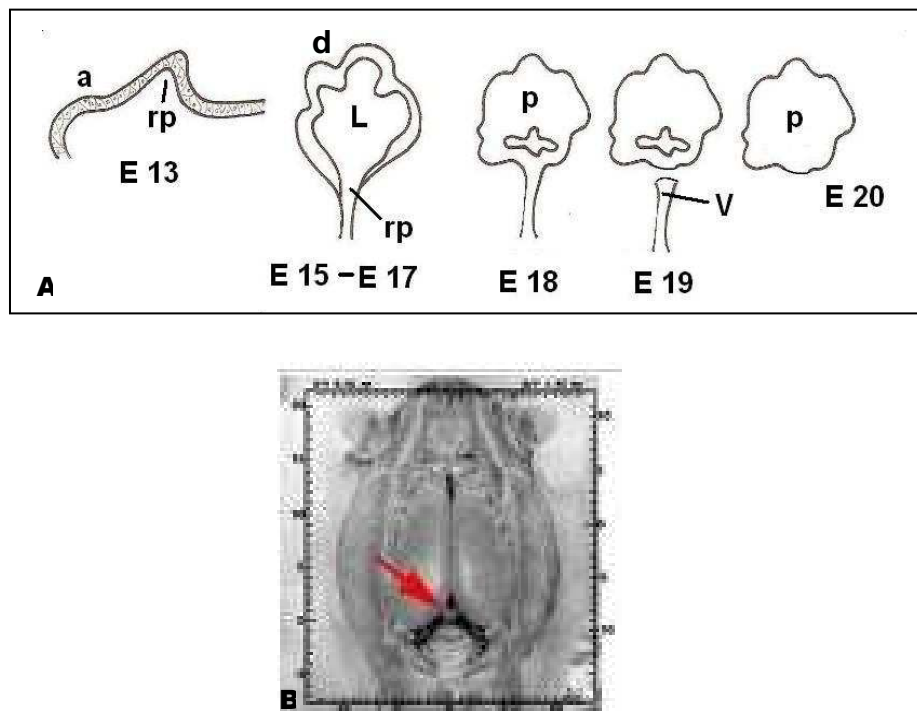


Fig.1 – A: Esquema ilustrativo do desenvolvimento da GP de ratos. Estágio de desenvolvimento embrionário (E). Em **E13** - Evaginação do neuroepitélio (**a**) na linha média do teto diencefálico; **E15-E17** - Recesso pineal (**rp**) em comunicação com o 3º ventrículo (**V**). (**d**) Dobramento e espessamento da GP. (**L**) - Lúmen da pineal; **E18, E19** - Diminuição do lúmen. **E20** - Presença de cordões de células separados por septos de conjuntivo; (**p**) - parênquima pineal compacto. (Modificado de CALVO e BOYA, 1981). B: Fotografia do encéfalo de rato mostrando a localização anatômica da glândula pineal (seta) (SIBAROV, 2002).

Histologicamente, a pineal de mamíferos é revestida por uma cápsula conjuntiva originada da pia-máter (KIERSZENBAUM, 2004; KORF, 1994), e desta partem septos que subdividem a glândula pineal em lóbulos pouco delimitados – *pseudolóbulos*, que abrigam os vasos sanguíneos e as fibras nervosas simpáticas (maioria) que se distribuem pela pineal. A maior parte dos vasos sanguíneos do parênquima pineal é considerada capilar sinusóide, derivados de vasos sinusóides da cápsula e capilares que podem apresentar um endotélio com 2-3 células endoteliais. Esses capilares são fenestrados (com cerca de 70 nm de comprimento e diafragmas de membrana única com 5 nm de espessura), não havendo a propriedade de barreira hematoencefálica verdadeira na glândula pineal (MATSUSHIMA e REITES, 1975; LUO et al., 1984). Uma característica do capilar da glândula pineal é a presença de processos citoplasmáticos que se projetam para o lúmen do vaso em um arranjo complexo de dobras. Nestes processos aparecem

algumas vesículas alargadas e podem ocorrer fenestras entre as várias dobras. Entre as células endoteliais ocorrem junções comunicantes (20 nm) e neste local as membranas plasmáticas das células podem se sobrepor e se interdigitar. Na glândula pineal, o fluxo sanguíneo é um dos mais intensos no organismo por toda a vida (só superado pelo do rim) (SCHARENBERG e LISS, 1965; MATSUSHIMA e REITES, 1975; GARTNER e HIATT, 1999). Os capilares da glândula pineal são circundados por um moderado (5-20 μm de largura) espaço perivascular (EP) (SORIANO et al., 1991; TAGUCHI et al., 2000), que é delimitado em ambos os lados, do parênquima pineal e do capilar, por lâminas basais. O espaço perivascular é preenchido por material filamentososo isolado ou agregado que foram sugeridos como sendo proteoglicanos que se associam às fibrilas colágenas finas (possivelmente colágeno tipo II e IX). Estes proteoglicanos associados à água estariam não só formando um gel hidratado que atuaria na manutenção do próprio espaço perivascular, mas também funcionando como um regulador seletivo (por tamanho e carga) da passagem de moléculas (TAGUCHI et al., 2000). Pericitos encontrados nas adjacências do endotélio capilar adluminal ao endotélio e luminal ao parênquima (DORE-DUFFY, 2008), apresentam lâmina basal e seus longos processos celulares envolvem parcialmente o endotélio. Um único pericito pode estar associado a dois capilares adjacentes (MATSUSHIMA e REITES, 1975).

No parênquima pineal, cerca de 95% das células são pinealócitos (**Fig.2**), os quais nos mamíferos, evoluíram de uma célula fotorreceptora para uma função neuroendócrina. A glândula pineal funciona como um transdutor neuroendócrino, onde uma estimulação neural é traduzida em secreção endócrina. Isto ocorre sob controle indireto do núcleo supraquiasmático (KLEIN e MOORE, 1979). O percentual restante (5%) corresponde às células não residentes (do tecido conjuntivo e sangue) e as células gliais (RIO HORTEGA, 1932; Mc NULTY et al., 1987; SHIH-YEN e McNULTY, 1997).

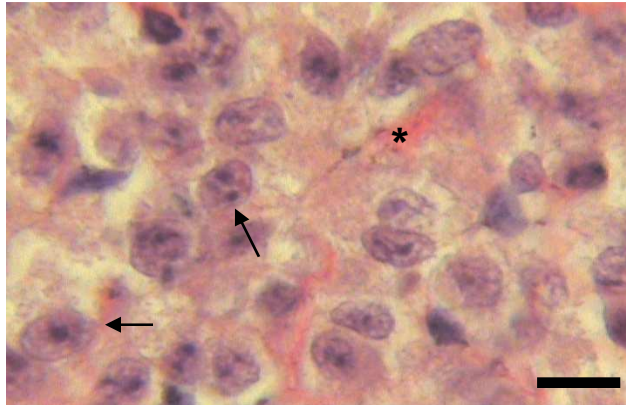


Fig.2 - Fotomicrografia do parênquima da glândula pineal de ratos PN 90. Setas apontam para pinealócitos, entre os septos do conjuntivo (*). Coloração picrossírius. Barra = 3,5 μ m

Acúmulos ovóides formando anéis concêntricos de material hialino (areia cerebral) estão presentes na glândula pineal, tanto de humanos (mais em crianças e adolescentes do que em adultos) quanto de animais. Estes são depósitos de fosfato e carbonato de cálcio. Não se conhece a função desse material (SCHARENBERG e LISS, 1965; HUMBERT e PÉVET, 1994).

Os pinealócitos (CALVO e BOYA, 1984) apresentam núcleos grandes, esféricos, com cromatina pálida, que podem ser lobulados ou indentados (especialmente quando estão com atividade neuroendócrina ativa) (MILIN et al., 1996), os nucléolos são evidentes, tem o citoplasma com retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, pequena quantidade de retículo endoplasmático granular e um aparelho de Golgi pouco desenvolvido (CALVO e BOYA, 1983; SHIH-YEN e McNULTY, 1997). Pequenas vesículas distribuem-se pelo citoplasma, algumas com a aparência de lisossomos (CALVO e BOYA, 1983) e outras correspondem às vesículas sinápticas (apresentando centros claros ou densos, indicativos de constituição química distinta) (REDECKER, 1993). Processos celulares típicos (curtos e finos ou longos e espessos) partem do corpo celular dos pinealócitos e terminam próximos aos capilares fenestrados, ou a outras células, através de tumefações em forma de clava ou bulbos (SCHARENBERG e LISS, 1965). Diferentes estudos sugerem uma heterogeneidade para a população de pinealócitos (REDECKER, 1993; HIRA et al., 1998). Calvo e Boya (1981) identificaram dois tipos de pinealócitos: tipo I (95% das células) e tipo II (5% das células). Em 1988, os mesmos autores relataram que os pinealócitos tipo II eram células positivas para

GFAP* (astrócitos). Foram relatadas diferenças morfológicas em pinealócitos de acordo com estado funcional (REDECKER, 1993; HIRA et al., 1998).

A astroglia pineal é representada por astrócito anteriormente conhecido como glia gigante ou “glia monstro” de Weigert (SCHARENBERG e LISS, 1965), porém esta célula tem aspecto típico de um astrócito. Seu núcleo é pequeno e oval diferindo dos núcleos arredondados e maiores dos pinealócitos (SCHARENBERG e LISS, 1965; CALVO et al., 1988). No rato, astrócitos positivos para GFAP foram relatados por diferentes autores como estando presentes somente na área do pedúnculo da pineal, enquanto que astrócitos imaturos apareciam distribuídos por toda a glândula. Já outros autores relataram células positivas para GFAP por toda a glândula (PAPASOZOMENOS, 1986; CALVO et al., 1988; PEDERSEN et al., 1993; CORREA-GILLIERON, *comunicação pessoal*).

Outro tipo glial encontrado na GP de rato é a microglia (TSAI e McNULTY, 1997), em especial nas adjacências dos vasos. Sua morfologia varia de uma célula amebóide e com prolongamentos curtos (e poucos) a células de aspecto fusiforme com poucos e longos prolongamentos. Acredita-se que estas células participam na glândula como mediadoras em interações neuroimunes (SHIH-YEN e McNULTY, 1997; TSAI e McNULTY, 1997). Há relatos da presença de oligodendrócitos, apenas no pedúnculo da pineal e associados a axônios mielinizados (LUO et al., 1984).

Estudos imunohistoquímicos têm demonstrado a presença de substâncias na pineal que são produzidas na glândula (**Tabela 1**) ou que são trazidas pelas fibras nervosas até a glândula pineal. Algumas destas substâncias funcionam como neuromoduladores (REITER, 1981; REUSS, 1996) (**Tabela 1**). No entanto, o principal produto de secreção da pineal é a melatonina (N-acetil-5-metoxi-serotonina) (MEL) (**Tabela 2**) que é produzida pelos pinealócitos (**Fig.2**), liberada no espaço perivascular imediatamente após a sua formação, não sendo estocada no parênquima pineal (KORF, 1994; HISSA et al., 1998; TRICOIRE et al., 2003), e por ser lipossolúvel, se difunde na circulação ligada a proteínas (ex.: albumina).

* GFAP: Proteína ácida fibrilar glial, que compõe os filamentos intermediários do citoesqueleto das células astrogliais. É ideal para marcação *in situ* e *in vitro* de astrócitos.

Tabela 1: Fatores Neuroquímicos na glândula pineal

Acetilcolina	Histamina	Prostaglandinas
GABA	Neuropeptídeo Y	Serotonina
AMPc	Noradrenalina	Somatostatina
Dopamina	Octopamina	Transtirretina
Somatostatina	Angiotensina II	leu-encefalina
Glutamato	Orexinas/hipocretinas*	beta-endorfina

* Neuropeptídeo excitatório relacionado com o ciclo sono-vigília entre outros. Em azul, fatores neuroquímicos produzidos na GP. (Modificado de REITER, 1981; REUSS, 1996)

Comprovadamente, a melatonina é sintetizada na glândula pineal e na retina, muito embora existam citações de síntese em outros locais (por exemplo, intestino e células sanguíneas) (PANDI-PERUMAL et al., 2006). A melatonina plasmática reflete a melatonina sintetizada na pineal, enquanto a melatonina sintetizada na retina tem uma ação local. A produção de melatonina é deflagrada na fase escura do ciclo circadiano, e a luz (que inibe o processo de secreção da melatonina) atua indiretamente como reguladora do ritmo circadiano de produção (PANDI-PERUMAL et al., 2006). A secreção depende da ativação da divisão simpática do sistema nervoso autônomo, e, a conseqüente liberação de noradrenalina pelos terminais que inervam a glândula, e que, ativando receptores pós-sinápticos adrenérgicos nos pinealócitos, leva à síntese de melatonina por uma via que se inicia com o triptofano (triptofano → 5-hidroxitriptofano → serotonina → N-acetilserotonina → melatonina) (REITER, 1991; VANECEK, 1998). Em humanos, o maior pico de produção é noturno (2:00 a 4:00h) chegando à ~ 80-100 pg/ml (GREEN et al., 1996). A influência da luz é indireta, incidindo sobre a retina, que envia informação para o núcleo supraquiasmático (trato retino-hipotalâmico), este se projeta para o núcleo paraventricular, de onde através de uma cadeia polissináptica se projeta para a medula espinal, de onde fibras pré-ganglionares simpáticas se projetam para o gânglio cervical superior, o qual envia fibras nervosas para a glândula pineal.

Há duas vias principais de metabolização da melatonina: no fígado e no cérebro. No fígado é transformada por hidroxilação em 6-OH-melatonina (6-hidromelatonina) que conjugada a sulfatos (ou glucoronato) é excretada na urina (sob a forma primitiva e sob a forma de 6 - sulfatoximelatonina), onde pode ser medida sua concentração (OZAKI e LYNCH, 1976 a,b) (sangue e saliva também podem ser usados para avaliação dos níveis de melatonina – ERIKSSON et al.,

2003). No tecido cerebral, a melatonina é convertida em N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramine, que é transformada imediatamente a N¹-acetil-5-metoxiquinuramine (HISSA, 1998).

Tabela 2: Algumas funções relacionadas à melatonina

Funções	Melatonina	Referência
Proteção contra estresse oxidativo no SNC	Altos Níveis	KARBOWNIK e REITER, 2000
Aumento da incidência de câncer de mama	Baixos Níveis	TAMARKIN et al., 1981
Relacionados a quadros de depressão	Baixos Níveis	Mc INTYRE et al., 1986
Diminuição da produção de anticorpos	Baixos Níveis	CSABA et al., 1966
Proteção contra neurotoxicidade do A β	Altos Níveis	SKENE et al., 1990
Crianças que falecem de morte súbita	Baixos Níveis	ALVES et al., 1998
Puberdade precoce	Baixos Níveis	WALDHAUSER et al., 1991
Diminuição dos sintomas do <i>Jet Lag</i>	Exógena	MARKUS et al., 2003

1.3. AMILOIDOSE

O termo amilóide (derivado do Latim *amyllum*) foi introduzido em 1854 pelo cientista físico alemão Rudolph Virchow (VIRCHOW, 1854 *apud* SIPE e COHEN, 2000) para designar os depósitos conhecidos como corpos amiláceos que se apresentam como camadas concêntricas e eosinofílicas. A resolução histológica só foi possível por Bennhold (BENNHOLD, 1922 *apud* HAZENBERG e RIJSWIJK, 1994) que introduziu a coloração pelo vermelho congo, o qual combinado a microscopia de polarização, se tornou o teste histológico mais eficiente para se detectar depósitos de amilóide. Em 1959 (COHEN e CALKINS, 1959; HAZENBERG e RIJSWIJK, 1994), análises ultraestruturais revelaram que o amilóide era formado por fibrilas (a morfologia fibrilar do amilóide foi confirmada em 1982) (COHEN, 1982 *apud* INOUE e KISILEVSKY, 1999; SIPE e COHEN, 2000; GOTO et al., 2008). O critério para considerar um depósito como amilóide foi obtido em 1953, onde a positividade ao vermelho congo e a birrefringência em verde maçã passaram a ser características determinantes (SIPE e COHEN, 2000). Em 1968 foi visto , pela

técnica de difração de raio X ,que as fibrilas de amilóide apresentavam uma estrutura β -pregueada (EANES e GLENNER, 1968; HAZENBERG e RIJSWIJK, 1994).

As diretrizes para a nomenclatura e classificação dos amilóides e das amiloidoses foram atualizadas pelo *Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis*. Os depósitos amilóides devem ser classificados utilizando a letra maiúscula “**A**” como primeira letra de designação, seguida da designação da proteína sem qualquer espaço entre estes (ex: “**AL**” - amilóide que envolve as cadeias leves de imunoglobulinas) (HUSBY et al., 1993).

1.3.1. Características Gerais

A amiloidose é uma patologia onde ocorre a deposição de material protéico fibrilar, de composição química heterogênea, entre as células. Este material é insolúvel e resistente a degradação. No entanto comprovou-se bioquimicamente que o amilóide não contém apenas um componente fibrilar, mas também proteoglicanos e derivados (proteína P) de uma proteína amilóide do soro (SAP) (PEPYS, 1992 *apud* ASCENSÃO et al., 1997; INOUE e KISILEVSKY, 1999; KUMAR et al., 2004).

Os depósitos podem estar associados a alterações fisiopatológicas graves, mas a amiloidose não deve ser considerada uma doença única, e sim um grupo de doenças que têm em comum a deposição anormal de proteínas (RIJSWIJK e VAN HEUSDEN, 1979; KUMAR et al., 2004).

A amiloidose resulta de um enovelamento anormal de monômeros protéicos que se associam e são depositados como fibrilas de amilóide na matriz extracelular de diferentes tecidos (FRANKLIN e FRANKLIN, 1970; BÉLY, 2003; RAMBARAN e LOUISE, 2008). Técnicas mais recentes demonstraram que a transformação do estado de monômeros solúveis para o de fibrilas insolúveis de proteínas distintas, envolve intermediários, que são os oligômeros, e depende ainda da concentração destes. Os oligômeros se associam e formam fibrilas insolúveis, que também são depositadas nos tecidos (PODLISNY et al., 1995; DRAGO et al., 2008).

As proteínas formadoras de amiloidose são separadas em duas categorias gerais: proteínas normais, quando produzidas em quantidades elevadas, têm uma tendência inerente a se enovelar inadequadamente, associando-se e formando fibrilas, e, proteínas mutantes, as quais são estruturalmente instáveis e propensas a se enovelar de forma incorreta (RAMBARAM e LOISE, 2008). Até o momento há

mais de 20 formas de proteínas identificadas como formadoras de amilóide e que se depositam por diferentes mecanismos patogênicos como descrito na **tabela 3** (HUSBY et al., 1993; ASCENSÃO et al., 1997; SIPE e COHEN, 2006; RAMBARAM e LOISE, 2008).

Sob microscopia de luz e com colorações convencionais, o amilóide aparece como uma substância extracelular amorfa, eosinofílica e hialina que, com acúmulo progressivo compromete as células adjacentes podendo produzir uma atrofia destas por sua ação compressiva (PUCHTLER et al., 1961; WESTERMARK et al., 1999; KHURANA et al., 2001; BÉLY, 2003).

Tabela 3: Nomenclatura e classificação dos amilóides

Proteína Amilóide	Precursor	Síndrome ou tecidos acometidos
AA ¹	AA (Apo) sérica	Amiloidose secundária reativa, Febre do Mediterrâneo Familiar
AApoAL ¹	Apolipoproteína AI	Polineuropatia amilóide familiar
AApoAll ^{a1}	apoAll	Amiloidose senil (murinos)
AANF ²	Fator natriurético auricular	Amilóide atrial isolado
Abri ¹	Proteína precursora de amilóide Bri	Demência Familiar Britânica
ACal ²	(Pro) calcitonina	Carcinoma medular da tiróide
ACys ¹	Cistatina C	Angiopatia amilóide cerebral hereditária
AFib ¹	Cadeia α do fibrinogênio	Amiloidose familiar
AGel ¹	Gelsolina	Amiloidose sistêmica hereditária familiar
AH ¹	Cadeia pesada de imunoglobulina	Amiloidose sistêmica primária associada ao mieloma
AIAPP ²	Polipeptídio amilóide dos ilhéus pancreáticos	Ilhotas de Langerhans, Insulinomas , Diabetes tipo II
AKer ²	Cerato – epitelina	Córnea
AL ¹	Cadeia leve de imunoglobulina	Amiloidose sistêmica primária associada ao mieloma
Alns ^{a2}	Insulina	Latrogênica - Amiloidose localizada em locais de injeção de insulina (murinos)
ALys ¹	Lisozima	Amiloidose sistêmica hereditária não neuropática
AMed ²	Lactaderina	Aórtica senil, Túnica média
APro ²	Prolactina	Envelhecimento da hipófise, Prolactinomas
ATTR ¹	Transtirretina	Amiloidose sistêmica senil, Polineuropatia amilóide familiar
A β ²	Precursor da proteína A β (APP)	Doença de Alzheimer , Síndrome de Down
A β ₂ M ¹	β ₂ -microglobulina	Amiloidose associada à Hemodiálise
PrP ^{sc2}	Proteína priônica (PrPc)	Encefalopatias espongiiformes

^a Não encontrado em humanos , ¹ Amiloidose Sistêmicas, ² Amiloidose localizada . Retirado com modificações de: SIPE e COHEN, 2000; KHAN e FALK, 2001; RAMBARAN e LOUISE, 2008.

1.3.2. Natureza física do amilóide

As características ultraestruturais do amilóide foram descritas primeiramente em 1959 (COHEN e CALKINS, 1959) apresentando fibrilas não ramificadas de comprimento indefinido e diâmetro de 7,5 a 10 nm aproximadamente para quase todos os tipos de amilóide (INOUE e KISILEVSKY, 1999; SIPE e COHEN, 2000; KUMAR et al., 2004). A cristalografia por raios X e a espectroscopia infravermelha demonstraram que o amilóide é uma proteína secundária, que adquire uma estrutura folha β -pregueada (EANES e GLENNER, 1968; KUMAR et al., 2004; GOTO et al., 2008) (**Fig.3**).

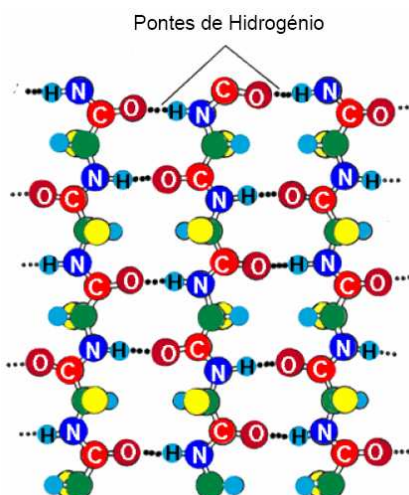


Fig.3 – Estrutura folha β -pregueada de uma cadeia polipeptídica que consiste em várias lâminas de polipeptídios, colocadas umas sobre as outras e dobradas sobre si, sendo que cada lâmina está ligada a sua vizinha por pontes de hidrogênio (retirado de ALBERTS et al., 1994 *apud* XAVIER, 2008).

Esta conformação β é encontrada independentemente das condições clínicas ou da composição química do amilóide, sendo observada tanto *in situ* quanto em material onde as fibrilas foram isoladas (COHEN et al., 1982 *apud* INOUE e KISILEVSKY, 1999). Esta conformação é responsável pela coloração e birrefringência características do amilóide quando corado pelo vermelho congo. Grupos deste corante se orientam em paralelo com a estrutura fibrilar do amilóide em sítios específicos (PUCHTLER et al., 1961; KHURANA et al., 2001; KUMAR et al., 2004) (**Fig.4**).

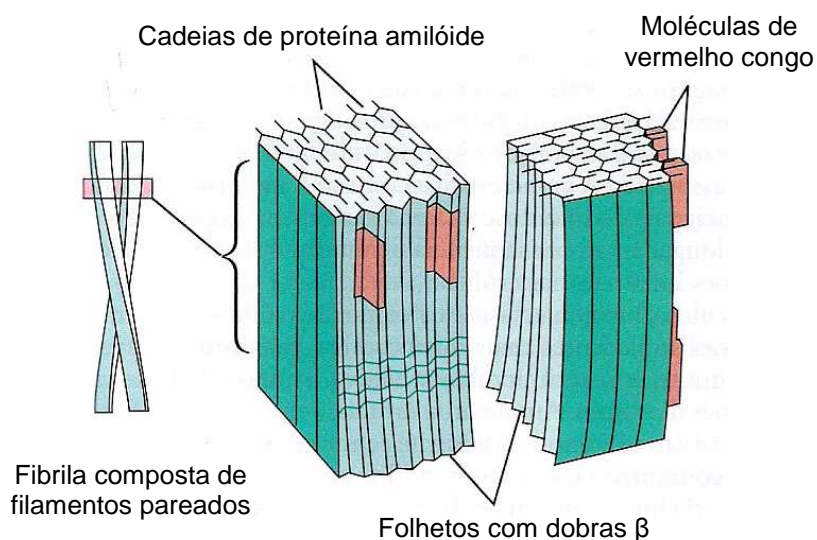


Fig. 4 - Estrutura de uma fibrila de amiloide mostrando a estrutura folha β -pregueada e a interação do vermelho congo com esta (retirado de KUMAR et al., 2004).

A amiloidose pode ser clinicamente classificada como: a) amiloidose sistêmica que se subdivide em: amiloidose primária ou associada à mieloma, amiloidose secundária ou reativa e amiloidose familiar; b) amiloidose localizada que se subdivide em: amiloidose localizada em órgãos endócrinos, amiloidose presente nas placas senis, angiopatia amiloide cerebral, amiloidose por proteínas priônicas e amiloidose cardíaca, como segue:

1.3.3. Amiloidose Sistêmica

1.3.3.a. Amiloidose Primária (Idiopática) ou amiloidose associada à mieloma ou

Amiloidose AL: É a forma mais comum de amiloidose sistêmica. A proteína é produzida por células secretoras de imunoglobulinas monoclonais e sua deposição está associada a algumas formas de proliferação monoclonal de células B que produzem os pequenos fragmentos protéicos. Histologicamente, embora possa envolver qualquer tecido ou órgão, parece haver uma tendência para a deposição nodular e o envolvimento dos pequenos vasos sanguíneos (GLENNER et al., 1971; LOPES et al., 1990 *apud* ASCENSÃO et al., 1997; KHAN e FALK, 2001) .

1.3.3.b. Amiloidose Secundária (adquirida) ou Amiloidose Sistêmica Reativa ou

Amiloidose AA: Durante uma inflamação, algumas citocinas (interleucina 1 (IL-1), 6 (IL-6) e o factor de necrose tumoral -TNF), estimulam a síntese hepática da proteína

amilóide A sérica (SAA- associada a amilóide do soro, o precursor das fibrilas AA) uma proteína da fase aguda, que circula no sangue em associação com a subclasse HDL3. Os depósitos envolvem, classicamente, os órgãos parenquimatosos (LEVIN et al., 1972; GERTZ e KYLE, 1991; SHTRASBURG et al., 2005).

1.3.3.c. Amiloidose Hereditária ou Amiloidose Familiar: São transmitidas por herança autossômica dominante, em geral em associação a uma mutação que intensifica o dobramento inadequado das proteínas e a formação de fibrilas (ASCENSÃO et al., 1997).

1.3.4. Amiloidose Localizada

A amiloidose localizada pode ser derivada de hormônios, sendo comum ocorrerem depósitos amilóides em tecidos produtores de hormônios polipeptídicos. Ex: calcitonina (ACal), prolactina (APro), etc. (ver **Tabela 3**).

1.3.4.a. Amiloidose associada à Doença de Alzheimer (amiloidose localizada nas placas senis): A proteína β -amilóide ($A\beta$) é a principal proteína fibrilar encontrada nesses depósitos amilóides, constituindo o núcleo das placas neuríticas (senis). A proteína $A\beta$ deriva de uma glicoproteína transmembrânica chamada proteína precursora de amilóide (APP). Esta patologia é em geral tardia (~ 60 anos de idade), mas pode ser precoce (um terço dos casos, em torno de 40 anos), sendo então considerada uma amiloidose familiar, que tem um padrão de herança autossômica dominante (SMITH, 1999; MACCIONI et al., 2001; DRAGO et al., 2008).

1.3.4.b. Angiopatia Amilóide Cerebral ou Angiopatia Congofílica: Refere-se a uma amiloidose onde ocorre uma deposição de fibrilas amilóides nas camadas média e adventícia das pequenas artérias e arteríolas encefálicas ou leptomeninges. Na doença de Alzheimer (DA), a angiopatia amilóide cerebral (AAC) está sempre presente. Entretanto, ela pode aparecer por outras razões, não necessariamente por esta doença (OSUMI et al., 1995; ANDRADE et al., 2006).

1.3.4.c. Amiloidose por Proteínas Priônicas ou Encefalopatia Espongiforme: Os príons são uma classe peculiar de proteínas infecciosas associadas a um grupo de

doenças neurodegenerativas. A PrP^{sc} é uma forma patogênica da proteína priônica (PrP), que difere desta pela presença de uma elevada quantidade de estrutura em lâmina pregueada, bem como por ser insolúvel e resistente às enzimas proteolíticas se agregando no espaço extracelular. As doenças priônicas são algumas vezes consideradas exemplos de amiloidose local (KUMAR et al., 2004; SIPE e COHEN, 2000; SILVA et al., 2008).

1.4. ÍONS METÁLICOS

1.4.1. Metabolismo Mineral

Em relação ao conteúdo mineral do corpo humano, 98% deste são elementos não metálicos. Os outros 1,89% são representados por quatro elementos minerais principais (macronutrientes): sódio, magnésio, potássio e cálcio e os 0,012% restante são compostos pelos chamados elementos traço: cobre, cromo, cobalto, ferro, iodo, manganês, molibdênio, níquel, selênio, estanho e zinco. Apesar dessa pequena fração de elementos traços, eles exercem uma forte influência em todo o funcionamento do corpo humano (LINDH, 1995).

Os elementos traço estão intimamente envolvidos com a fisiologia em todos os níveis de organização nos seres vivos, e podem ser subdivididos em 3 grupos: essenciais, possivelmente essenciais e não essenciais, de acordo com as necessidades dietéticas dos eucariotos. São elementos traço essenciais (micronutrientes): ferro, iodo, cobre, zinco, rubídio, cobalto, molibdênio, selênio, cromo e flúor; são elementos traço possivelmente essenciais: manganês, níquel, vanádio, boro e silício e são elementos traço não essenciais: alumínio, germânio, cádmio, arsênio, chumbo, lítio, estanho e mercúrio (HARPER et al., 1982; FAVANO, 1998; SPEICH et al., 2001).

O que determina o caráter essencial de um elemento químico é o grau de sua participação em uma ou mais reações bioquímicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1973 *apud* LINDH, 1995), o termo essencial não seria mais correto para classificar os elementos traço, sendo mais adequado chamá-los de “benéfico” ao organismo - quando sua deficiência na dieta reduz o crescimento e a vitalidade do organismo (humanos, animais e plantas) (LINDH, 1995). Baseado nesta definição torna-se coerente que o caráter essencial de um elemento é um conceito relativo, ou seja, depende de sua concentração no organismo. Por exemplo, elementos que a

priori são conhecidos pela sua toxicidade, como o arsênio e o chumbo, são necessários em diminutas quantidades para o funcionamento normal do metabolismo celular, embora sejam altamente tóxicos em concentrações elevadas (LINDH, 1995).

Mais recentemente foram desenvolvidas técnicas analíticas bastante sensíveis que são utilizadas para quantificar e qualificar os elementos minerais em amostras biológicas, como a fluorescência de raios X por reflexão total com radiação Síncrotron (TXRF), que estabelece as concentrações dos elementos químicos analisados nos tecidos e materiais biológicos (TOMICK et al., 2006; SERPA et al., 2008).

A verificação da distribuição espacial e da concentração local dos elementos traço nos tecidos é relevante, uma vez que tanto a deficiência quanto o excesso destes minerais podem se relacionar com o aparecimento de diferentes desordens metabólicas (BOHIC et al., 2001). Como exemplo, alterações nas concentrações dos elementos traço manganês, ferro, cobre e zinco, são observáveis em certas neuropatias (CAMPBELL et al., 2001; BÉLAVÁRI et al., 2005; ZATTA et al., 2009).

1.4.2. ZINCO

1.4.2.a. Zinco no organismo humano

O zinco (Zn^{+2}) (0,65 Å, 0,065 nm) é considerado um elemento traço, ou seja, um elemento que se apresenta em quantidades diminutas no organismo (LINDH, 1995; FAVANO, 1998; DUTRA et al., 2004). O zinco é um íon que se liga principalmente aos doadores de nitrogênio e enxofre, no entanto, como tem baixa energia de estabilização, ele pode facilmente permutar entre diferentes compartimentos celulares e ligantes. É considerado o segundo elemento traço mais prevalente no organismo, e a **Tabela 4** apresenta algumas concentrações deste íon em diferentes tecidos humanos (TASMAN-JONES, 1992 *apud* WYNGAARDEN et al., 1992; FAVANO, 1998). Observa-se que em humanos, há locais com expressivas concentrações desse elemento traço como a próstata, a pele, o fígado, pâncreas, ossos e sangue. Estima-se que nos tecidos, apenas 2% apresentam-se na forma livre (WAHID et al., 1988; PERSON et al., 2006).

Tabela 4: Concentrações normais de zinco no organismo

Órgãos	Peso Seco	Órgãos	Peso Seco
	mg/g		mg/g
Olho	281	Pâncreas	29
Pele	151	Baço	21
Unha	151	Testículo	17
Próstata	102	Pulmão	15
Rins	55	Cérebro	14
Fígado	55	Adrenal	12 fresco
Músculo	54	Plasma	> 70mg/dL
Coração	33	Corpo humano	29 a 43mg/kg

(Modificado de TASMAN-JONES, 1992 *apud* WYNGAARDEN et al., 1992; FAVANO, 1998)

O zinco é um importante componente estabilizador de macromoléculas e membranas biológicas, sendo necessário em todas as fases da vida, em especial durante o desenvolvimento fetal e a gestação (KOURY e DONANGELO, 2003; PERSON et al., 2006). A **Tabela 5** traz algumas das funções atribuídas a este metal.

Tabela 5: Alguns papéis do zinco no organismo humano

<ul style="list-style-type: none">• Início e regulação da resposta imune• Estocagem e liberação de insulina• Estabilização de macromoléculas• Espermatogênese e esteroidogênese• Regulação da transcrição do DNA• Cicatrização• Papel estrutural• Metabolismo da vitamina A	<ul style="list-style-type: none">• Metabolismo energético• Síntese de proteínas• Síntese de metalotioneínas• Ação Antioxidante• Papel na divisão celular• Modulador de resposta ao nível de receptores celulares (em especial NMDA e GABA_A, quando liberado de terminais sinápticos)
--	---

(Retirado de KOURY e DONANGELO, 2003; PERSON et al., 2006)

Na síntese protéica e na expressão gênica o zinco atua como cofator na atividade funcional de diversas enzimas, como por exemplo: algumas enzimas envolvidas na síntese de RNA e DNA, a álcool-desidrogenase de cadeia longa, a fosfatase-alcalina, anidrase carbônica, procarboxipeptidases ou carboxipeptidase A e B, e a superóxido-dismutase do citossol (TUYA et al., 1996; POWELL, 2000; KOURY e DONANGELO, 2003). O zinco também é necessário para manter as concentrações normais de vitamina A plasmática, e pode ser necessário para a

mobilização da vitamina A contida no fígado. Quando as concentrações de vitamina A no plasma estão abaixo do normal e não respondem a uma terapia com vitamina A, a suplementação com zinco parece ser eficiente (HARPER et al., 1982; CHRISTIAN et al., 2001). Na clínica médica, na nutrição parenteral total (NPT), é indicada a administração de elementos traço, entre eles o zinco (este em quantidades bem precisas de 2,5 – 4,0 mg/dia) para minimizar as diminutas e patológicas concentrações desses elementos no plasma sanguíneo.

O papel estrutural do zinco associado a proteínas que se ligam ao DNA, está relacionado à sua alta capacidade de ligação a cisteínas e histidinas, dando a estas proteínas uma estrutura conformacional conhecida como “dedos de zinco” (*zinc fingers*) (LEWIN, 2001) (**Fig.5**).

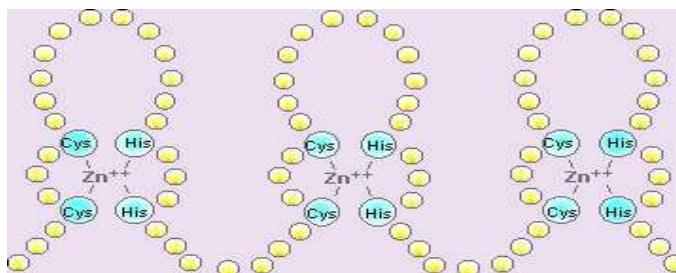


Fig.5 - Esquema representativo de uma série de três dedos de zinco. Nos dedos de zinco, o íon se liga a um grupo pequeno de aminoácidos através de seus resíduos de cisteína (cys) e histidina (His), e criam alças de aminoácidos descritas como dedos Cys/His que representam domínios independentes na proteína, e estes se ligam ao DNA (Modificado de LEWIN, 2001).

1.4.2.b. Sistemas de absorção, excreção e determinação dos níveis de zinco em humanos

A absorção de zinco pelo sistema digestivo é dependente da concentração e ocorre através de todo o intestino delgado, sendo o jejuno e íleo o local de absorção máxima (SANDSTRÖM, 1986). Quantidades diminutas são absorvidas no estômago e intestino grosso. No intestino delgado há uma grande expressão das proteínas transportadoras de zinco, como o transportador ZnT1 (atua no efluxo de zinco para o sangue) e ZnT 7 (atua na absorção de zinco). A presença de glicose no lúmen intestinal, na borda em escova das células do intestino delgado, auxilia a absorção do metal (VALLEE e FALCHUK, 1993).

A absorção de zinco em humanos é um processo que ocorre tanto por transporte passivo como por transporte ativo. O transporte ativo é saturável em altas

concentrações do metal no lúmen do intestino, e sua eficiência aumenta durante períodos de baixa ingestão de zinco. Já o transporte passivo, é um mecanismo de difusão facilitada que permanece inalterado durante períodos de baixa ingestão do metal, e cuja eficiência é proporcional a concentração de zinco no lúmen intestinal (SANDSTRÖM , 1986; LEE, 1989; KREBS et al., 1996, SALGUEIRO, et al., 2000).

O zinco administrado por solução aquosa em indivíduos em jejum é absorvido muito eficientemente (60 a 70%), e não há indicação de saturação até doses de 10 a 15 mg do íon. A absorção do zinco a partir de dietas sólidas é muito menos eficiente (FAVANO, 1998).

A excreção de zinco é feita pelos rins, pele e intestino. A maior fração é excretada pelas fezes, podendo variar de 0,5 a 3 mg/dia dependendo da ingestão de zinco. Aproximadamente 0,7 mg de zinco são perdidos por dia na urina de indivíduos normais saudáveis. Exercícios extenuantes e temperaturas ambientes elevadas podem levar a perdas maiores (TASMAN-JONES, 1992 apud WYNGAARDEN et al., 1992; FAVANO, 1998; KOURY e DONANGELO, 2003).

A avaliação do estado nutricional em relação ao zinco é feita por métodos laboratoriais onde os níveis desse elemento são determinados. Os principais exames laboratoriais para determinação do zinco estão listados na **Tabela 6** (SALGUEIRO et al., 2000).

Concentração de zinco no plasma	Concentração de zinco nos leucócitos
Concentração de zinco no soro	Metalotioneína no plasma
Metalotioneína nos eritrócitos*	Concentração de zinco nos eritrócitos
Concentração de zinco nos neutrófilos	Atividade da 5' nucleotidase
Atividade da fosfatase alcalina	Concentração de zinco no cabelo

* Proposto como o melhor indicador para os níveis de zinco nutricional, inclusive usado na medição de zinco na dieta de atletas (retirado de SALGUEIRO et al., 2000; DUTRA, 2004).

1.4.2.c. Biodisponibilidade do Zinco

As quantidades de zinco necessárias na dieta são determinadas pelas necessidades teciduais, pela taxa de perda de zinco pelo organismo, e pelas características da dieta, que pode influenciar a absorção ou não do elemento durante a digestão (FAVANO, 1998).

Estudos experimentais apontam diversos fatores como promotores ou antagonistas potenciais da absorção de zinco. Aminoácidos e hidroxíácidos são ligantes de zinco e facilitam sua absorção, enquanto alguns compostos orgânicos formam complexos estáveis e pouco solúveis com o zinco (ex: os fitatos) e podem diminuir sua absorção (PRASAD, 1996). Interações competitivas entre o zinco e outros íons (em concentrações excessivas) com propriedades físico-químicas semelhantes (ex.: cádmio), também podem restringir a captação, o transporte, e conseqüentemente a absorção do zinco.

Também se considera que a absorção do zinco pode ser influenciada por fatores dietéticos, porém, a diminuição de sua absorção pode ocorrer devido a doenças intestinais, e, um aumento de sua excreção (hiperzinciúria) pode ser decorrente de patologias renais (PRASAD, 1996). A **Tabela 7** mostra as concentrações de zinco em determinados alimentos.

Alho	1,00	Carne de boi	1,80
logurte	0,38	Germe de trigo	3,70
Nozes	2,70	Feijões/Lentilhas	2,60
Banana	0,22	Camarão/Ostra	2,00
Leite	0,38	Cereais Refinados	0,50
Milho	2,50	Fígado de boi	5,10
Gema de Ovo	4,00	Chocolate	1,00-2,00
Frango	1,00	Amendoim	2,00-3,00
Ração Nutrilab.	70 g/Kg		

Todos os valores são referentes à mg zinco / 100 g de alimento (retirado de PRASAD, 1996; FAVANO, 1998)

A **tabela 8** apresenta as concentrações recomendadas de ingestão de zinco para humanos.

Recém Nascidos	5 mg/dia	Grávidas	15 mg/dia
Crianças 1- 10 anos	10 mg/dia	Lactantes no 1° semestre	19 mg/dia
Homens > 10 anos	15 mg/dia	Lactantes no 2° se mestre	16 mg/dia
Mulheres > 10 anos	10 mg/dia		

(Retirado de PRASAD,1996; FAVANO,1998)

1.4.2.d. Ação antioxidante do zinco

Um estresse oxidativo pode surgir no organismo devido à diminuição das defesas em relação aos processos metabólicos de oxidações (ex: redução do oxigênio a água) ou ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species) e radicais livres (ex: O_2^- - anion superóxido; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; OH – radical hidroxila). Portanto, organismos que usam oxigênio estão sujeitos a enfrentar a ameaça de uma produção intracelular de ROS, que poderia trazer consequências para as células, não fossem os sistemas enzimáticos de defesa, capazes de atuar nestas situações. Os organismos sem estes sistemas de defesa devem se limitar a ambientes anaeróbicos. A participação do zinco em relação às defesas contra um estresse oxidativo foi estudada *in vivo* e em estudos *in vitro*, onde foi demonstrado que a deficiência de zinco poderia estar associada à presença de lesões relacionadas à ação de espécies reativas de oxigênio, tanto em animais quanto em humanos (KOURY e DONANGELO, 2003; POWELL, 2000a; POWELL et al., 2000b). A literatura relata que a presença de ROS e de radicais livres pode desencadear uma cascata de eventos capazes de gerar, por exemplo, neurodegeneração (SINGH et al., 2004). O papel exato do zinco como antioxidante ainda não foi elucidado. A ação antioxidante desse mineral é indireta, uma vez que o íon zinco não é ativo em reações de óxido-redução, mas as evidências indicam ação desse íon em várias situações como na regulação da expressão de metalotioneínas, na atividade da enzima superóxido dismutase e na proteção de grupamentos sulfidrila de proteínas de membranas celulares por antagonismo com metais pró-oxidantes como cobre e ferro (POWELL, 2000a; KOURY e DONANGELO, 2003).

Metalotioneína (MT), é uma família de proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa), rica em resíduos de cisteína (25%-30%) e serina e/ou lisina (12-18%), e com capacidade de ligação de 5-7 átomos de zinco por molécula (POWELL, 2000a). A proteína apresenta propriedades antioxidantes em uma diversidade de condições tais como exposição à radiação, drogas e metais pesados, podendo ser considerada um agente desintoxicante em relação aos radicais livres e ROS (SATO et al., 1984; MATSUBARA, 1987; LAZO et al., 1998). A metalotioneína, por ligar zinco, limita a concentração desse íon livre e tem importante papel em sua biodisponibilidade. No cérebro, as áreas ricas em zinco também apresentam síntese de MT, como na

glândula pineal (AWAD et al., 1989), no entanto, verificou-se que a administração de zinco (como sulfato de zinco - 7,5 mg/kg por via intraperitoneal ou intravenosa em dose única ou 1 dose/10 dias), não estimula a síntese desta enzima. No entanto quantidades menores de zinco administradas por via intraventricular por 48h induz esta síntese (AWAD et al., 1989). A MT III é um membro da família que regula a homeostase do zinco, e esta enzima aparece em grandes quantidades em neurônios que apresentam um pool de zinco vesicular (neurônios ZEN – neurônios ricos em zinco).

1.4.2.e. Histoquímica do zinco

O zinco considerado como quelável, aquele passível de ser aprisionado por agentes específicos – quelantes (que tem afinidade pelo íon podendo abstrá-lo de complexos que ligam o zinco, como as metaloproteínas), é aquele que é identificado histoquimicamente. As principais fontes de zinco quelável são: o pool vesicular, o zinco fracamente ligado a proteínas e o zinco livre (FREDERICKSON et al., 1983; PÉREZ-CLAUSELL e DANSCHER, 1985). No sistema nervoso central o zinco quelável é principalmente identificável no hipocampo (em terminais de fibras musgosas). Algumas técnicas histoquímicas revelam o zinco quelável, entre elas o Neo-Timm (DANSCHER, 1981; HAMANI et al., 2005) e o TSQ (N-(6-methoxy-8-quinolil)-p-toluenosulfonamida) (FREDERICKSON et al., 1987 *apud* KOH, 1996).

1.4.2.f Compostos de zinco

Várias considerações precisam ser feitas para se escolher o melhor sal de zinco a ser utilizado em experimentos e estes são: solubilidade, biodisponibilidade, efeitos adversos, custo, frequência da dosagem e o grau de toxicidade. Os sais de zinco mais utilizados, por exemplo, na suplementação em dietas são: sulfato de zinco (mais utilizado), acetato de zinco, gluconato de zinco, carbonato de zinco, cloreto de zinco e óxido de zinco (ALEN, 1998).

A solubilidade dos sais de zinco em soluções aquosas varia em relação ao sal utilizado: sulfato e cloreto são os mais solúveis, o acetato de zinco é fracamente solúvel e o carbonato e óxido de zinco são praticamente insolúveis logo, os menos absorvíveis pelo organismo (BUDAVARI, 1989).

1.4.2.g. Uptake do zinco no cérebro

No cérebro há três fontes principais de zinco: a) o pool vesicular encontrado em vesículas sinápticas nos terminais de neurônios ZEN e que liberam este zinco durante a atividade sináptica. No hipocampo esta liberação corresponde a 8% do zinco total desta região (CUAJUNGCO e LESS, 1997); b) o pool de zinco acoplado a metaloproteínas ligadas a membranas ou acoplado a complexos metal-proteína envolvido em reações metabólicas, ou, servindo como suporte estrutural de biomembranas; c) o pool iônico livre (o que apresenta as menores concentrações no cérebro) ou fracamente ligado a constituintes citoplasmáticos.

O zinco é necessário para a maturação e função cerebral, estando o maior percentual ligado a proteínas, enquanto um menor percentual está como zinco vesicular e zinco quimicamente reativo (FREDERICKSON, 1989). O zinco vesicular tem sido considerado um neurotransmissor (HUANG, 1994) ou um neuromodulador endógeno de importantes receptores sinápticos como: receptores AMPA, NMDA e GABA (FREDERICKSON e DANSCHER, 1990). Na transmissão sináptica, neurônios que sequestram zinco em vesículas, o liberam da mesma maneira que liberam neurotransmissores, ou seja, de forma cálcio-dependente.

A concentração de zinco no cérebro aumenta durante o desenvolvimento e se mantém constante na vida adulta (TAKEDA, 2001). No sistema nervoso o *turnover* de zinco é mais lento do que nos demais tecidos em função das barreiras hematoencefálica (BHE) e hemato-liquórica (BHL), deste modo, estas barreiras são importantes para a manutenção da homeostase deste íon (FRANKLIN et al., 1992).

Estudos utilizando injeções parenterais e intraventriculares de zinco mostraram que, para o parênquima cerebral, o *uptake* deste íon seria aproximadamente de 6-10 dias. A vida média de eliminação do zinco radioativo do cérebro de ratos foi estimada como variando de 16 a 43 dias, dependendo da região cerebral, e sendo realizada através das vilosidades aracnóides, via líquido cefalorraquidiano (TAKEDA, 2001).

A concentração do zinco intracelular é regulada através do influxo e efluxo deste íon, um sistema que é auxiliado pela quelação fisiológica do íon a complexos protéicos (e aminoácidos) sequestradores do metal (KING et al., 2000).

No caso do sistema nervoso central o íon absorvido, depois de cruzar as barreiras (BHE – a maior parte, e BHL) (FRANKLIN et al., 1992), se concentra

principalmente no parênquima da região hipocampal e áreas adjacentes como a amígdala-hipocampal (TAKEDA, 2001).

No sangue, o zinco é carregado preferencialmente pela albumina (PERSON et al.,2006) e o complexo no sangue pode ser subdividido em duas frações: uma de alto peso molecular (98% de zinco ligado a proteína) e uma de baixo peso molecular (2% de zinco ligado a constituintes de baixo peso), sendo carregado para o parênquima cerebral através de transportadores e cruzando as barreiras cerebrais (**Fig.6**). A absorção e liberação do zinco pelas células do parênquima cerebral (neurônios e glia) é pouco entendida, mas pode envolver a presença de alguns transportadores como o ZIP (família de proteínas transportadoras de zinco) (COUSINS e McMAHON, 2000; KAMBE et al., 2004).

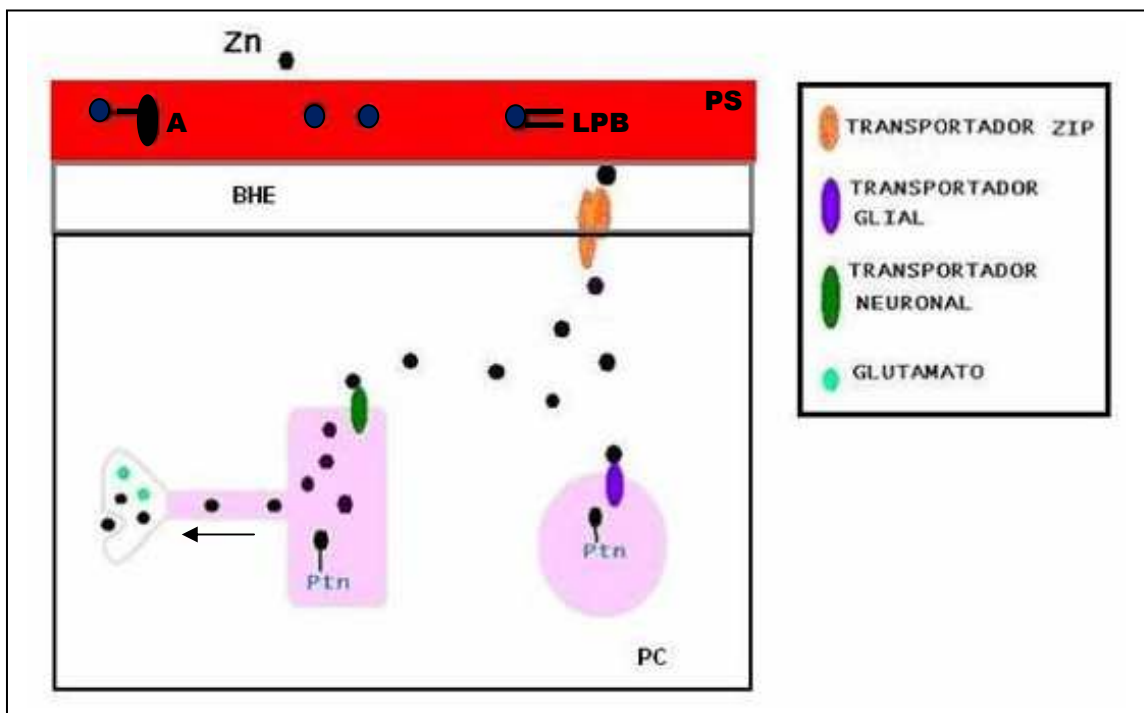


Fig. 6 - Esquema ilustrativo do transporte de zinco para dentro do cérebro. O zinco é transportado no plasma sanguíneo (PS) ligado à albumina (A) ou a ligantes de baixo peso molecular (LBP). O íon atravessa o sistema de barreira cerebral (BHE) via transportadores de zinco. O zinco é transportado para dentro das células gliais e neurônios via transportadores específicos. Nos citoplasmas pode se ligar a proteínas (metalotioneínas). No caso dos neurônios, parte do zinco pode ficar no corpo celular (papel funcional) enquanto outra é transferida para vesículas sinápticas. Este zinco vesicular pode ser, por exemplo, liberado para fenda sináptica junto com o glutamato (papel de neuromodulador).

1.4.2.h. Toxicidade do zinco

Metais pesados são considerados neurotóxicos quando em concentrações muito aumentadas. No cérebro bovino, um estudo feito em 11 regiões cerebrais diferentes ressaltou, em especial na glândula pineal, uma concentração mais alta de

alguns metais, entre eles o zinco (95 µg/g peso seco), em relação às demais regiões analisadas, inclusive o hipocampo (70 µg/g peso seco) (WONG e FRITZE, 1969). No entanto, estes valores não foram associados a nenhum grau de toxicidade. Porém, há dados da literatura sobre toxicidade oral aguda com o zinco mas este efeito tóxico só foi considerado em relação ao crescimento e anemia (OPRESKO, 1992). Nesse estudo, foram considerados como LD₅₀ doses variando entre 30-600 mg/kg de peso corporal, porém, isto seria dependente do sal de zinco administrado. Estudos sobre a toxicidade do zinco em roedores (e outros animais) estabeleceram ainda um “nível ou concentração na qual não se observava efeito tóxico” (representa um índice – NOEL, *no-observed-adverse-effect levels*), e para o caso do sulfato de zinco da dieta, este índice correspondeu a valores < 100 mg/kg de peso corporal (OPRESKO, 1992).

1.4.2.i. Toxicidade do zinco e sua contribuição a doenças neurodegenerativas

WEISS et al. (2001), afirmaram que alterações na homeostase do zinco podiam contribuir para algumas condições degenerativas (neuropatias degenerativas). Em situações especiais, como a epilepsia e a isquemia global transitória, o zinco acumulado nas sinapses contribui para a perda neuronal seletiva a qual ocorre nestas condições agudas.

Vários estudos relatam que o zinco, o cobre e o ferro favorecem a agregação de βA, sugerindo que esses metais possam contribuir para o processo de formação das placas senis (ATWOOD et al., 1998; BUSH et al., 1994; CUAJUNGCO e LESS, 1997). Exames de cérebros de pacientes com doença de Alzheimer revelaram zinco quelável em placas senis e emaranhados neurofibrilares (CUAJUNGCO e LESS, 1997; MISHIMOTO et al., 1993). Em 1992 foi demonstrado que proteoglicanos como a heparina e o heparan sulfato, contem sítios de ligação para metais (WHITFIELD e SARKAR, 1992), e alguns autores sugeriram que o proteoglicano heparan sulfato contribui para a ligação do zinco as placas de βA (LEE et al., 1999).

A importância dos transportadores de zinco (**Tabela 9**) para a formação das placas senis foi observada através de um estudo que mostrou diminuição acentuada na deposição de βA, em ratos que não possuíam o transportador ZnT3 (PALMITER et al., 1996). Este transportador faz parte de uma família de transportadores de zinco

(ZnT1-6) (KAMBE et al., 2004) que estão presentes em terminais sinápticos de neurônios ZEN (do hipocampo, entre outros). Sua presença, na membrana de vesículas sinápticas sugere que este transportador esteja envolvido no transporte de zinco para dentro da vesícula (PALMITER et al., 1996).

Tabela 9: Principais transportadores de zinco e suas respectivas funções e localizações			
Transportador	Funções	Localização	Referência
ZnT-1	Efluxo de zinco	intestino (duodeno e jejuno), rins e fígado	PALMITER e FINDLEY, 1995
ZnT-2	Acumula zinco em vesículas ou organelas	intestino e rins	LIUZZI et al., 2001
ZnT-3	Transporta zinco para vesículas sinápticas	cérebro e testículos	PALMITER et al., 1996
ZnT-4	Envolvido na secreção de zinco no leite	glândulas mamárias, coração, fígado, pulmão, rim, baço	COUSINS e McMAHON, 2000

Evidências para a toxicidade do zinco surgiram principalmente com os estudos que mostravam acúmulos deste íon em certas regiões cerebrais, como, por exemplo, no caso dos terminais sinápticos das fibras musgosas do hipocampo no rato, onde há uma alta concentração de zinco (SATO et al., 1984). Esse pool de zinco pode ser liberado para a fenda sináptica sob estimulação elétrica, chegando a uma concentração entre 220 a 300 μM (FREDERICKSON et al., 1983). Estudos *in vitro* mostraram que células nervosas tinham sua sobrevivência comprometida quando eram expostas a concentrações de zinco entre 225 a 1000 μM (KOH e CHOI, 1994). Assim é essencial o controle homeostático do zinco no sistema nervoso central (PALMITER et al., 1996).

Diante da existência de um modelo de hiperzincemia onde se mostrou claramente alterações histopatológicas e comportamentais expressivas era fundamental ampliar o estudo, usando o modelo desenvolvido, para outros tipos de avaliação científica. Portanto, no presente estudo, foram utilizados animais submetidos às mesmas condições utilizadas no Modelo Experimental de Hiperzincemia com o propósito de ampliar o conhecimento sobre a ação do zinco na glândula pineal, através de técnicas de quantificação para elementos químicos, e análises ultraestruturais. A relevância do presente estudo está nas respostas que ele trará como por exemplo, os dados ainda não citados na literatura sobre elementos traço na glândula pineal avaliados pela técnica do TXRF. Do mesmo modo, os resultados fornecerão dados de microscopia eletrônica nesta glândula esclarecedores sobre o material fibrilar considerado como depósitos amilóides, e

que surgiram devido a um excesso de zinco, dados estes que não foram encontrados na literatura científica até o presente. E mais, o estudo trará esclarecimentos sobre uma possível natureza protéica dos amilóides observados, e possíveis alterações no equilíbrio homeostático de diversos elementos químicos, que podem ainda contribuir para o comprometimento na atividade motora dos animais. Assim, os dados obtidos no presente estudo ampliam o conhecimento sobre a glândula pineal e contribuem para diversos estudos histopatológicos envolvendo metais pesados e outros íons importantes para a homeostasia.

2.OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

Objetivo geral:

- Avaliar nos animais submetidos ao excesso de zinco através da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão total, a concentração de zinco na glândula pineal e no sangue e a concentração de zinco endógeno excretada por esses animais.

Objetivos específicos

- Caracterizar na glândula pineal as áreas zinco positivas, usando histoquímica para zinco (TSQ e Neo-Timm) e compará-las com as marcações positivas para amiloidose.
- Confirmar os resultados anteriores (FEREZIN-PINTO, 2007) que apontavam para o comprometimento da atividade motora, em animais submetidos ao excesso de zinco , e avaliar o comportamento alimentar destes animais.
- Avaliar por Microscopia Eletrônica a ultraestrutura e localização dos depósitos amilóides previamente evidenciados em animais submetidos não excesso de sulfato de zinco.
- Verificar a natureza protéica dos depósitos amilóides usando o método histoquímico específico do permanganato de potássio.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais utilizados (Conforme as normas do Comitê de Ética para uso de animais[†])

Foram utilizadas um total de 48 ratas albinas da linhagem Wistar, com 90 dias pós-natais que foram mantidas sob ciclo claro-escuro (12-12h), em gaiolas biológicas. As ratas foram divididas em 3 grupos: grupos para terapia de alta dose (GTAD), grupos controles com solução salina (GC) e grupos controles neutros sem solução salina (GCN). Os animais destinados as diferentes técnicas de análise, foram distribuídos como segue:

Técnicas	GTAD	GC	GCN
AM	11	11	4
TXRF	9	9	4

AM = Análises por microscopia óptica, fluorescência e eletrônica

TXRF = Análises por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

Os animais controles neutros foram utilizados para a técnica de TXRF com o intuito de analisar se a solução salina administrada no grupo controle alteraria a concentração dos elementos químicos nas amostras biológicas (glândula pineal, soro sanguíneo e fezes).

Todos os animais receberam ração (Nutrilab) controlada (100 g a cada dois dias, total de 500 g em 10 dias) contendo quantidades pré-determinadas de zinco (7 mg de zinco/100g ração) e água *ad libitum*. No primeiro dia do experimento (D0) os animais haviam ingerido cerca de 58 g de ração (4,1 mg de zinco). Todos os animais foram pesados antes (D0), durante (D5) e após cada experimento (D10).

Os animais utilizados nos experimentos eram colocados em gaiolas biológicas (*gb*) uma semana antes da idade pós-natal 90, com o objetivo de ambientá-los neste tipo de *habitat*, procedimento necessário para obtenção de uma resposta adequada quando das análises em labirinto de campo aberto. As gaiolas biológicas eram duplas (com separação interna), permitindo que cada rata ficasse isolada no seu compartimento.

[†] Número da CAUAP-CCS:DAHEICB 002

3.2. Administração das doses de zinco

A dose hiperzincêmica total (DH) usada em todos os animais, correspondeu a 600 mg/kg (dose padrão) de uma solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) 0,1 M (Sigma) (1000 mM). A administração foi por via oral (V.O.) durante 10 dias, ou seja, a dose total foi dividida em dez subdoses, sendo administrada 1 subdose/dia.

As doses eram administradas sempre na parte da manhã (~10h), sem anestesia, com auxílio de agulha de gavagem para ratos ($\theta = 1,2$ mm com esfera) embebida em glicerina, e de acordo com as normas e procedimentos referentes à Ética Experimental*.

Após a última dose, os animais sobreviviam por 48h e eram sacrificados conforme as normas e procedimentos referentes à ética experimental* e sob profunda anestesia com 0,3 ml da solução com Ketamina (2,14 ml), Xilasina (2,15 ml) e Acepromazina (0,7 ml).

3.3. Análise pela técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

As doses foram administradas de acordo com os procedimentos relatados no item 3.2. Utilizou-se uma relação peso X dose para os animais como segue na tabela 10:

* Riviera, E.A.B. Ética, bem-estar e legislação. In: *Manual para técnicos em bioterismo*. 2. ed. São Paulo: EPM, 1996.

Tabela 10: Relação entre o peso do animal e a dose administrada

Animais (n=22)	Peso inicial (g)	Dose Total Administrada (ml)	Concentração de Zn (mg) na dose total	Solução
GTAD 1	188	7,4	48,1	ZnSO ₄ 0,1M
GC1	202	7,4	X	Salina
GTAD 2	211	6,7	43,55	ZnSO ₄ 0,1M
GC2	200	6,1	X	Salina
GTAD 3	194	7,2	46,8	ZnSO ₄ 0,1M
GC3	136	5,1	X	Salina
GTAD 4	220	8,2	53,3	ZnSO ₄ 0,1M
GC4	209	7,8	X	Salina
GTAD 5	198	7,4	48,1	ZnSO ₄ 0,1M
GC5	190	7,1	X	Salina
GTAD 6	189	7,0	45,5	ZnSO ₄ 0,1M
GC6	184	6,9	X	Salina
GTAD 7	208	7,7	50,05	ZnSO ₄ 0,1M
GC7	201	7,5	X	Salina
GTAD 8	180	6,7	43,55	ZnSO ₄ 0,1M
GC8	176	6,5	X	Salina
GTAD 9	151	5,6	36,4	ZnSO ₄ 0,1M
GC9	145	5,4	X	Salina
GCN1	188	X	X	X
GCN2	200	X	X	X
GCN3	202	X	X	X
GCN4	164	X	X	X

GTAD - terapia de alta dose; GC - solução salina 0,9%; GCN - nada foi administrado.

3.3.1. Perfusão e retirada do material

Os animais, sob anestesia profunda, foram perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9% em tampão fosfato (PBS) 0,1M.

Imediatamente após a perfusão, os animais foram decapitados, as caixas cranianas dissecadas e os encéfalos removidos. Foram colhidos para análises: as glândulas pineais, as quais foram envoltas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a - 70°C até a sua análise, as fezes e o

sangue. As fezes de cada animal foram coletadas antes, durante e após a administração das 10 doses (total de 3 amostras por animal), eram secas e armazenadas (em *ependorfs*) sob refrigeração. O sangue de cada animal, coletado no momento da perfusão, foi armazenado em *ependorfs* sem anticoagulante e congelado.

3.3.2. Procedimento para a digestão química em meio ácido

Todas as glândulas pineais foram pesadas como uma amostra única (GTAD = 3 mg; GC= 3,3 mg), e colocadas em *ependorfs* com 100 μ L de ácido nítrico (HNO_3) a 65%. As amostras das fezes foram pesadas e digeridas com HNO_3 a 65%. A digestão ocorreu em estufa a 60°C durante duas horas. Após a digestão química pelo ácido, o volume das amostras era ajustado com água deionizada e solução de Gálio (102,5 ppm) para um volume final de 550 μ L. As amostras de sangue foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos) e 200 μ L de soro foram retirados de cada amostra. Para o soro sanguíneo, sem digestão ácida, o volume de 200 μ L era ajustado do mesmo modo.

Todas as amostras foram preparadas em duplicata com a finalidade de aprimorar os resultados. De cada amostra do material coletado, eram retirados 5 μ L, e estes microlitros eram colocados no centro de cada suporte refletor (*Lucite*). Cada *Lucite* era seco sob luz infravermelha (**Fig.7**).

Foi preparada, para cada material coletado, uma amostra-controle (“branco”) contendo apenas água, gálio e HNO_3 (sem o ácido no caso do sangue).

Nesta técnica, em geral, a quantificação é realizada através do método da adição do padrão interno (KLOCKENKAMPER, 1996). Este método é baseado na adição de um elemento que não está presente na amostra, como por exemplo, o gálio. Isto é utilizado porque o fino filme formado no suporte refletor (*Lucite*) não possui uma geometria regular e as intensidades dos raios X dependem da posição do filme fino. Este efeito de geometria pode ser corrigido normalizando-se cada linha elementar de raios-X pelo padrão interno adicionado em todas as amostras e padrões (KLOCKENKAMPER e VON BOHLEN, 1996).

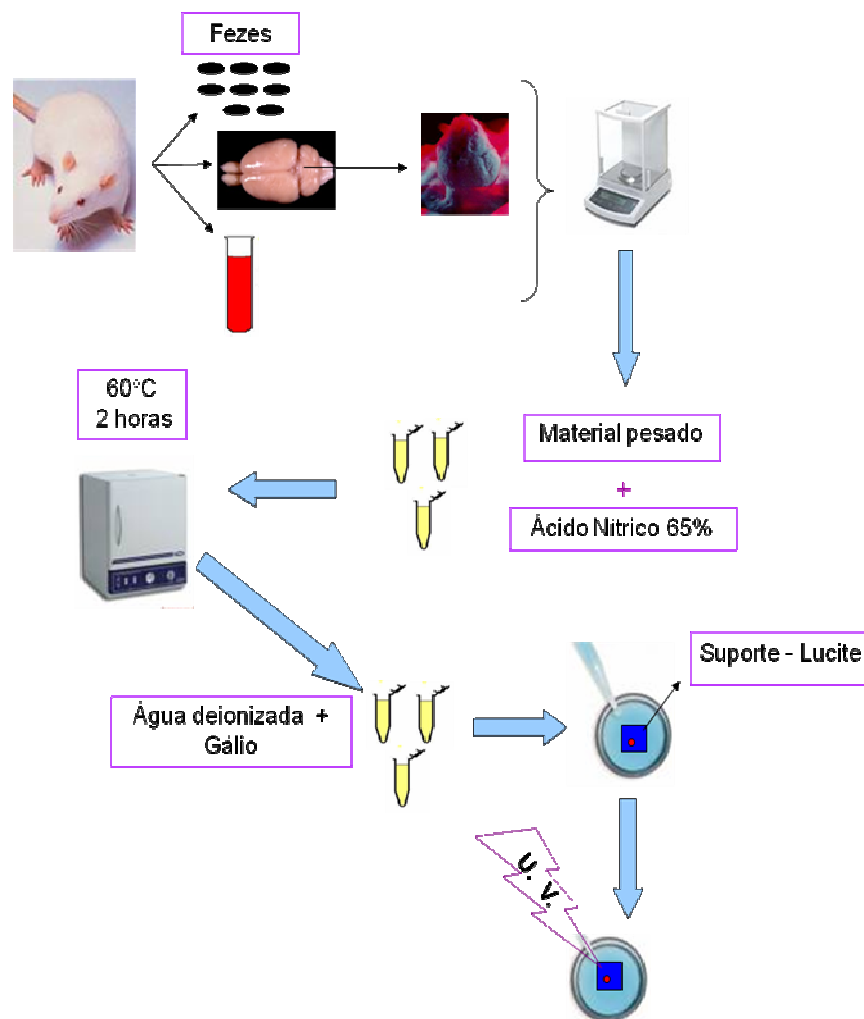


Fig.7 - Esquema ilustrativo dos procedimentos para obtenção do material analisado pela técnica TXRF. Cada *lucite* obtido, contendo a amostra seca, era submetido à excitação pelo feixe de radiação.

3.3.3. Utilização de amostras certificadas

A acurácia das medidas foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de fígado bovino (NIST1577b), preparada por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras do experimento.

3.3.4. Instrumentação

As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo pela pesquisadora Dra. Renata Barbosa Serpa.

Utilizou-se para tal um detector de germânio hiperpuro (HPGe) (resolução de 140 eV em 5,9 keV) onde as amostras a serem analisadas são colocadas e

excitadas através de um feixe branco de irradiação, com energia máxima igual a 20 keV (feixe filtrado por 0,5 mm de alumínio com um ângulo de incidência de 1,0 mrad). O tempo de irradiação de cada amostra e de cada padrão é igual a 100 s.

Os espectros de raios X obtidos e característicos de cada elemento químico foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL) (Quantitative X ray analysis system (QXAS) software package, IAEA, Vienna), distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), para estabelecer as intensidades de cada elemento químico encontrado.

3.3.5. Análises estatísticas

Os resultados apresentados como média \pm desvio padrão foram comparados pela análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5 %. As médias foram comparadas pelo teste Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Programa de Bioestatística *Primer*.

3.4. Análise da glândula pineal pelas técnicas histológicas, histoquímicas e ultraestruturais

3.4.1. Administração das doses:

Os animais destinados a microscopia óptica e eletrônica, foram submetidos à terapia de alta dose (TAD) de modo similar ao explicado anteriormente no item 3.2. A **Tabela 11** mostra os valores das doses administradas em relação aos pesos, como segue:

Tabela 11: Relação entre o peso e dose administrada por animal

Animais (n=26)	Peso inicial (g)	Dose Total Administrada (ml)	Concentração de Zn (mg) na dose total	Solução
GTAD 10	156	5,81	37,76	ZnSO ₄ 0,1M
GC10	174	6,48	X	Salina
GTAD 11	185	6,9	44,85	ZnSO ₄ 0,1M
GC 11	190	7,08	X	Salina
GTAD 12	184	6,86	44,59	ZnSO ₄ 0,1M
GC 12	176	6,56	X	Salina
GTAD 13	198	7,38	47,97	ZnSO ₄ 0,1M
GC 13	185	6,9	X	Salina
GTAD 14	176	6,56	42,64	ZnSO ₄ 0,1M
GC 14	168	6,26	X	Salina
GTAD 15	215	8,01	52,06	ZnSO ₄
GC 15	155	5,77	X	Salina
GTAD 16	218	8,124	52,8	ZnSO ₄ 0,1M
GC 16	187	6,97	X	Salina
GTAD 17	200	7,45	48,4	ZnSO ₄ 0,1M
GC 17	194	7,23	X	Salina
GTAD18	187	6,97	45,3	ZnSO ₄ 0,1M
GC 18	178	6,63	X	Salina
GTAD19	228	8,5	55,25	ZnSO ₄ 0,1M
GC19	216	8,05	X	Salina
GTAD20	200	7,45	48,4	ZnSO ₄ 0,1M
GC20	194	7,23	X	Salina
GCN5	187	X	X	X
GCN6	201	X	X	X
GCN7	178	X	X	X
GCN8	193	X	X	X

GTAD - terapia de alta dose; GC - solução salina 0,9%; GCN - nada foi administrado.

3.4.2. Perfusão e retirada do material

As ratas profundamente anestesiadas foram perfundidas por via intracardíaca, com as soluções: salina 0,9% em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, seguida de paraformaldeído a 4% tamponado (PBS). A pós-fixação ocorreu por 24 h. no mesmo fixador. Posteriormente, os encéfalos contendo as glândulas pineais foram colocados em PBS 0,1 M.

3.4.3. Inclusão em parafina e microtomia

As glândulas pineais foram desidratadas em álcool etílico PA (70% até etanol absoluto – 10 min. cada), clarificadas (2 banhos de xileno – 5 min. cada), impregnadas em parafina (3 banhos - 10 a 30 min. cada) e incluídas, orientadamente, para a obtenção de cortes parassagitais. Os blocos obtidos foram cortados na espessura de 5 µm (micrótomo Rotary Microtome, Lipshaw) e os cortes recolhidos em lâminas histológicas gelatinizadas.

3.4.4. Colorações

a) Técnica da hematoxilina – eosina (HE)

As preparações histológicas passaram pela desparafinação em três banhos de xileno (1 min. cada); hidratação em etanol (100% a 70% - 1 min. cada, e água destilada, 2 min.); coloração em HE (Hematoxilina - 1 min., lavagem em água corrente - 5 min., Eosina - 1 min.), desidratação em etanol (70% a 90% - 1 min. cada e absoluto, 2 banhos - 1 min. cada); clarificação em xileno e montagem com entelan.

b) Método vermelho congo Romhányi (VC) (BÉLY, 2003)

As preparações histológicas foram desparafinadas por 2 dias a 56°C, incubadas duas vezes em solução de clorofórmio e metanol (1:1) por 1 hora cada, seguida de hidratação em álcool 96% (2 banhos de 30 min. cada). Os cortes foram lavados em água corrente, rinsados em água destilada, e corados com vermelho congo 1% aquoso por 10 min., seguido de lavagem em água destilada, clarificação e montagem em entelan. Os depósitos avermelhados que são interpretados como

amilóide, sob microscopia de polarização (Microscópio Axioscop MC80 - Zeiss) aparecem birrefringentes em verde-maçã.

b.1) Mecanismo de coloração: O vermelho congo é um corante azóico de molécula linear que contém o grupo **-N=N-** (azo) (**Fig.8**), que corresponde ao sítio de ligação dos radicais de hidroxila de carboidratos (similarmente espaçados) encontrados no amilóide (KHURANA, et al., 2001).

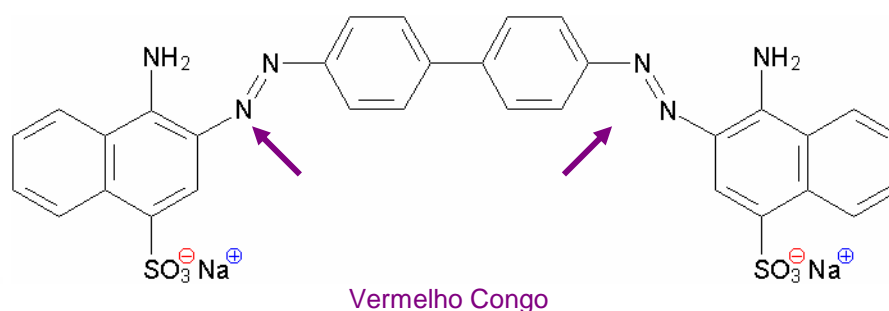


Fig.8 - Molécula de vermelho congo. Grupamento azóico (setas)

c) Tioflavina T

Preparações histológicas da glândula pineal foram desparafinadas e coradas por Hematoxilina de Mayer's (2 min.) e lavadas em água corrente. Posteriormente foram incubadas com tioflavina T por 3 min., rinsadas em água destilada, diferenciadas em ácido acético 1% por 20 min., lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas e montadas em entelan. A tioflavina T, um corante histoquímico e fluorescente, possui uma grande sensibilidade para marcar fibrilas amilóides, que apresentam ou não a configuração β e sua marcação independe da sequência de aminoácidos do peptídeo envolvido. Este procedimento visa reforçar os resultados encontrados com o vermelho congo (HAWE et al., 2007). As fibrilas amilóides aparecem marcadas por intensa fluorescência verde, amarela ou azul (dependendo do filtro utilizado) (WESTERMARK et al., 1999).

d) Técnica de pré-tratamento com permanganato de potássio

O permanganato de potássio é usado para diferenciar o tipo de amilóide (amilóide AA) (RIJSWIJK e VAN HEUSDEN, 1979). Caso o depósito seja amilóide tipo AA, com este tratamento, o resultado será vermelho congo negativo, não

aparecendo birrefringência no tecido. Preparações histológicas foram desparafinadas (pela técnica histológica clássica), hidratadas em álcool 100% e recobertas por celoidina 0,5% (2 min.). Em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar. A solução de permanganato de potássio a 0,25% com ácido sulfúrico a 0,15% (V:V) foi colocada sobre os cortes por 3 min. Em seguida as preparações histológicas foram branqueadas em ácido oxálico a 2,5%, lavadas em água destilada, e, coradas em vermelho congo por 20 min. Seguiu-se a desidratação, clarificação e montagem em entelan. Controles foram corados somente pelo vermelho congo.

e) Técnicas histoquímicas para evidenciar o zinco.

e.1) TSQ - N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-toluenosulfonamida.

O método histoquímico TSQ marca por fluorescência azul o zinco fracamente ligado ou livre (FREDERICKSON, 1987 *apud* KOH,1996). As glândulas pineais não fixadas foram crioprotetidas em sacarose (10%, 20% por 1h. cada e 30% - overnight), embebidas em O.C.T. (Tissue Tek) e emblocadas neste mesmo meio. Os cortes (14 μ m) foram feitos em criostato (Slee Cryostal), a -14°C, e recolhidos em lâminas gelatinizadas que foram imersas (60 s.) na solução de TSQ (4,5 μ M) tamponada (tampão barbital 140 mM e tampão acetato de sódio 140 mM, pH 10.5 - 11) e lavadas em solução salina 0,9%. As preparações foram analisadas usando microscópio de fluorescência (Axioscop MC80 - Zeiss, feixe-excitação 355-375 nm, espelho dicróico, 380 nm; barreira 420 nm).

e.2) Método do Neo-Timm

Utilizado para verificar preferencialmente a distribuição de zinco quelável (e vesicular). Baseia-se na conversão do íon metálico no tecido em moléculas de sulfeto metálico, sobre os quais a prata metálica se deposita. Deste modo, após a incubação dos cortes na solução reveladora, aparecem precipitados escuros de prata-metálica que são reveladores dos locais onde está o sulfeto de zinco (DANSCHER, 1981; HAMANI et al., 2005).

Para esta técnica foi administrado, durante a perfusão solução salina 0,9% (tamponada – PBS 0,1 M) seguida de 5 mL de solução de sulfeto de sódio em

tampão Sorensen 0,15 M, pH 7,4 e então glutaraldeído 3% (em tampão Sorensen 0,15 M, pH 7,4). Em seguida, a mesma solução de sulfeto de sódio foi passada novamente por 7 min. Os encéfalos contendo as glândulas pineais foram retirados, pós-fixados em glutaraldeído por 1 h. e lavados em seguida em 3 banhos (5 min. cada) de tampão Sorensen 0,15 M, pH 7,4.

As glândulas pineais foram desidratadas em álcool etílico PA (70% até etanol absoluto – 10 min. cada), clarificadas (2 banhos de xileno – 5 min. cada), impregnadas em parafina (2 banhos - 10 min. cada) e em paraplast (1 banho – 10 min.) e incluídas orientadas, para a obtenção de cortes parassagitais. Os blocos obtidos foram cortados na espessura de 5 µm (micrótomo Rotary Microtome, Lipshaw) e os cortes recolhidos em lâminas histológicas gelatinizadas.

As preparações histológicas foram posteriormente desparafinadas em três banhos de xileno (1 min. cada) e hidratadas em etanol (100% a 70% - 1 min. cada, e água destilada, 2 min.). As lâminas foram postas na solução reveladora (goma arábica, tampão citrato, hidroquinona e nitrato de prata) por 60 min. (no escuro) e passadas em solução de tiosulfato de sódio 5% (12 min.) para parar o processo de revelação (DANSCHER, 1981; HAMANI et al., 2005). As preparações histológicas foram lavadas em água destilada por 10 min., contracoradas com hematoxilina, desidratadas em etanol (70% a 90% - 1 min. cada e absoluto, 2 banhos - 1 min. cada), clarificadas em xileno e montadas com entelan.

3.5. Microscopia eletrônica

3.5.1. Perfusão e retirada do material:

Os animais profundamente anestesiados conforme explicado anteriormente no item 3.4.2 foram perfundidos por via intracardíaca, com solução salina 0,9% tamponada (PBS 0,1 M,) seguida de solução fixadora de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 4%, tamponada. Os encéfalos foram retirados e pós-fixados por 24 horas no mesmo fixador. Posteriormente, as glândulas pineais foram removidas do encéfalo e colocadas em PBS 0,1 M.

3.5.2. Inclusão em epon

As glândulas pineais foram lavadas em solução tampão 0,1 M, desidratadas em álcool etílico PA (50%, 70%, 95% e etanol absoluto – 2 banhos de 10 min. cada), seguido por acetona (2 banhos , 10 min. cada) e colocadas para impregnação em Epon-acetona (1:1) por 2 h. e Epon puro por 24 h. O material foi incluído, orientadamente para obtenção de cortes transversais, em Epon puro por 72 h. em estufa a 60°C para polimerização. Os cortes semifinos na espessura de 1 um foram corados com azul de toluidina a 1% e serviram de delimitação para as áreas de interesse e orientação dos cortes ultrafinos (com cerca de 60-70 nm) (Leica Ultracut UCT) que foram colhidos em grades de 300 *mesh* e contrastados por acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900, gentilmente cedido pela Dra. Thais Cristina Baeta Soares Souto-Padrón, do Laboratório de Biologia de Protozoários, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

3.6. Avaliação da atividade motora em animais submetidos à terapia de alta dose (TAD)

3.6.1. Testes comportamentais

Para analisar a alteração na atividade motora nos animais submetidos à TAD, foi utilizado o labirinto de campo aberto (LCA-NEuro)*. Os testes foram realizados nesta arena de campo aberto, que consta de seis retângulos iguais (área 3,28 m² cada retângulo), e um círculo central indicador do local onde o animal é colocado para o início das sessões teste. Uma WebCan é usada para a filmagem de todos os testes, e as imagens com respectivos tempos são captados pelo computador acoplado.

Uma semana antes do início do experimento, cada animal era ambientado no labirinto por 5 dias consecutivos, em sessões denominadas de sessões ambientação (SAM). Essas sessões (5 SAM no total) com duração de 3 min. cada eram feitas uma vez por dia (**Fig.9 a**).

* LCA-Neuro se refere à arena desenvolvida especificamente para avaliar os parâmetros relacionados ao modelo de hiperzincemia que foi desenvolvido no Lab. de Neurobiologia (Dra. Elenice M. Correa).

Posteriormente, para a análise da atividade motora os animais eram submetidos a sessões testes (ST), num total de três (1ª ST – antes do início do experimento, antes da aplicação da primeira dose; 2ª ST – no meio do experimento, na época entre a 4ª e 5ª dose; 3ª ST – ao final do experimento, após a última dose) (Fig.9 b, c). O procedimento para a realização das STs era o seguinte: nas STs, cada rata era colocada no labirinto por 3 minutos (3 min/ST). Cada ST era repetida 6 vezes e entre elas havia um intervalo também de 3 min. (STEIN et al., 1994).

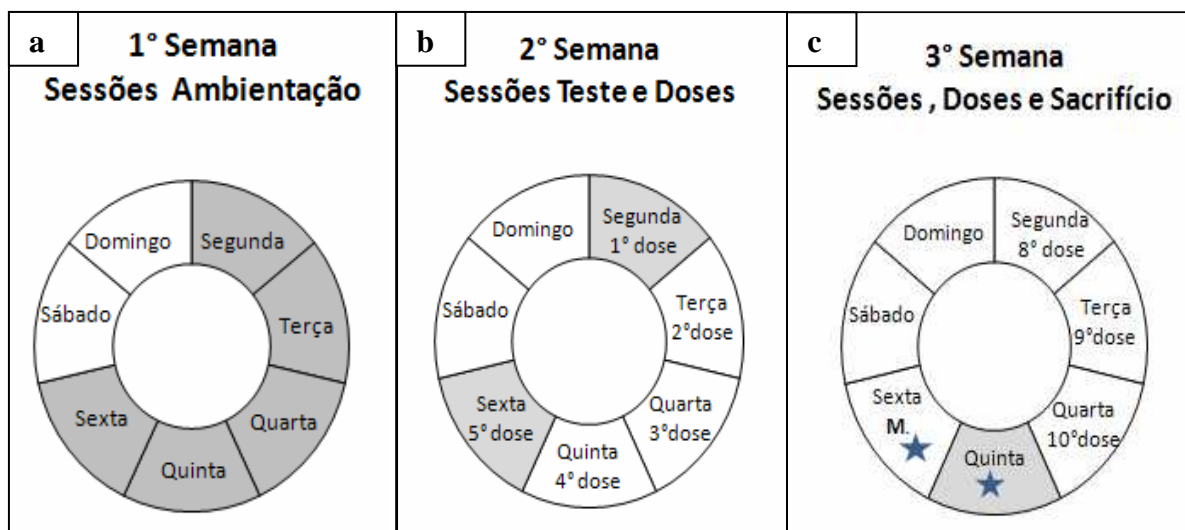


Fig.9 - Esquema ilustrativo dos procedimentos usados nos testes de labirinto. **a** - os dias marcados em cinza escuro se referem as SAM; **b** e **c** - correspondem as sessões testes (dias marcados em cinza claro) realizadas. Os dias das doses administradas estão representados nos gráficos. Em **c**, o símbolo estrela (☆) indica a sobrevivência dos animais e **M** indica o dia de sacrifício dos animais.

3.6.2. Parâmetros considerados para a avaliação da atividade motora.

Foram usados os seguintes parâmetros :

- 1) *Ambulação* - Cada retângulo andado foi considerado como ultrapassado quando a rata cruzava este espaço com as quatro patas. A ambulação era quantificada como retângulos andados, e também podia ser quantificada em distância percorrida.
- 2) *Rearing* - Comportamento de levantar as patas anteriores apoiado nas patas traseiras e assumindo uma postura bípede. Este comportamento exploratório, quando associado à ambulação, é representativo da atividade motora (CRUZ et al., 1994).

Todas as avaliações foram realizadas através da análise dos vídeos gravados. A atividade motora avaliada nos controles representou o padrão normal comparativo. Nas análises, a ambulação e o número de *rearing* (por animal) eram quantificados a cada ST e, posteriormente os resultados eram expressos como médias e plotados em gráficos (**Fig. 15, 16**). A atividade motora era representada pela relação de proporcionalidade direta entre ambulação e *rearing* (**Fig. 17**). Qualquer relação indireta entre ambulação e *rearing* foi apenas quantificada como parâmetros isolados, ou seja, apenas como um valor de ambulação ou um valor de *rearing* não sendo representativa de atividade motora.

3.6.3. Procedimentos para análises em relação ao comportamento alimentar e variação de peso dos animais submetidos à TAD

Todos os animais eram pesados antes do início do experimento, entre a 4^o e 5^a dose e após a 10^a dose (sempre antes do início das sessões no labirinto).

Para avaliar a quantidade de ração ingerida pelos animais experimentais (o que passou a representar o comportamento alimentar), a ração fornecida era pesada e completada para 100 g de dois em dois dias. Avaliou-se então, pela pesagem do ingerido em relação à ração fornecida, a quantidade de alimento consumido pelos animais submetidos à TAD. O mesmo cálculo foi feito para os controles e representou o padrão normal comparativo.

3.6.4. Análises estatísticas

Os resultados representativos de médias \pm desvios padrões foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5 %. As médias entre os valores foram comparadas utilizando o teste Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Programa BioEstat 5.0.

4. RESULTADOS

4.1- Análise quantitativa por TXRF

4.1.1. Glândula Pineal (GP)

Os resultados mostram na glândula pineal dos animais do GTAD: **diminuição** da concentração dos elementos traço fósforo (um macronutriente) e níquel (**Fig.10**), e, **aumento** das concentrações dos minerais potássio e cálcio (macronutrientes), dos elementos químicos essenciais, enxofre e cloro, dos micronutrientes ferro e zinco, do metal de transição titânio e do elemento traço manganês (**Fig.11**).

A **Tabela 12** e as **Figuras 10** e **11** que se seguem, ilustram as concentrações médias de cada elemento químico encontrado na GP.

Tabela 12: Concentração elementar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) na glândula pineal de ratas Wistar. Os elementos químicos estão em ordem crescente de acordo com seu número atômico (Z).

Elementos (Z)	Grupo Controle	Grupo TAD
Si	52±0,67	89±36
P	8478±109 ^a	1404±62 ^a
S	1244±20 ^a	2215±23 ^a
Cl	864±26 ^a	1736±22 ^a
K	2893±7,6 ^a	4040±43 ^a
Ca	1835±17 ^a	4272±56 ^a
Ti	43±4 ^a	62±6 ^a
Cr	29±1	28,8±5
Mn	3,5±0,6 ^a	6,0±0,85 ^a
Fe	645±11 ^a	1953±26 ^a
Ni	100±0,78 ^a	47±0,5 ^a
Zn	105±0,5 ^a	150±1 ^a

Valores: média ± desvio padrão. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

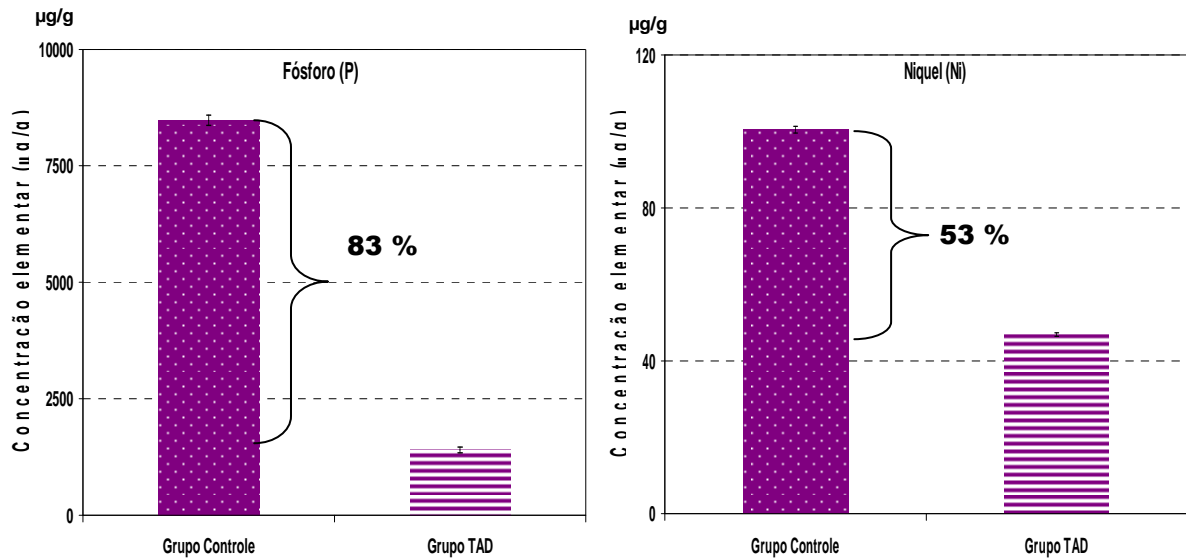
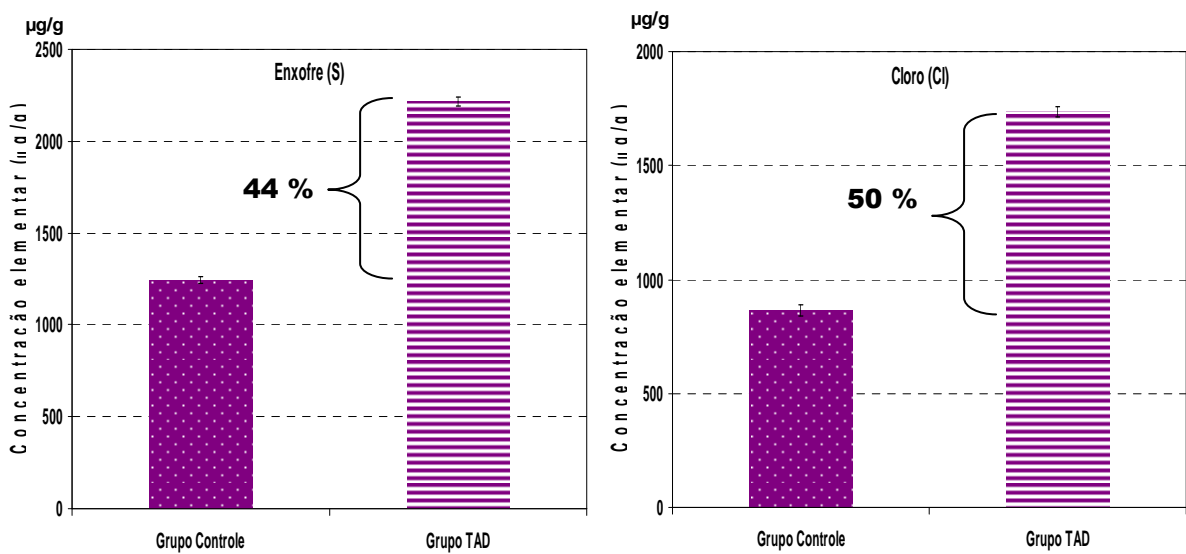


Fig.10 - Gráficos representativos dos elementos químicos da glândula pineal que apresentaram **diminuição** estatisticamente significativa em suas concentrações com a terapia de alta dose (TAD) (n = 18). Os decaimentos das concentrações estão expressos em porcentagem. Resultados expressos em média \pm SD .

Figura 11



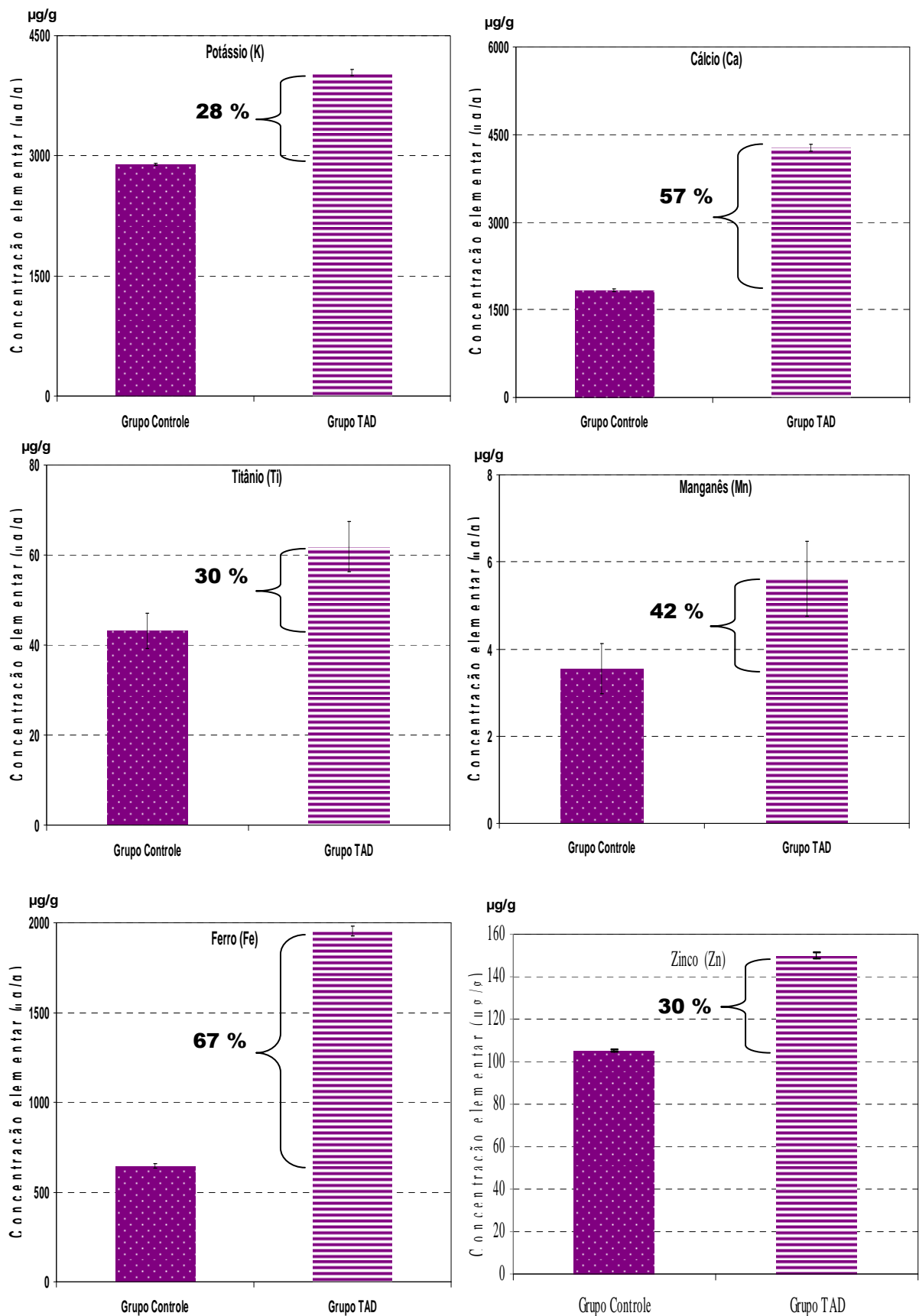


Fig.11 – Gráficos representativos dos elementos químicos da glândula pineal que apresentaram **aumento** estatisticamente significativo em suas concentrações com a terapia de alta dose (TAD) (n = 18). Os aumentos das concentrações estão expressos em porcentagem. Resultados expressos em média ± SD.

4.1.2. Soro Sanguíneo

Os resultados mostram no soro sanguíneo dos animais do GTAD: **diminuição** da concentração do micronutriente ferro (**Fig.12**), e aumento dos elementos químicos essenciais enxofre, cloro e do macronutriente, potássio (**Fig.13**). Não houve alteração estatisticamente significativa em relação ao zinco do soro sanguíneo dos animais submetidos à TAD pelo sulfato de zinco.

A **Tabela 13** e as **Figuras 12 e 13** que se seguem, ilustram as concentrações médias de cada elemento químico encontrado no soro sanguíneo, após 10 doses hiperzincêmicas.

Tabela 13: Concentração elemental ($\mu\text{g.Ml}^{-1}$) nas amostras do soro sanguíneo de ratas Wistar. Os elementos químicos estão por ordem crescente de número atômico (Z).

Elementos (Z)	Grupo Controle	Grupo TAD
Si	<LMD	7,0±2
P	15±6	14±6
S	40±8 ^a	62±18 ^a
Cl	218±91 ^a	290±72 ^a
K	281±54 ^a	491±88 ^a
Ca	228±118	221±123
Ti	7,0±2	9,0±3
Cr	4,0±2	4,0±2
Mn	9,0±0,2	1,5±1
Fe	348±173 ^a	245±96 ^a
Ni	2,0±1	4,0±2
Zn	13±5	13±4

Valores: média ± desvio padrão; o índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$. LMD = Limite mínimo detectável

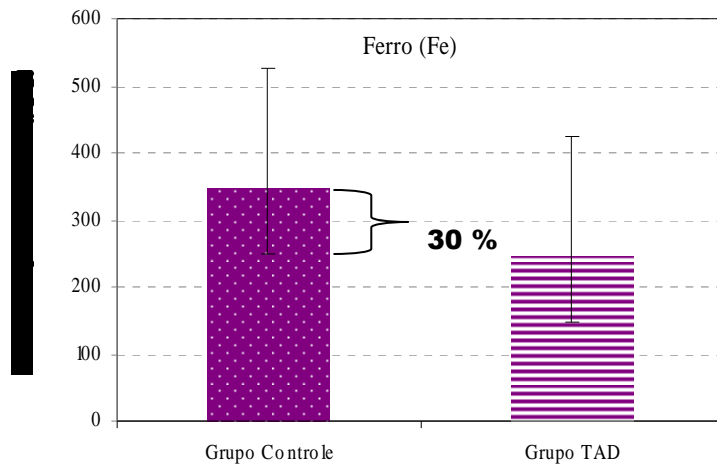


Fig.12 - Gráficos representativos do elemento químico ferro no soro sanguíneo que apresentou **diminuição** estatisticamente significativa em sua concentração com a terapia de alta dose (TAD) (n = 18). A diminuição da concentração está expressa em porcentagem. Resultados expressos em média \pm SD.

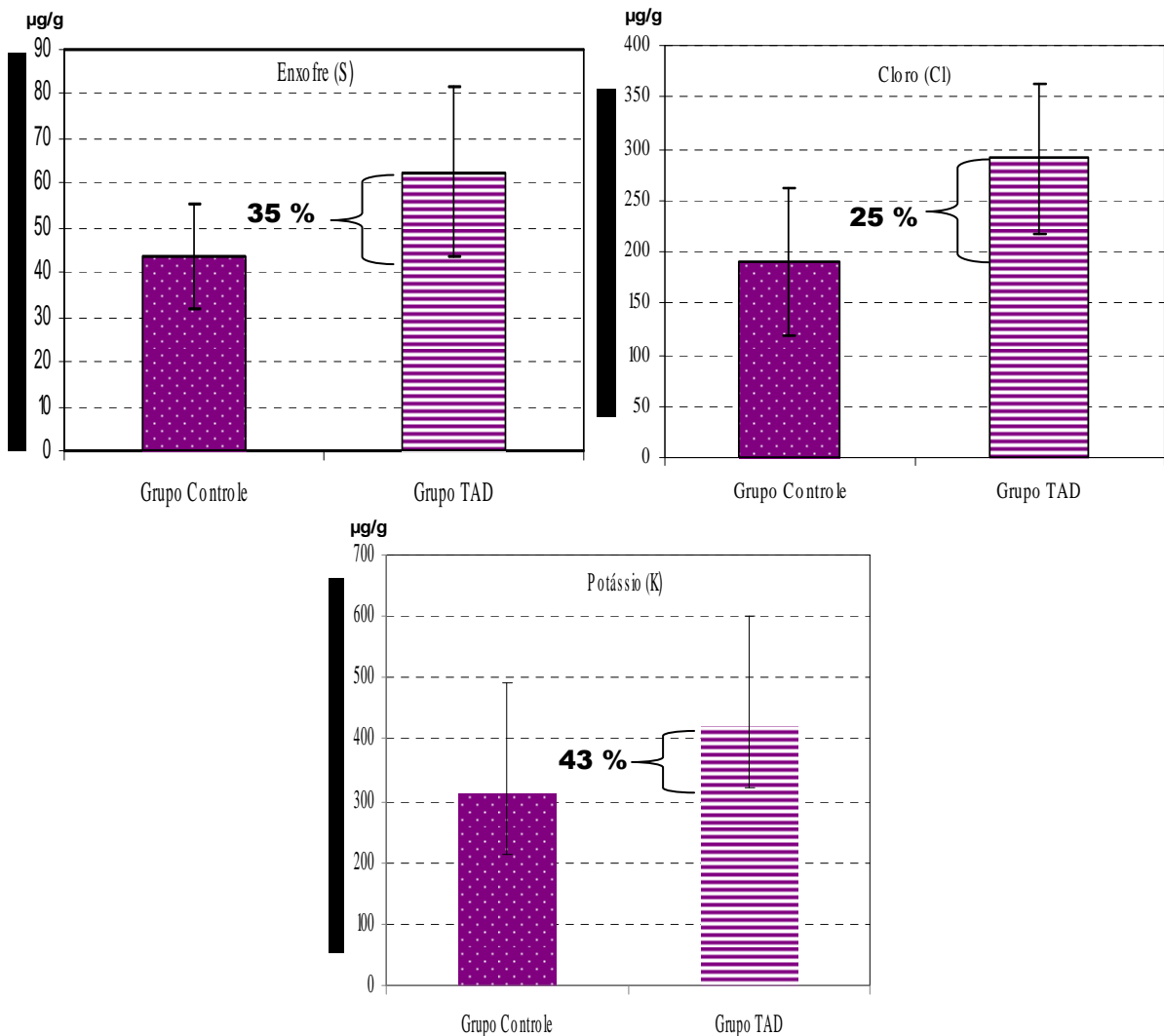


Fig.13 - Gráficos representativos dos elementos químicos no soro sanguíneo que apresentaram **aumento** estatisticamente significativo em suas concentrações com a terapia de alta dose (TAD) (n = 18). Os aumentos das concentrações estão expressos em porcentagem. Resultados expressos em média \pm SD.

4.1.3. Fezes

Os resultados em relação à excreção de elementos químicos nas fezes dos animais do GTAD, mostraram alterações (diminuições) estatisticamente significativas na excreção dos elementos químicos fósforo, enxofre, potássio, e titânio, antes de ser administrada a quinta dose de sulfato de zinco. Para a excreção de zinco os valores não foram estatisticamente significativos. Com a administração das 5 doses restantes, portanto, com as 10 doses de sulfato de zinco inorgânico, os resultados mostraram uma diminuição significativa da excreção do ferro, e um aumento significativo da excreção do zinco, em relação aos controles. No entanto, quando a comparação era feita apenas considerando os animais do GTAD, sendo estes seus próprios controles, não houve diferença estatisticamente significativa na excreção de ferro (entre D0 e D5 e entre D5 e D10). O mesmo ocorreu com a excreção do zinco. Quando a comparação era feita apenas considerando os animais do GC, sendo estes seus próprios controles, não houve diferença estatisticamente significativa na excreção de zinco (entre D0 e D5 e entre D5 e D10) (**Fig.14**).

A **Tabela 14** e a **Figura 14** abaixo ilustram as concentrações médias de cada elemento químico encontrado nas fezes das ratas do GTAD e do GC ao longo do experimento.

Tabela 14. Concentração elementar média ($\mu\text{g. g}^{-1}$) dos elementos químicos nas amostras de fezes frescas de ratas Wistar colhidas em três épocas: antes do início do experimento (D 0), Entre a 4^a e 5^a dose (D 5) e ao final do experimento, 1 dia após a 10^a dose (D 10).

Elementos	D 0		D 5		D 10	
	GC	GTAD	GC	GTAD	GC	GTAD
Si	75±20	76±26	88±43	78±15	170±58	142±49
P	832±132	852±510	923±379 ^a	638±114 ^a	996±394	1001±419
S	126±30	121±40	169±61 ^a	103±36 ^a	134±43	116±47
K	1756±532	1730±669	1897±531 ^a	1277±164 ^a	1591±504	1123±440
Ca	23541±3253	30424±7660	24236±6328	23341±3800	27961±11867	24379±7825
Ti	43±8	39±5	59±10 ^a	29±6 ^a	79±10	79±40
Cr	19±4	24±21	38±16	37±17	37±16	23±24
Mn	414±47	438±189	425±52	439±47	538±136	512±114
Fe	1595±549	1570±374	1559±456	1501±609	2256±143 ^a	1927±372 ^a
Ni	8±24	7±13	11±4	12±3	3±5	1±3
Zn	792±275	837±214	648±127	962±409	597±105 ^a	853±137 ^a

Valores: média ± desvio padrão. GC: grupo controle; GTAD: grupo terapia de alta dose. Valores: média ± desvio padrão; o índice **a** significa diferença estatística significativa $p < 0,05$.

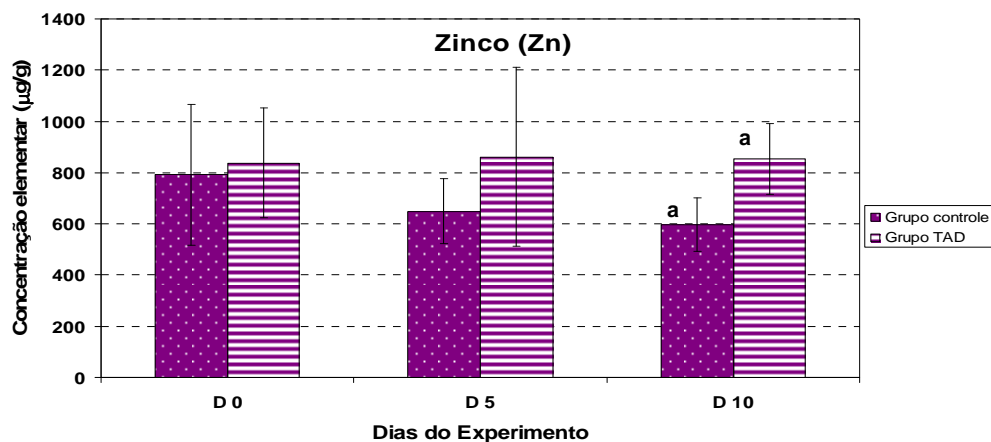


Fig. 14 - Gráfico representativo da excreção do elemento químico zinco durante o experimento. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$.

4.2. Resultados de análises da atividade motora e do comportamento alimentar

Resultados obtidos com o modelo de hiperzincemia (FEREZIN-PINTO, 2007) já haviam mostrado comprometimento da atividade motora em animais submetidos à TAD. No presente trabalho, obtivemos os seguintes resultados:

4.2.1. Ambulação

Os resultados mostraram que houve uma diminuição estatisticamente significativa na distância percorrida pelas ratas do grupo TAD a partir da ST2, quando os animais já haviam recebido 4 doses de sulfato de zinco. A diminuição se manteve constante após a administração das 10 doses. No grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa na ambulação durante todo o experimento (**Fig.15**).

A **tabela 15** e a **figura 15** ilustram as médias e os desvios padrões das distâncias percorridas no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar do grupo controle e grupo TAD, nas sessões testes a que foram submetidas.

Tabela 15. Média das distâncias percorridas no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar

Sessões Teste	Grupo Controle n° de retângulos ultrapassados	m ²	Grupo TAD n° de retângulos ultrapassados	m ²
ST1	13 ± 5,6	43	12,5±5.5	41
ST2	14 ± 5,1 ^a	46	4±1,98 ^a	13
ST3	13 ± 3,9 ^a	43	4±1,9 ^a	13

Valores: média ± desvio padrão; o índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$.

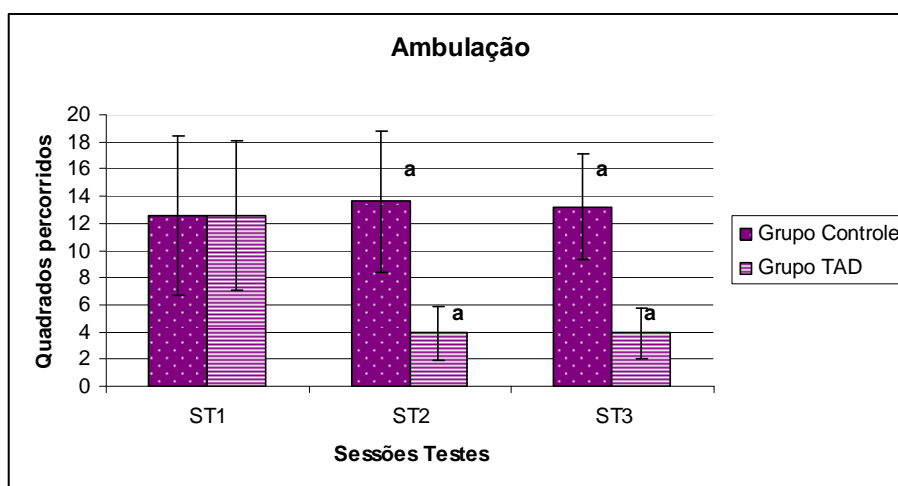


Fig.15 – Gráfico representativo da média da ambulação dos animais do grupo controle e grupo TAD, nas sessões testes a que foram submetidos. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$.

4.2.2. Rearing

Os resultados mostraram que os animais submetidos à TAD apresentaram uma diminuição do comportamento *rearing* após a administração da 4^o dose de sulfato de zinco, quando comparado ao grupo controle. Após a 10^o dose, o rearing não foi mais observado nos animais do GTAD. Os animais controles continuavam a executá-lo normalmente (**Fig.16**).

A **Tabela 16** e a **Figura 16** que se segue ilustram as médias e os desvios padrões da quantidade de *rearing* efetuada no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar do grupo controle e TAD, nas sessões testes submetidas.

Tabela 16. Quantidade de *rearing* efetuada no labirinto de campo aberto pelas ratas Wistar do grupo controle e do grupo TAD nas sessões teste 1 a 3.

Sessões Teste	Grupo Controle	Grupo TAD
ST1	1,3±0,45	1,26±0,44
ST2	1,4±0,5 ^a	0,65±0,47 ^a
ST3	1,2±0,44 ^a	0±0 ^a

Valores: média ± desvio padrão; o índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$. Valor base: 3 *rearing* (quantidade máxima). Zero *rearing* (nenhum *rearing*).

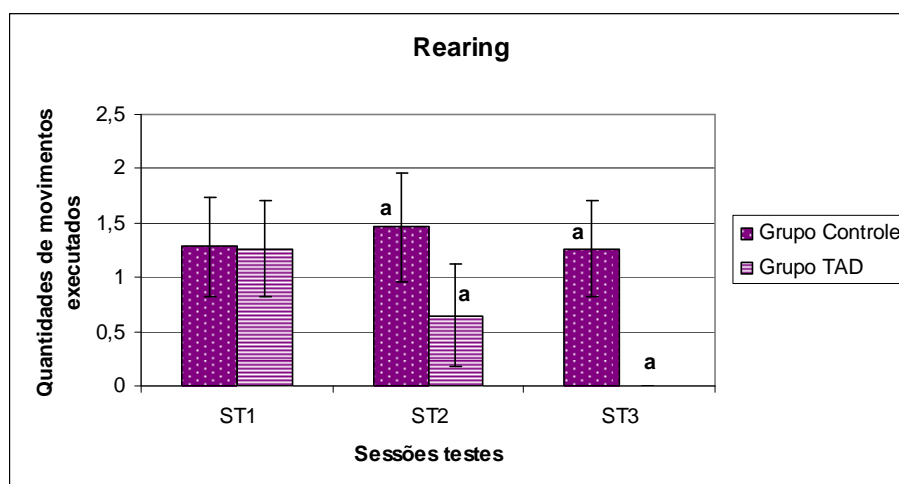


Fig.16 - Gráfico representativo das médias da quantidade de *rearing* efetuada pelos animais do grupo controle e grupo TAD, nas sessões testes submetidos. O índice **a** indica diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$

4.2.3. Resultados sobre a atividade motora

A análise da atividade motora dos animais do GTAD evidenciou (em relação aos controles), que houve uma expressiva diminuição na atividade motora após 4 doses de sulfato de zinco. Após a 10^o dose quando se realizou a ST3, a inexistência do *rearing*, concomitantemente, com uma ambulação diminuída, mas igual à observada em ST2, não permitiu a caracterização da atividade motora diminuída.

A **Figura 17** representa a atividade motora dos animais submetidos à TAD.

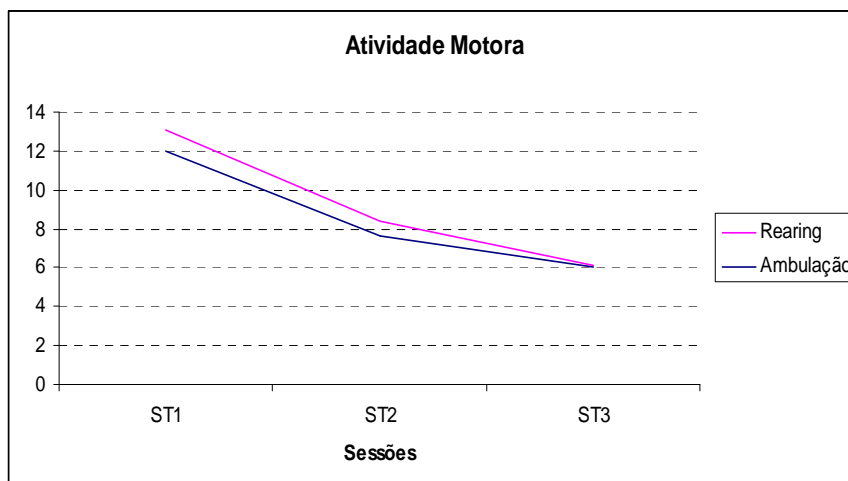


Fig.17 - Gráfico de tendência da ambulação e *rearing*. Observa-se que ocorreu uma diminuição simultânea entre a ambulação e o *rearing* medidos no decorrer das sessões testes, o que caracterizou alteração na atividade motora dos animais do grupo TAD, n = 40.

4.2.4. Ração ingerida

Os resultados mostraram que não houve variação estatisticamente significativa entre as médias, em relação à quantidade de ração ingerida (RI) pelos animais do grupo TAD e os controles, durante todo o experimento. De modo semelhante, nenhuma variação estatisticamente significativa foi observada na comparação entre os controles e os controles neutros (animais que não recebiam nenhum tipo de composto por via oral).

A **Tabela 17** ilustra as médias e os desvios padrões em relação à ração ingerida (g) por todas as ratas Wistar dos grupos controle e TAD.

Tabela 17. Ração ingerida pelos animais durante o experimento.

Dia da pesagem da ração	RI Grupo Controle (GC)	zinco (mg) na ração ingerida	RI Grupo TAD (GTAD)	zinco (mg) na ração ingerida
Dia 1	38±24,35	4,1	39±25,11	4,1
Dia 3	32±6,27	2,3	31±6,78	2,2
Dia 5	25±9,63	1,7	23±8,75	1,6
Dia 7	32±5,21	2,3	32±10,6	2,3
Dia 9	32±6,7	2,3	31±8,1	2,2
Dia 11	31±12,78	2,2	28±13,44	2,0

RI = Quantidade de ração ingerida (g) em relação à 100g (7 mg de zinco) fornecidas a cada 2 dias. Dia 1: primeiro dia da pesagem, antes da 1ª dose; Dia 3: corresponde ao terceiro dia de experimento; Dia 5, Dia 7, Dia 9, Dia 11: correspondem aos demais dias das pesagens.

4.2.5. Peso corporal (Kg)

Os resultados mostraram que não houve variação estatisticamente significativa no que se refere ao peso das ratas submetidas à TAD em relação aos controles.

A **Tabela 18** ilustra as médias e desvios padrões dos pesos corporais (g) dos grupos controle e TAD.

Tabela 18. Médias do peso corporal (g) das ratas Wistar do grupo controle e do grupo TAD.

Sessões Teste	Grupo Controle	Grupo TAD
ST1	180±18,51	192±17,99
ST2	183±18,98	189±17,95
ST3	186±18,59	190±19,97

4.3. Análises Histopatológicas na Glândula Pineal.

4.3.1. Aspectos normais da glândula pineal (GP).

A **Fig. 18 (A,B,C)** mostra aspectos histológicos da GP corada por diferentes métodos (método de Mallory, PAS – Ácido Periódico de Schiff e método do picrossírius) em preparações histológicas cedidas pelo Laboratório de Neurobiologia para essa demonstração. Observa-se a homogeneidade do estroma pineal (**Fig.18 A**), de parte da cápsula da glândula (**Fig.18 B**) e dos septos de tecido conjuntivo que separam os pseudolóbulos, envolvem vasos sanguíneos e que se distribuem entre as células pineais (**Fig.18 B, C**).

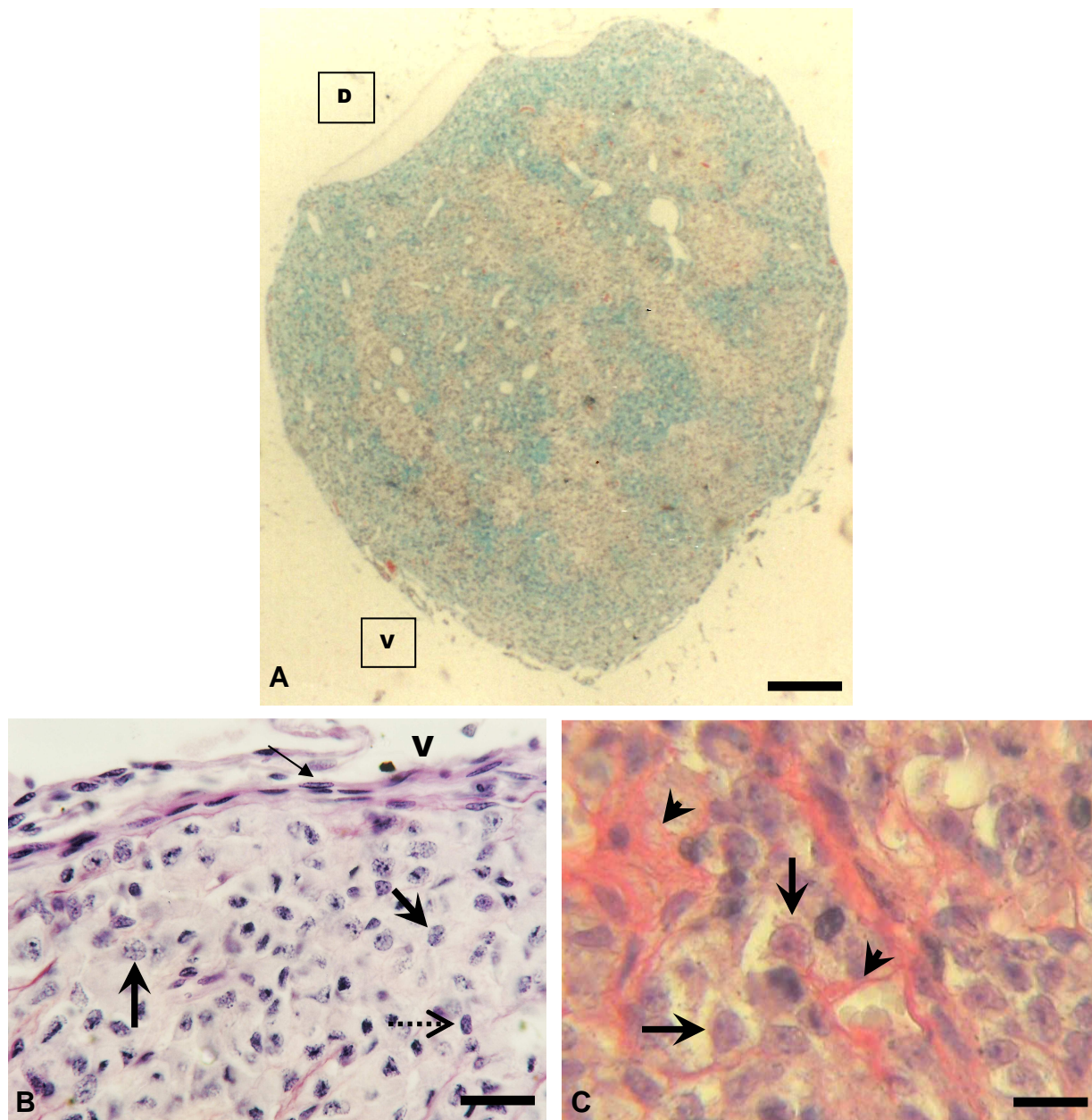


Fig.18 - Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP) de animais controles. **A:** Na glândula pineal observa-se os cordões celulares entremeados por tecido conjuntivo (em azul). D - dorsal; V - ventral. Coloração pelo método de Mallory. Barra = 29 μm . **B:** (V) mostra vaso da cápsula da pineal; a seta fina aponta para fibroblasto do tecido conjuntivo da cápsula, as setas grossas apontam para pinealócitos, e a seta tracejada aponta para o núcleo de um astrócito. Áreas coradas na cápsula e nos septos de conjuntivo, evidenciam mucosubstâncias deste tecido. Coloração pelo PAS. Barra = 5,5 μm . **C:** Cabeças de setas apontam para o tecido conjuntivo dos septos e ao redor do vaso, corados pelo Picrossírius. Setas grossas apontam para pinealócitos em um dos pseudolobulos. Barra = 3,5 μm .

4.3.2. Hematoxilina Eosina

Na glândula pineal dos animais do grupo controle, o parênquima apresentava aspecto homogêneo nas três regiões (central, dorsal e ventral) (**Fig. 19 A, C, E**). A técnica de hematoxilina eosina permitiu verificar uma desestruturação do parênquima pineal do grupo TAD (**Fig. 19 B, D, F**), principalmente nas adjacências dos capilares sinusóides e de capilares menores (**Fig. 20 B, C**). Havia áreas com possível extração de material, desorganização nos espaços perivascularares e deposições de material inespecífico (**Fig. 19, 20**). Essas alterações variaram regionalmente, sendo mais visíveis na região dorsal da glândula (**Fig. 19 D**), do que na região ventral (adjacente ao recesso pineal) (**Fig. 19 F**).

Em relação aos vasos, o espaço perivascular (EP) e os espaços intercelulares (EI), aparecem preservados e moderadamente amplos nos controles (**Fig. 20 A, C**). Nos animais do GTAD, estas áreas apresentaram desorganização no seu padrão e afastamento maior entre as células (**Fig. 20 B, D**).

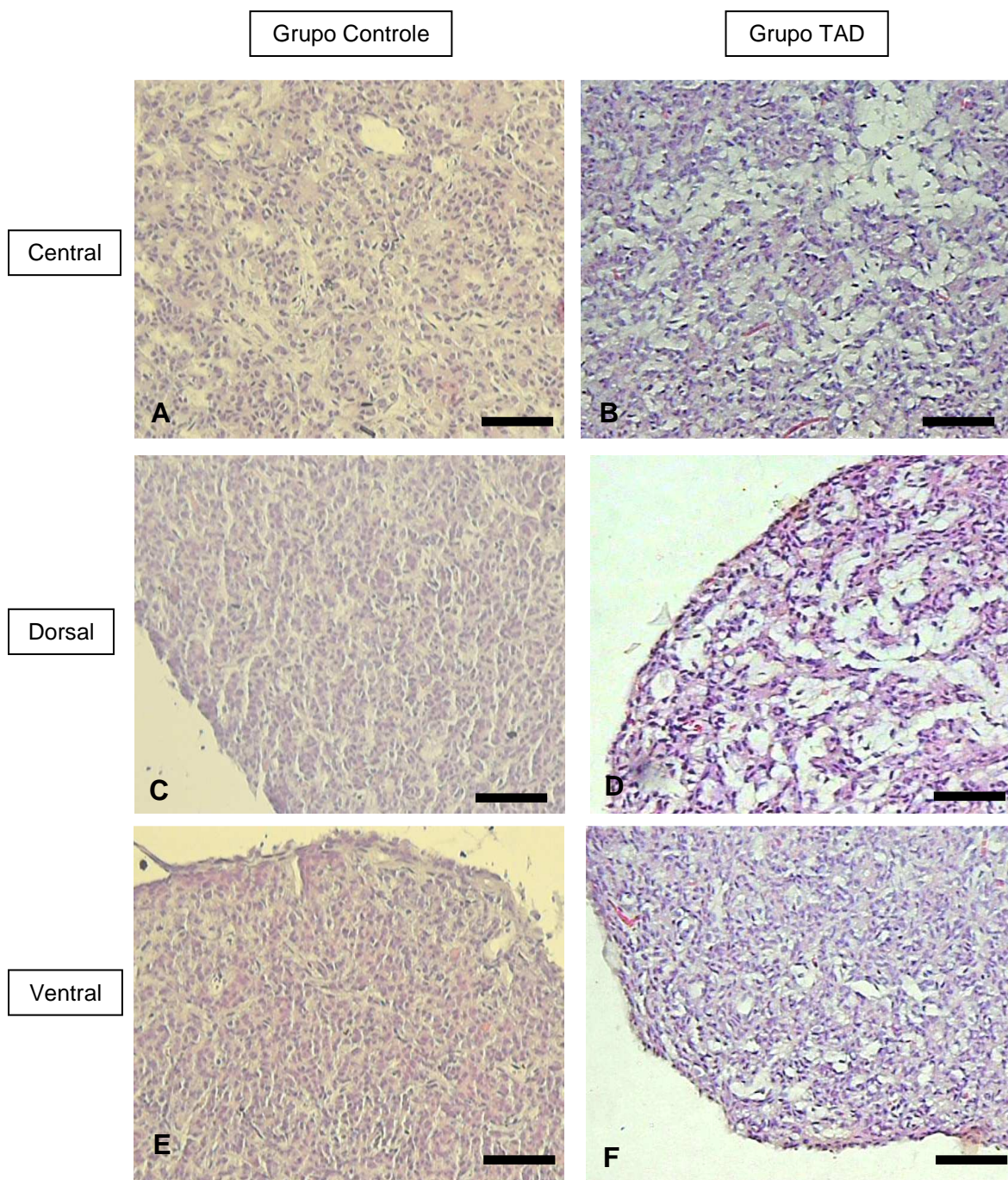


Fig.19 - Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP). Coloração HE. **A, C, E:** controle. Regiões da pineal: central (**A, B**), dorsal (**C, D**), ventral (**E, F**). Aspecto homogêneo do parênquima no animal controle, nas três regiões central, dorsal e ventral da glândula. **B, D, F:** Grupo TAD. Observa-se a desestruturação em áreas do parênquima, principalmente nas regiões central (**B**) e dorsal (**D**, a mais evidente). Barras = 21,5 µm.

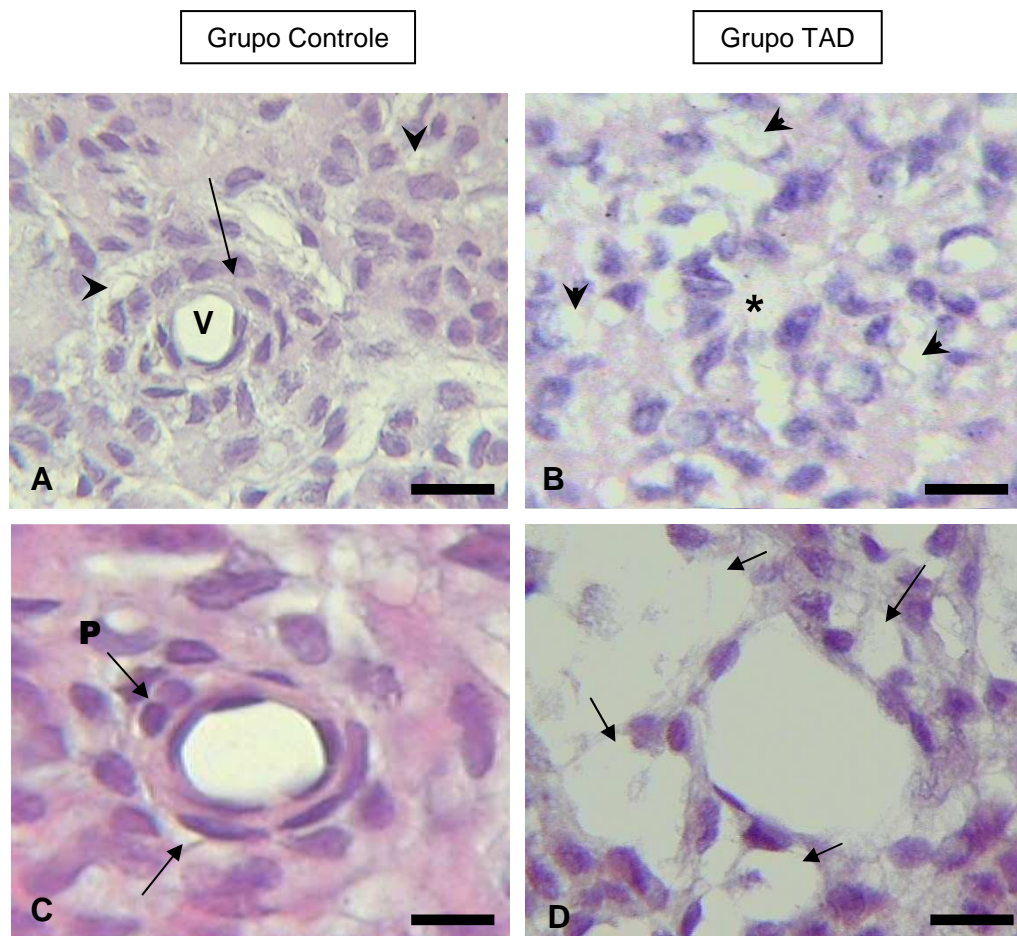


Fig.20 - Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP). Coloração HE. **A,C:** controle: observa-se a homogeneidade do parênquima com os espaços intercelulares (cabeça de seta) e espaços perivasculares preservados (setas); vaso (v), pericito (P). **C:** Vaso com dupla camada de células endoteliais. Barras = 14,5 μ m (A), 5,5 μ m (C). **B,D:** Grupo TAD. **B:** O asterisco mostra uma pseudoroseta. As cabeças de seta apontam espaços intercelulares alterados. Barra = 5,5 μ m. **D:** As setas indicam desorganização do espaço perivascular, com grande afastamento entre as células. Barra = 5,5 μ m.

4.3.3. Vermelho Congo

O método do vermelho congo mostra à microscopia de luz, áreas do parênquima pineal com coloração positiva para amilóide, principalmente adjacente a vasos (**Fig. 21 A**), nos animais do GTAD.

Com o auxílio do pré-tratamento com o permanganato de potássio, observou-se que as áreas adjacentes aos vasos, as quais apareciam coradas pelo vermelho congo, não perderam a birrefringência em verde maçã (**Fig. 21 B**), demonstrando deste modo, que o amilóide presente nesta amiloidose sistêmica não é do tipo AA.

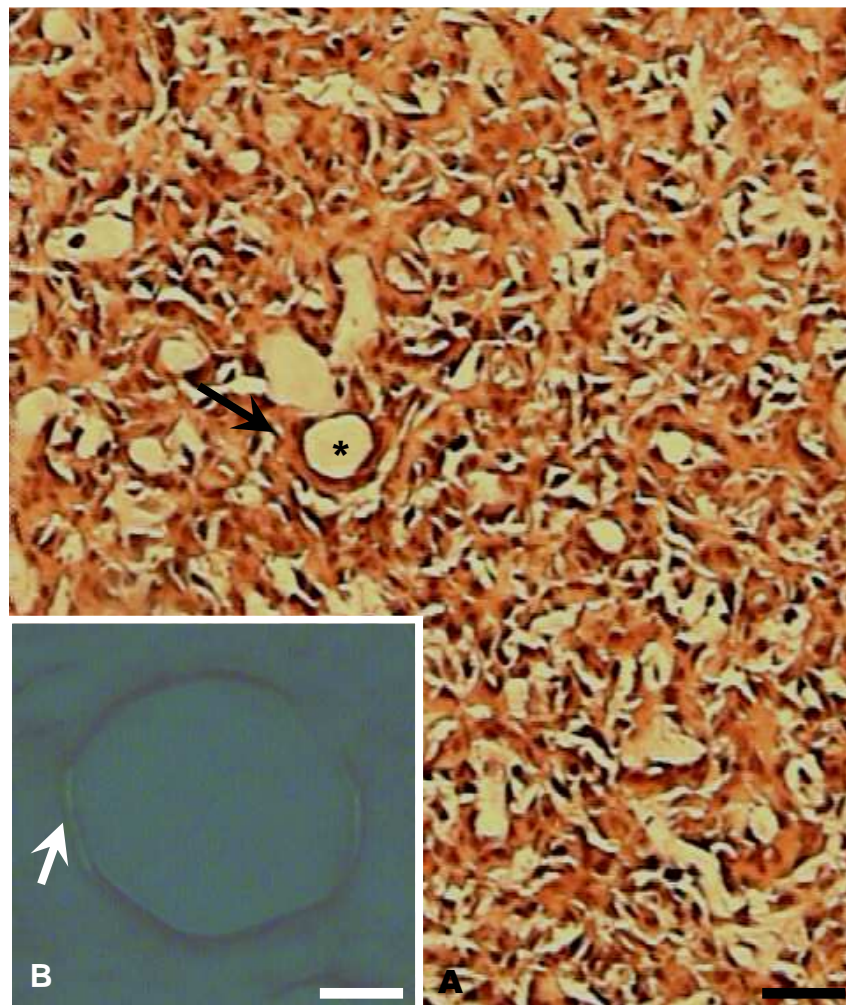


Fig.21 - Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP) de animal do grupo TAD. **A:** Corte transversal corado pelo vermelho congo. Seta indica marcação pelo corante adjacente ao endotélio do capilar. Barra = 14,5 μ m. **B:** Inserido. Corte indicado em **A** sob microscopia de polarização após o pré- tratamento com permanganato de potássio. Observa-se o mesmo capilar marcado pelo VC (*), a seta branca aponta a birrefringência verde maçã em áreas vermelho congo positivas. Barra = 5 μ m.

4.3.4. Tioflavina T

A análise pelo método da tioflavina T do parênquima pineal dos animais submetidos à TAD, evidenciou discreta marcação fluorescente em áreas adjacentes a vasos, em especial nos capilares sinusóides da cápsula da glândula pineal (**Fig. 22 C**). Coradas pelo vermelho congo, e sob microscopia de polarização, estas áreas apresentaram birrefringência verde maçã (**Fig. 22 D**). A fluorescência observada com a tioflavina T não aparecia nos animais controle (**Fig. 22 A, B**).

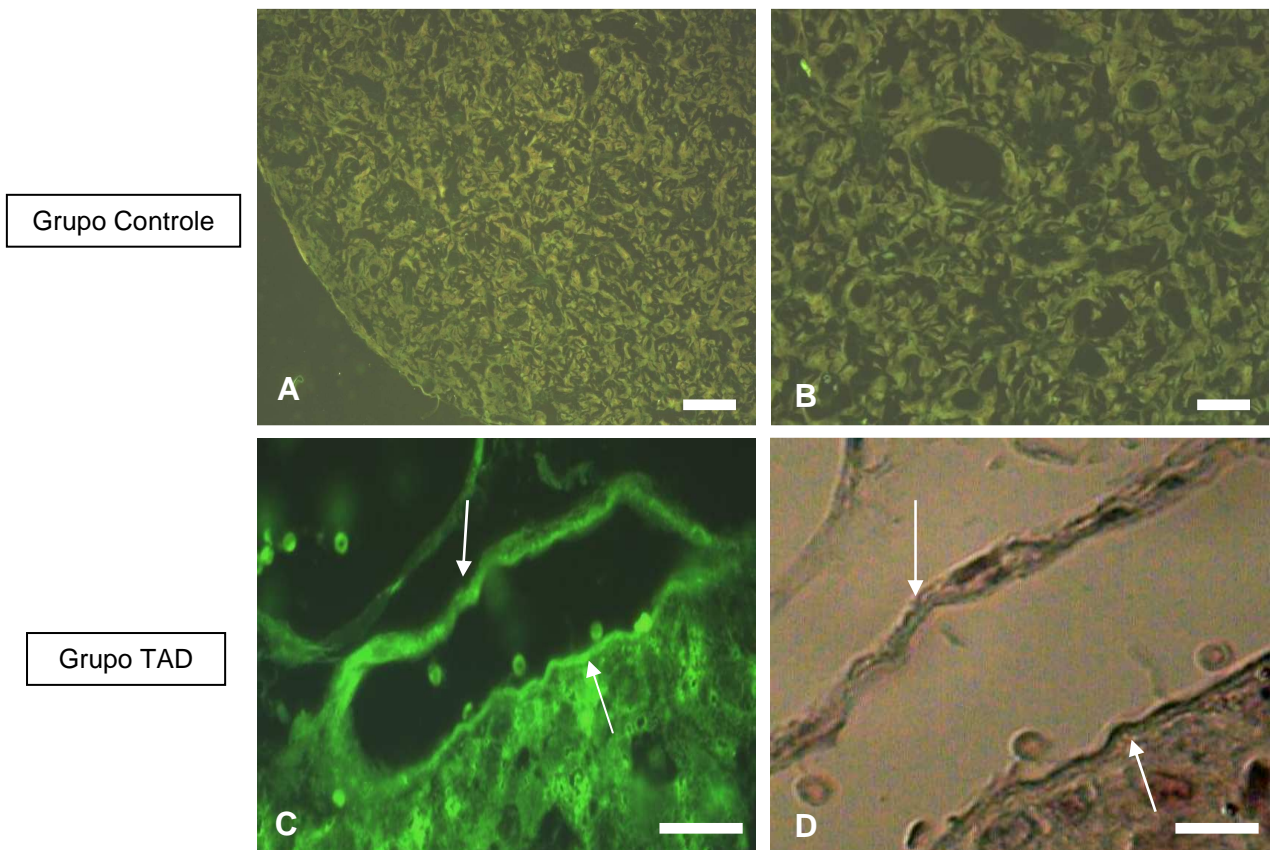


Fig.22: Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP) do animal do grupo controle (**A, B**) e do grupo TAD (**C, D**). **A, B:** Áreas do parênquima da glândula pineal mostrando ausência de marcação por tioflavina T. Barras = 2 μ m. **C:** Sinusóide da cápsula da glândula pineal corado por tioflavina T. Setas apontam marcação positiva para amilóide adjacente ao vaso. Barra = 10 μ m. **D:** Maior aumento de **C**, após coloração por vermelho congo, as setas apontam áreas com birrefringência em verde maçã. Barra = 14,5 μ m.

4.3.5. TSQ

O método do TSQ marcou por fluorescência azul brilhante, células do parênquima pineal dos animais submetidos à TAD. Nestes animais a fluorescência foi mais visível nas pseudorosetas (**Fig. 23 B, C, D**), mas também foi observada em células dispersas pelo parênquima. No grupo controle as marcações fluorescentes eram menos evidentes (**Fig. 23 A**). A técnica evidenciou zinco nestas regiões, de modo mais expressivo na glândula pineal dos animais do GTAD.

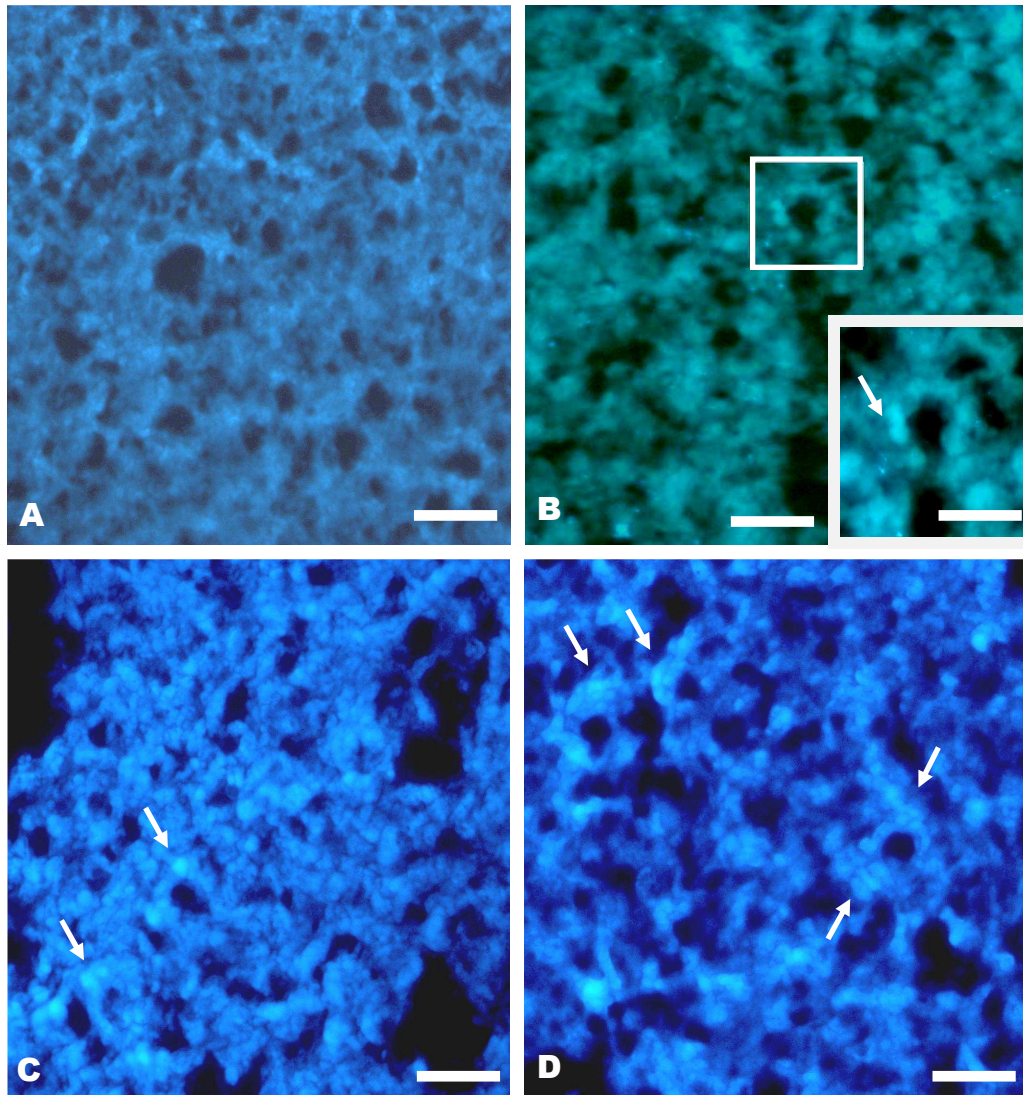


Fig.23 - Fotomicrografia do parênquima da glândula pineal (GP) de animais do Grupo TAD (**B, C, D**) e do Grupo Controle (**A**). **A**: Parênquima da glândula pineal do animal controle. Marcação para TSQ menos evidente. Barra = 5,0 μ m. **B**: Quadrado delimita pseudoroseta com células TSQ+. Barra = 3,0 μ m. Inseto: maior aumento da área demarcada. Barra = 5,0 μ m. **C, D** : Parênquima da glândula pineal do animal do grupo TAD mostrando células marcadas positivamente pelo TSQ em pseudorosetas e em células dispersas (setas). Barra = 14,5 μ m (**C**) , 5,5 μ m (**D**).

4.3.6. Neo – Timm

O método do Neo-Timm evidencia marcações granulares que correspondem a depósitos metálicos revelados. No GTAD , estas granulações escuras apareciam em associação com vasos (**Fig. 24 A, B, C, D**). Estas eram áreas que a microscopia de luz, mostrava marcações para amilóide.

Deste modo, os grânulos de prata metálica correspondem a depósitos de metais pesados, entre eles o zinco. Estas marcações correspondem a locais adjacentes a vasos e que aparecem corados pelo vermelho congo, pela tioflavina T e pelo TSQ.

Os vasos pineais citados nas **Fig. 24 A, B, C, D**, foram considerados como tais em função de uma morfologia semelhante aquela dos vasos pineais marcados anteriormente por técnica específica (**Fig. 24 E**) (FERREIRA-MEDEIROS e CORREA-GILLIERON,2004).

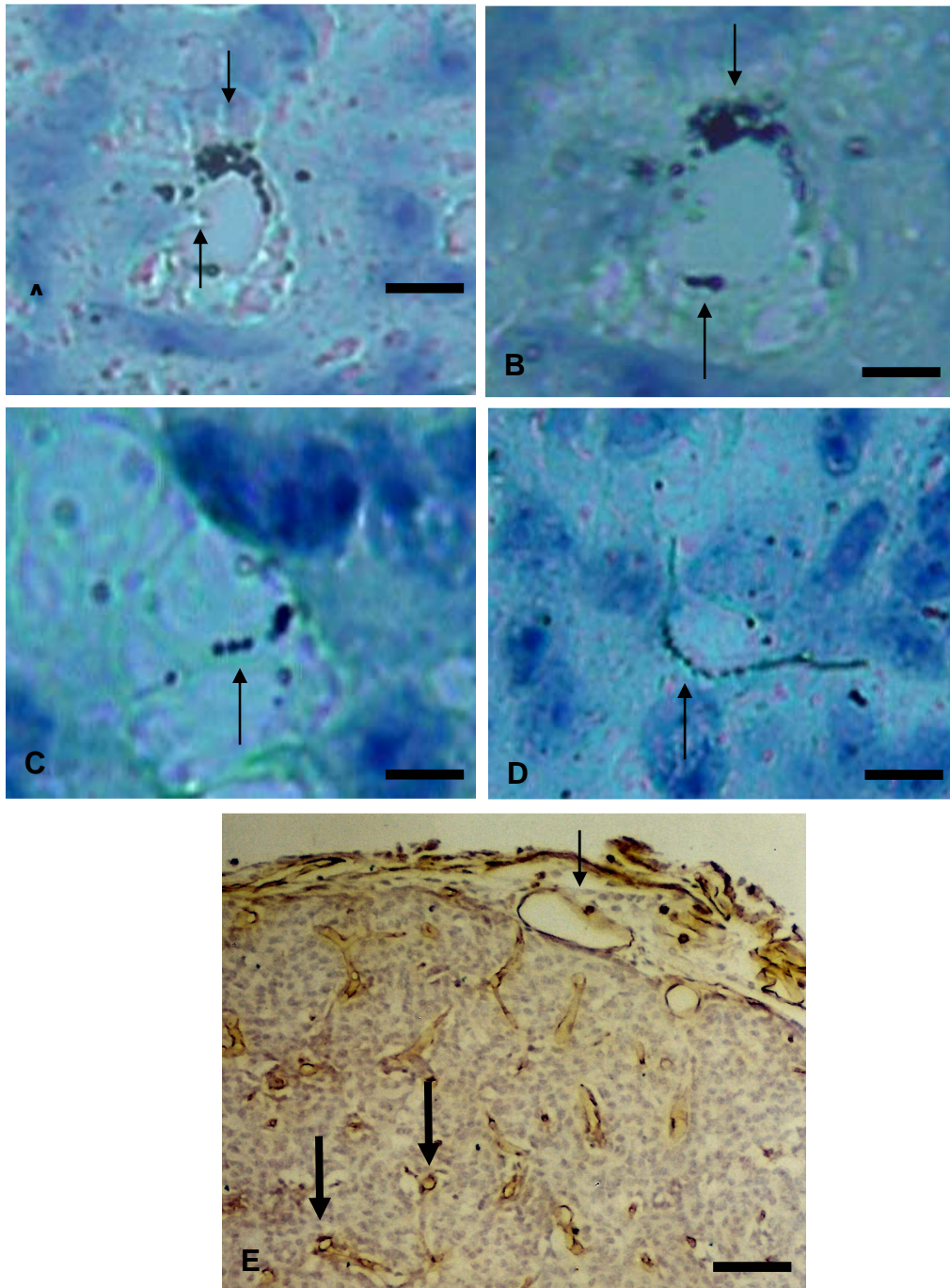


Fig.24 - Fotomicrografias do parênquima da glândula pineal (GP) de animais do Grupo TAD. **A, B** (maior aumento de **A**), **C, D**: Corte de material revelado pelo Neo-Timm, evidenciando a presença de metais pesados em áreas adjacentes a vasos (setas), como grânulos de prata revelada. Barras = 5,5 μm (**A**) , 6,0 μm (**B,C,D**). **E**: Na fotomicrografia são observados vasos no parênquima da glândula pineal marcados pela lectina (Ferreira-Medeiros,M. e Correa-Gilleiron,E.M.2004), que correspondem aos sinusóides da cápsula (seta fina), que se ramificam pelo parênquima e capilares menores (seta grossa). Estes vasos apresentam morfologia semelhante aos que aparecem nas fotos acima com grânulos de metais pesados adjacentes. Barra = 14,5 μm .

4.3.7. Microscopia Eletrônica

A análise da ultraestrutura do parênquima pineal dos animais do GTAD confirmou a desestruturação sugerida na microscopia de luz, ou seja, apareciam espaços intercelulares (EI) e principalmente espaços adjacentes a vasos (espaços perivasculares, EP), que diferiam do aspecto mais homogêneo do parênquima observado nos controles (**Fig. 25 A**). Também era possível observar estruturas vacuolares claras e inespecíficas (**Fig. 25 B**) e um material fibrilar desorganizado (**Fig. 25 B – inserido**), alguns de aspecto incomum. A lâmina basal em animais do grupo controle apareciam íntegras ao redor do vaso (**Fig. 25 A**), o qual apresentava em seu lúmen prolongamentos citoplasmáticos, comuns nos vasos pineais. No GTAD, foram vistas alterações da lâmina basal associada ao vaso (a qual normalmente aparece como um arranjo em camada uniforme), alterações no endotélio (achatamento da célula) e diminuição das projeções citoplasmáticas para o lúmen do vaso (**Fig. 25 B**). Em muitas células apareciam corpos celulares com grande quantidade de material fibrilar (**Fig. 25 B**) e espaços vesiculares eram freqüentes no espaço perivascular (**Fig. 25 B – inserido**). Nos espaços perivasculares os depósitos fibrilares eram sugestivos de serem as fibrilas amilóides, e estes apareciam aparentemente nos mesmos locais onde havia marcação positiva para o vermelho congo e tioflavina T.

No animal controle os espaços intercelulares apareciam preservados e de moderado tamanho (**Fig. 26 A, B**). Mas nos animais submetidos à TAD esse aspecto modificava-se, ocorrendo uma desorganização, com aumento dos espaços intracelulares, deposição de material fibrilar, e aparecimento de corpos residuais (**Fig. 26 C, D, E**).

Os capilares da pineal apresentam inúmeros prolongamentos citoplasmáticos para o lúmen do vaso e muitas cavéolas (vesículas de pinocitose revestidas pela proteína caveolina). No grupo controle observa-se vários prolongamentos para o lúmen do vaso (**Fig. 27 A**). Este aspecto modificava-se bastante no GTAD, onde os prolongamentos citoplasmáticos diminuem ou até desaparecem completamente (**Fig. 27 B**). Do mesmo modo houve uma diminuição da quantidade de cavéolas nos endotélios dos animais do GTAD. O espaço perivascular no animal controle apresentou uma certa organização das fibras colágenas (**Fig. 27 C**), e aparentemente não havia grandes quantidades de material fibrilar (**Fig. 27 A, C**), no

entanto, no GTAD, havia uma expressiva desorganização, inclusive da lâmina basal, e a deposição de material fibrilar (**Fig. 27 C, D**).

A análise do material fibrilar que apareceu no animal do GTAD (**Fig. 28 C, D, E**) e não estavam presentes nos controles (**Fig. 28 A**), tanto no espaço intracelular quanto no espaço perivascular, apresentava uma morfologia linear, como filamentos isolados (**Fig. 28 C**), formando redes (**Fig. 28 D**) ou como estruturas ramificadas (**Fig. 28 E**). As características deste material fibrilar assemelham-se aquelas citadas na literatura como fibrilas amilóides (diâmetro 8 a 16 nm).

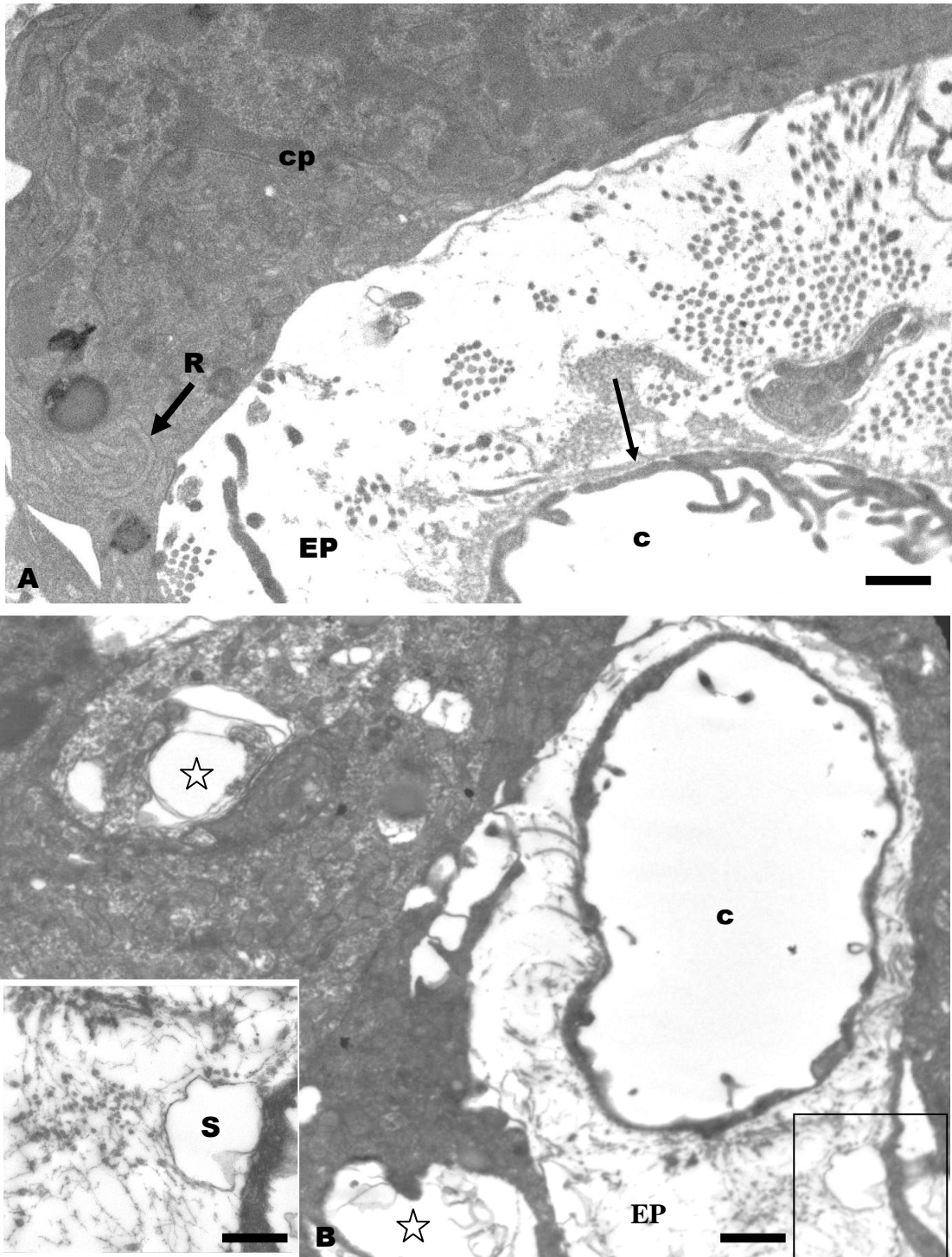


Fig. 25 - Eletromicrografia do parênquima da glândula pineal (GP) do animal controle (**A**) – observa-se espaço perivascular normal e amplo (**EP**) com fibras colágenas em corte transversal, regularmente distribuídas, nota-se a ausência de material fibrilar em excesso. Na célula do parênquima (**cp**) observa-se parte de um expressivo retículo endoplasmático (**R**). Seta fina aponta integridade da lâmina basal do vaso (**c**) cujo lúmen apresenta projeções citoplasmáticas. Animal submetido à TAD (**B** e **insetido**) - o vaso (**c**) deixa de apresentar projeções citoplasmáticas em seu lúmen, o espaço perivascular (**EP**) se desorganiza e grande quantidade de material fibrilar é depositada. Surgem espaços vesiculares (**S**) de tamanhos e formas distintas e sem material de preenchimento nesta região (**B** e **insetido**). Corpos residuais grandes e pequenos, com ou sem material no seu interior (estrela) também aparecem nas células do parênquima nestes animais. Em **B**, quadrado em preto delimita a área do insetido. Barras = 0,23 μ m (insetido), 0,45 μ m (A,B).

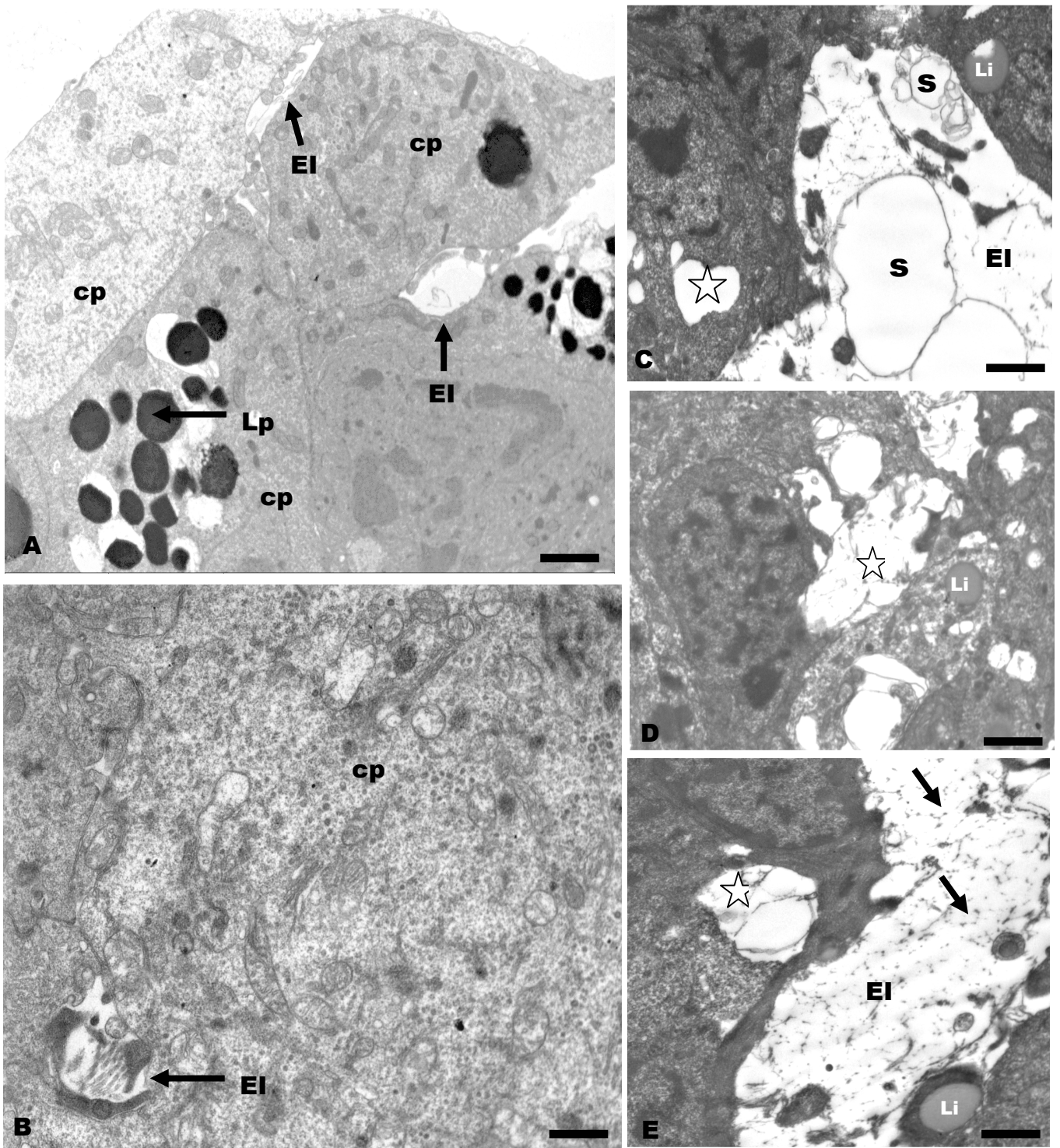


Fig.26 – Eletromicrografia do parênquima da glândula pineal (GP) dos animais controles (**A**, **B**) e dos animais submetidos a TAD (**C**, **D**, **E**). Em **A** o parênquima pineal apresenta-se homogêneo, e os espaços intercelulares (**EI**) são menores (**A**, **B**); alguns apresentam fibras nervosas em corte transversal (**A**); (**cp**) - células do parênquima; **LP** – grânulos de lipofuscina; **B** - parênquima pineal de animal GC de aspecto homogêneo e com espaços intercelulares pequenos (**EI**, e com fibras colágenas organizadas). Nos animais do GTAD (**C**, **D**, **E**) observa-se o aumento dos **EI** os quais se tornam desorganizados, com deposição de material fibrilar, e grandes corpos celulares (estrelas) de aspecto claro, como se houvesse extração de material. Observa-se um aumento na quantidade de espaços vesiculares (**S**), lisossomas (**Li**). Barras = 0,6 μ m (**A**); 0,38 μ m (**B**); 0,47 μ m (**C**, **D**, **E**).

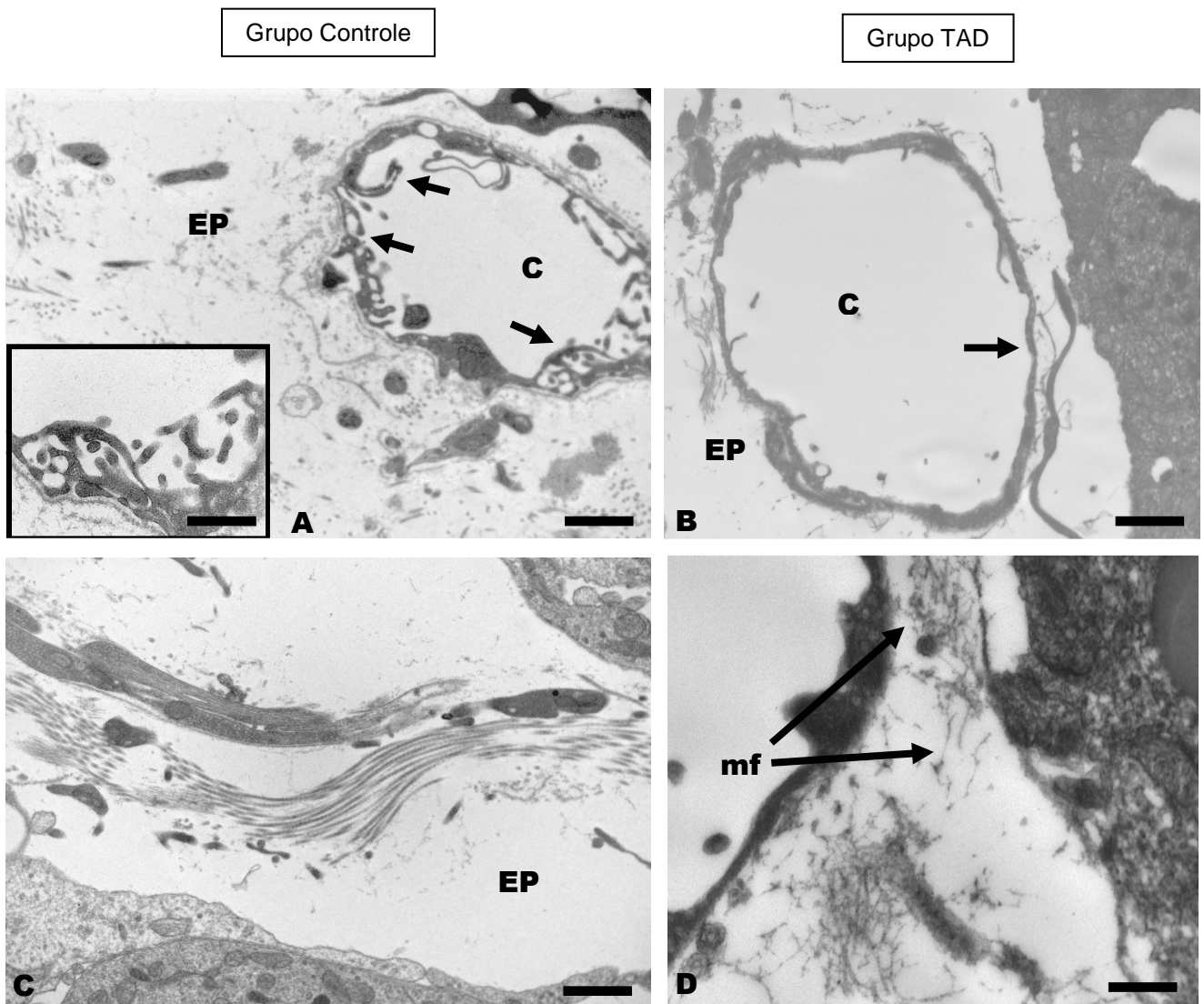


Fig.27 – Eletromicrografia do parênquima da glândula pineal do animal controle (**A,C**) e do animal submetido à TAD (**B,D**). **A** - Observa-se um capilar (**c**), onde aparecem inúmeros prolongamentos celulares para o lúmen do capilar (**setas**). Partes destes prolongamentos aparecem em maior aumento em **inseto** (Barra = 0,15 μ m). O capilar do animal controle é rodeado por um moderado espaço perivascular (**EP**), onde aparecem fibras colágenas (em corte transversal e longitudinal) que apresentam arranjo regular, e, o espaço perivascular, apresenta-se sem material fibrilar heterogêneo (**A,C**). No GTAD os prolongamentos celulares para o lúmen dos vasos (**c**) diminuem (**seta**) e o **EP** apresenta desorganização de seus elementos (**B**), e a deposição (**em D**) de material fibrilar (**mf**) irregular. Barras = 0,47 μ m (**A,B**), 0,38 μ m (**C,D**), 0,15 μ m (inseto).

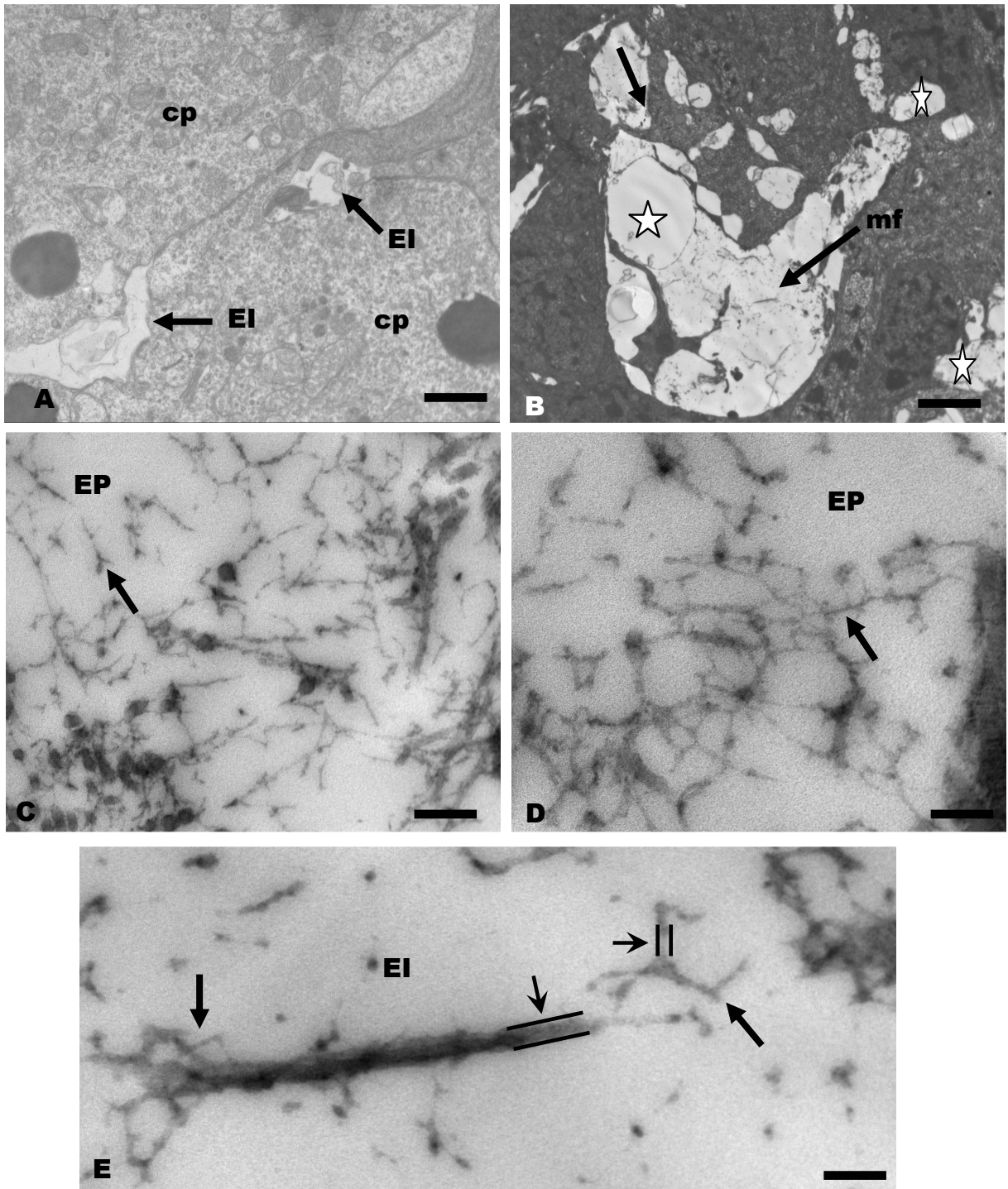


Fig.28 - Eletromicrografia do parênquima da glândula pineal (GP) do animal controle (**A**) onde observa-se a integridade das células (**cp**) e a presença de espaços intercelulares (EI) de aspecto normal (setas). Animal submetido à TAD (**B, C, D**). Em **B** observa-se a desorganização dos espaços intercelulares, com a presença de corpos residuais, alguns apresentando debris celulares (**estrela**), e deposição de material fibrilar (**mf**). Seta - pequena célula estrelada. O **mf** que aparece em **C, D, E**, mostra-se como uma trama de filamentos isolados (seta em **C**), formando redes (seta em **D**), ou como filamentos ramificados (setas em **E**). Este material fibrilar dos animais do GTAD apresenta características das fibrilas amilóides (diâmetro = 8 a 16 nm). Barras = 0,43 μ m (**A,B**), 40nm (**C,D,E**).

5. DISCUSSÃO

A aplicação da técnica de análise de metais pesados pelo feixe Síncrotron não havia sido utilizada para avaliar a glândula pineal até a presente data, e tampouco para avaliar amostras de fezes e sangue, e a própria glândula, de animais submetidos a altas doses de zinco. Portanto, o uso desta técnica no presente trabalho é uma novidade. Uma vantagem de se usar a técnica TXRF para determinar a concentração regional elementar de metais pesados, diz respeito a sua capacidade de analisar diminutas quantidades de amostras (na ordem de μl para amostras líquidas e μg para amostras sólidas), tornando a técnica ideal para análise de quantidades muito pequenas de material como é o caso da glândula pineal.

O aumento de 30% (150 $\mu\text{g/g}$) na concentração de zinco na GP dos animais submetidos à TAD, obtidos com a técnica TXRF, pode ter sido favorecido pelo intenso fluxo sanguíneo, e por não existir uma barreira hemato-encefálica verdadeira nessa glândula (MATSUSHIMA e REITES, 1975; LUO et al., 1984). Na GP, um órgão onde a concentração de zinco já é maior do que em outras regiões cerebrais, como mostrado em pineais bovinas e suínas (WONG e FRITZE, 1969), não é discutido ou esclarecido na literatura o mecanismo de transporte do zinco. O transporte de zinco por membranas celulares não é em si um problema, já que concentrações milimolares cruzam as membranas por transportadores, além de haver um transporte dependente de concentração. Porém, na glândula pineal algum mecanismo deve favorecer a entrada de zinco, mesmo que este já exista ali em excesso, como é o caso. Em vista disto, é possível supor que além de uma grande necessidade de zinco na pineal, o que favorece o seu acúmulo no órgão, houve um intenso transporte do íon através do endotélio no caso dos animais do GTAD e uma concentração aumentada nas células pineais. Como não houve alteração estatisticamente significativa na concentração de zinco no soro sanguíneo, e nem na excreção pelas fezes, inferimos que o excesso de zinco foi absorvido pela glândula.

Os vasos na pineal possuem ao seu redor um espaço perivascular relativamente amplo, e o revestimento endotelial pode ter até duas a três células. Em ratos, partem do revestimento endotelial, diversos prolongamentos celulares (projeções citoplasmáticas) que se estendem da superfície endotelial para dentro do lúmen do vaso. No presente trabalho foram vistas diversas alterações no endotélio dos vasos pineais dos animais do GTAD através da microscopia eletrônica. O

revestimento endotelial parecia mais fino, e havia uma grande diminuição da quantidade dos prolongamentos celulares para o lúmen, e também na quantidade de cavéolas, esta última uma característica bem expressiva no endotélio dos vasos da GP em ratos normais. Não está claro porque estas modificações acontecem com o excesso de zinco, no entanto, devem estar relacionadas à alteração da homeostase do zinco e seu acúmulo dentro da célula, e talvez também em relação às alterações na homeostase de outros íons, como será discutido.

A absorção do zinco em células de mamíferos ocorre por um processo saturável e um não-saturável (PATTISON e COUSINS, 1986; ACKLAND et al., 1988; ACKLAND e MCARDLE, 1990). Uma forma de transporte saturável é por endocitose do complexo albumina-zinco. Neste caso, dentro do endossoma o complexo se dissocia, e o zinco liberado pode sair para o citoplasma (os transportadores de zinco ZnT-2 e ZnT-4 na membrana do endossoma estariam encarregados do seu transporte para o citoplasma) ou ficar no endossoma para ser excretado. A homeostase do zinco estaria afetada na dependência do zinco absorvido do sangue ficar ou sair do endossoma. Porém, estudos envolvendo a albumina mudaram o seu papel passivo de transportar elementos no sangue, mostrando que há receptores específicos na célula endotelial para albumina complexada a ligantes e para albumina livre (SCHNITZER et al., 1992; ROWE e BOBILYA, 2000), e dependendo do ligante à albumina, a transcitose pela célula endotelial é aumentada, e isto acontece quando o zinco é o ligante. No entanto, a albumina não é essencial para o zinco entrar na célula (VALEE e FALCHUCK, 1993). Um estudo verificou que a entrada do zinco na célula endotelial pode depender da concentração do íon, e ainda, depender do tipo de célula (ROWE e BOBILYA, 2000). ACKLAND e MCARDLE (1990) mostraram, por exemplo, que nos fibroblastos, a entrada do zinco é concentração-dependente, sendo maior quanto maior for a concentração deste íon nos fluídos extracelulares, e, a via usada para entrada é através de vesículas de pinocitose tipo cavéolas (GRIDER e VAZQUEZ, 1996). Esperava-se que, a semelhança dos fibroblastos, um excesso de zinco pudesse favorecer a presença de cavéolas, mas isto não ocorreu. Uma hipótese possível seria que na GP o transporte preferencial para o zinco entrar na pineal não seja através da endocitose por cavéolas do endotélio.

As células endoteliais, que tem uma face luminal e outra ab-luminal, apresentam transportadores de zinco nestas membranas, e um estudo em capilares

com BHE mostrou que em situação experimental (concentração de zinco maior que o normal) havia um aumento transitório de ZnT-1 das membranas plasmáticas. Com 48h, a absorção aumentada do zinco continuava levando-o para dentro da célula, mas sua saída para o tecido era diminuída, assim, parecia que o zinco ia sendo estocado (em vesículas ou associado a metalotioneínas) talvez para manter a sua homeostase (BOBILYA et al., 2007). Portanto, existindo uma BHE verdadeira, o controle da homeostase do zinco é feito pelo endotélio, favorecendo (ou não) o seu acúmulo dentro da célula. A BHE seria, portanto a primeira barreira contra um desequilíbrio homeostático. Qual seria a situação em áreas sem BHE não está claramente definido na literatura. No caso da GP especificamente nada foi relatado. Como o zinco está em excesso nos animais do GTAD, uma hipótese seria que houve um transporte de zinco para dentro da pineal via endotélio, favorecido pelo aumento da concentração do íon, e talvez, igualmente favorecido pela expressão de um tipo de transportador de zinco de membrana, que ajudasse no influxo do metal para dentro da célula endotelial da pineal (a semelhança do descrito para endotélios com BHE). Em roedores, o ZnT-1 é o único membro da família ZnT localizado na membrana plasmática, mas existe o membro ZnT-8, por exemplo, cuja função e localização são desconhecidas (PALMITER e HUANG, 2004), e ainda, existe a família Zip, onde alguns membros estão localizados em membranas plasmáticas (KAMBE et al., 2004).

O que a literatura diz sobre o fluxo de zinco é que existe um sistema transportador saturável de zinco nas membranas de células endoteliais (MICHALCZYK et al., 2002; SHEN et al., 2007). Em geral, há 9 tipos de transportadores de zinco da família ZnT e 15 da família Zip em células humanas (LIUZZI e COUSINS, 2004). Estes transportadores apresentam papéis opostos: a) a família ZnT reduz o zinco intracelular, porque promove o efluxo deste íon da célula (ou do citoplasma para dentro das vesículas citoplasmáticas) (PALMITER et al., 1996; SHEN et al., 2007); b) a família Zip aumenta o zinco intracelular, porque promove a absorção do mesmo para dentro da célula (e também a sua liberação das vesículas para o citoplasma) (KAMBE et al., 2004). Ambas as famílias de transportadores são tecido-específicas e sofrem influência das concentrações de zinco (deficiente ou em excesso) (EIDE, 1997; LIUZZI E COUSIN, 2004). Deste modo, há possibilidades já citadas na literatura que reforçam a hipótese formulada

acima para o presente trabalho, sobre a ação favorecedora da entrada do zinco em excesso via transportadores de membrana.

Além deste transporte ativo via um sistema de transportadores de metais pesados nas membranas celulares, admite-se que o zinco possa passar por proteínas canais via um transporte passivo (sem gasto de energia) em um sistema de difusão facilitada que depende da concentração do íon, a semelhança do que ocorre no intestino delgado. No intestino delgado há uma grande participação das proteínas transportadoras de zinco (ex: ZnT1, ZnT7) e o íon é absorvido por transporte ativo saturável, auxiliado pela presença de glicose no lúmen intestinal, na borda em escova das células (LEE, 1989; VALLEE e FALCHUK, 1993). No intestino, inclusive, se o nível de um metal é baixo, há aumento dos transportadores e isto potencializa a absorção, podendo aumentar o nível tóxico do metal na célula. Além dessa via por transporte ativo, ocorre no intestino um transporte passivo do zinco por difusão facilitada cuja eficiência é proporcional à concentração de zinco no lúmen intestinal (SANDSTRÖM, 1986; KREBS et al., 1996). Este tipo de transporte passivo também ocorre para outros metais, como chumbo (BRADBURY e DEANE, 1993) entre outros. Não foi avaliado no presente trabalho a mecânica de transporte do zinco administrado, porém, considerando-se os dados apresentados na literatura é possível sugerir que o aumento de zinco observado na pineal com a técnica do TXRF possa ocorrer por alterações nas vias de transportadores de zinco e/ou na via de difusão facilitada. Outros estudos são necessários para encontrar esta resposta.

O aumento de zinco mostrado pela técnica TXRF leva ao questionamento sobre a ação da regulação deste excesso de zinco. No cérebro a regulação dos níveis de metais é muito rigorosa. O cérebro é um órgão especializado, que concentra íons metálicos, portanto, estaria preparado para realizar um eficiente mecanismo de homeostase e tamponamento destes íons. No caso do zinco, estudos *in vitro*, mostraram que a liberação de altas concentrações de zinco (~300 μmol) vesicular (de neurônios ZEN) de modo cálcio-dependente (FREDERICKSON et al., 1983; TAKEDA, 2001) foram mais do que suficientes para causar dano a células neurais (KOH et al., 1994; BUSH, 2000). Portanto, em situações normais, o cérebro como um todo deve possuir mecanismos de defesa para lidar com as alterações que envolvem metais, e para manter a sua homeostase. Na maioria dos órgãos, de acordo com a literatura (OPRESKO, 1992), existe um período crítico de 6 a 12 dias, para ajustes homeostáticos do zinco plasmático e recuperação dos efeitos causados

por etapas de hipozincemia ou hiperzincemia. Neste período são importantes as metalotioneínas (MT) citosólicas que ligam zinco (e também cobre) (MARET, 2000), atuando como agentes tamponantes e como um reservatório do zinco (KAMBE et al., 2004), regulando a sua biodisponibilidade e impedindo que alterações nas concentrações destes metais perturbem a homeostase (VALLEE e FALCHUK, 1993; MARET, 2000; SALGUEIRO, 2000). Na GP bovina, foi mostrado (AWAD et al., 1989) que existem dois tipos distintos de metalotioneínas (metalotioneína I e II) e que estas deveriam exercer um eficiente mecanismo homeostático para este íon nesta glândula. Apesar destes dados da literatura, os resultados obtidos neste trabalho sobre o aumento da concentração de zinco no GTAD sugerem que o ajuste homeostático do zinco plasmático dentro do período previsto (período de 6 a 12 dias), não conseguiu impedir ou regular o acúmulo de 30% no tecido pineal. Um fator que pode ter contribuído pra tal seria que as doses de zinco eram dadas inclusive durante este provável período de ajuste. Como as marcações para o zinco pelas técnicas específicas, como será discutido adiante, mostram que existe zinco livre e/ou fracamente ligado na GP dos animais do GTAD, pode ter ocorrido uma falha no mecanismo de tamponamento do zinco ou alterações no mecanismo de seqüestro de zinco pelas metalotioneínas (ou saturação das metalotioneínas) e estes mecanismos alterados seriam responsáveis pelo desequilíbrio homeostático na pineal. Para determinar que fator ou fatores permitiram o desequilíbrio nas concentrações e aumento de 30% de zinco na GP com a condição de hiperzincemia experimental são necessários estudos complementares.

Estudos em aves demonstraram que sob a administração de um excesso de zinco na dieta (antes de uma dieta pobre em zinco), o íon se acumulava nos ossos para ser liberado durante a fase de baixa ingestão de zinco (EMMERT e BAKER, 1995). A deposição nos ossos seria uma reserva funcional passiva (para a deficiência de zinco). A situação apresentada no presente trabalho partiu de um modelo de hiperzincemia (FEREZIN-PINTO e CORREA-GILLIERON, 2007) onde a situação de excesso de zinco foi forçada. Portanto, como não há deficiência de zinco, não está havendo liberação do zinco acumulado em ossos ou em qualquer outro tecido. Porém, a situação inversa, zinco acumular nos ossos por estar em excesso, pode ser considerada. Não foram feitas análises dos ossos nos animais do GTAD. No entanto, mesmo considerando uma possível absorção de zinco pelos

ossos, a concentração foi maior na pineal (30%), o que indica que qualquer deposição em outro tecido não foi significativa para o resultado.

Apesar da deposição de zinco em tecidos interferir na sua homeostase, o ajuste gastrointestinal de absorção e de excreção endógena (zinco que está no intestino para ser eliminado nas fezes) é o primeiro mecanismo pelo qual o corpo mantém constantes os níveis de zinco (KING et al., 2000). No presente trabalho, não houve alteração estatisticamente significativa na excreção de zinco quando se comparou os animais do GTAD entre eles mesmos, mas houve alteração estatisticamente significativa (aumento da excreção) quando se comparou os animais do GTAD e os controles após a última dose, provavelmente, uma tentativa do organismo em regular a concentração excessiva de zinco.

O equilíbrio entre os vários elementos minerais e a relação entre as suas concentrações, é fundamental para o funcionamento adequado do organismo, e há relatos de alterações em metais capazes de afetar a biodisponibilidade de outros metais (JANSSEN et al., 2000). No presente trabalho foi observado pela técnica do TXRF, nos animais submetidos à TAD, desequilíbrio homeostático em diversos elementos químicos analisados, além do zinco. As alterações destes elementos foram estatisticamente significativas na glândula pineal e no soro sanguíneo, sugerindo uma ação do zinco administrado por via oral, sobre a homeostase de outros elementos químicos.

Os elementos que mostraram aumento em *correlação direta* com o aumento de 30% na concentração de zinco na GP e no soro sanguíneo foram enxofre (S^{+2}), cloro (Cl^{-1}), potássio (K^{+1}) (em ambos), e, os elementos cálcio (Ca^{+2}), titânio (Ti^{+3}), manganês (Mn^{+2}), ferro (Fe^{+2}) (apenas na GP). No caso do ferro, sua concentração diminuiu no soro sanguíneo, e também nas fezes, tendo aí então uma *correlação inversa* em relação à concentração de zinco. O estudo de correlações (diretas ou inversas) entre as concentrações dos elementos químicos é mostrado na literatura por diferentes métodos de análises, por exemplo, o uso de métodos quantitativos por ativação de nêutrons. Em cérebro humano isto foi feito, para avaliar as concentrações absolutas (HÖCK et al., 1975) de elementos traço essenciais (entre eles o zinco), e foi mostrado que não havia uma distribuição homogênea dos elementos nas diferentes regiões cerebrais, mas havia uma grande variação entre as concentrações dos elementos essenciais em relação aos elementos não essenciais. As análises das concentrações (Co^{+2} , Fe^{+2} , Rb^{+1} , Se^{+2} , Zn^{+2}) apontavam

para uma correlação direta quando os elementos eram relacionados entre si, onde quase sempre, o aumento de um implicava em aumento do outro (HÖCK et al., 1975). Em 1992, GOOD et al., demonstram por técnica de espectrometria, uma elevação na concentração de ferro nos emaranhados neurofibrilares e nas placas senis. Esse aumento foi corroborado por outros autores que mostraram concentrações significativamente elevadas na substância cinzenta do neocórtex, quando comparados com pacientes controles (FREDERICKSON, 1987 *apud* KOH et al., 1996). Estes estudos sugeriram que o ferro podia ocasionar uma neurodegeneração pela geração de espécies de radicais livres, o que aumentaria a formação de fibrilas de β -amilóide (HENSLEY et al., 1995) e que a homeostase do ferro estaria rompida nos cérebros acometidos pela DA (LOVELL et al., 1998). Mais recentemente aumentos nas concentrações de ferro e zinco (entre outros elementos) foram relatados em animais com diminuição no processo cognitivo com o uso da técnica do TXRF (Serpa et al., 2008).

De acordo com os resultados do presente estudo, existe na pineal, uma correlação direta entre a concentração do ferro e o excesso de zinco. O ferro é considerado um elemento fundamental para várias funções orgânicas nos mamíferos (ATYABI et al., 2006) e tanto a sua deficiência (a anemia é a expressão mais relevante - FRANCIOSI et al., 2009) quanto o seu excesso (causa fadiga crônica, etc.) são prejudiciais. Em humanos, existe para este íon, o que se chamou de *ciclo interno*, um processo onde uma vez penetrado no organismo o ferro sofre ciclagem num sistema fechado (estômago, intestino, células intestinais, sangue circulante, células do baço, medula óssea e outros tecidos, e fígado) onde a entrada de pequenas quantidades diárias substitui as pequenas quantidades perdidas (BROWN et al., 1977). O ferro ferroso (Fe^{+2}) (resultante do Fe^{+3} , ferro férrico - inorgânico) é bastante solúvel e facilmente absorvido pelas células, e no interior destas se acumula como ferritina e hemossiderina (proteínas de reserva do ferro) (POLLYCOVE et al., 1978). Pela análise por TXRF observamos um aumento expressivo do ferro na pineal (67%), sugerindo sua acumulação neste órgão (uma sobrecarga de ferro no tecido pineal). Já em relação ao soro sanguíneo e fezes observamos uma correlação inversa, onde o aumento de zinco gerou diminuição do ferro (30%) no soro sanguíneo e também nas fezes. A sobrecarga de ferro em tecidos é um fato que em geral acontece em relação ao fígado (um órgão alvo e primário para deposição irregular do ferro, seguido do coração e pâncreas),

principalmente na hemocromatose (uma doença genética devido à hiperabsorção intestinal do ferro) (BONINI-DOMINGOS, 2007). O excesso de ferro livre nos tecidos é bastante nocivo, pois promove a geração de espécies reativas de oxigênio que são tóxicos para a célula e lesam proteínas, lipídios e DNA. O aumento de ferro nos tecidos, a *hemossiderose*, pode ocorrer em doenças graves (renais e pulmonares), onde por razões desconhecidas há extravasamento de sangue na região. Uma hipótese para o aumento de ferro na glândula pineal seria estar havendo uma hemossiderose provocada pelo excesso de zinco. Não foi possível encontrar imagens da pineal a microscopia óptica ou eletrônica suficientemente reveladoras de extravasamento de sangue no tecido, mas a hipótese não deve ser descartada. No entanto, outra hipótese para o acúmulo de ferro na pineal poderia ser a ocorrência de uma absorção facilitada do ferro do sangue para a pineal, através do endotélio. Se isto estiver acontecendo o ferro poderia diminuir no sangue nos animais do GTAD, sem haver uma excreção aumentada (como de fato ocorreu), porque o ferro está se concentrando nos tecidos. Outros estudos são necessários para comprovar esta hipótese. De qualquer modo, a situação de hiperzincemia gerou um acúmulo de ferro no tecido pineal, associada à diminuição da sua excreção e de sua concentração no sangue. Na literatura é relatado que no sangue, o ferro se prende a transferrina, mas se houver saturação da transferrina ele circula livre, como forma não ligada de ferro, e esta forma pode ser facilmente reabsorvida pela célula, aumentando assim o acúmulo intracelular danoso à mesma (WORWOOD, 2002). Como a homeostase do ferro intracelular é feita por proteínas reguladoras de ferro, que na situação de acúmulo de ferro estão inativadas (NAIRZ e WEISS, 2006), isto também poderia estar ocorrendo na pineal. Recentemente, foi descoberto um hormônio, a hepcidina (GANZ e NEMETH, 2006) que nos vertebrados superiores está bastante relacionada com a homeostase do ferro. A proteína é sintetizada no fígado e atua como um regulador negativo do ferro. Ela regula a absorção do ferro através das células intestinais. Quando a secreção desta proteína aumenta, diminui a absorção e retenção do ferro pelas células intestinais e pelos macrófagos. Porém, a deficiência de hepcidina causou em camundongos a sobrecarga de ferro, especialmente no fígado, pâncreas e coração (e paradoxalmente provocou a depleção de ferro nos macrófagos) (GANZ e NEMETH, 2006). Outra hipótese para a hemossiderose aqui sugerida pode, portanto, ter também relação com este hormônio.

Os resultados no presente trabalho com a técnica TXRF mostraram que houve uma relação direta entre o aumento da concentração de zinco e a concentração de cálcio na pineal. *In vivo*, o cálcio pode estar tanto no fluido intracelular quanto no extracelular (cálcio livre), e armazenado dentro dos compartimentos celulares (ex: nas mitocôndrias) (POZZAN e RIZZUTO, 2000). Aumento da concentração de cálcio intracelular pode ocorrer por despolarização das membranas (há ativação de canais cálcio sensíveis a despolarização) que permite o influxo de cálcio para dentro da célula, onde pode ser armazenado (BERRIDGE et al., 2003), por ativação de receptores ionotrópicos de membrana (NMDA, AMPA/Kainato) (que ativados aumentam a concentração de cálcio intracelular - SENSI et al., 1999), e também devido a sua liberação dos estoques intracelulares. Estas alterações são vistas como responsáveis por distúrbios na homeostase do cálcio (FRANDSEN e SCHOUSBOE, 1993). Presume-se que o aumento da concentração de cálcio na pineal possa estar refletindo a liberação deste íon dos compartimentos intracelulares (ex: mitocôndria), somado ao cálcio livre no citoplasma e no tecido como um todo, motivado pela hiperzincemia. A homeostase do cálcio de uma maneira geral deve ser mantida dentro de limites muito estreitos, para evitar efeitos tóxicos, como por exemplo a ação tóxica do cálcio sobre as mitocôndrias levando-as a produzir radicais livres, (POZZAN e RIZZUTO, 2000). No presente trabalho, o aumento da concentração de cálcio em relação ao zinco, é reforçado pelo relato de que o zinco induz um aumento da permeabilidade da membrana celular ao cálcio, contribuindo para o desequilíbrio na homeostase deste elemento químico (HORNING et al., 2000).

No controle do nível de cálcio no sangue (calcemia) é importante o seu armazenamento nos ossos e sua excreção renal e fecal. O cálcio do sangue aparece como: cálcio ionizado livre (forma fisiologicamente ativa - maior fração), como uma pequena fração complexada a fosfatos e outros ânions e uma fração não difusível ligada a proteínas. No caso do soro sanguíneo e das fezes dos animais do GTAD, a diminuição da concentração de cálcio não foi estatisticamente significativa após a hiperzincemia.

No organismo quase todo o fósforo está na forma de fosfato (1 átomo de fósforo e 4 de hidrogênio). A técnica do TXRF mostrou que há uma correlação inversa entre zinco e fósforo, no caso dos animais do grupo TAD. Assim o aumento de zinco implicou na diminuição expressiva (83%) do fósforo. Uma situação similar

de diminuição do fósforo pode ocorrer em relação ao cálcio, por exemplo, para manter a relação cálcio:fósforo. Normalmente o fosfato (PO_4^{-3}) tem uma relação recíproca com o cálcio, onde a diminuição do fosfato implica no aumento do cálcio, e nesta relação, se qualquer um dos íons estiver em excesso à excreção do outro aumenta (TAYLOR e BUSHINSKY, 2009). Uma hipótese seria que as alterações observadas no caso do fósforo nos animais do GTAD, possam estar mais diretamente ligadas ao que está acontecendo com a concentração de cálcio, alterada nas pineais do GTAD. O resultado sobre a excreção de fósforo não foi estatisticamente significativo para explicar a diminuição de fósforo na pineal devido a sua excreção nas fezes. E, deve ainda ser observado que a principal via de excreção do fósforo é a urina, e não as fezes. Alterações não significativas no sangue (onde o fosfato tem ampla flutuação diária que pode chegar a 50%, tendo assim uma homeostase menos rígida - TAYLOR e BUSHINSKY, 2009) indicam que não havia uma hipofosfatemia (diminuição de fosfato no sangue), uma condição que pode acontecer em casos de acidose metabólica (onde o aumento de ácido no sangue supera o sistema tampão do organismo), originadas por intoxicações, pela ingestão de soluções ácidas ou de constituintes que ingeridos se tornam sais ácidos (LAUAR et al., 2006). Assim, uma hipofosfatemia podia ser esperada no caso da TAD onde havia ingestão de solução de sulfato de zinco, uma solução cujo pH é moderadamente ácido (4,5-5). No entanto, apesar de não terem sido feitas análises adicionais para verificar uma acidose metabólica nos animais do GTAD, a análise do sangue pelo TXRF mostrou que as alterações na concentração de fósforo no soro não eram significativas para caracterizar uma hipofosfatemia, e talvez uma acidose.

Nos animais do grupo TAD ocorreu uma relação direta entre o aumento do zinco e o aumento de potássio na pineal, e também no soro sanguíneo. O potássio é o cátion predominante nas células animais. A manutenção de sua distribuição no meio intracelular e no sangue depende da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Assim, a maior concentração de sódio é do lado de fora da célula e a maior concentração de potássio é do lado de dentro. O potássio consumido na dieta é em geral suficiente para compensar a sua perda. O aumento de potássio na GP e no soro pode ter razões que não são facilmente deduzíveis. Algumas situações favorecem o aumento da entrada de potássio numa célula entre elas estão à elevação do pH extracelular, alguns tipos de intoxicação (ex: pelo bário), a hipotermia, entre outras situações mais graves. Importante no metabolismo do potássio e também do equilíbrio ácido-

básico do organismo é o entendimento sobre o funcionamento da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, que captura 2 íons de potássio para cada 3 de sódio que libera. Em uma situação de alcalose (aumento da alcalinidade do sangue por concentração anormal do bicarbonato, casos como, por exemplo, no vômito prolongado) sai hidrogênio da célula e aumenta a concentração de potássio intracelular, com diminuição de potássio no sangue. No resultados com as análises do TXRF não houve diminuição de potássio no soro, e sim aumento do íon portanto não houve alcalose. Na acidose (acidez excessiva do sangue por concentração baixa de bicarbonato) ocorre o oposto, a célula perde potássio para o meio extracelular. Nos animais do GTAD o aumento no sangue (hipercalemia) foi bastante significativo (43%) com a hiperzincemia. A hipercalemia se manifesta quando os rins não excretam quantidade suficiente de potássio (insuficiência renal), e a hipercalemia associada a aumento de potássio intracelular ocorre em doenças como na insuficiência das supra-renais (GENNARI, 2002). Elevação na concentração de potássio no sangue é bastante perigoso, pois pode afetar o sistema de condução elétrica do coração, e quando seu aumento é progressivo pode implicar em parada cardíaca. No caso de animais do GTAD, alguns apresentavam palpitações (batimentos cardíacos irregulares), e a hipercalemia era evidente, e pode estar associada indiretamente a uma acidose. Outras análises são necessárias para esclarecer esta hipercalemia. As variações das concentrações extracelulares do potássio, por exemplo, são também importantes porque influenciam a atividade da musculatura estriada esquelética, fato considerável para a análise dos animais do GTAD que apresentaram alterações na atividade motora, possivelmente devido às alterações do potássio. O potássio e o sódio estão entre os principais eletrólitos do organismo que influenciam a distribuição e retenção de água corporal. O movimento de água através da membrana é influenciado pela concentração destes eletrólitos. Portanto, qualquer modificação em suas concentrações são a base para o deslocamento da água. Uma hipótese no caso do aumento de potássio no GTAD pode ter uma relação importante com o movimento de fluídos entre os compartimentos intra e extracelular, um processo que poderia estar ocorrendo no tecido pineal e sendo responsável pela dilatação dos espaços extracelulares observados, como será discutido mais adiante com os resultados da microscopia eletrônica.

Outros elementos químicos como o enxofre e o cloro também mostraram pela técnica do TXRF aumento em suas concentrações em correlação direta com o

aumento de zinco, tanto na pineal quanto no soro sanguíneo dos animais do GTAD, e as causas disto não são claras e necessitam maiores estudos para uma explicação. O enxofre participa da composição de vários compostos orgânicos (cisteína, metionina, e outros) e os distúrbios na homeostase gerado pelo excesso de zinco pode ter causado alterações no metabolismo dos compostos de enxofre.

Quanto ao cloro, em associação com o sódio e o potássio, é o principal contribuinte para a manutenção do conteúdo normal de água do organismo. O ânion cloro predomina no líquido extracelular; onde atua na manutenção do equilíbrio químico com os cátions presentes. O cloro também participa no sistema tampão do sangue junto com o bicarbonato. O conteúdo de cloro pode ser um indicador de alterações no compartimento de líquido extracelular (CLE). Um aumento na concentração de cloro altera o equilíbrio de cátions, entre outras ações importantes para a homeostase, e assim o aumento na sua concentração (em correlação direta com o zinco) sanguínea e na pineal poderia estar relacionado a um desequilíbrio dos cátions e talvez a algum tipo de distúrbio no CLE. Há relatos na literatura (BLOOM, 1967) sobre alterações na concentração de cloro, onde para manter estáveis as concentrações eletrolíticas no sangue (e também do líquido intersticial) o CLE poderia se expandir. Uma expansão deste espaço extracelular, como dito anteriormente, foi observada na GP dos animais do GTAD em relação aos controles, e isto pode ter relação com as concentrações de cloro aumentadas.

As alterações de outros íons, como o titânio, manganês e níquel, que ocorreram com o aumento do zinco, são de difícil interpretação. No caso do níquel este trabalho mostrou uma relação inversa entre as concentrações deste íon e a do zinco, pois houve expressiva redução do níquel na glândula pineal. O níquel é um íon que sob várias circunstâncias pode ativar ou inibir reações enzimáticas importantes. Sua falta pode interferir nestas reações e causar efeitos deletérios severos. Este íon tem sido citado como um elemento que interage com outros elementos importantes, para proporcionar um funcionamento apropriado de vários sistemas metabólicos (LI e ZAMBLE, 2009). Uma característica importante é que o níquel atua inibindo a ação da enzima superóxido dismutase que participa no processo de metabolização dos radicais livres, assim em doses elevadas este íon é tóxico causando em humanos irritação gastrointestinal, náuseas, vômitos, diminuição do apetite, alterações neurológicas, dor de cabeça, vertigens, e fraqueza muscular, entre outros problemas. Em ratos a sua deficiência parece afetar os níveis

da vitamina B-12, alterar o peso e provocar alterações nas concentrações de cobre, ferro, cálcio e molibdênio no sangue. Os animais do grupo TAD não mostraram diminuição significativa de peso que pudesse estar relacionada à diminuição na concentração de níquel, causada pelo excesso de zinco e/ou pela homeostase alterada de vários elementos químicos. Não é possível afirmar que houve alteração das concentrações de níquel devido ao excesso de zinco ou que as alterações nas concentrações dos outros metais geradas pelo excesso de zinco influenciaram na concentração do níquel. No entanto, considerando o papel modulador do níquel nas reações enzimáticas é possível supor que no caso do GTAD estas estejam comprometidas, trazendo assim efeitos deletérios aos animais. Entre as concentrações de manganês e zinco, no entanto, houve correlação direta nos animais do GTAD na glândula pineal, e no sangue. O manganês no sangue encontra-se principalmente nos eritrócitos. No sistema nervoso central este íon atravessa a barreira hemato-encefálica chegando ao tecido nervoso onde sua eliminação é lenta. O íon é importante para o desenvolvimento e o funcionamento do cérebro (SLOOT et al., 1994). Uma dieta deficiente em manganês pode levar a severos problemas na atividade cerebral. No entanto, este íon pode também se acumular anormalmente em algumas regiões e uma concentração elevada de manganês pode ser tóxico para o cérebro e causar neuropatias (SANTOS et al., 2010). Dados da literatura indicam que níveis aumentados de manganês no sangue pode implicar em deposição anormal do íon em tecidos, como foi visto para os núcleos de base (SOTOGAKU et al., 2000), e esta informação favorece a hipótese de que o manganês esteja sendo depositado na glândula pineal.

O mecanismo pelo qual o manganês induz danos neuronais ainda não está claro, mas parece estar relacionado ao estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação (MILATOVIC et al., 2009). Se o manganês pode causar uma disfunção mitocondrial, é possível que o seu aumento esteja relacionado a alterações mitocondriais que favoreceram a liberação de cálcio, e portanto, aumento de sua concentração, conforme foi medido pelo TXRF. Reforçam esta hipótese relatos mostrando que o manganês é considerado um íon que pode, em determinadas condições, induzir a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, por exemplo, do retículo endoplasmático (TAKEDA et al., 2003). Os sinais e sintomas de intoxicação pelo manganês em humanos envolvem anorexia, cefaléia, insônia e fraqueza geral, e alterações neurológicas e psicomotoras como hipertonia

muscular, astenia, parestesias, dores musculares, alteração da fala e da libido. A toxicidade do manganês em animais implica principalmente na diminuição do crescimento e do apetite (HURLEY et al., 1984), fatos que não foram observados nas ratas do GTAD.

Dados da literatura mostraram que há um aumento nos níveis de manganês quando se aumenta a concentração de potássio (TAKEDA et al., 2003), e talvez as alterações encontradas para o potássio no presente trabalho estejam também relacionadas a este aumento de manganês na glândula pineal.

Uma correlação direta com o excesso de zinco, para a qual não temos uma explicação, é observado para o titânio, um íon biocompatível e capaz de se acumular em tecidos, sem relatos de toxicidade, porém cujo significado biológico ainda é pouco conhecido. É provável que este íon seja um contaminante ambiental.

A análise pela microscopia eletrônica das pineais dos animais do GTAD, e com amiloidose (como observado no modelo de hiperzincemia usado) trouxeram resultados interessantes e compatíveis com a literatura. Em 1959 COHEN e CALKINS estudaram por microscopia eletrônica (ME), amiloidoses primárias e secundárias observadas em tecido humano e de animais, pensando na possibilidade de haver uma estrutura microscópica fibrilar orientada no amilóide (como indicado pela birrefringência deste material sob microscopia de polarização). Seus resultados comprovaram que todas as formas de amilóide em tecido fixado apresentavam uma estrutura fibrilar comparável. A estrutura fibrilar observada a ME apresentou feixes de fibrilas (eventualmente sinuosas) com larguras médias que variavam de 7,5 a 10 nm e com comprimentos de 100 a 1600 nm. Outros estudos (GUEFT e GHIDONI, 1963) sugeriram que as fibrilas amilóides eram duplas com um espaço intrafibrilar entre elas de cerca de 2,5 nm, igual ao diâmetro da fibrila. Em 1964, TERRY et al. estudaram a estrutura fibrilar da amiloidose associada a placas senis em cérebros com Alzheimer e relataram fibrilas de 7 a 9 nm de largura, que pareciam ter uma estrutura fibrilar tríplice com um centro oco. Posteriormente, em 1967 SHIRAMA e COHEN, realizaram um extenso estudo, sobre a ultraestrutura fibrilar do amilóide, e o conjunto de informações levou ao consenso exposto em 1982 por COHEN et al., de que a unidade estrutural da fibrila de amilóide *in vivo* apresenta largura de 7,5 a 10 nm, formando arranjos aleatórios. Estudos realizados *in vitro* por COHEN e CALKINS (1964), conseguiram isolar de tecido e órgãos, uma camada de fibrilas com todas as características tintoriais de amilóide, e estas fibrilas tinham as mesmas

dimensões das fibrilas observadas a ME. Estes resultados levaram à conclusão que todas as fibrilas isoladas no estudo eram similares às fibrilas de amilóide analisadas nos tecidos. Contudo, o estudo *in vitro* das fibrilas isoladas, não levaram em consideração que poderia haver depósitos em tecidos, que não formam fibrilas mas, que possuem as características dos depósitos de amilóides. Estudos posteriores mostraram que havia componentes não-fibrilares associados aos amilóides (SIPE e COHEN, 2000) e estes seriam: proteoglicanos de heparan sulfato, componente P (uma alfa-globulina) do amilóide sérico, e a apolipoproteína. O desenvolvimento de técnicas e novos estudos mostraram que uma combinação de fatores (estrutura do peptídeo formador do amilóide, a capacidade de assumir uma conformação beta, a influência de proteoglicanos no dobramento das cadeias polipeptídicas, entre outros) eram determinantes para a formação ou não de fibrilas amilóides típicas (GLENNER et al., 1971; KELLY, 1998; WEST et al., 1999).

No presente trabalho foram observadas estruturas fibrilares no parênquima pineal dos animais submetidos à TAD, principalmente no espaço perivascular. Estas eram fibrilas alongadas, eventualmente sinuosas que se cruzavam entre si, e algumas vezes mostravam discretas ramificações (**Fig. 28 C,D,E**), uma morfologia muito parecida àquela das fibrilas analisadas à microscopia eletrônica por outros autores (PRAS et al., 1969; ZUCKER-FRANKLIN e FRANKLIN, 1970) e que foi considerada como a morfologia típica de uma fibrila de amilóide *in vivo*. Apesar da grande resolução do ME usado no presente trabalho, não houve um isolamento desta estrutura fibrilar para se poder julgar em detalhes a sua morfologia (se fibrilas duplas ou tríplexes, separadas por espaços, por exemplo). As larguras destas fibras correspondiam a valores entre 8 a 16 nm (**Fig. 28 E**). Estas estruturas fibrilares compunham um cenário de desorganização observada nas pineais dos animais do GTAD, nas áreas perivasculares ou nos espaços extracelulares. Especialmente nos espaços perivasculares, as fibrilas apareciam entre arranjos desorganizados de fibrilas colágenas (estas últimas, nos controles, apareciam como feixes mais organizados - **Fig. 25 A, B**). Estas fibrilas, com a morfologia de fibrilas amilóides, eram muito menores que as fibrilas colágenas, e igualmente não correspondiam às fibrilas elásticas estudadas na pineal (FEREZIN-PINTO, ARAÚJO e CORREA-GILLIERON, 2004).

A observação a ME também mostrou uma desorganização estrutural do tecido da glândula pineal, com a presença de corpos residuais nos espaços

intercelulares, (**Fig. 25 B e 26 C, D, E**) corroborando a hipótese que já vinha sendo cogitada no estudo do modelo de hiperzincemia, de que poderia estar ocorrendo uma desestruturação do parênquima pineal nos animais do grupo TAD (FEREZIN-PINTO e CORREA-GILLIERON, 2005, 2007 e 2009), principalmente nas adjacências (espaços perivasculares) dos capilares e nos espaços intercelulares, os quais pareciam aumentados, quando observados na microscopia de luz. Deste modo, a análise pela ME evidenciou a desestruturação do parênquima pineal, sob excesso de zinco. Um estudo feito em glândulas pineais de ratos contrastadas pelo ferro coloidal revelou que nos espaços perivasculares há muitos proteoglicanos sulfatados (sensíveis a hialuronidase e condroitinase ABC) que formam uma rede onde os glicosaminoglicanos estariam interagindo com o colágeno, e atraindo e retendo moléculas de água, para formar um gel hidratado que atua como um regulador seletivo de moléculas do sangue para o tecido (TAGUCHI et al., 2000). Uma hipótese em relação à desestruturação observada no espaço perivascular no GTAD seria ter havido, em função de um excesso de zinco, um desarranjo desta organização em “rede de proteoglicanos-colágeno-água” relatada pelos autores (TAGUCHI et al., 2000). A participação do zinco alterando um tipo de estrutura histológica agregada, disposta na matriz extracelular, em função de uma interação entre o metal e proteoglicanos da matriz, tem reforço nos estudos que mostraram interações entre zinco e proteoglicanos, como no caso do proteoglicano de heparan sulfato e heparina, que possuem sítios de ligação para metais (WHITFIELD e SARKAR, 1992). Um exemplo que favorece o importante papel exercido por concentrações milimolares de zinco sobre a interação com proteoglicanos, vem do estudo de MULTHAUP et al. em 1995, que relataram que a proteína precursora de amilóide (APP) se liga de forma saturável a heparina, um análogo funcional e estrutural do proteoglicano de heparan sulfato, pois apresenta dentro do seu domínio de carboidrato um sítio de alta afinidade pela heparina, e esta afinidade aumenta muito na presença de quantidades micromolares de zinco. Com isto os autores sugeriram que o zinco teria um papel na agregação de fibrilas de beta-amilóide.

No presente trabalho, a análise ultraestrutural pôde avaliar os amilóides encontrados no grupo TAD, e mostrou que as fibrilas encontradas estavam sempre nas adjacências de capilares sanguíneos, portanto estes amilóides estão próximos às células endoteliais, podendo estas serem a fonte da amiloidose. Em geral nos estudos realizados observou-se que as células (fibroblastos, células endoteliais,

células reticuloendoteliais, e células sanguíneas) que pareciam produzir depósitos protéicos anormais estavam sempre próximas aos depósitos de amilóide (HOROWITZ et al., 1965; FRANKLIN e PRAS, 1969), o que reforça a hipótese formulada. Os amilóides são proteínas fibrilares que se depositam no espaço extracelular, mas a fonte destas proteínas é ainda uma incógnita. Recentemente, uma grande quantidade de novas tecnologias tem contribuído para o estudo da estrutura do amilóide (microscopia de força atômica, ressonância nuclear magnética, etc.), e neste contexto a polimerização de monômeros solúveis em fibrilas amilóides e insolúveis é fundamental (RAMBARAN e LOUISE, 2008). As pesquisas (Mc PARLAND et al., 2000; EAKIN et al., 2006) tornaram conhecido que para a formação de uma fibrila amilóide existe a produção de intermediários. Vários estudos sobre intermediários na amiloidose (coletivamente chamados de oligômeros – PODLISNY et al., 1995) foram surgindo (LOMAKIN et al., 1996; HARPER et al., 1997; HARPER et al., 1999), e a idéia discutida foi que estes intermediários (termodinamicamente desfavoráveis) rapidamente progrediriam para o estado amiloidogênico, mais favorável. Estudos posteriores comentaram que oligômeros solúveis poderiam ser intermediários para formação de fibrilas na patologia de Alzheimer (De FELICE, et al., 2009; SAKOMO e ZAKO, 2010). Mais recentemente a biotecnologia (RAMBARAN e LOUISE, 2008) se interessou pela formação de fibrilas amilóides, e estudou fibrilas de beta-amilóides sintéticas que apareceram como estruturas alongadas, que se cruzavam sinuosamente formando tramas, e que apresentavam larguras de até 20 nm. Estas fibrilas estudadas são imagens muito similares as observadas no presente trabalho nos espaços perivasculares (local positivo para vermelho congo a microscopia de luz). Muito embora a formação de fibrilas seja ainda um assunto controverso, as fibrilas observadas no parênquima pineal no presente trabalho têm morfologia similar ao que se caracterizou na literatura como uma fibrila amilóide a microscopia eletrônica.

No presente trabalho a coloração pelo vermelho congo foi repetida do mesmo modo que foi utilizado em estudos anteriores no modelo de hiperzincemia (FEREZIN-PINTO e CORREA-GILLIERON, 2005, 2007), e, para complementar o estudo utilizou-se a técnica da tioflavina T. A técnica mais amplamente utilizada para a marcação do amilóide é a coloração pelo vermelho congo, mas a tioflavina T é bastante usada com o mesmo propósito, e por este corante as fibrilas amilóides apresentam-se fluorescentes. No caso da tioflavina T o corante é capaz de interagir

com amilóides que não estejam na conformação beta (HAWE et al., 2007). No entanto, estes corantes interagem basicamente com qualquer amilóide, não especificando um tipo bioquímico, porém, alguns autores discutem que haja alguma alteração na intensidade da fluorescência dependendo do tipo de conformação do amilóide. Atualmente os diferentes tipos de amilóides podem ser melhor diferenciados por imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos. No entanto, antigos métodos são ainda utilizados para diferenciar alguns tipos de amiloidose.

Recentemente, novos estudos trouxeram evidências de que a tioflavina T também podia tornar fluorescente os beta-oligômeros, os possíveis intermediários para a formação da fibrila de beta-amilóide (CAUGHEY e LANSBURY, 2003; De FELICE, et al., 2009). Em geral esses beta-oligômeros são evidenciados por anticorpos (KAYED et al., 2009; LAMBERT et al., 2007) mas há evidências de marcação intraneuronal de beta-oligômeros pela tioflavina T (CASAS et al., 2004; OAKLEY et al., 2006). Os oligômeros têm sido considerados como uma via alternativa na formação de amilóides, além da via da fibrilogênese (HAWE et al., 2007).

No presente trabalho, a coloração positiva pelo vermelho congo nos animais submetidos à TAD nas adjacências dos capilares sinusóides e pequenos capilares da glândula, mostrava birrefringência e após o pré-tratamento com o permanganato de potássio, a birrefringência se manteve. Isto evidenciou que o amilóide adquirido após a TAD, não se trata de um amilóide do tipo AA. Assim, novos estudos serão necessários para determinar a natureza química do amilóide neste caso. Os resultados tiveram como embasamento os estudos de WRIGHT et al. (1977), onde é possível diferenciar a amiloidose AA (amiloidose sistêmica) dos outros tipos através do pré-tratamento com o permanganato de potássio. Este tipo de metodologia simples foi usada no presente trabalho e mostrou um bom resultado. A afinidade do amilóide pelo vermelho congo, após incubação com o permanganato de potássio, é perdida, desaparecendo a birrefringência verde maçã sob microscopia de polarização, quando se trata de amiloidose do tipo AA (RIJSWIJK e VAN HEUSDEN, 1979).

A proteína amilóide A sérica (SAA - associada a amilóide do soro, o precursor das fibrilas AA) é uma proteína de fase inflamatória aguda, que circula no sangue em associação com a subclasse HDL3 de lipoproteínas. Durante uma inflamação, algumas citocinas (interleucina 1 (IL-1), 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral -TNF),

estimulam a síntese hepática da proteína AA. Os depósitos desta proteína são frequentes em órgãos parenquimatosos (LEVIN et al., 1972; GERTZ e KYLE, 1991; SHTRASBURG et al., 2005).

No presente trabalho foi possível observar pela técnica do Neo-Timm na pineal dos animais submetidos à TAD, varias marcações granulares, grânulos de prata metálica, que apareciam nas adjacências de capilares sinusóides e pequenos capilares. Estas eram áreas que à microscopia de luz, mostravam marcações pelo vermelho congo e tioflavina T. Assim, nestas áreas eram bastante visíveis granulações que possuem o metal zinco.

O método histoquímico para metais pesados foi descrito inicialmente por Timm, em 1958 (*apud* Danscher,1981). Essa técnica, denominada de método do Neo-Timm, tem sido extensivamente utilizada para a visualização da presença de metais de transição e metais do grupo IIb, em cortes de tecido. Além do zinco outros metais são detectados por esse método (cobre, ferro, cobalto e o níquel, e metais tóxicos: mercúrio, cádmio, chumbo, arsênico, bismuto, tálio, ouro e prata) (DANSCHER, 1981). Com a técnica esses metais formam sulfetos de metais insolúveis, que permanecem nos locais de origem. Embora o método detecte a presença de metais pesados, é provável que somente alguns dos compostos de metais dos tecidos sejam evidenciados pela revelação, já que muitos complexos de metais não estão disponíveis para reagirem com o sulfeto. O princípio do método está embasado na conversão do íon metálico no tecido em moléculas de sulfeto metálico, sobre os quais a prata metálica se deposita (DANSCHER, 1981; HAMANI, 2005). Deste modo, após a incubação dos cortes na solução reveladora, os locais onde está o sulfeto correspondem aos depósitos de metais pesados. Ao nível de microscopia de luz, a marcação pelo Neo-Timm é complementar a obtida com o método do TSQ, mas o Neo-Timm apresenta uma maior resolução, e pode demonstrar a presença de zinco dentro de grânulos, como ocorre por exemplo na glândula submandibular (FREDERICKSON, 1987 *apud* KOH et al., 1996).

Normalmente, o zinco que é histoquimicamente reativo ao TSQ é o zinco vesicular, que no encéfalo corresponde de 5 a 15% do conteúdo de zinco no cérebro (PALMITER et al., 1996). No entanto, há evidências sugestivas de que algum zinco ligado às metalotioneínas (MT- III) também possa reagir ao TSQ, um corante que pode penetrar facilmente pelas membranas celulares e corar o zinco fracamente

ligado (MASTERS et al., 1994). Assim, o TSQ poderia corar tanto o zinco vesicular quanto o fracamente ligado, inclusive o citoplasmático.

Resultados de um estudo sobre encéfalos de camundongos mutantes para a APP, mostraram que zinco corável pelo TSQ seria o zinco presente em depósitos amilóides definitivos e coráveis pelo vermelho congo, porém este zinco não estaria presente em depósitos pré-amilóides tipo beta (LEE et al., 1999). Associados a resultados obtidos em cérebros humanos com Alzheimer, que também apresentavam zinco quelável em placas senis (SUH et al., 1996), os autores sugeriram que a presença de zinco quelável seria uma característica universal das placas de amilóide coráveis pelo vermelho congo.

Pela técnica do TSQ observou-se na glândula pineal dos animais submetidos à TAD uma expressiva marcação fluorescente azul brilhante, em marcações difusas pelo parênquima e intensas ao redor de capilares. Os controles apresentaram uma marcação bastante tênue. Na pineal as marcações apareceram também em células (pinealócitos) das pseudorosetas (arranjos celulares ao redor de capilares - FERREIRA-MEDEIROS e CORREA-GILLIERON, 2004). A marcação positiva ao TSQ pode estar evidenciando qualquer dos dois tipos de zinco citados, vesicular e/ou fracamente ligado. Considerando que a marcação do zinco pelo TSQ nos controles era menos evidente, sugere-se que parte desse zinco marcado seja devido à hiperzincemia. Este zinco fluorescente na adjacência dos capilares pineais nos animais submetidos à TAD, pode estar associado ao amilóide.

O motivo desta deposição do metal nas adjacências dos capilares pode ser devido a alterações no sistema de transportadores de zinco para dentro da célula (alterações no mecanismo de transporte ou por saturação destes), de modo que uma parcela do zinco poderia ser absorvida e outra não, ocorrendo um acúmulo desse metal do lado de fora, no espaço perivascular, na mesma região onde a amiloidose vascular é observada. Tanto a marcação pelo TSQ (fluorescente difusa) quanto pelo Neo-Timm (com grânulos) indicam esta possibilidade.

Foi sugerido que um excessivo influxo do zinco pela membrana plasmática, através dos canais de cálcio, induz a morte neuronal (WEISS et al., 1993). Esta depende da concentração de zinco extracelular (entre 300 μ M e 1 mM). Foi sugerido que os canais de cálcio devem ter um papel importante na rota de toxicidade para o zinco, enquanto que os canais NMDA possuem um papel bem menor nesse evento (CANZONIEIRO et al., 1999). Pequenas elevações na concentração de zinco podem

produzir danos em muitos processos celulares, no qual ele participa (BAUDIER et al., 1983; SHUMILLA et al., 1998), e, especificamente na angiopatia amilóide cerebral (FRIEDLICH et al., 2004), foi sugerido que a atividade aumentada de ZnT-3 favoreça a amiloidose porque estaria indiretamente relacionada com as alterações da concentração de zinco no espaço perivascular.

Efeitos gastrointestinais como náuseas, vômitos, cólicas e diarreia que poderiam refletir em perda de apetite e perda de peso foram descritos em humanos após super exposição ao zinco (YIN et al., 1985). No entanto, nas ratas submetidas à TAD não foi vista nenhuma alteração alimentar significativa. Igualmente, a perda de peso nas ratas submetidas à TAD foi insignificante. Estes resultados corroboram relatos sobre ausência de perda de peso em ratos, gado e coelhos submetidos respectivamente a diferentes doses de zinco (174, 191 e 326,7 mg de zinco/Kg/dia) (OPRESKO, 1992). Com os resultados do presente trabalho, inferiu-se que o excesso de zinco não atuou sobre o comportamento alimentar dos animais (e também não houve nenhum efeito antidipsogênico - a água era *ad libitum*) e, em relação a um processo de emagrecimento por distúrbio metabólico causado pela hiperzincemia, a perda de peso não foi estatisticamente significativa, (até o período em que foi avaliada), apesar de que devem estar existindo alterações metabólicas graves. Possivelmente, ou a perda de peso ainda não se evidenciou, ou a alimentação foi suficiente para compensá-la até a 10ª dose hiperzincêmica.

Para os controles, de modo semelhante, nenhuma variação estatisticamente significativa foi observada na comparação entre os controles que receberam salina e o grupo controle neutro (animais que não recebiam nenhum tipo de composto por via oral), indicando, portanto, que a administração de solução salina não implicou em nenhuma alteração estatisticamente significativa no comportamento alimentar ou no peso dos animais.

Os animais (sob o modelo de hiperzincemia utilizado no presente trabalho), já haviam sido testados em estudos anteriores em labirinto de campo aberto, usando um labirinto desenvolvido com características especiais para testar o *rearing* em conjunto com a ambulação (o que corresponde à avaliação da atividade motora), e mostrado que existia uma diminuição da atividade motora nos animais sob hiperzincemia (FEREZIN-PINTO, 2007; SALES, 2007). O labirinto de campo aberto tem sido usado desde 1976 (WALSH e CUMMINS) como modelo para estudo da atividade ambulatória em roedores, em especial em estudos que testavam drogas

psicoestimulantes - que aumentavam a atividade ambulatoria e a atividade motora (MAYER e ROSENBLATT, 1977). O presente trabalho repetiu este tipo de teste para reforçar os dados já obtidos, e assim confirmar resultados anteriores que apontavam para o comprometimento da atividade motora. Isto se evidenciou nas análises onde as ratas submetidas à TAD, a partir da sessão testes 2 (ST2 – entre a 4ª e 5ª dose de ZnSO₄), ambulavam menos no labirinto quando comparadas com as ratas do grupo controle. Esse padrão permaneceu constante até o final do experimento. De modo semelhante, estes animais diminuía a quantidade de *rearing* realizados, também a partir da sessão testes 2, e ao final do experimento (após a 10ª dose) deixaram de executar o movimento *rearing*, enquanto as ratas do grupo controle executavam o *rearing* na mesma quantidade ao longo do experimento. Portanto, nos animais do GTAD houve realmente diminuição da atividade motora, com o excesso de zinco administrado, e, já após a administração da 4ª dose de sulfato de zinco. Estes resultados corroboram outros estudos que sugeriram, em ratas albinas (com outro tipo de abordagem) a diminuição da ambulação e do número de *rearing* efetuados, além de outras alterações comportamentais, em situações onde há alterações na concentração de cobre e zinco no organismo (BARANSKI, 1986), e, estudos com a exposição ao acetato de zinco e a 2,5-hexadiona (o principal metabólito neurotóxico do n-hexano, que se liga a grupos amino da lisina nos filamentos axonais formando 2,5-dimetilpirrol – o metabólito responsável pela neurotoxicidade) onde houve comprometimento da atividade locomotora e o *rearing* de ratas (MATHEUS e BATORÉU, 2002).

De acordo com a literatura, o comportamento exploratório e a atividade locomotora de animais cessam quando o animal se ambienta (MATAQUEIRO, 2004). Porém, o tipo de teste utilizado no presente trabalho (com sessões de ambientação prévias) e a comparação com os controles que apresentaram a ambulação normal e constante durante todas as sessões testes, e continuaram a fazer *rearing*, permitiu inferir que a hiperzincemia provocada realmente altera a atividade motora nas ratas adultas jovens. As alterações observadas na atividade motora sob hiperzincemia podem estar refletindo alterações metabólicas, efetivas ou passageiras, que levam os animais a fraqueza geral e apatia.

Com os resultados obtidos no presente estudo foi possível comprovar que os animais submetidos ao modelo experimental de hiperzincemia apresentaram um aumento na concentração de zinco na glândula pineal quando comparados aos

animais do grupo controle e esse aumento gerou um desequilíbrio homeostático na em diversos elementos químicos analisados na glândula pineal. Os animais submetidos a esse modelo apresentaram estruturas fibrilares com características de fibrilas de amilóide, principalmente nos espaços perivasculares na glândula pineal, próximas às células endoteliais. Essas eram áreas onde era vista marcação positiva para amilóide (pela coloração por vermelho congo e Tioflavina T) e para zinco (TSQ e Neo-Timm).

Sendo assim, ratas wistar submetida a 600 mg/kg de $ZnSO_4$ apresentam uma acúmulo de zinco na glândula pineal onde desenvolvem amiloidose (não AA), principalmente vascular e as áreas positivas para amilóide se correlacionam com áreas positivas para zinco. O excesso de zinco na glândula pineal causa um desequilíbrio homeostático em diversos elementos químicos bem como uma diminuição na atividade motora desses animais.

Esses achados indicam um possível papel prejudicial do excesso de zinco ao organismo e comprovam a importância do equilíbrio homeostático dos elementos químicos para o bom funcionamento do mesmo.

6. CONCLUSÕES

Foi possível concluir com os resultados do presente trabalho :

- A hiperzincemia avaliada pela técnica do TXRF quantificou um aumento substancial (30%) (desequilíbrio homeostático) na concentração de zinco na glândula pineal das ratas jovens. Considerando que não houve alteração estatisticamente significativa na excreção de zinco endógeno e na concentração de zinco no soro sanguíneo, estes dados favorecem a hipótese de que o zinco em excesso é absorvido pelos tecidos, especialmente pela pineal, onde se acumula. Este aumento na absorção pode estar ocorrendo por alterações na via de transportadores de zinco e/ou na via de difusão facilitada. Este excesso de sulfato de zinco por via oral causou também desequilíbrio homeostático em outros elementos químicos analisados: ferro, cálcio, potássio, cloro, manganês, titânio, enxofre (estes em correlação direta com o aumento de zinco) e fósforo e níquel (em correlação inversa). No caso do ferro e do potássio sugere-se na pineal uma hemossiderose e uma hipercalemia, respectivamente.
- As análises do soro sanguíneo mostraram que a concentração de ferro varia em correlação inversa com o aumento do zinco, ao contrario dos elementos enxofre, potássio, cloro que aparecem aumentados no soro. Assim, o resultado do ferro no soro pode favorecer a hipótese de hemossiderose.
- O desequilíbrio homeostático do fósforo (em correlação inversa com o aumento de zinco), sem hipofosfatemia, pode estar relacionado apenas com o desequilíbrio homeostático do cálcio. E, o aumento da concentração de manganês (correlação direta com a hiperzincemia) na glândula pineal pode ter favorecido este desequilíbrio homeostático do cálcio, talvez causando uma disfunção mitocondrial, situação que é favorecida por excesso de manganês.
- Considerando o papel modulador do níquel em reações enzimáticas sugere-se que a expressiva diminuição deste íon na glândula pineal (em correlação inversa com o aumento de zinco) possa comprometer importantes reações químicas de defesa do organismo e aumentar os efeitos deletérios para o animal.

- A microscopia eletrônica evidenciou que estruturas fibrilares com características de fibrilas de amilóide apareciam principalmente nos espaços perivasculares na glândula pineal, próximas às células endoteliais, podendo ser o amilóide vascular observado nos animais submetidos à Terapia de Alta Dose. Estes depósitos amilóides não deram reação positiva para identificá-los como do tipo AA. Marcações para o zinco na pineal no grupo GTAD, apareciam em correlação com as áreas positivas para amilóide.
- A hiperzincemia experimental não implicou em alterações no comportamento alimentar e no peso corporal das ratas jovens, porém, causou diminuição da atividade motora.

7. BIBLIOGRAFIA

ACKLAND, M. L.; DANKS, D. M.; McARDLE, H. J. Studies on the mechanism of zinc uptake by human fibroblast. **J. Cell. Physiol.**, v. 135, p. 521-526, 1988.

ACKLAND, M. L.; MCARDLE, H. J. Significance of extracellular zinc-binding ligands in the uptake of zinc by human fibroblasts. **J. Cell. Physiol.**, v. 145, p. 409-413, 1990.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; WATSON, J. **Biologia Molecular da Célula**, 3ed., Porto Alegre; Artmed, p.111-118, 1994 in XAVIER F. **Amiloidose – Revisão bibliográfica**, 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade da Beira Interior, Portugal, 2008.

ALEN, L.H. Zinc and micronutrient supplements for children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p. 495-498, 1998.

ALVES, C. R.; CIPOLLA-NETO, J.; NAVARRO, M. J.; et al. Melatonin and sleep in children. **Pediatria**, v. 20, p. 99-105, 1998.

ANDRADE, G. C.; SILVEIRA, R. L.; JUNIOR, N. P.; et al. Angiopatia amilóide cerebral simulando tumor cerebral. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 64, n. 1, p. 153-156, 2006.

ASCENSÃO, M.; FIGUEIREDO, H.; ONTES J.; et al. Non-familial systemic amyloidosis. **Medicina Interna**, v. 4, n. 3, p. 156-162, 1997.

ATYABI, N.; GHARAGOZLOO, F.; NASSIRI, S. M. The necessity of iron supplementation for normal development of commercially reared suckling calves. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 15, n. 3, p. 165–168, 2006.

ATWOOD, C. S.; MOIR, R. D.; HUANG, X.; et al. Dramatic aggregation of Alzheimer a beta by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 21, p. 12817-12826, 1998.

AWAD, A.; GOVITRAPONG, P.; HAMA, Y.; et al. Presence of a metallothionein-like protein in the bovine pineal gland. **J. Neural Transm.**, n.75, p.129-144, 1989.

BARANSKI, B. Effect of maternal cadmium exposure on postnatal development and tissue cadmium, copper and zinc concentrations in rats. **Archives of toxicology**, v.58, n. 4, p. 255-260, 1986.

BAUDIER, J.; HAGLID, K.; HAIECH, J.; et al. Zinc ion binding to human brain calcium binding proteins, calmodulin and S100b protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 114, n. 3, p. 1138-1146, 1983.

BÉLAVÁRI, C. S.; ANDRÁSI, E.; MOLNÁR, Z.; et al. Determination of alkali metals in control and AD brain samples by different techniques. **Microchemical Journal**, v.79, p. 367-373, 2005.

BÉLY, M. Differential diagnosis of amyloid and amyloidosis by histochemical methods of Romhányi and Wright. **Acta Histochem.**, v. 105, n. 4, p. 361-365, 2003.

BENNHOLD H. Eine spezifische Amyloid färbung mit Kongorot. **München Medisiner Wochenschrift**, v. 69, p.153, 1922, in: HAZENBERG, B. P.; RIJSWIJK, M. H. Clinical and Therapeutic aspects of AA amyloidosis. **Baillière's Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 661-690, 1994.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Nature Reviews**, v. 4, p. 517-529, 2003.

BLOOM, W. L. Carbohydrates and water balance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 20, p. 57, 1967.

BOBILYA, D. J.; GAUTHIER, N. A.; KARKI, S.; et al. Longitudinal changes in zinc transport kinetics, metallothionein and zinc transporter expression in a blood-brain barrier model in response to a moderately excessive zinc environment. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, n. 2, p.129-137, 2007.

BOHIC, S.; SIMIONOVICI, A.; ORTEGA, R.; et al. Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on single cells. **Nuclear Instr. Meth. Phys. Research B**, v. 181, p.728-733, 2001.

BOHL, J.; STORKEL, S.; STEINMETZ, H. Involvement of the central nervous system and its coverings in different forms of amyloidosis. **Prog. Clin. Biol. Res.** v. 317, p.1007-1019, 1989.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Iron increases, hereditary hemochromatosis and HFE gene disorders: what do we know of the Brazilian population? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, 2007.

BRADBURY, M. W.; DEANE, R. Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology*, v. 14, n. 2-3, p. 131-136, 1993.

BROWN, E. B.; AISEN, P.; FIELDING, J.; et al. *Proteins of Iron Metabolism*, Grune & Stratton, New York, 1977.

BUDAVARI, S. **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 11 ed. Rahway, NJ: Merck and Co., 1989.

BUSH, A. I.; PETTINGELL, W. H.; MULTHAUP, G.; et al. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. **Science**, v. 265, n. 5177, p.1464-1467, 1994.

BUSH, A. I.; Metals and neuroscience. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 4, n. 2, p. 184-191, 2000.

CALVO, J.; BOYA, J. Embryonic development of the rat pineal gland. **Anat. Rec.**, v. 200, n. 4, p. 491-500, 1981.

CALVO, J.; BOYA, J. Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. **J.Anat.**, v. 138, n. 3, p. 405-409, 1983.

CALVO, J.; BOYA, J. Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. **J. Anat.**, v. 138, n. 1, p. 45-53, 1984.

CALVO J.; BOYA J.; BORREGON A., et al. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. **J. Anat.**, v. 220, p. 424-428, 1988.

CAMPBELL, A.; SMITH, M. A.; SAYRE, L. M.; et al. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. **Brain Resear. Bull.**, v. 55, n. 2, p. 125-132, 2001.

CANZONIERO, L. M.; TURETSKY, D. M.; CHOI, D. W. Measurement of intracellular free zinc concentrations accompanying zinc-induced neuronal death. **J. Neurosci.**, v.19, n. 19, p. 1-6, 1999.

CAUGHEY, B.; LANSBURY, P. T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26. p. 267-298, 2003.

CASAS, C.; SERGEANT, N.; ITIER, J. M.; et al. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. **Am. J. Pathol.**, v. 165, n. 4, p. 1289-300, 2004.

CHRISTIAN, P.; KHATRY, S. K.; YAMINI, S.; et al. Zinc supplementation might potentiate the effect of vitamin A in restoring night vision in pregnant Nepalese women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1045-1051, 2001.

COHEN, A. S., CALKINS, E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid in diverse origins. **Nature** v. 183, p. 1202-1203, 1959.

COHEN, A. S.; CALKINS, E. The isolation of amyloid fibrils and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. **J. Cell. Biol.**, v. 21, p. 481-486, 1964.

COHEN, A. S.; SHIRAHAMA, T.; SKINNER, M. Electron microscopy of proteins. London, J.R.Harris, p. 165, 1982 in INOUE, S; KISILEVSKY, R. Situ Electron Microscopy of Amyloid Deposits in Tissues. **Methods in Enzymology**, v. 309, p. 496-509, 1999.

COUSINS, R. J.; McMAHON R. J. Integrative aspects of zinc transporters. **Ame. Soc. Nutri. Sciences**, p. 1384-1387, 2000.

CRUZ, A. P. M; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, n. 1, p. 171-176, 1994.

CSABA, G.; BODOKY, M.; FISCHER, J. The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. **Experientia**, v. 22, n. 3, p. 168-169, 1966.

CUAJUNGCO M. P.; LESS G. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 4, p.137-169, 1997.

DAMANTE, C. A.; OSZ, K.; NAGY, Z.; et al. The metal loading ability of beta-amyloid N-terminus: a combined potentiometric and spectroscopic study of copper (II) complexes with beta-amyloid (1-16), its short or mutated peptide fragments, and its polyethylene glycol (PED)-ylated analogue. **Inorg. Chem.**, v. 47, n. 20, p. 9669-9683, 2008.

DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals. **Histochemistry**, v. 71, p. 1-16, 1981.

DE FELICE, F. G.; VIEIRA, M. N.; SARAIVA, L. M.; et al. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. **FASEB. J.**, v. 18, n. 12, p. 1366-1372, 2004.

DE FELICE, F. G.; VIEIRA, M. N.; BOMFIM, T. R.; et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 6, p. 1971-1976, 2009.

DORE-DUFFY, P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 16, p. 1581-1593, 2008.

DRAGO, D.; CAVALIERE, A.; MASCETRA, N.; et al. Aluminum modulates effects of β amyloid₁₋₄₂ on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Rej. Resea.**, v. 11, n. 5, 2008.

DUTRA, R. L.; CANTOS, G. A; PEROZIN, A. R.; et al. Determination of Zinc in blood serum by FAAS and its correlation with the stress condition. **Saúde em revista**, v. 6, n. 14, p. 31-37, 2004.

EAKIN, C. M.; BERMAN, A. J.; MIRANKER, A. D. A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 13, p. 202-208, 2006.

EANES E.D.; GLENNER G. G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 16, p. 673-677, 1968.

EIDE, D. Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. **Cur.Opin.Cell Biol.**, v. 9, n. 4, p. 573-577, 1997.

EMMERT, J. L.; BAKER, D. H. Zinc stores in chickens delay the onset of zinc deficiency symptoms. **Poultry. Sci.**, v. 74, p. 1011-1021, 1995.

ERIKSSON, K.; OSTIN, A.; LEVIN, J.O. Quantification of melatonin in human saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using stable isotope dilution. **J. Chroma. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 794, n. 1, p. 115-123, 2003.

FAVANO, A. Trace elements in human nutrition. **WHO Expert Committee**. 1ed., São Paulo; Roca, 1998.

FEREZIN-PINTO, C.; ARAÚJO, J. S.; CORREA-GILLIERON, E. M. Formação fibrosa no desenvolvimento da glândula pineal. XIX Reunião anual da federação da sociedade de biologia experimental, **FeSBE**, 2004.

FEREZIN-PINTO, C.; CORREA-GILLIERON, E. M. Experimental models of hyperzincemie in pineal gland. **Braz. J. Morphol. Sci.**, Supplement, p. 219, 2005.

FEREZIN-PINTO, C. Administração de uma dose excessiva de sulfato de zinco. I - influência no comportamento e metabolismo. II – alterações histopatológicas. **Monografia**, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

FEREZIN-PINTO, C.; SALES, N. S.; CORREA-GILLIERON, E. M. Histopathological alterations associated with excessive doses of zinc sulphate. **Braz. J. Morphol. Sci.**, Supplement, 2007.

FEREZIN-PINTO, C.; SERPA, R. F. B.; MARTINEZ, A. M. B.; CORREA-GILLIERON, E. M. Trace-Elemental Analysis in the Pineal Gland in association with an Amyloidosis induced by Zn. **Acta Microscopica**, v. 18, suplemento B, 2009.

FERREIRA-MEDEIROS, M.; CORREA-GILLIERON, E. Recognition of N-acetylglicosamine and Poly-N-acetylactosamine residues in vessels of the rat pineal gland. **Int. J. Morphol.**, v. 22, n. 4, p. 285-290, 2004.

FRANCIOOSI, C.; ROCHA, T. G.; VILELA, M. V.; et al. Concentration of iron and other blood serum components of holstein calves supplemented by iron dextran injections. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 53-57, 2009.

FRANSEN, A.; SCHOUSBOE, A. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. **J. Neurochem.**, v. 60, n. 4, p. 1202-1211, 1993.

FRANKLIN, D. Z.; FRANKLIN E. C. Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. **Ame. Journ. Patho.**, v. 59, n. 1, p. 23-40, 1970.

FRANKLIN, E. C.; PRAS, M. Immunologic studies of water-soluble human amyloid fibrils. Comparative studies of eight amyloid preparations. **J. Exp. Med.**, v. 130, n. 4, p. 797-808, 1969.

FRANKLIN, P. A.; PULLEN, R. G. L.; HALL, G. H. Blood brain exchange routes and distribution of Zn in rat brain. **Neurochem. Res.**, v. 17, p. 767-771, 1992.

FREDERICKSON, C. J.; KLITENICK, M. A.; MANTON, W. I.; et al. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. **Brain. Res.**, v. 273, n. 2, p. 335-339, 1983.

FREDERICKSON, C. J.; KASARKIS, E. J.; RINGO, D.; et al. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (boutsin zinc) in the brain. **J. Neurosci. Meth.**, v. 20, p. 91-103, 1987 in: KOH, J. Y.; SUH, S. W.; GWAG, B. J. et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science**, v. 272, p. 1013-1016, 1996.

FREDERICKSON, C. J. Neurobiology of zinc and zinc containing neurons. **Int. Rev. Neurobiology**, v. 31, p. 145-238, 1989.

FREDERICKSON C. J.; DANSCHER G. Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structure. **Prog. Brain Res.**, v. 83, p. 71-84, 1990.

FRIEDLICH, A. L.; LEE, J. Y.; GROEN, T. V.; et al. Neuronal zinc exchange with the blood vessel wall promotes cerebral amyloid angiopathy in an animal model of Alzheimer's disease. **J. Neuro.**, v. 24, n. 13, p. 3453-3459, 2004.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, n. 2, p. 199-203, 2006.

GARTNER, P. L.; HIATT, J. L. Atlas de histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, p. 251 – 252, 1999.

GENNARI, F. J. Disorders of potassium homeostasis. Hypokalemia and hyperkalemia. **Crit. Care. Clin.**, v. 18, n. 2, p. 272-288, 2002.

GERTZ, M. A.; KYLE, R. A. Secondary systemic amyloidosis: response and survival in 64 patients. **Medice**, v. 70, p. 246-256, 1991.

GLENNER, G. G.; TERRY, W.; HARADA, M.; et al. Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. **Science**, v. 172, p. 1150-1151, 1971.

GOOD, P. F.; PERL, D. P.; BIERER, L. M.; et al. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. **Ann. Neurol.**, v. 31, n. 3, p. 286-292, 1992.

GOTO, Y.; YAGI, H.; YAMAGUCHI, K.; et al. Structure, formation and propagation of amyloid fibrils. **Current. Pharma. Design**, v. 14, p. 3205-3218, 2008.

GREEN, C. B; BESHARSE, J. C; ZATZ, M. Tryptophan hydroxylase mRNA levels are regulated by the circadian clock, temperature and cAMP in chick pineal cells. **Brain Res.**, v. 28, n. 2738, p.1-7, 1996.

GRIDER, A.; VAZQUEZ, F. Nystatin affects zinc uptake in human fibroblasts. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 54, p. 97-104, 1996.

GUEFT, B.; GHIDONI, J.J. The site of formation and ultrastructure of amyloid. **Am. J. Pathol.**, v. 43, p. 837-854, 1963.

HACKER, G. W.; MUSS, W. H.; DANSCHER, G.; et al. Electron microscopical autometallography: immunogold-silver staining (IGSS) and Heavy-metal histochemistry. **Methods: companion methods enzy.** v. 10, p. 257-269, 1996.

HAMANI, C.; PAULO, I.; MELLO, L. E. A. M. Neo-Timm staining in the thalamus of chronically epileptic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 1677-1682, 2005.

HARPER H. A.; RODWELL V. W.; MAYES P. A. Manual de química fisiológica 5 ed, São Paulo; Atheneu, p. 601-623, 1982.

HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M.; et al. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. **Chem. Biol.**, v. 4, p. 119-125, 1997.

HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M.; et al. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 38, p. 8972-8980, 1999.

HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. **Pharma. Rese.**, v. 25, n. 7, p.1487-1499, 2007.

HAZENBERG, B. P.; RIJSWIJK, M. H. Clinical and Therapeutic aspects of AA amyloidosis. **Baillière's Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 661-690, 1994.

HENSLEY, K.; HALL, N.; SUBRAMANIAM, R.; et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 2146-2156, 1995.

HIGA S.; SUZUKI T.; SAKODA S.; et al. Disturbed function of the pineal gland in familial amyloid polyneuropathy. **Journal Neural Trans.**, v. 69, n. 1, p. 97-103, 2005.

HIRA, Y.; SAKAI, Y.; MATSUSHIMA, S. Quantitative light microscopic study on the heterogeneity in the superficial pineal gland of the rat. **Anat. Rec.**, v. 250, n. 1, p. 80-94, 1998.

HISSA, M. N.; LIMA, G. G.; SIMÕES, J. C.; et al. Melatonin and pineal gland. **REPM**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 1998.

HOCK, A.; DEMMEL, U.; SCHICHA, H.; et al. Trace element concentration in human brain. **Brain**, v. 98, p. 49-64, 1975.

HORNING, M. S.; BLAKEMORE, L. J.; TROMBLEY, P. Q. Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. **Brain Research**, v. 852, p. 56-61, 2000.

HOROWITZ, R. E.; STUYVESANT, V. W.; WIGMORE, W., et al. Fibrinogen as a component of amyloid. **Arch. Path.** v. 79, p. 238-244, 1965.

HUANG E. P. Metal ions and synaptic transmission: think zinc. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, p. 13386-13387, 1994.

HUANG, X.; CUAJUNGCO, M. P.; ATWOOD, C. S.; et al. Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1488-1492, 2000.

HUMBERT, W.; PÉVET, P. Calcium contents and concretions of pineal glands of young and old rats. **Cell Tissue Res.**, v. 263, p. 593-596, 1991.

HURLEY, L. S.; KEEN, C. L.; BALY, D. L. Manganese deficiency and toxicity: effects on carbohydrate metabolism in the rat. **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 97-104, 1984.

HUSBY G.; ARAKI S.; BENDITT E.P.; et al. WHO NOMENCLATURE SUB-COMMITTEE. Nomenclature of amyloid and amyloidosis. **Bulletin of the world health organization**, v. 71, n. 1, p. 105-108, 1993.

INOUE, S; KISILEVSKY, R. In Situ Electron Microscopy of Amyloid Deposits in Tissues. **Methods in Enzymology**, v. 309, p. 496-509, 1999.

JANSSEN, C. R.; De SCHAMPHELAERE, K.; HEIJERICK, D.; et al. Uncertainties in the Environmental Risk Assessment of Metals. **Hum. Ecol. Risk Assess.**, v. 6, p. 1003, 2000.

KAMBE, T.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; SASAKI, R.; et al. Overview of mammalian zinc transporters. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 1.p. 49-68, 2004.

KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 225, n. 1, p. 9-22, 2000.

KAYED, R.; PENSALFINI, A.; MARGOL, L.; et al. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 7, p. 4230-4237, 2009

KELLY, J. W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 101-106, 1998.

KHAN, M. F.; FALK, R. H. Amyloidosis. **Post. Grad. Med. J.**, v. 77, p. 686-693, 2001.

KHURANA, R.; UVERSKY, V. N.; NIELSEN, L.; et al. Is Congo red an amyloid-specific dye? **Journal Biolo. Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22715-22721, 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e Biologia celular – uma introdução à patologia. São Paulo; Elsevier, p. 524-528, 2004.

KING, J. C.; SHARMES, D. M.; WOODHOUSE, R. Zinc homeostasis in humans. **Journal Nutrition**, p. 1360-1366, 2000.

KLEIN, D. C; MOORE, R. Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. **Brain Res.**, v. 174, n. 2, p. 245-262, 1979.

KLOCKEMKAMPER, R. Total-Reflection X-Ray fluorescence analysis. **Wile-Interscience publication**, v. 140, p. 123, 1996.

KLOCKEMKAMPER, R; VON BOHLEN, A. Elemental analysis of environmental samples by total reflection fluorescent: a review. **X-Ray Spectrometry**, v. 25, p. 156-162, 1996.

KOH J. Y.; CHOI D. W. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 60, n. 4, p. 1049-1057, 1994.

KORF, H.W. The pineal organ as a component of the biological clock. **Ann Acad. Sci.**, v. 719, p. 13-42, 1994.

KOURY J. C.; DONANGELO C. M. Zinc, oxidative stress and physical activity. **Rev. Nutr.** v.1 6, n. 4, p. 433-441, 2003.

KREBS, N. F.; REINDINGER, C. J.; MILLER, L. V.; et al. Zinc homeostasis in breastfed. **Pediatr. Res.**, v. 39, p. 661-665, 1996.

KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Bases patológicas das doenças. Robbins & Cotran Patologia. 7 ed. São Paulo; Elsevier, p. 272-280, 2004.

LAMBERT, M. P.; VELASCO, P. T.; CHANG, L.; et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. **J. Neurochem.**, v. 110, n. 1; p. 23-35, 2007.

LAUAR, J. T.; ARAUJO, L. H. L; FIALHO E. L.; et al. Hypophosphatemia in chronic alcoholic patients. **J. Bras. Gastroenterol.**, v. 6, n. 1, p. 38-40, 2006.

LAZO, J. S.; KUO, S. M.; WOO, E. S.; et al. The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. **Chem. Biol. Interact.**, v. 11-112, p. 255-262, 1998.

LEE H. H. Zinc absorption in human small intestine. **American Journal of Phy.** v.256, p. 87-91, 1989.

LEE, J. Y.; MOOK-JUNG, I.; KOH, J. Y. Histochemically reactive zinc in plaques of the Swedish mutant β -amyloid precursor protein transgenic mice. **Journal Neuroscience**, v. 19, p. 1-5, 1999.

LEVIN, M. FRANKLIN, E. C.; FRANGIONE, B.; et al. The amino acid sequence of a major non-immunoglobulin component of some amyloid fibrils. **J. Clin. Invest.**, v. 51, p. 2773-2776, 1972.

LEWIN, B. Genes VII – Tratado do genética molecular. 7 ed. Porto Alegre; Art Med, p. 624-625, 2001.

LI, Y.; ZAMBLE, D. B. Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 10, p. 4617-4643, 2009.

LINDH, U. Cell biology, trace elements and nuclear microscopy. **Nuclear Instr. Meth. Phys. Research B**, v. 104, p. 285-291, 1995.

LIUZZI, J. P.; BLANCHARD, R. K.; COUSINS, R. J. Differential regulation of zinc transporter 1, 2 and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. **J. Nutr.**, v. 131.n. 1, p. 46-52, 2001.

LIUZZI, J. P.; COUSINS R. J. Mammalian zinc transporters. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 151-172, 2004

LOMAKIN, A.; CHUNG, D. S.; BENEDEK, G. B.; et al. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 1125-1129, 1996.

LOPES, S.; COSTA, A. ; AFONSO, A.; et al. Amiloidose AL ou AA – a propósito de um caso clínico. **O médico**, v. 123, p. 165-166, 1990 in: Ascensão, M.; Figueiredo, H.; Ontes, J.; et al. Non-familial systemic amyloidosis. **Medicina Interna**, v. 4, n. 3, p. 156-162, 1997.

LOVELL, M.A.; ROBERTSON, J.D.; TEESDALE, W.J.; et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **J. Neuro. Sciences**, v. 158, p. 47-52, 1998.

LUO, Z. R.; SCHULTZ, R. L.; WHITTER, E. F.; et al. Ultrastructural characterization of glial cells in the rat pineal gland with special reference to the pineal stalk. **Anat. Rec.**, v. 210, p. 663-674, 1984.

MACCIONI, R. B.; MUÑOZ, J. P.; BARBEIRO, L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Arch. Medi. Reser.**, v. 32, p. 367-381, 2001.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **Journal Nutrition**, v. 130, p. 1455-1458, 2000.

MARKUS, R. P.; AFECHE, C. S.; BARBOSA, E. M.; et al. Glândula pineal e Melatonina. Cronobiologia: princípios e Aplicações. 3ªed. Sao Paulo, EDUSP, 2003.

MASTERS, B. A.; QUAIFE, C. J.; ERICKSON, J. C.; et al. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. **J. Neurosci.**, v. 14, n.10, p. 5844-5857, 1994.

MATAQUEIRO, M. I. A comparative study of the sedative and antinociceptive effects of levomepromazine, azaperone and midazolam in laboratory animals. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.**, v. 56, n. 3, p. 340-345, 2004.

MATHEUS, M. L. S; BATORÉU, M. C. Evidence of zinc protection against 2, 5-hexanedione neurotoxicity: correlation of neurobehavioral testing with biomarkers of excretion. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 6, p. 747-754, 2002.

MATSUBARA, J. Alteration of radiosensitivity in metallothionein induced mice and a possible role of Zn-Cu-thionein in GSH-peroxidase system. **Exp. Suppl.**, v. 52, p. 603-612, 1987.

MATSUSHIMA, S.; REITES, R. J. Ultrastructural observations of pineal gland capillaries in four rodent species. **Am. J. Anat.**, v. 143, p. 265-282, 1975.

- MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Effects of intranasal zinc sulfate on open field and maternal behavior in female rats. **Physiology Behavior**, v. 18, n. 1, p. 101-109, 1977.
- MAYNARD, C. J.; CAPPALÀ, R.; VOLITAKIS, I.; et al. Chronic exposure to high levels of zinc or copper has little effect on brain metal homeostasis or Aβ accumulation in transgenic APP-C100 mice. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 29, n. 5, p. 757-767, 2009.
- McCREA, R.P.E; HARDER, S.L.; MARTIN, M.; et al. A comparison of rapid-scanning X-ray fluorescence mapping and magnetic resonance imaging to localize brain iron distribution. **European Jour. Radio.**, v. 68, n. 3, p. 1-5, 2008.
- McINTYRE, I. H.; JUDD, F. K.; NORMAN, T. R.; et al. Plasma melatonin levels in depression. **Aust. NZJ Psychiatry**, v. 20, p. 381-383, 1986.
- McNULTY, J. A.; FOX, L. M.; LISCO, S. J. Pinealocyte dense-cored vesicles and synaptic ribbons. A correlative ultrastructural – biochemical investigation in rats and mice. **J. Pineal Res.**, v. 4, p. 45-59, 1987.
- McPARLAND, V. J.; KAD, N. M.; KALVERDA A. P.; et al. Partially unfolded states of beta (2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. **Biochemistry**, v. 39, p. 8735-8746, 2000.
- MICHALCZYK, A. A.; ALLEN, J.; BLOMELEY, R. C.; et al. Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. **J. Biochem.**, v. 364, p. 105-113, 2002.
- MILATOVIĆ, D.; ZAJA-MILATOVIĆ, S.; GUPTA, R. C.; et al. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 240, n. 2, p. 219-225, 2009.
- MILIN, J.; DEMAJO, M.; TODOROVIC, V. Rat pinealocyte reactive response to a long-term stress inducement. **Neuroscience**, v. 73, n. 3, p. 845-854, 1996.
- MISHIMOTO, I.; OKAMOTO, T.; MATSUURA, Y.; et al. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G. **Nature**, v. 362, p. 75-79, 1993.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia Clínica*, 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p. 448-453, 2000.

MULTHAUP, G.; MECHLER, H.; MASTERS, C. L. Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc (II). **J. Mol. Recognit.**, v. 8, n. 4, p. 247-257, 1995.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis. **Wien. Klin. Wochenschr.** v. 118, p. 442-462, 2006

OAKLEY, H.; COLE, S. L.; LOGAN, S.; et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 40, p. 10129-10140, 2006.

OPRESKO D. M. Toxicity summary for zinc and zinc compounds. **May Oak Ridge Reservation Environmental**, 1992.

OSUMI, A. K.; TIEN, R. D.; FELSBURG, G. J.; et al. Cerebral amyloid angiopathy presenting as a brain mass. **Am. J. Neuroradiol.**, v. 16, p. 911-915, 1995.

OZAKI, Y.; LYNCH, H. J. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. **Endocrinology**, v. 99, n. 2, p. 641-644, 1976, a.

OZAKI, Y.; LYNCH, H. J.; WURTMAN, R. J. Melatonin in rat pineal, plasma, and urine: 24-hour rhythmicity and effect of chlorpromazine. **Endocrinology**, v. 98, n. 6, p. 1418-1424, 1976, b.

PALMITER, R. D.; FINDLEY, S. D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **Embo. J.**, v. 14, n. 4, p. 639 – 649, 1995.

PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; QUAIFFE, C. J. ZnT-3, putative transporter zinc into synaptic vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, n. 25, p. 14934-14939, 1996.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. **Pflugers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 744-751, 2004.

PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J. M.; et al. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 273, p. 2813-2838, 2006.

PAPASOZOMENOS, S. C. Astrocytes in the pineal gland the rats. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 45, p. 192-193, 1986.

PATTISON, S. E.; COUSINS, S. E. Kinetics of zinc uptake and exchange by primary cultures of rat hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. 677-685, 1986.

PEDERSEN, E. B.; FOX, L. M; CASTRO, A. J. Immunocytochemical and electron microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 272, n. 2, p. 257-265, 1993.

PEPYS, M. B. Amyloid P component and the diagnosis of amyloidosis. *J. Int. Med.*, v. 232, p. 519-521, 1992 in: ASCENSÃO, M.; FIGUEIREDO, H.; ONTES, J.; et al. Non-familial systemic amyloidosis. **Medicina Interna**, v. 4, n. 3, p. 156-162, 1997.

PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. **Brain Res.**, v. 337, n. 1, p. 91-98, 1985.

PERSON, O. C.; BOTTI, A. S.; FÉRES, M. C. L. C. Clinical repercussions of zinc deficiency in human beings. **Arq. Med. ABC**, v. 31, n. 1, p. 46-52, 2006.

PODLISNY, M. B.; OSTASZEWSKI, B. L.; SQUAZZO, S. L.; et al. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 9564-9570, 1995.

POLLYCOVE, M.; STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; et al. The Genetic Basis of Inherited Diseases, 4^a ed., McGraw-Hill, Nova York, p. 1133, 1978.

POWELL, S. R. A. The antioxidant properties of zinc. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1447-14454, 2000 a.

POWELL S. R. B.; SHAMES D. M.; WOODHOUSE L. Zinc homeostasis in humans. **J.Nutr.**, v. 130, p. 1360-1366, 2000 b.

POZZAN, T.; RIZZUTO, R. The renaissance of mitochondrial calcium transport. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5269-5273, 2000.

PRAS, M.; ZUCKER-FRANKLIN, D.; RIMON, A.; et al. Physical, chemical and ultrastructural studies of water-soluble human amyloid fibrils. Comparative analyses of nine amyloid preparations. **J. Exp. Med.**, v. 130, n. 4, p. 777-796, 1969.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in women, infants and children. **J. Am. Coll. of Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 113-120, 1996.

PUCHTLER, H.; SWEAT, F.; LEVINE, M. On the binding of Congo red by amyloid. **Journal Histo. Cytoche.**, p. 355-364, 1961.

RAMBARAN, R. N.; LOUISE, C. S. Amyloid Fibrils – Abnormal protein assembly. **Prion**, v. 2, n. 3, p. 112-117, 2008.

REDECKER, P. Dense accumulations of synaptic-like microvesicles in 'dark' pinealocytes of the gerbil pineal gland. **J. Neurocytol.**, v. 7, p. 572-581, 1993.

REITER, R. J. Pineal melatonin; cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Ver.**, v. 12, p.151-180, 1981.

REITER, R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 79, n. 1-3, p. 153-158, 1991.

REUSS, S. Components and connections of the circadian timing system in mammals. **Cell Tissue Res.**, v. 285, n. 3, p. 353-378, 1996.

RIJSWIJK, M. H.; VAN HEUSDEN, C. W. G. J. The potassium permanganate method. A reliable method for differentiating amyloid AA from other forms of amyloid in routine laboratory practice. **American Association of pathologists**, v. 16, p. 43-58, 1979.

RIO HORTEGA, P.D. Pineal gland in cytology and cellular pathology of the nervous system. W. Penfield, Hooper, New York, v. 2, p. 637-703, 1932.

ROWE, D. J.; BOBILYA, D. J. Albumin facilitates zinc acquisition by endothelial cells. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.**, v. 224, n. 3, p. 178-186, 2000.

SCHNITZER, J. E.; SUNG, A.; HORVAT, R.; et al. Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24544-24553, 1992.

SAKOMO, M.; ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. **FEBS J.**, v. 277, n. 6, p. 1348-1358, 2010.

SALES, N.S. Análise Comportamental Avaliada no Labirinto de Campo Aberto em Modelo Experimental Submetido ao Excesso de Sulfato de Zinco. Monografia, Faculdade de Fisioterapia, Centro Universitário Augusto Motta, 2007.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutr. Res.**, v. 20, p. 737-755, 2000.

SANDSTRÖM, B. Retention of zinc and calcium from the human colon. **American Journal of Clinical Nutrition.**, v. 44, p. 501-504, 1986.

SANTOS, A. P. M.; MILATOVIC, D.; A. U. C.; et al. Rat brain endothelial cells are a target of manganese toxicity. **Brain Res.**, [Epub ahead of print], 2010

SATO, S. M.; FRAZIER, J. M.; GOLDBERG, A. M. The distribution and binding of zinc in the hippocampus. **J. Neuroscience**, v. 4, n. 6, p. 1662-1670, 1984.

SCHARENBERG, K.; LISS, L. The histologic structure of the human pineal body. **Prog. Brain Res.**, v. 10, p. 193-217, 1965.

SENSI, S. L.; YIN, H. Z.; CARRIEDO, S. G.; et al. Preferential Zn⁺² influx through Ca⁺² permeable AMPA/kainite channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 2414-2419, 1999.

SERPA, R. F. B.; JESUS, E. F. O.; ANJOS, M. J. et al. Elemental concentration analysis in brain structures from Young, adult and old Wistar rats by total reflection X-ray fluorescence with synchrotron radiation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 1205-1209, 2008.

SHEN, H.; ZHANG, Y.; XU, J.; et al. Zinc distribution and expression pattern of ZnT3 in mouse brain. **Biol. Trace Elem. Res.**; v. 119, n. 2, p. 166-174, 2007.

SHIH-YEN, T.; McNULTY, J. A. Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. **Glia**, v. 20, p. 243-253, 1997.

SHIRAHAMA, T.; COHEN. A. S. Reconstitution of amyloid fibrils from alkaline extracts. **J. Cell. Biol.**, v. 35, n. 2, p. 459-464, 1967.

SHTRASBURG, S.; GAL, R.; GRUYS, E. et al. Na ancillary tool for the diagnosis of amyloid A amyloidosis in a variety of domestic and wild animals. **Vet. Pathol.**, v. 42, p. 132-139, 2005.

SHUMILLA, J. A.; WETTERHAHN, K. E.; BARCOWSKY, A. Inhibition of NF-kappa B binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 349, n. 2, p. 356-362, 1998.

SIBAROV, D.A.; KOVALENKO, R.I.; MALININ, V.V.; et al. Epitalon influences pineal secretion in stress-exposed rats in the daytime. **Neurpeptid. Lett.**, v. 23, n. 5, p. 473-475, 2002.

SIPE J. D; COHEN A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. **Journal of Structural Biology**, v. 130, p. 88-98, 2000.

SIPE J.; COHEN A. S. **Harrison Medicina Interna**, Amiloidose, Volume II, 16 ed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, p. 2123-2128, 2006.

SILVA, J. L.; LIMA, L. M. T. R.; FOGUEL, D. et al. Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. **Trends Biochem. Sci.**, v. 3, n. 3, 2008.

SINGH, R. P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. **JACM**, v. 5, n. 3, p. 218-225, 2004.

SKENE, J. D.; VIVIEN-ROELS, B.; SPARKS, D. L.; et al. Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. **Brain Res.**, v. 528, p. 170-174, 1990.

SLOOT, W. N.; VAN DER, A. J.; GRAMSBERGEN, J. B. Selective lesions by manganese and extensive damage by iron injection into rat striatum or hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 62, n. 1, p. 205-216, 1994.

SMITH C. A. M. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de psiquiatria**, v. 21, p. 3-7, 1999.

SORIANO, F. M.; GARCIA, C. C.; TORNER, A. R. Circadian and seasonal variations in pineal gland intercellular canaliculi in the White rat. **Histol. Histopath.**, v. 6, p. 387-393, 1991.

SOTOGAKU, N.; OKU, N.; TAKEDA, A. Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection. **J. Neurosci. Res.**, v. 61, n. 3, p. 350-356, 2000.

SPEICH, M.; PINEAU, A.; BALLEREAU, F. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. **Clin. Chim. Acta**, v. 312, n. 1-2, p. 1-11, 2001.

STEIN, C.; BUENO, O. F. A.; XAVIER, G. F. Rats do react to stimulus omission. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2423-2430, 1994.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, p. 922-932, 1989.

SUH, S. W.; GWAG, B. J. et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science**, v. 272, p. 1013-1016, 1996.

TAGUCHI, T.; KOSAKA, M.; MURAKAMI, S.; et al. Intensely negative-charged pericapillary spaces in the rat pineal gland. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 63, n. 5, p. 485-494, 2000.

TAKEDA, A. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. **BioMetals**, v. 14, p. 343-351, 2001.

TAKEDA, A.; SOTOGAKU, N.; OKU, N. Influence of manganese on the release of neurotransmitters in rat striatum. **Brain Res.**, v. 965, n. 1-2, p. 279-282, 2003.

TAMARKIN, L.; COHEN, M.; ROSELLO, D.; et al. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 12-dimethylbenzanthracene induced mammary tumors in the rat. **Cancer Res.**, v. 41, p. 4432-4436, 1981.

TAROHDA, T.; YAMAMOTO, M.; AMAMO, R. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 380, n. 2, p. 240-246, 2004.

TASMAN-JONES C. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos, 1992. In: WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. Tratado de medicina interna. 19 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, v. 1, p.1204-1207, 1992.

TAYLOR, J. G.; BUSHINSKY, D. A. Calcium and phosphorus homeostasis. **Blood Purif.**, v. 27, n. 4, p. 387-394, 2009.

TERRY, R. D.; GONATAS, N. K.; WEISS, M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. **Am. J. Pathol.**, v. 44, p. 269-297, 1964.

TIMM, F. Zur histochemie der schwermetalle das sulfide-verfahren. Dtsch Z. Gesamte Gerichtl Med., v: 46, p. 706-711, 1958 In: DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals. **Histochemistry**, v. 71, p. 1-16, 1981.

TOMIK, B.; CHWIEJ, J.; SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA; et al. Implementation of X- ray fluorescence microscopy for investigation of elemental abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurochem. Res.**, v. 31, p. 321-331, 2006.

TRICOIRE, H.; MOLLER, M.; CHEMINEAU, P.; et al. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. **Reprod. Suppl.**, v.61, p. 311-321, 2003.

TSAI, S.Y.; McNULTY, J.A. Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. **Glia**, v. 20, n. 3, p. 243-252, 1997.

TUYA, R.; GIL, P. E.; MARINO, M. M.; et al. Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace metals. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 73, p. 299-303, 1996.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiology Rev.**, v. 73, n. 1, p. 79-118, 1993.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 3, p. 687-721, 1998.

VIRCHOW, R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. **Arch. Pathol. Ana. Phy.**, v. 6, p. 135-138, 1854. In: SIPE J. D; COHEN A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. **Journal of Structural Biology**, v. 130, p. 88-98, 2000.

WAHID, M. A; FATHI, S.; ABOUL-KHAIR, M. R. Zinc in human health and disease. **Ric. Clin. Lab.**, v. 18, p. 9-16, 1988.

WALDHAUSER, F.; BOEPPLE, P. A; SCHEMPER, M.; et al. Serum melatonin in central precocious puberty is lower than in age-matched prepubertal children. **J. Endocrinol. Metab.**, v. 73, n. 4, p. 793-796, 1991.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WEISS, J.H.; HARTLEY, D.M.; KOY, J.Y.; et al. AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. **Neuron**, v. 10, p. 43-49, 1993.

WEISS, J.H.; SENSI, S.L.; KOH, J.Y. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 21, p. 395-401, 2001.

WEST, M. W.; WANG, W.; PATTERSON, J.; et al. De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 20, p.11211-11216, 1999.

WESTERMARK, G. T.; JOHNSON, K. H.; WESTERMARK, P. Staining methods for identification of amyloid in tissue. **Methods in Enzymology**, v. 309, p. 3-25, 1999.

WHITFIELD, D. M.; SARKAR, B. Heavy metal binding to heparin disaccharides.II.First evidence for zinc chelation. **Biopolymers**, v. 32, p. 597-619, 1992.

WHO. Trace elements in human nutrition. Tech. Rep. Ser. Geneva, n. 532,1973 in LINDH, U. Cell biology, trace elements and nuclear microscopy. **Nuclear Instr Meth Phy. Research B**, v. 104, p. 285-291, 1995.

WONG P.Y; FRITZE K. Determination by neutron activation of copper, manganese and zinc in the pineal body and other areas of brain tissue. **Journal of Neurochemistry**, v. 16, p. 1231-1234, 1969.

WORWOOD, M. Serum transferrin receptor assays and their application. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, n. 3, p. 221-230, 2002.

WRIGHT, J. R.; CALKINS, E.; HUMPHREY, R. L. Potassium permanganate reaction in amyloidosis. A histologic method to assist in differentiating forms of this disease. **Lab. Invest**, v. 36, p. 274-281, 1977.

YIN, T. A.; CHEN, X. C.; HE, J. S.; et al. Low levels of zinc in hair and blood, anorexia, and poor growth in Chinese preschool children. **Ame. Jour. Clinical Nutrition**. v. 42, p. 694-700, 1985.

ZATTA, P.; RASO, M.; ZAMBENEDETTI, P.; et al. Metallothionein I-II expression in young and adult bovine pineal gland. **J. Chemical Neuroanatomy**, v. 31, n. 2, p. 124-129, 2006.

ZATTA, P.; DRAGO, D.; BOLOGNIN, S.; et al. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. **Trends Pharm. Sciences**, v. 30, n. 7, 2009.

ZUCKER-FRANKLIN, D.; FRANKLIN, E. C. Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. **Ame. J. Pathology**, v. 59, n. 1, p. 23-40, 1970.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)