



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

***PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ELETROMECÂNICA CARDÍACA E REATIVIDADE VASCULAR***

TESE DE DOUTORADO

Edna Aparecida Silveira Almeida

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

Fevereiro, 2011



Exposição à baixa dose de acetato de chumbo por trinta dias aumenta a pressão arterial com alterações funcionais em anéis de aorta de ratos

Edna Aparecida Silveira Almeida

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

INTRODUÇÃO



Chumbo - Plumbum

➤ Características

➤ Tóxico, pesado, macio, maleável e mau condutor

➤ Coloração:

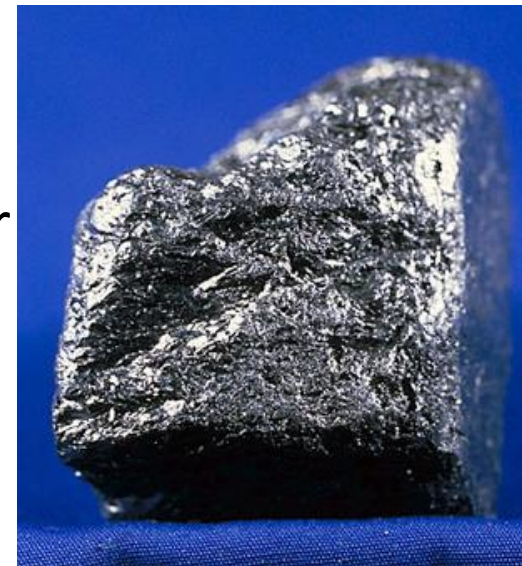
Branco-azulada → recentemente cortado

Acinzentada → exposto ao ar

➤ Utilização pelo homem

Egito Antigo

Idade Média



Chumbo - Pb

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026						
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122																	boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305																	aluminium 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80						
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [98]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	palladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29						
caesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	57-70 *	lutetium 71 Lu 174.97	hafnium 72 Hf 178.49	tantalum 73 Ta 180.95	tungsten 74 W 183.84	rhenium 75 Re 186.21	osmium 76 Os 190.23	iridium 77 Ir 192.22	platinum 78 Pt 195.08	gold 79 Au 196.97	mercury 80 Hg 200.59	thallium 81 Tl 204.38	lead 82 Pb 207.2	bismuth 83 Bi 208.98	polonium 84 Po [209]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]					
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	89-102 * *	lawrencium 103 Lr [262]	rutherfordium 104 Rf [261]	dubnium 105 Db [262]	seaborgium 106 Sg [266]	bohrium 107 Bh [264]	hassium 108 Hs [269]	meitnerium 109 Mt [268]	ununnium 110 Uun [271]	ununium 111 Uuu [272]	unubium 112 Uub [277]	ununquadium 114 Uuq [289]										

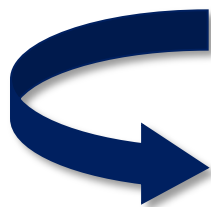
* Lanthanide series

** Actinide series

lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04
actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]

Chumbo – Pb²⁺

- Elemento tóxico de ocorrência natural
- Emissão na atmosfera: fontes naturais e antropogênicas
- Amplamente utilizado nas indústrias
- Seres humanos possuem chumbo em seu organismo
- Efeitos tóxicos sobre homens e animais



Alterações nos órgãos e sistemas

➤ Fontes de Chumbo:

Naturais

- Vulcanismo
- Desgaste da crosta terrestre
- Evaporação dos oceanos

Antropogênicas

- Combustíveis fósseis
- Dejetos industriais
- Mineração
- Pesticidas / Fungicidas

Saryan & Zen, 1994;

Moreira & Moreira, 2004;

Capitani, 2009.

➤ Fontes de exposição:

➤ Exposição ambiental

- Particulado na atmosfera
- Crosta terrestre
- Revestimento interno e externo das casas e edifícios
- Alimentos, bebidas e alguns medicamentos

➤ Exposição ocupacional

- Indústrias de baterias chumbo-ácidas
- Manufaturas de vidros coloridos
- Fábricas de tintas para plásticos
- Atiradores e instrutores de tiro ao alvo

WHO, 1995;
Mavropoulos, 1999;
Paoliello, 2001;
Capitani, 2009.

➤ Fontes de exposição:

Fontes Industriais

Fundições Primárias (refino de minério de chumbo) e Secundárias (fusão de sucatas ou barras de chumbo para fins variados)

Produção de ligas (bronze, latão)

Fabricação e recuperação de baterias

Esmaltação de cerâmicas

Fabricação de pigmentos e “fritas” para cerâmicas

Fabricação de PVC e outros plásticos

Indústria de borracha

Fabricação de cabos elétricos (elemento dielétrico)

Operação de corte e solda de peças e chapas metálicas contendo chumbo

Jateamento de areia de estruturas metálicas pintadas com tintas com chumbo (pontes, navios)

Solda eletrônica (Sn + Pb)

Produção de compostos orgânicos de chumbo

Fontes não industriais ou não ocupacionais

Bebidas alcoólicas (vinhos e destilados)

Uso de cristais finos e porcelana esmaltada

Utensílios de PVC

Fabricação caseira de “chumbadas” de pesca e cartuchos

Tinturas de cabelo

Prática de tiro ao alvo

Cerâmica artística caseira

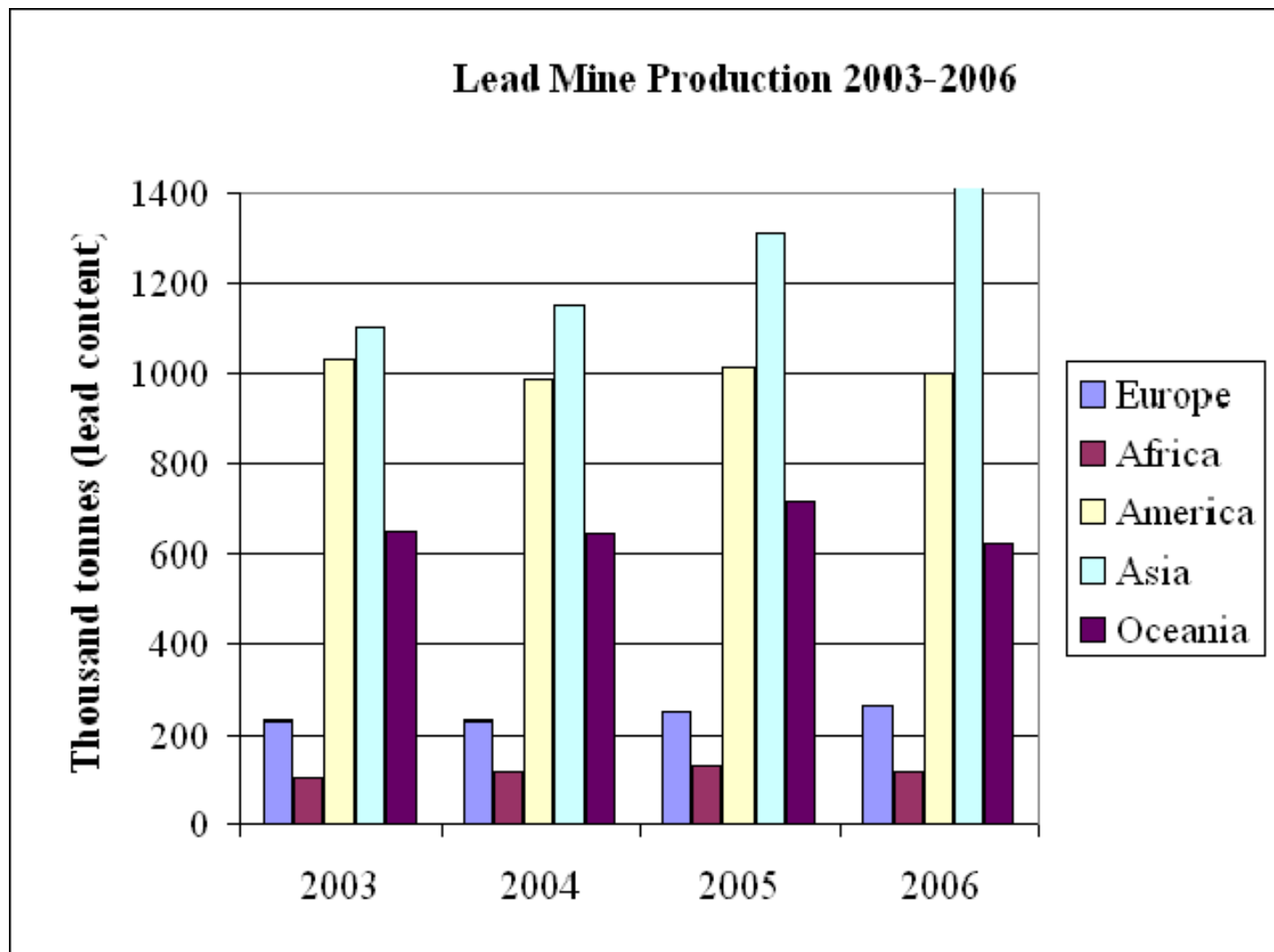
Projétil de arma de fogo alojado em articulações ou canal medular

Alimentos industrializados

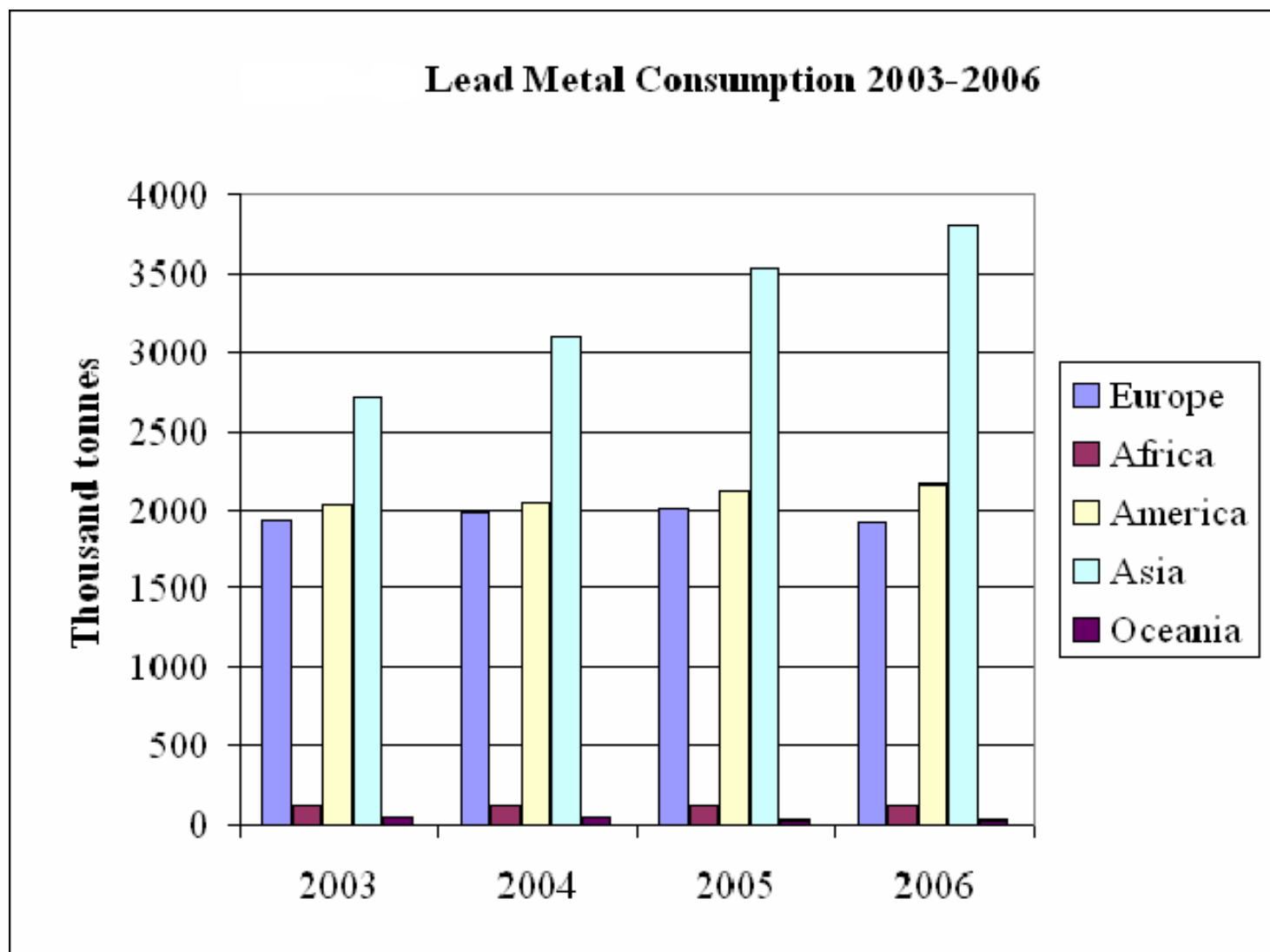
Tintas em brinquedos

Medicina chinesa e indiana

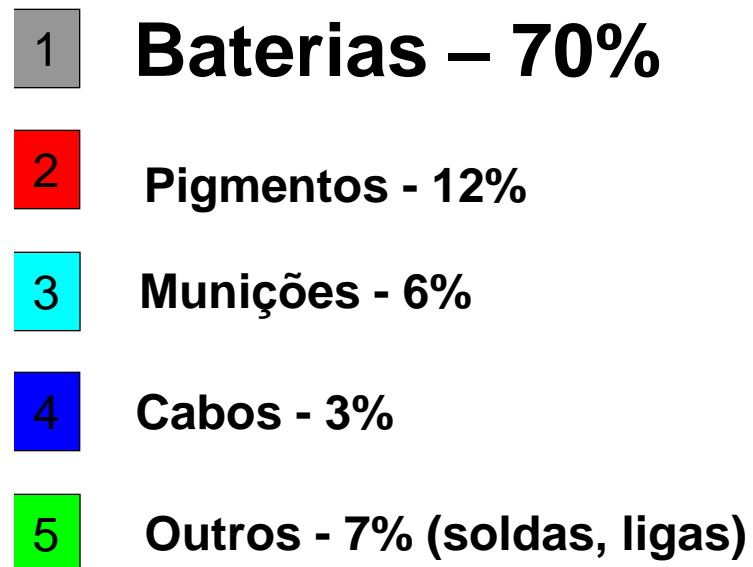
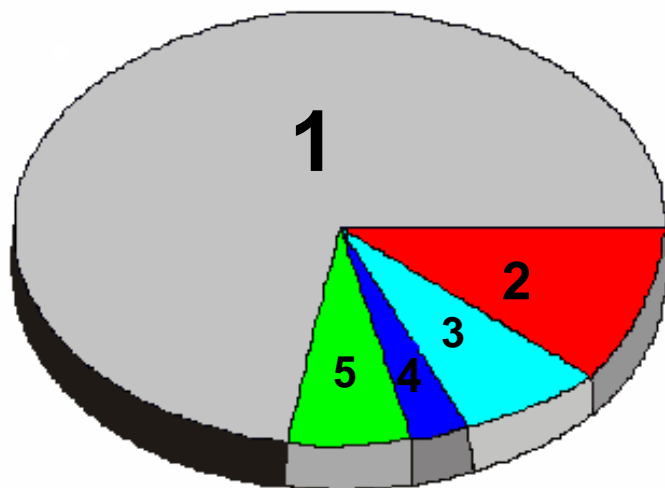
➤ Produção de Chumbo Metálico por Continentes



➤ Consumo de Chumbo Metálico por Continentes



➤ Consumo Mundial de Chumbo de 1997-2001



O chumbo é utilizado na fabricação de diversos materiais,
porém **não é metabolizado** pelos organismos.



Processos de **bioacumulação**, comprometendo os animais da
cadeia alimentar, inclusive o homem.

➤ Impacto ambiental causado pelo chumbo

- EUA: 23% amostras de águas superficiais: 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$
48% amostras de águas subterrâneas: 21 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

ATSDR, 1995

- Brasil: 1998 a 2000, amostras de águas superficiais do rio Ribeira e Ribeirão (PR e SP): 5 a 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ → **acima** dos valores estabelecidos pelo CONAMA: 3 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

Cunha et al, 2001

➤ Impacto ambiental causado pelo chumbo

➤ Santo Amaro da Purificação (BA):

Fábrica de mineração de chumbo → depositou aleatoriamente 490.000 toneladas de escória contaminada com chumbo → deposição nas áreas de suas instalações → solo e rios.

Essa empresa doou escória para prefeitura para pavimentação de ruas e fundações de casas.

Silvany-Neto, et al., 1989

Anjos, 1998

➤ Limites de tolerância biológica ao chumbo

➤ Brasil: A Norma Regulamentadora n° 7 (NR7) do Ministério do Trabalho em **1978** estabelece: Valor de Referência de normalidade e o Limite superior da normalidade (LBMP) para exposição ao chumbo.

VR: 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e LBMP: 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$

➤ *Internacionalmente: LBMP: 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$*

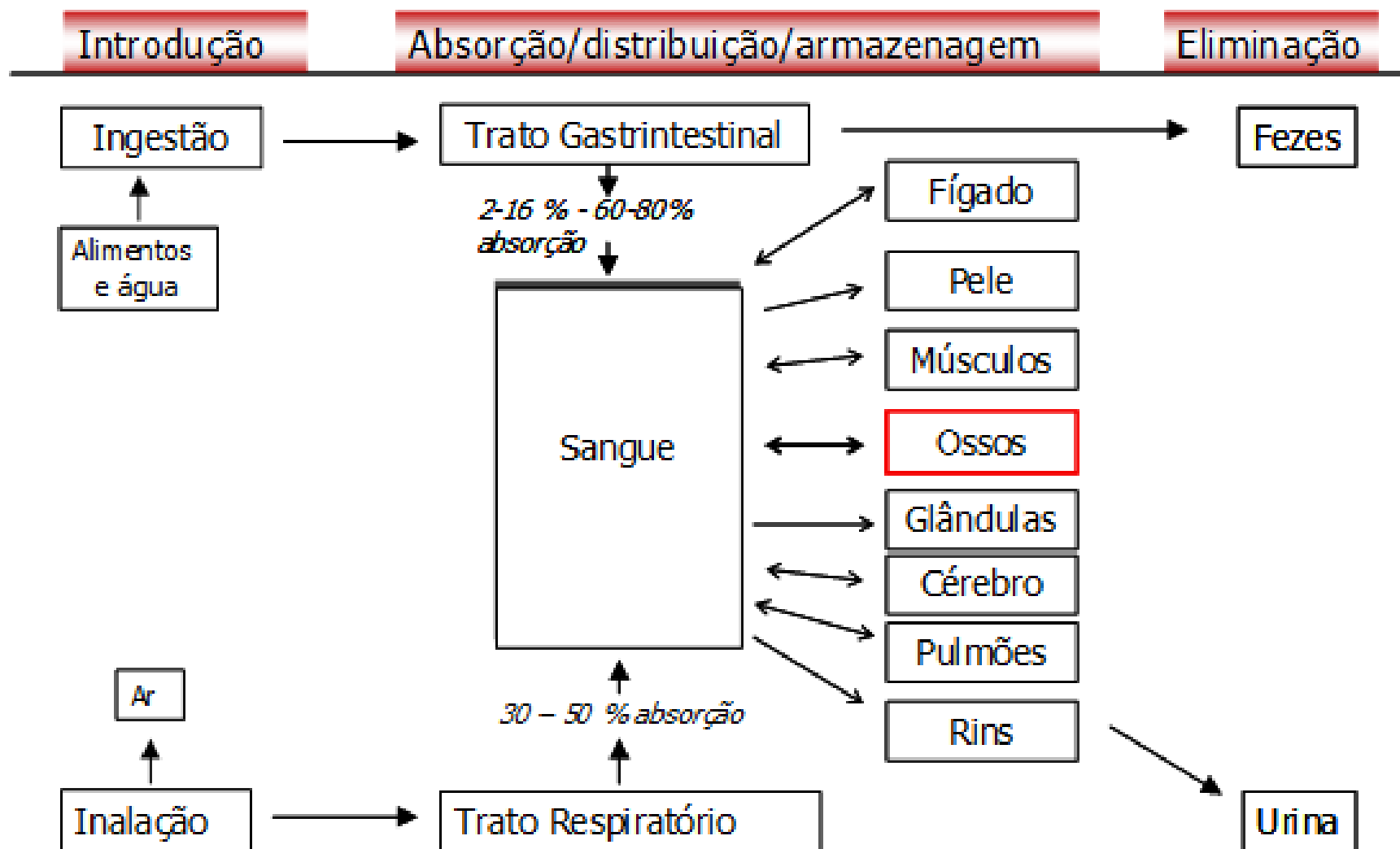
➤ Limites de tolerância biológica ao chumbo

- Center for Disease Control (1997): **10 µg/dL de Pb-S** como **valor de referência** para o gerenciamento de risco em crianças.
- Center for Disease Control (2005): concentrações **elevadas** de chumbo no sangue valores **≥ 10 µg/dL** para **todas** as idades.

➤ Limites de tolerância biológica ao chumbo

- Cordeiro *et al* (2003) avaliaram 20 operários de uma fábrica de acumuladores elétricos e sugerem que os limites de tolerância biológica ao chumbo sejam ajustados para **32 µg/dL**.
- 2007: American Conference of Government Industrial Hygienists dos Estados Unidos: **30 µg/dL** como Índice de Tolerância Biológica.

➤ Toxicocinética do chumbo



➤ Efeitos Tóxicos:



SNC

- Alterações no sistema nervoso periférico → adultos
- Encefalopatias → **crianças** e adultos

Alterações comportamentais

Déficit no aprendizado, redução do QI e na memorização

Reduz o crescimento físico e a estatura

Beyrs & Lord, 1943; Vivoli, et al., 1993 Saryan & Zen, 1994;
WHO, 1995; EPA, 1994; ATSDR, 2005; Dietrich, *et al.*, 2001;
NAHNES III, 2002; Lanphear *et al.*, 2005; Braun, *et al.*, 2008;

➤ **Efeitos Tóxicos:**



- Doença renal progressiva e irreversível
- Nefropatia → HA
- Esclerose glomerular
- Lesão do túbulo proximal

Saryan & Zen, 1995;
WHO, 1995;
Diamond, 2005;
Marsden, 2003.

➤ Efeitos Tóxicos:



SNC

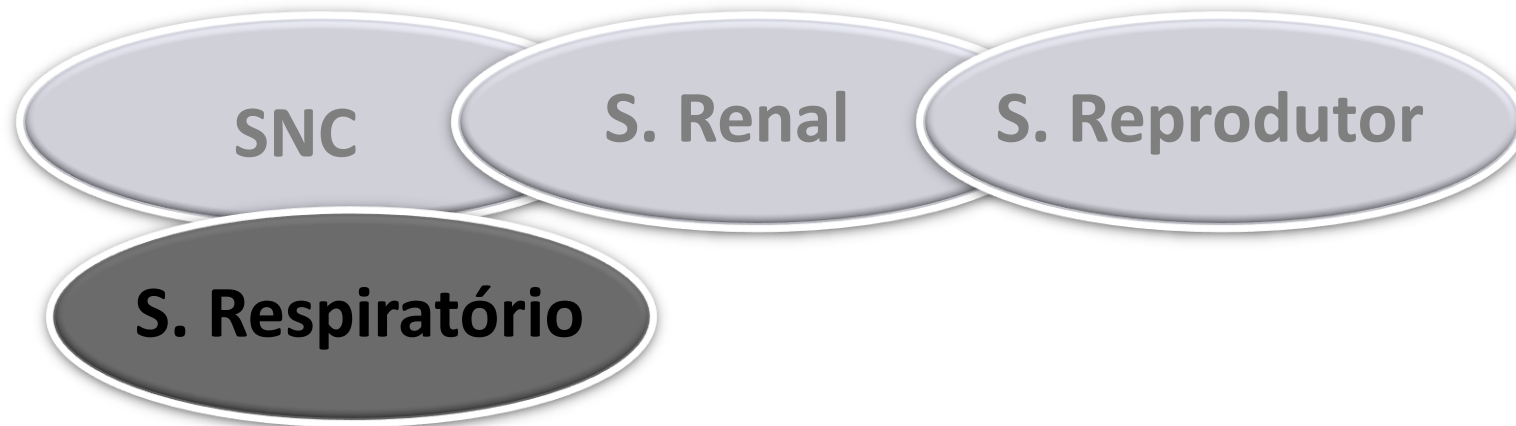
S. Renal

S. Reprodutor

- ↑ Abortos e partos de natimortos
- Danos fetais
- Baixo peso ao nascer e nascimento prematuro
- 40 a 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de Pb-S: ↓ da função reprodutiva dos homens;
- Infertilidade
- ↓ Libido

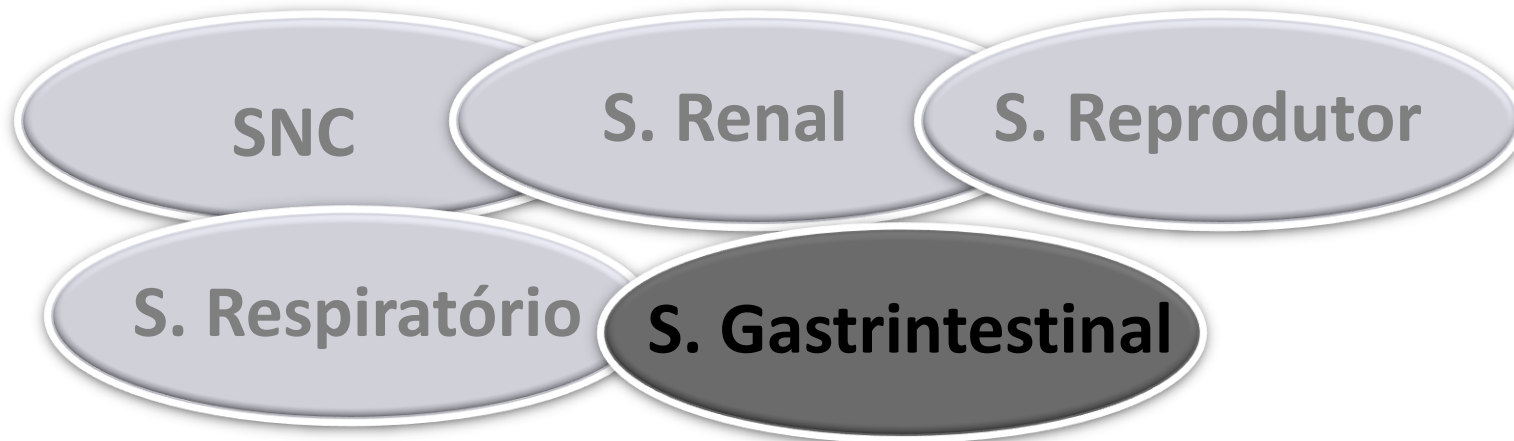
Goyer, 1991; ATSDR, 1992; Skerfving, 1993;
Saryan & Zen, 1994; WHO, 1995; ATSDR, 1999;
Levin, 2000.

➤ **Efeitos Tóxicos:**



➤ **Câncer de pulmão**

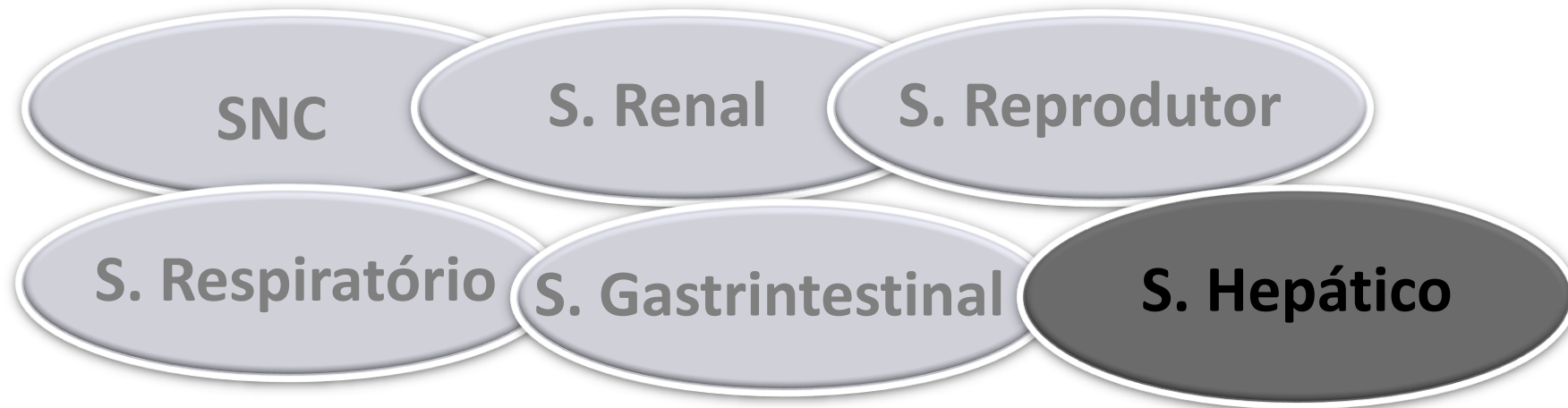
➤ Efeitos Tóxicos:



- Dores abdominais / diarréias;
- Hemorragia digestiva;
- Estomatite;
- Náuseas / vômitos;
- Linha azulada nas gengivas;

Saryan & Zen, 1995; WHO, 1995; ATSDR, 1999;
Skerfving, 1993; Tandon et al., 2001.

➤ Efeitos Tóxicos:



➤ Os efeitos do chumbo sobre a síntese do grupamento heme:
↓ a capacidade funcional do citocromo P-450 do sistema hepático.

➤ Efeitos Tóxicos:

SNC

S. Renal

S. Reprodutor

S. Respiratório

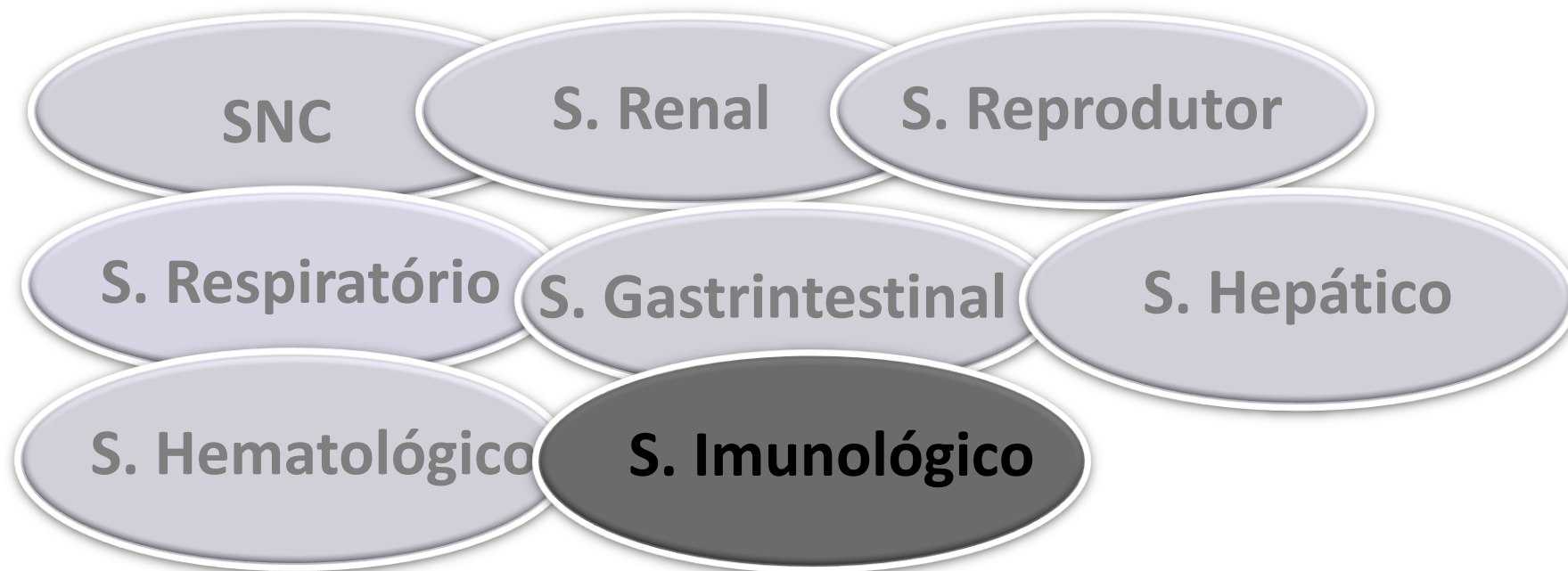
S. Gastrintestinal

S. Hepático

S. Hematológico

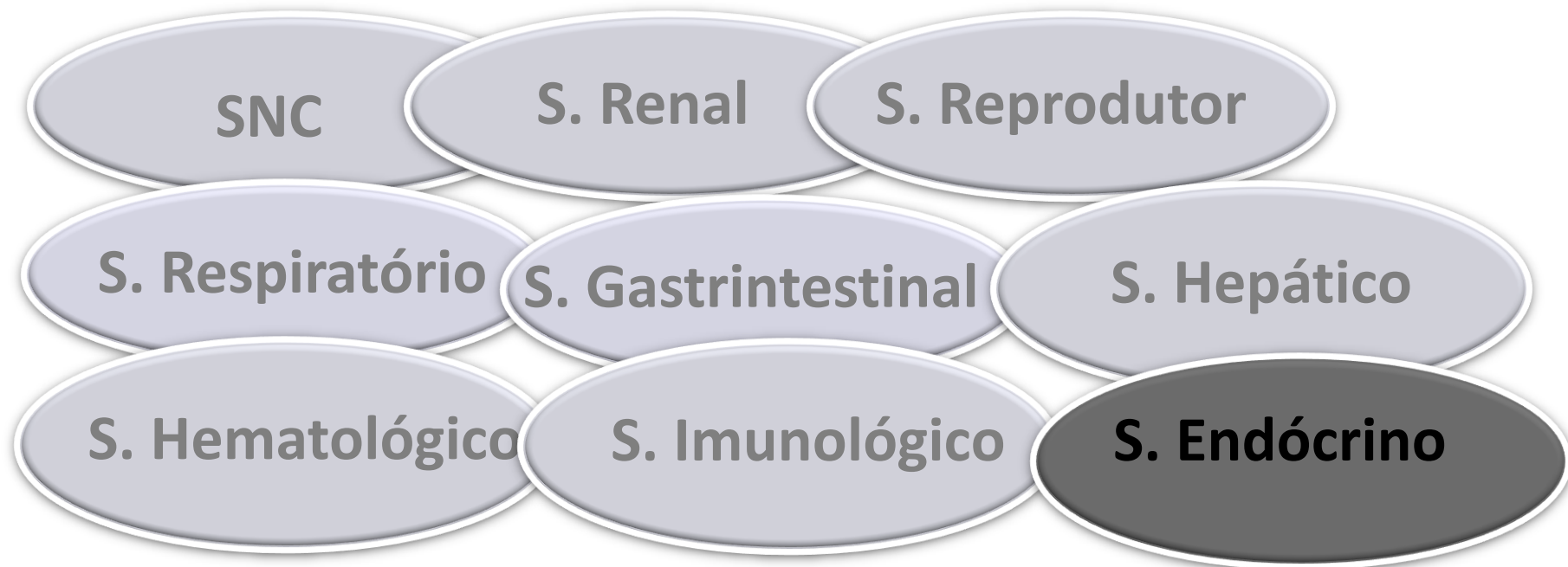
- Redução na síntese do grupamento heme representado uma das principais causas de doenças induzidas pelo chumbo;
- Anemias.

➤ Efeitos Tóxicos:



➤ Fetos e neonatos com distúrbios no sistema imune → na vida adulta → problemas alérgicos, infecção, câncer, doença automimune.

➤ Efeitos Tóxicos:



➤ Alterações, por exemplo, nos eixos hipotálamo-hipófise-tireóide/glândula supra-renal.

Skerfving, 1993; Saryan & Zen, 1994;
Erfuth, *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 2000;
ATSDR, 2005.

➤ Efeitos Tóxicos:

Sistema Cardiovascular

Influenciados pela dose, tempo de exposição, via de exposição, idade, temperatura e ingestão de cálcio.

Read & Williams, 1952;
Kline, 1960;
Dimitrova, 1972;
Kopp & Bárány, 1980;
Carmignani *et al.* 1999;
Hond, *et al.*, 2002;
Marques *et al.*, 2001;
Tsao *et al.*, 2000 ;
Courtois, *et al.*, 2003;
Vupputuri *et al.*, 2003;
Navas-Acien, *et al.*, 2007;
Vaziri *et al.*, 2008;
Prozialeck *et al.*, 2008;
Vassallo *et al.*, 2008;
Silveira *et al.*, 2010;
Fioresi *et al.*, 2010;
Simões *et al.*, 2010;
Fiorim *et al.*, 2011.

➤ Efeitos tóxicos do Chumbo sobre os sistema cardiovascular

↑ Pressão arterial

Altera a excitabilidade e contratilidade cardíaca

Disfunção endotelial

Alteração na complacência do MLV

Altera o SNC → regulação da PA

↑ Resistência vascular periférica

Doença coronariana

Miocardites

Rosenblum, 1965; Stöfen, 1974; Piccinini, *et al.*, 1977; Kopp, *et al.*, 1978; Kopp & Bárány, 1980 Webb, *et al.*, 1981; Hejtmancik & Williams, 1981; Bohr & Webb, 1984; Pretice & Kopp, 1985; Tomera & Harakal, 1986; Sharp, *et al.*, 1987; Harlan, 1988; Steassen, 1994; Sxhwartz, 1995; Marques *et al.*, 2001; Hond *et al.*, 2002; Courtois, *et al.*, 2003; Navas-Acien, *et al.*, 2007; Vassallo *et al.*, 2008; Silveira, *et al.*, 2010; Fiorese, *et al.*, 2010; Simões, *et al.*, 2010; Fiorim, *et al.*, 2011.

Efeitos tóxicos do Chumbo sobre os sistema cardiovascular

➤ Mecanismos de ação:

➤ Estresse oxidativo

Cai et al., 2000; Hansson, 2005; Libby, 2002; Shah, 2003; Vaziri et al., 2006; Khalil-Manesh et al., 1994; Gonick et al., 1998; Dursun et al., 2005; Ding et al., 2000; Ding et al., 2001.

➤ Via dos prostanóides derivados da ciclooxygenase

Gonock et al., 1998; Hotter et al., 1995; Dorman & Freeman, 2002.

➤ Sistema Renina-Angiotensina

Vander, 1988; Carmignani et al., 2000; Sharifi et al., 2004; Rodríguez-Iturbe et al., 2005; Vaziri et al., 2006; Bravo et al., 2007.

JUSTIFICATIVA



- Diversas fontes de exposição ao chumbo
- Efeitos prejudiciais à saúde humana
- Não há um consenso sobre os valores de chumbo no sangue para indivíduos **expostos e não expostos** a esse metal



MODELO EXPERIMENTAL

OBJETIVOS



➤ Geral

➤ Produzir um modelo experimental em ratos expostos à baixa dose de acetato de chumbo, a fim de alcançar uma concentração sanguínea **abaixo do VR e do IBMP** aceitável para indivíduos **expostos e não expostos** (ocupacionalmente) ao chumbo, e investigar as prováveis **alterações cardiovasculares** promovidas pelo chumbo.

➤ Específicos

Analisar os efeitos da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre:

1 - A pressão arterial de ratos acordados e anestesiados;

2 - A reatividade vascular à fenilefrina da artéria aorta torácica de ratos expostos ao chumbo, a partir das seguintes análises:

a) Participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina;

b) Participação do óxido nítrico; das espécies reativas de oxigênio; dos prostanóides derivados da ciclooxigenase e, do sistema renina-angiotensina.

➤ Específicos

Analisar os efeitos da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre:

- 3 - Expressão protéica das isoformas: endotelial e induzível da sintase do óxido nítrico, da ciclooxygenase-2 e do receptor da angiotensina - AT₁;
- 4 - Liberação local de óxido nítrico e de ânion superóxido;
- 5 - Atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina.

MATERIAIS E MÉTODOS



➤ **Animais:**

Ratos Wistar: 3 meses / 200 – 300 g.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da EMESCAM- CEUA 004/2007.

➤ **Animais:**

➤ **Modelo experimental:**

Exposição diária ao acetato de chumbo - 30 dias, via *im*

Concentração → $\approx 20 \mu\text{g/dL}$

Grupo Chumbo: Dose de ataque: $4 \mu\text{g}/100\text{g}$

Dose de manutenção: $0,55 \mu\text{g}/100 \text{g}/\text{dia}$;

Grupo Controle: NaCl (0,9%).

➤ **Animais:**

➤ **Modelo experimental:**

Acetato de chumbo;

Doses;

Dosagem do chumbo no sangue:

Espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite →

Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito

Santo.

➤ **Animais;**

➤ **Modelo experimental;**

➤ **Avaliação dos valores pressóricos**

Medida indireta da pressão arterial sistólica

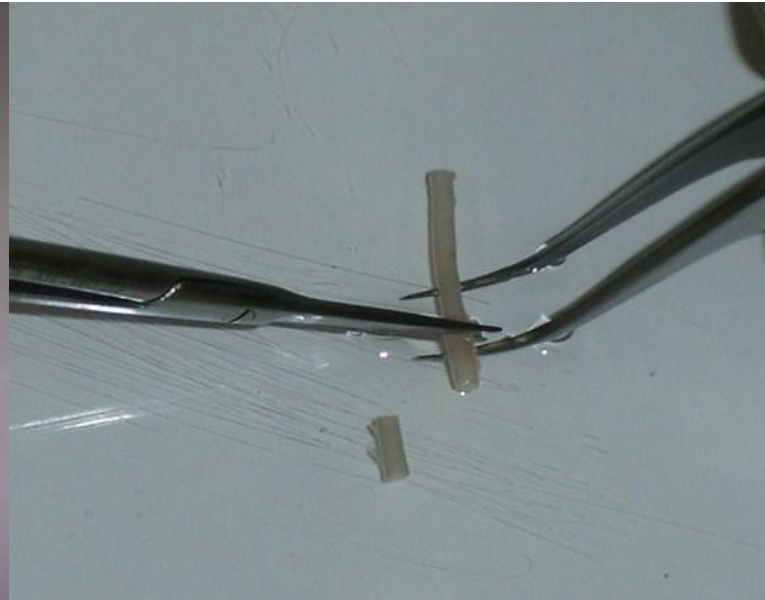
Pletismografia de cauda, durante o tratamento

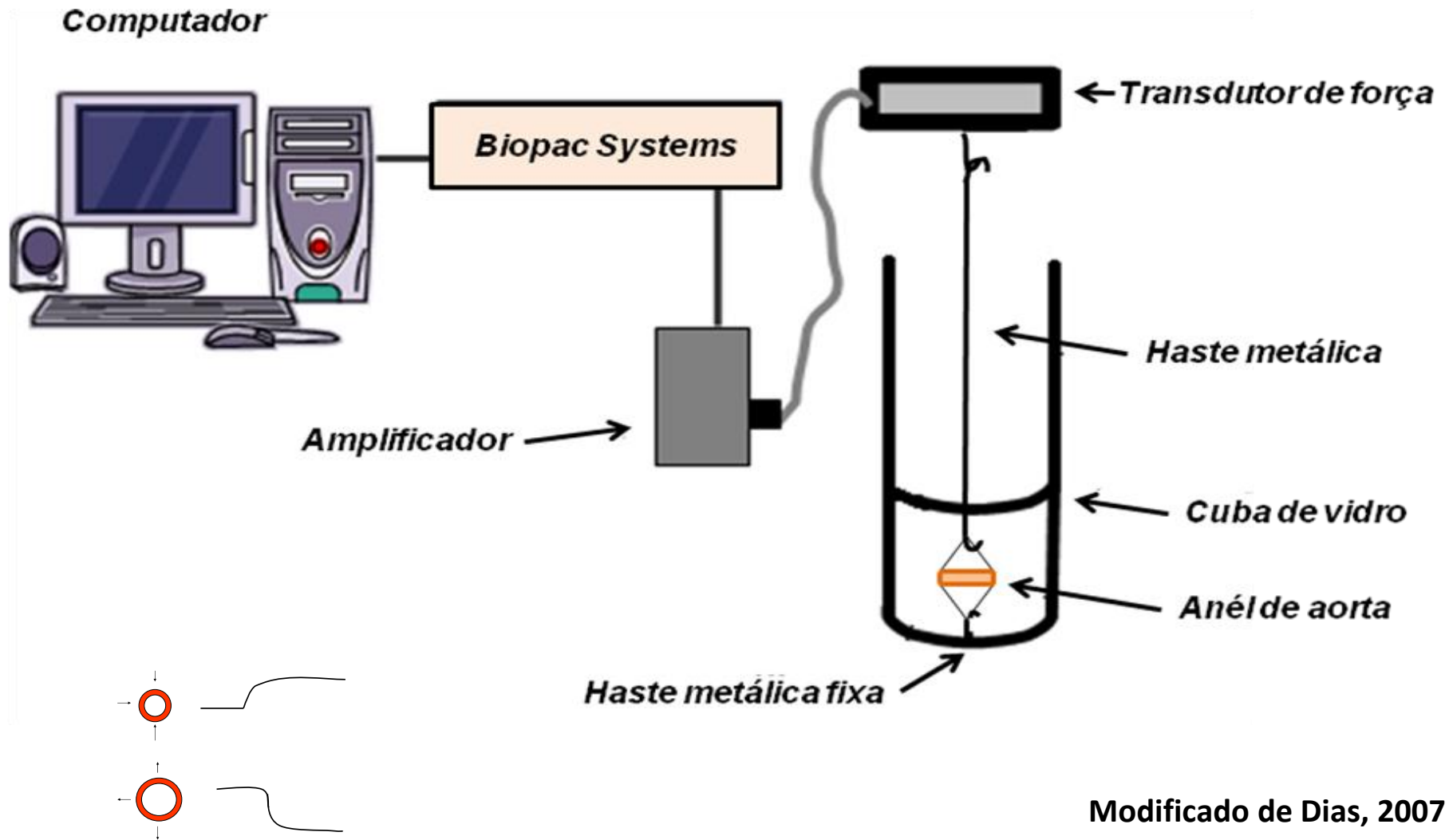
Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca

Cateterização da artéria carótida direita

- **Animais;**
- **Modelo experimental;**
- **Avaliação dos valores pressóricos**
- **Reatividade em anéis isolados de aorta de ratos**

- **Metodologia empregada para obtenção dos anéis de aorta torácica.**





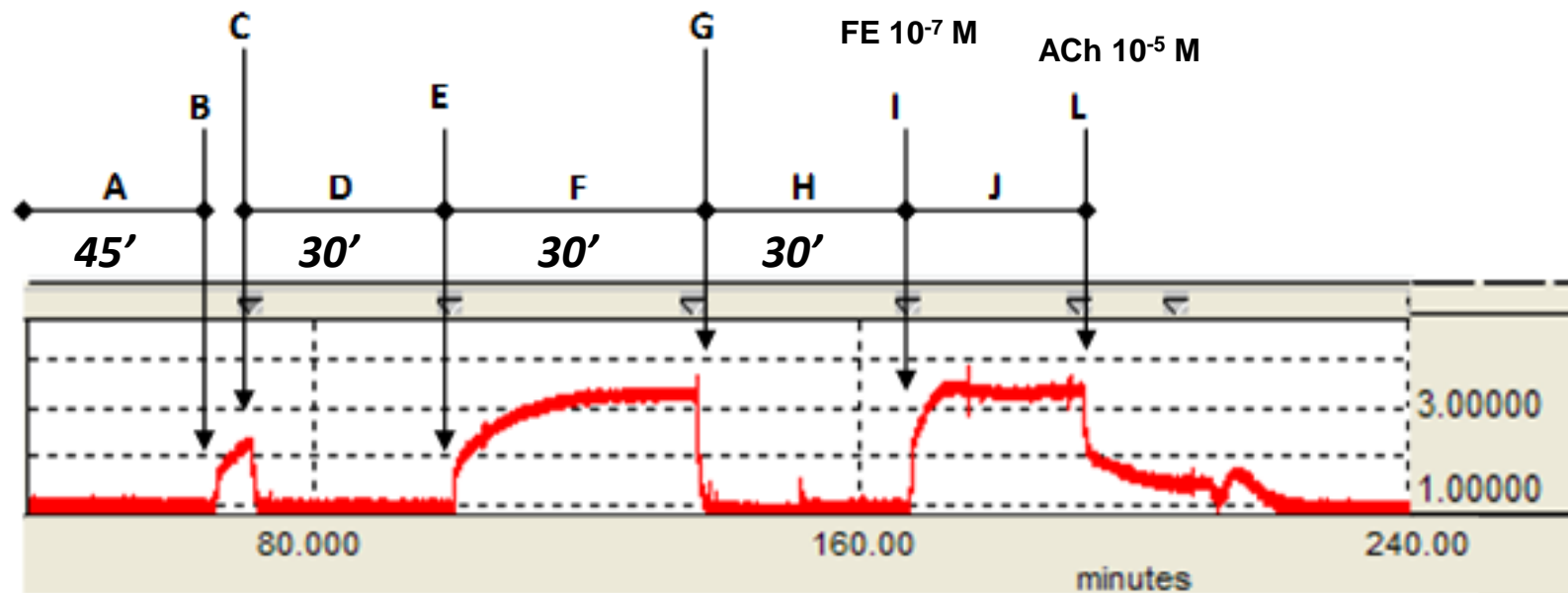
Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”.

- **Animais;**
- **Modelo experimental;**
- **Avaliação dos valores pressóricos;**
- **Reatividade em anéis isolados de aorta de ratos;**
- **Protocolos experimentais;**

➤ Protocolo de reatividade vascular *in vitro*:

Estabilização;

- KCl (75 mM);
- Teste do endotélio.

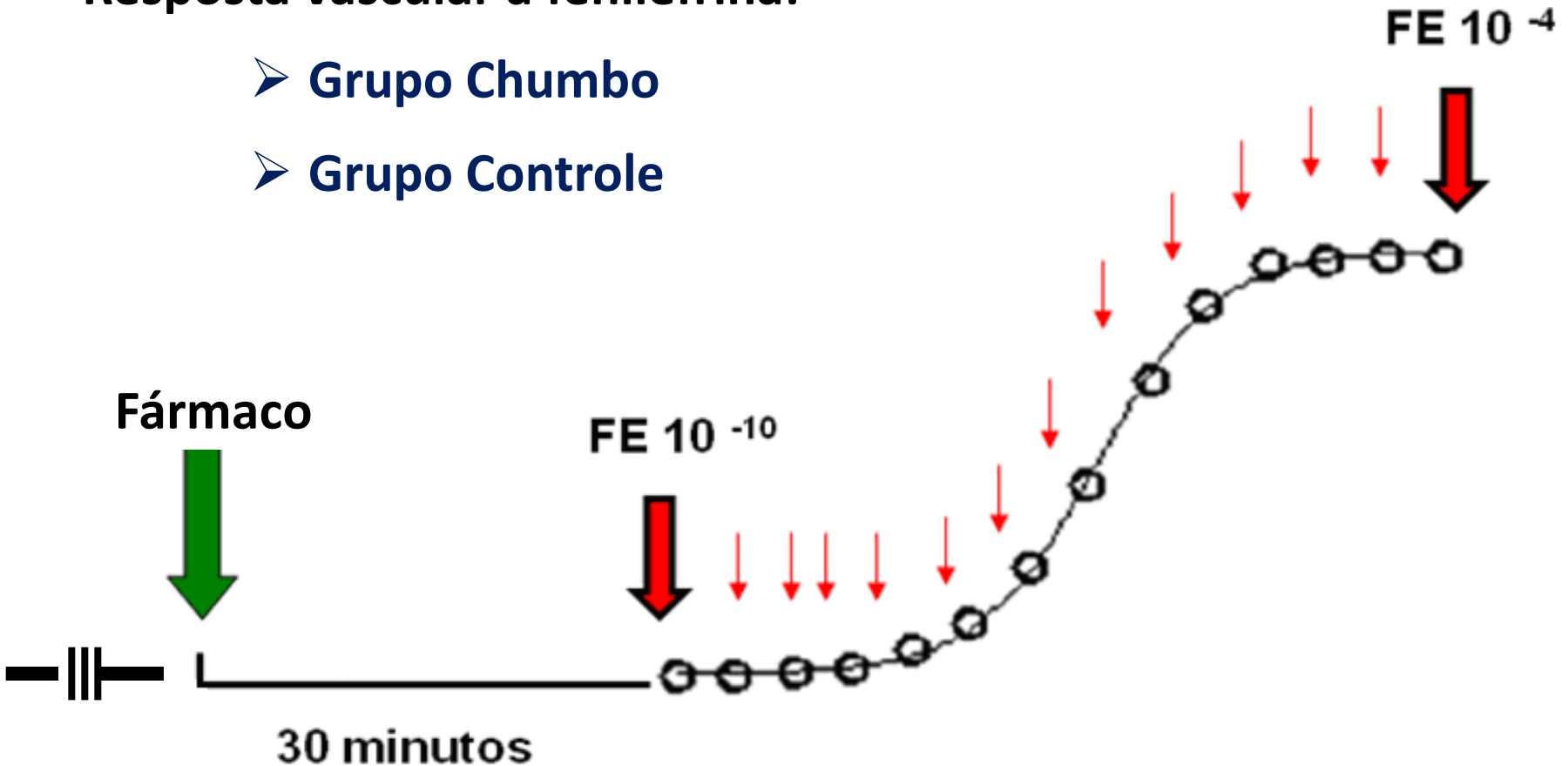


Registro típico com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.

➤ Protocolo de reatividade vascular *in vitro*

Resposta vascular a fenilefrina:

- Grupo Chumbo
- Grupo Controle



- **Animais;**
- **Modelo experimental;**
- **Avaliação dos valores pressóricos;**
- **Reatividade em anéis isolados de aorta de ratos;**
- **Protocolos experimentais;**
- **Biologia Molecular;**

➤ **Biologia molecular**

- **Medida da expressão protéica:** eNOS, iNOS, COX-2 e receptor AT₁
- **Liberação local do óxido nítrico:** Medida do aumento da fluorescência/DAF (4,5-diaminofluoresceína) (Martín *et al.*, 2005)
- **Produção local de ânion superóxido:** Medida do aumento da quimioluminescência/lucigenina (Martín *et al.*, 2005)
- **Determinação da atividade plasmática da ECA:** Medida do aumento da fluorescência/His-Leu (Friedland & Silverstein, 1976)

- **Animais;**
- **Modelo experimental;**
- **Avaliação dos valores pressóricos;**
- **Reatividade em anéis isolados de aorta de ratos;**
- **Protocolos experimentais;**
- **Biologia Molecular;**
- **Expressão dos dados e análise estatística.**

➤ Expressão dos dados:

Média \pm EPM;

Dados de reatividade vascular à FE foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressos em %.

➤ Análise estatística:

R_{máx} e pD₂ (-log EC₅₀) → análise de regressão não linear;

dAUC;

Teste *t* não-pareado;

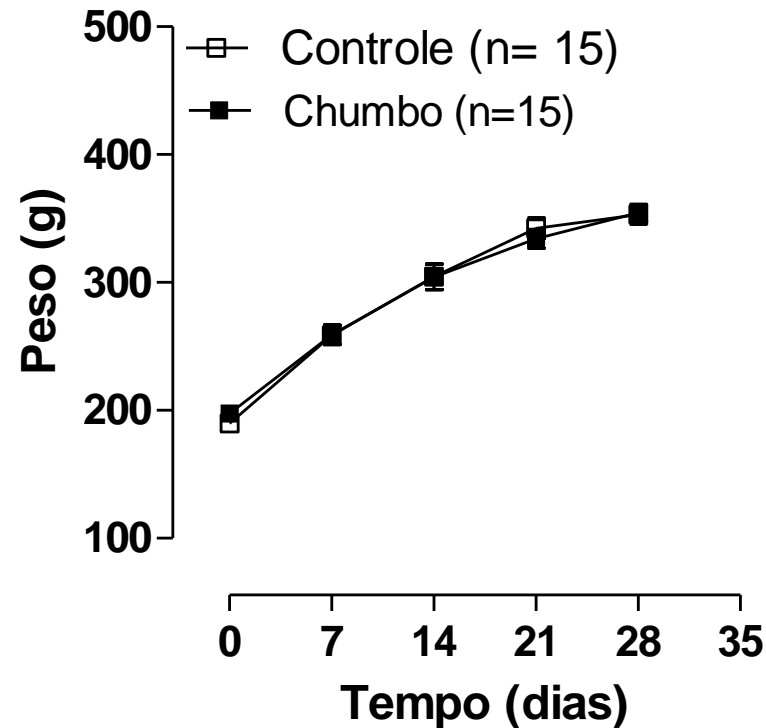
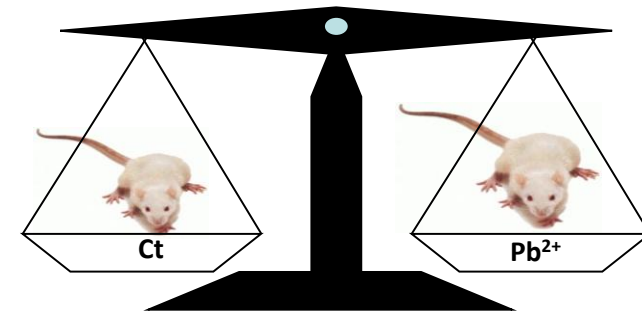
ANOVA 1/2 vias → teste *post-hoc* de Tukey;

P < 0,05.

RESULTADOS e DISCUSSÃO



➤ Controle do peso corporal



Média \pm EPM

Carmignani *et al.*, 1999;

Grizzo *et al.*, 2008;

Rizzi *et al.*, 2009.

➤ Concentração de chumbo no sangue

Grupo chumbo: $11,96 \pm 1,34 \mu\text{g/dL}$

➤ Gonick, *et al.*, (1997): Pb-S $12,4 \pm 1,8 \mu\text{g/dL}$ em ratos;

➤ Barbosa Jr. *et al.*, (2005): Pb-S $11,6 \pm 9,6 \mu\text{g/dL}$ em humanos.

Concentração Pb-S → $11,96 \pm 1,34 \mu\text{g/dL}$



VR: $40 \mu\text{g/dL}$ e do IBMP: $60 \mu\text{g/dL}$ (Brasil ,NR -7; 1978)

IBMP: $30 \mu\text{g/dL}$ (ACGIH - EUA, 2007)

Baixos valores de exposição ao chumbo têm sido fortemente associados com o desenvolvimento de **hipertensão arterial**, tanto em estudos realizados em humanos quanto em animais.

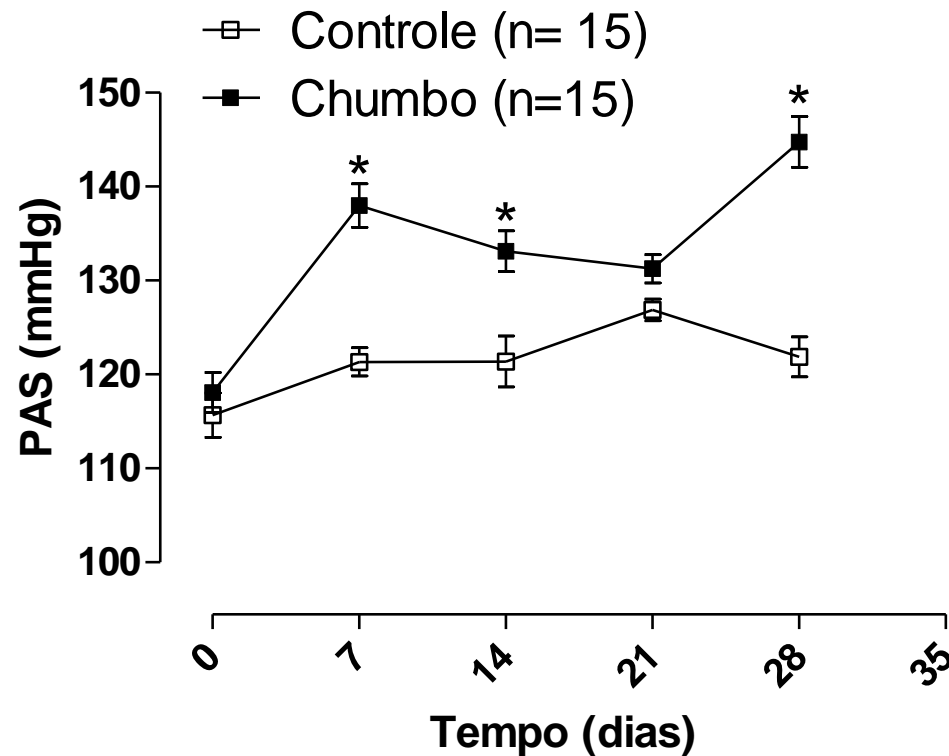
Gurer & Ercal, 2000;

Ni *et al.*, 2004;

Vaziri & Sica 2004.

➤ Avaliação dos valores pressóricos em ratos nos grupos controle e chumbo

➤ Medida indireta da PAS



Média \pm EPM. ANOVA (duas vias): $P < 0, 05$.

➤ Avaliação dos valores pressóricos em ratos nos grupos controle e chumbo

➤ Medida Direta

	Controle (n= 08)	Chumbo (n= 18)
PAS	94,8 ± 2,80	108 ± 2,81*
PAD	55,5 ± 2,39	68,9 ± 3,53*
FC	324 ± 14,01	348 ± 13,34

Média ± EPM. Teste *t* não pareado: *P < 0,05.

- Avaliação dos valores pressóricos em ratos nos grupos controle e chumbo

Chumbo provoca Hipertensão arterial:

Humanos:

Schwartz, *et al.*, 1985; Sharp, *et al.*, 1987; Moreau, *et al.*, 1988; Koop, *et al.*, 1988; Hertz-Picciotto & Croft, 1993; Staessen, *et al.*, 1994; Nawrot, *et al.*, 2002; Nash, *et al.*, 2003; Navas-Acien, *et al.*, 2007.

Ratos:

Griffith & Lindauer, 1944; Diaz-Rivera & Horn, 1945; Vander, 1988; Carmignani *et al.*, 1999; Vaziri *et al.*, 1999; Carmignani *et al.*, 2000; Tsao, *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2001; Vaziri, 2003; Sharifi *et al.*, 2004; Heydari *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2010; Fiorim, *et al.*, 2011.

Grupo chumbo: $11,96 \pm 1,34 \mu\text{g/dL}$



Valores de Referência e em curto período de tempo, já demonstram um **efeito hipertensor do chumbo**, recomendando que os Valores de Referência para esse metal, devem ser **repensados** pelas **Agências de Toxicovigilância**.

Reatividade vascular em anéis aórticos de ratos

➤ Resposta ao KCl:

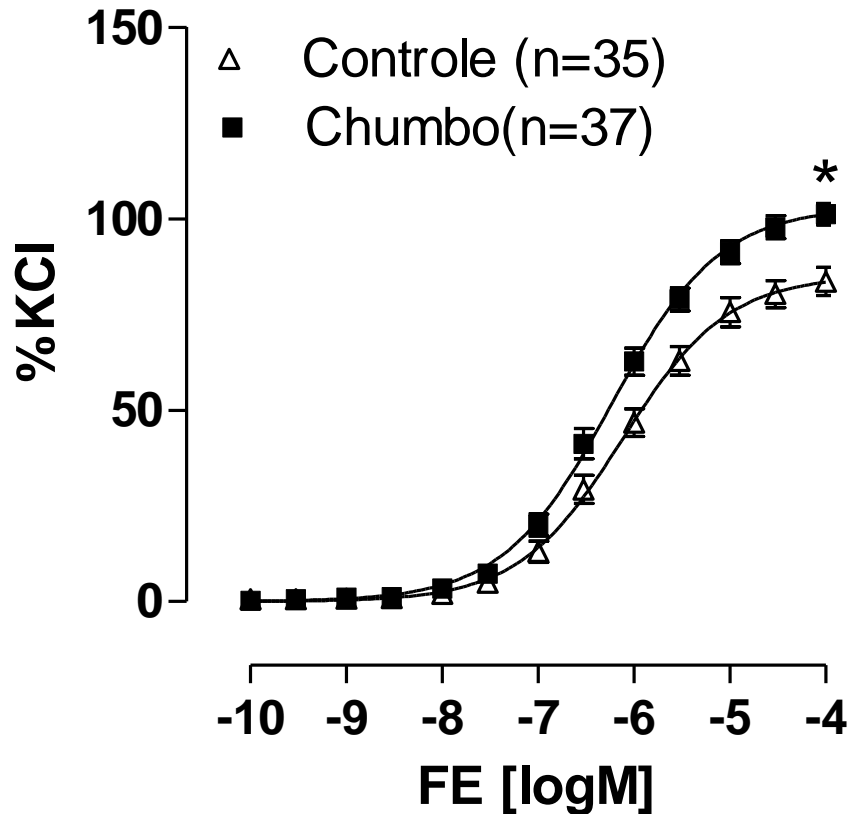
KCl (75 mM)	Controle (g)	Chumbo (g)
E ⁺ (n=7)	2,26 ± 0,11	2,43 ± 0,09
E ⁻ (n=7)	2,36 ± 0,13	2,53 ± 0,08

Média ± EPM

Os dados de reatividade vascular foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressos em %.

Reatividade vascular em anéis aórticos de ratos

➤ Resposta contrátil à Fenilefrina:



Média ± EPM. Teste *t* não pareado: **P* < 0,05

➤ Webb *et al.*, 1981

100 ppm → 7 meses

➤ Carmignani *et al.*, 2000

60 ppm → 10 meses

➤ Shelkovnikov *et al.*, 2001

100 μM e ↓ [Ca²⁺]

➤ Heydari *et al.*, 2006

100 ppm → 1, 2 e 3 meses

➤ Silveira *et al.*, 2010

100 μM

Fiorim, *et al.*, 2011

Hipertensão arterial induzida pelo chumbo

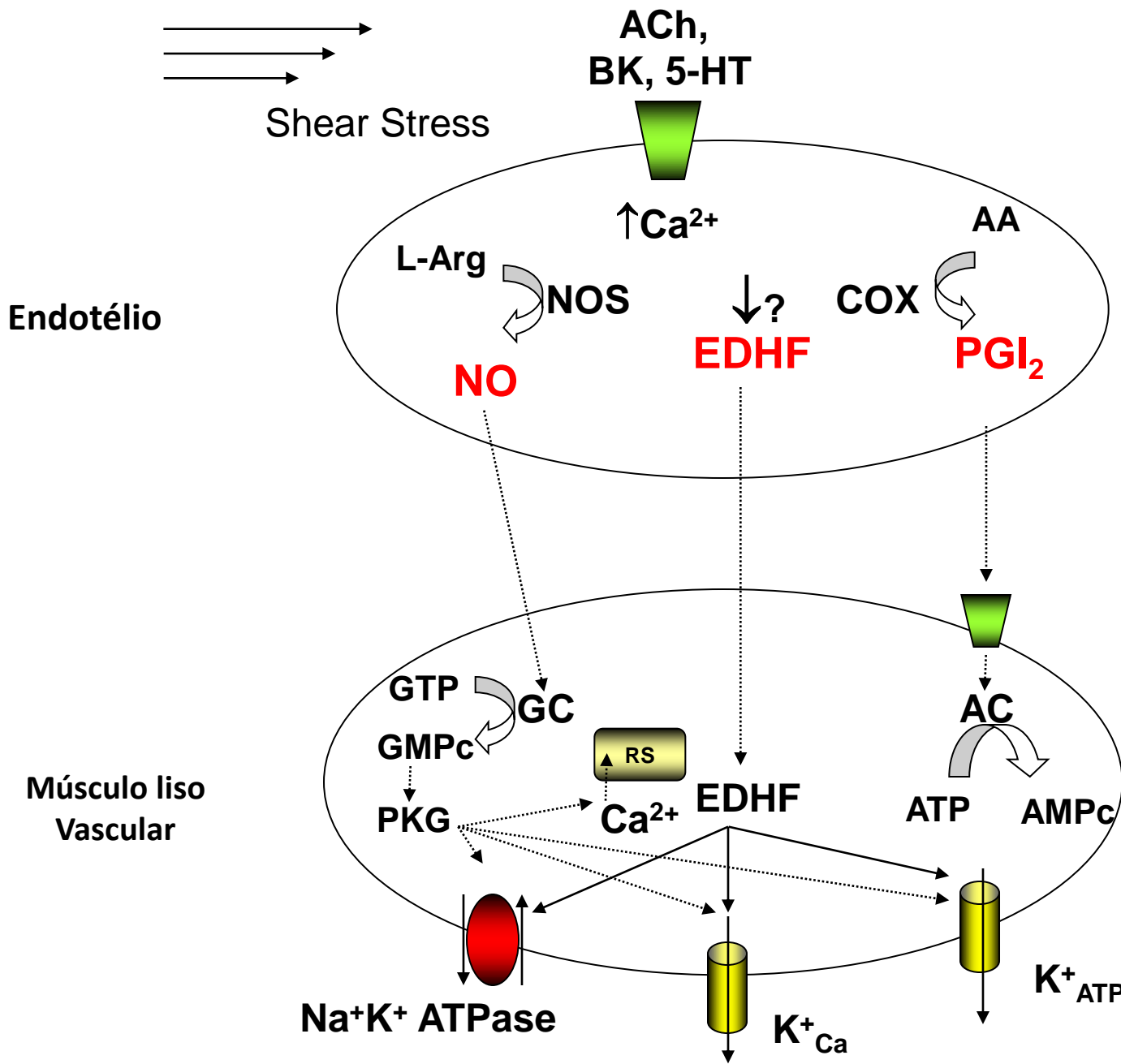


Alterações nas células endoteliais

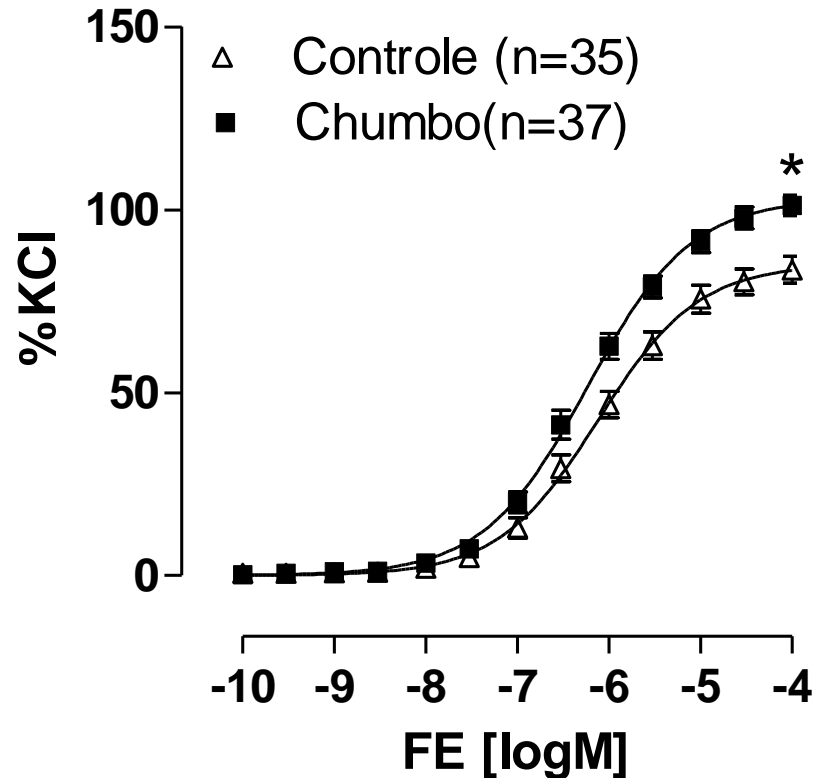
Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Oishi *et al.*, 1996; Mittal *et al.*, 1995; Vaziri *et al.*, 1997; Gonick *et al.*, 1997.

Alterações nas células do músculo liso vascular

Webb *et al.*, 1981; Tomera & Harakal, 1986; Skoczynska *et al.*, 1986; Chai & Webb, 1988; Kopp *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1995.



➤ Resposta contrátil à Fenilefrina  Endotélio-dependente?



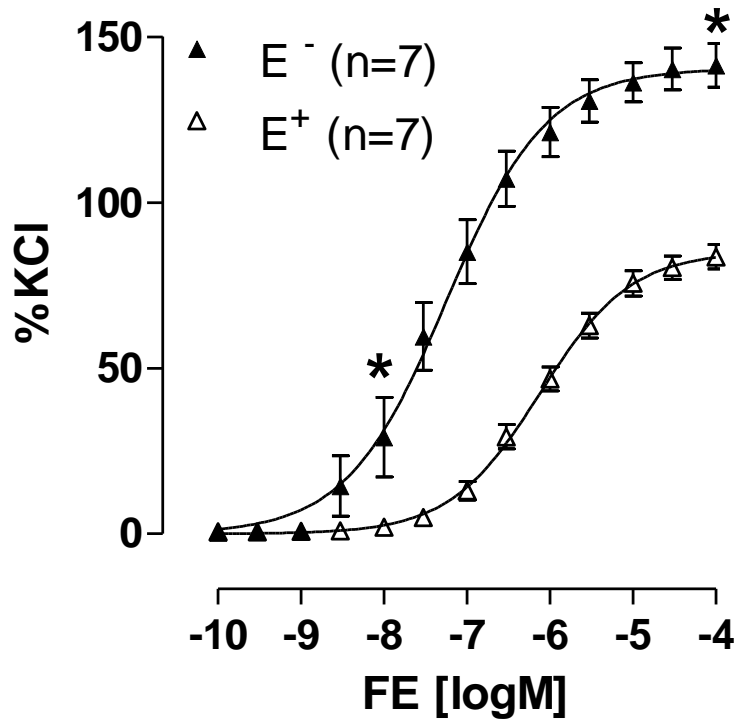
Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: **P* < 0,05

➤ Resposta à Fenilefrina

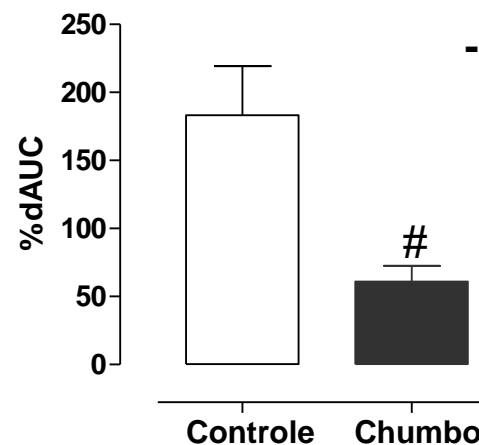
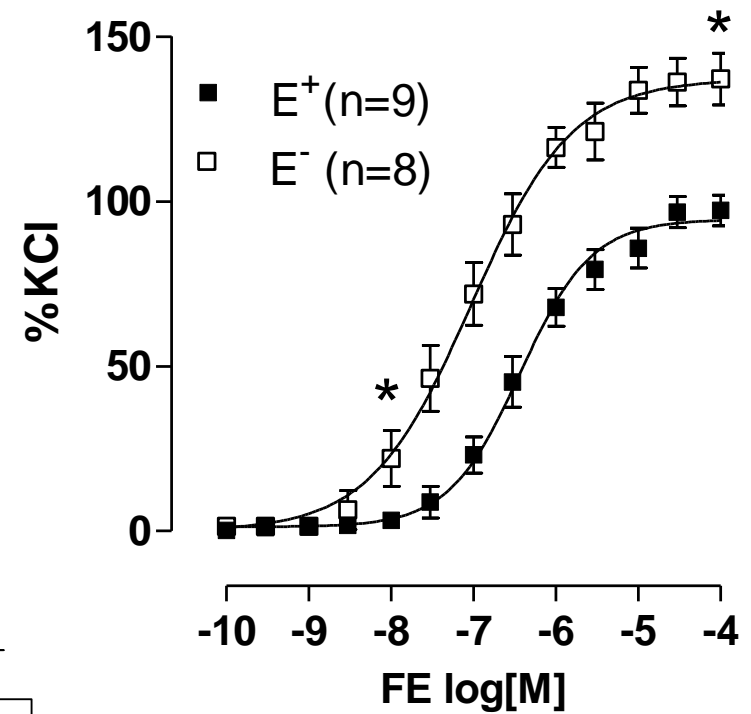


Endotélio

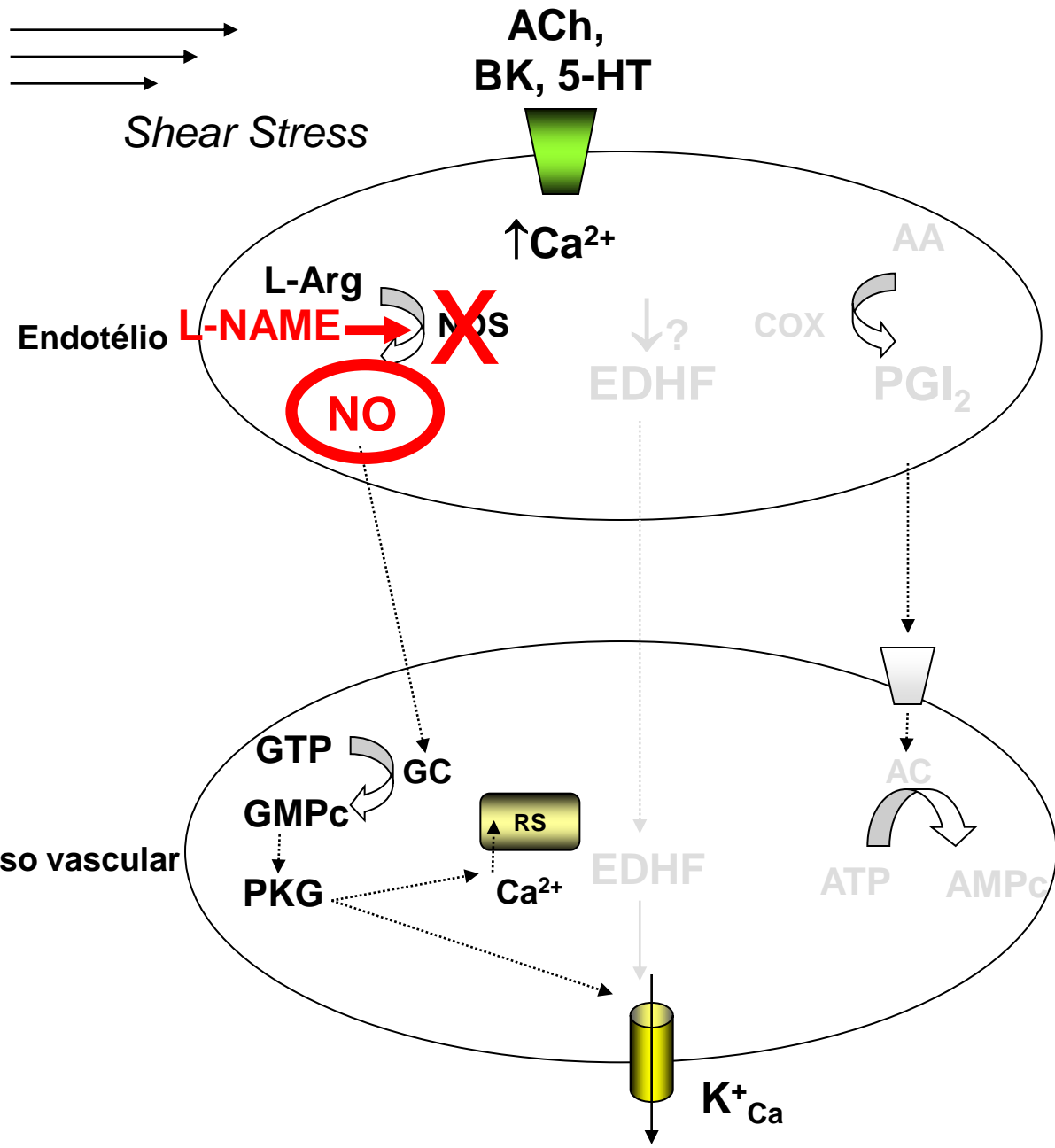
Controle



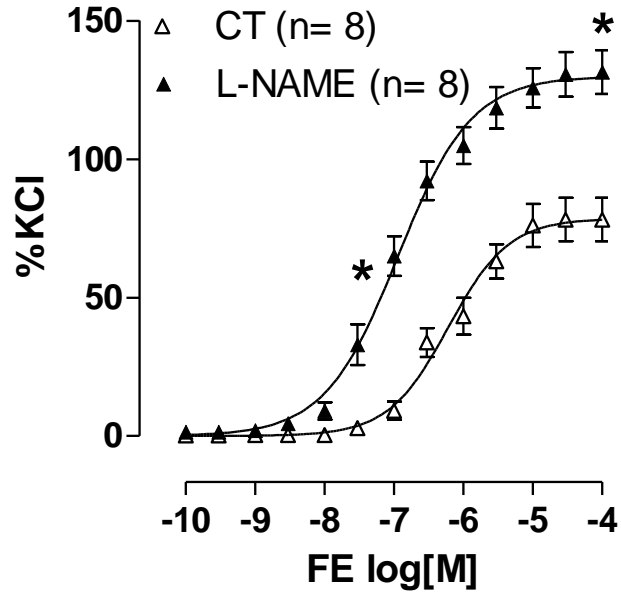
Chumbo



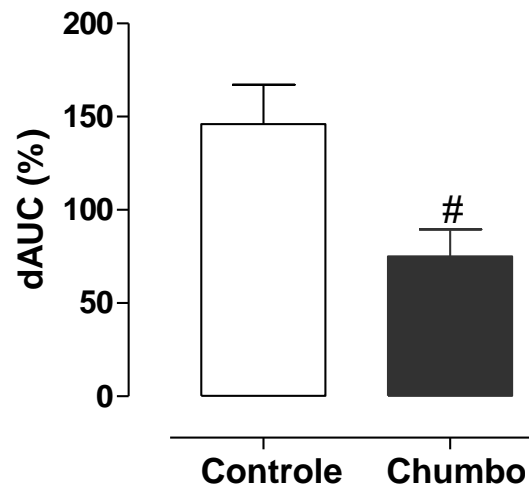
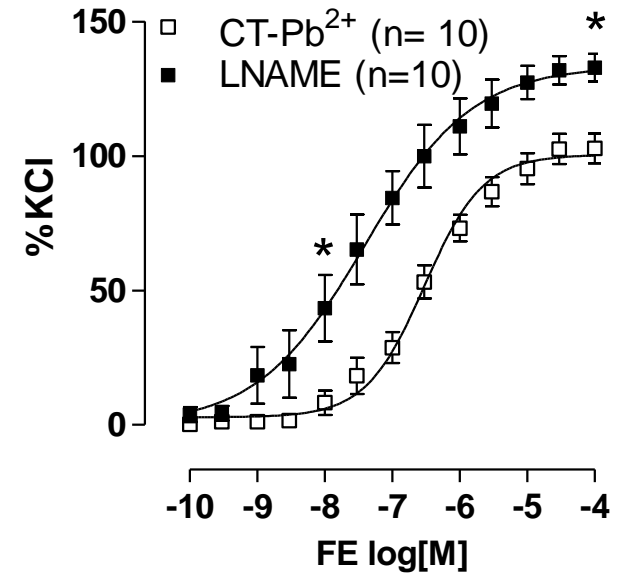
Média ± EPM. Teste t não pareado: *P < 0,05



Controle

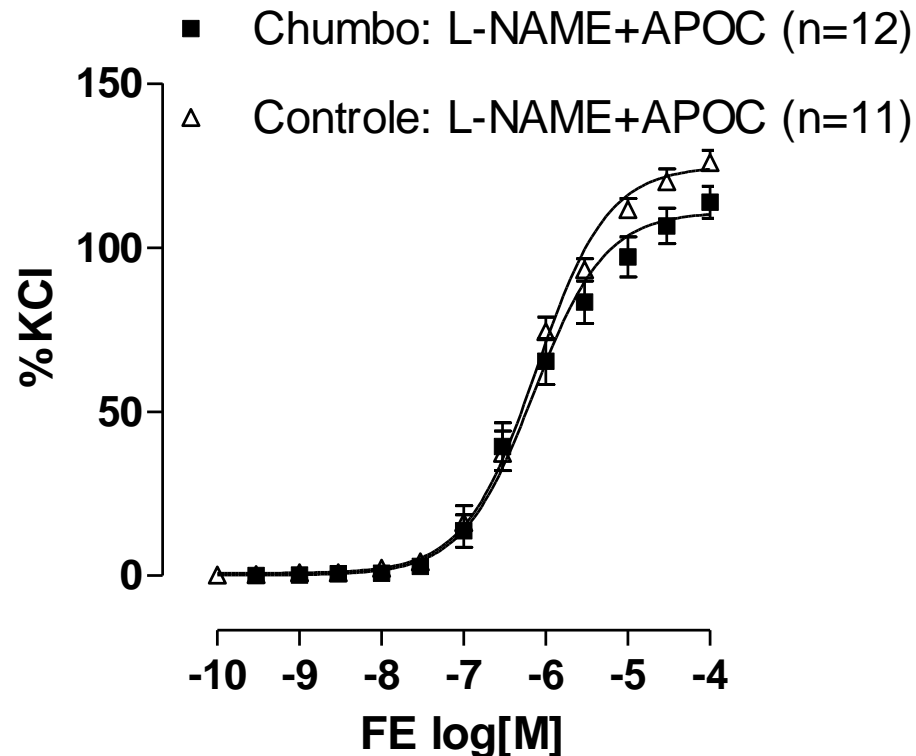


Chumbo



Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: *# P < 0,05

Será que a menor biodisponibilidade do NO poderia ser atribuída ao efeito direto do chumbo? Ou será que esse efeito poderia ser imputado à capacidade dos radicais livres em diminuir a biodisponibilidade do NO?



Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

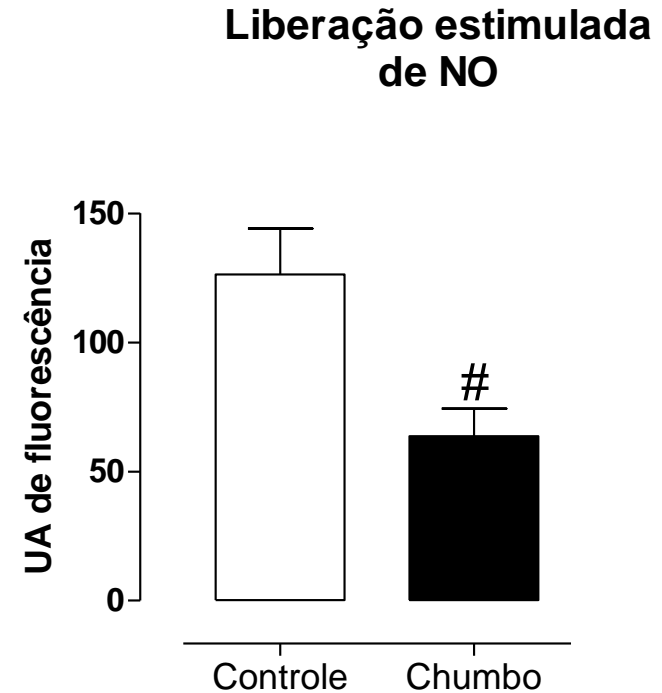
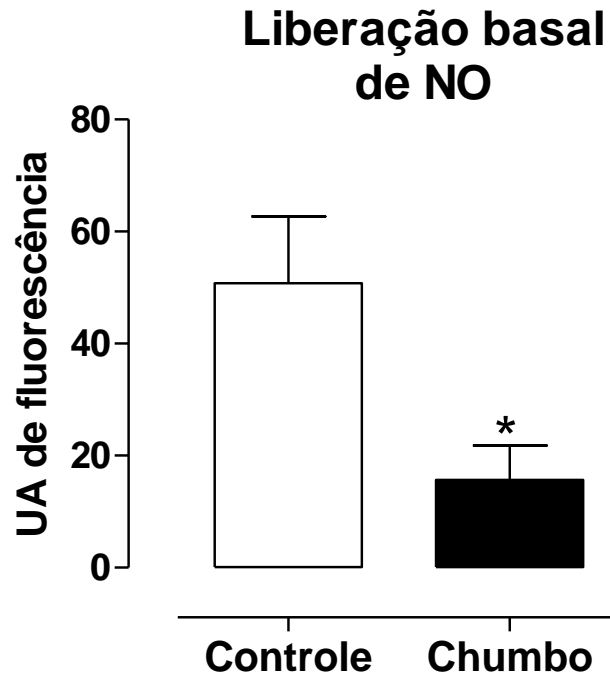
Barbosa Jr. *et al.*, 2006

Correlação negativa entre o nitrito plasmático e o chumbo presente no plasma e no sangue de humanos → efeito inibitório do chumbo na formação do NO.

Kelm *et al.*, 1999; Lauer *et al.*, 2001; Kleinbongard *et al.*, 2003 e 2006.

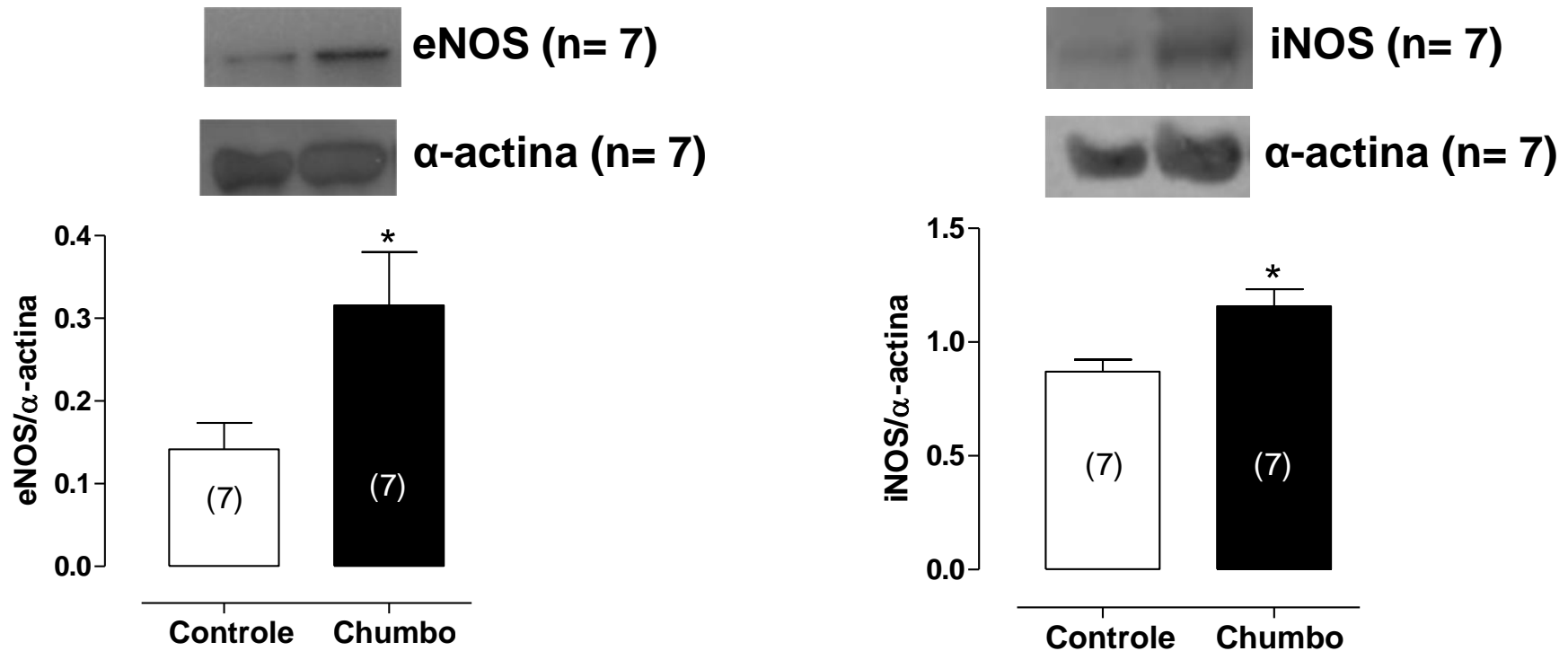
Vaziri *et al.*, 1999

Ratos expostos ao chumbo → diminuição significativa na excreção urinária dos metabólitos do NO e aumento na concentração plasmática do malondialdeído.



- Modelo experimental, os efeitos do chumbo são dependentes do endotélio e devem-se à menor biodisponibilidade do NO;
- Situações fisiopatológicas → redução na biodisponibilidade de NO → fenômeno adaptativo de aumento na produção de NO.

Média \pm EPM, estão expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido, calculados a partir da intensidade de fluorescência emitida pelo DAF. Teste t não pareado. A: ** P < 0,05



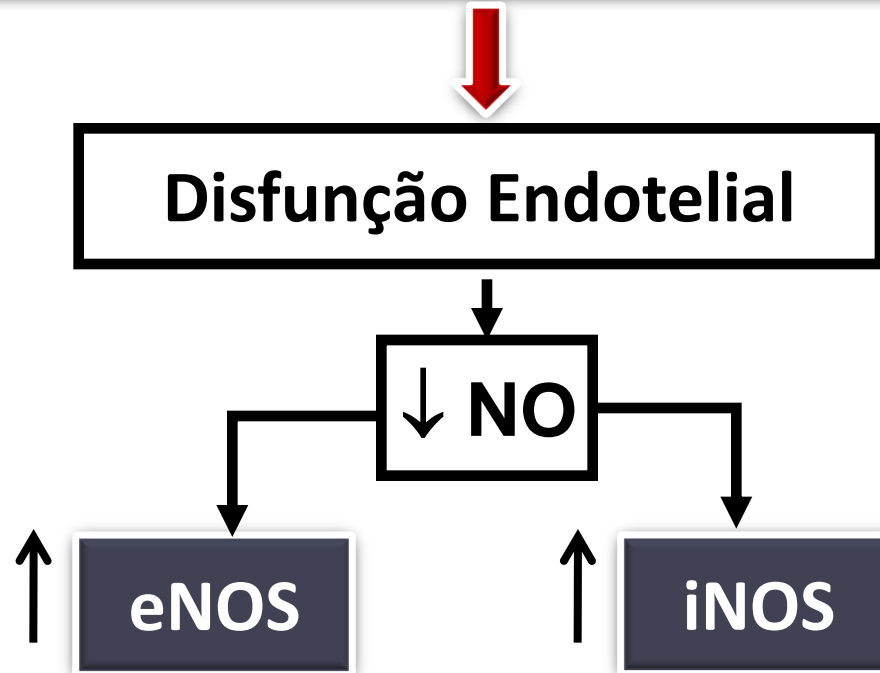
➤ Mittal *et al.*, 1995; Pohl *et al.*, 1995; Noris *et al.*, 1995; Le Cras *et al.*, 1996; Vaziri *et al.*, 1998; Vaziri & Wang 1999; Vaziri *et al.*, 1999; Drummond *et al.*, 2000; Vaziri *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2001

***Up-regulation* eNOS e iNOS em aorta e tecido renal de ratos**

Média \pm EPM: expressos como relação entre a densidade das bandas das isoformas eNOS e iNOS e bandas de α -actina. Teste t não pareado: * P < 0,05.

➤ Resultados funcionais e bioquímicos

30 dias de exposição à baixa dose de Pb



↑ eNOS

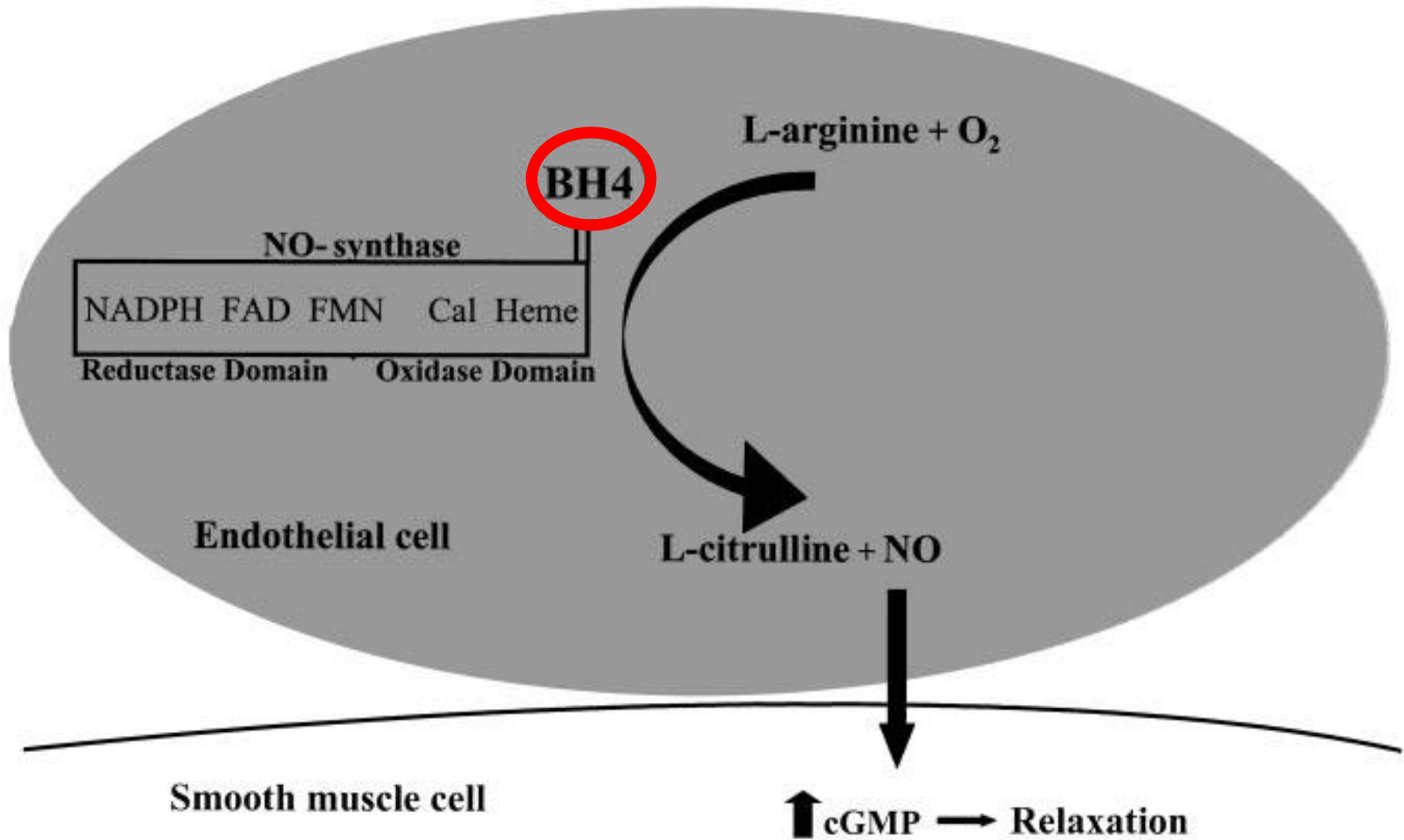


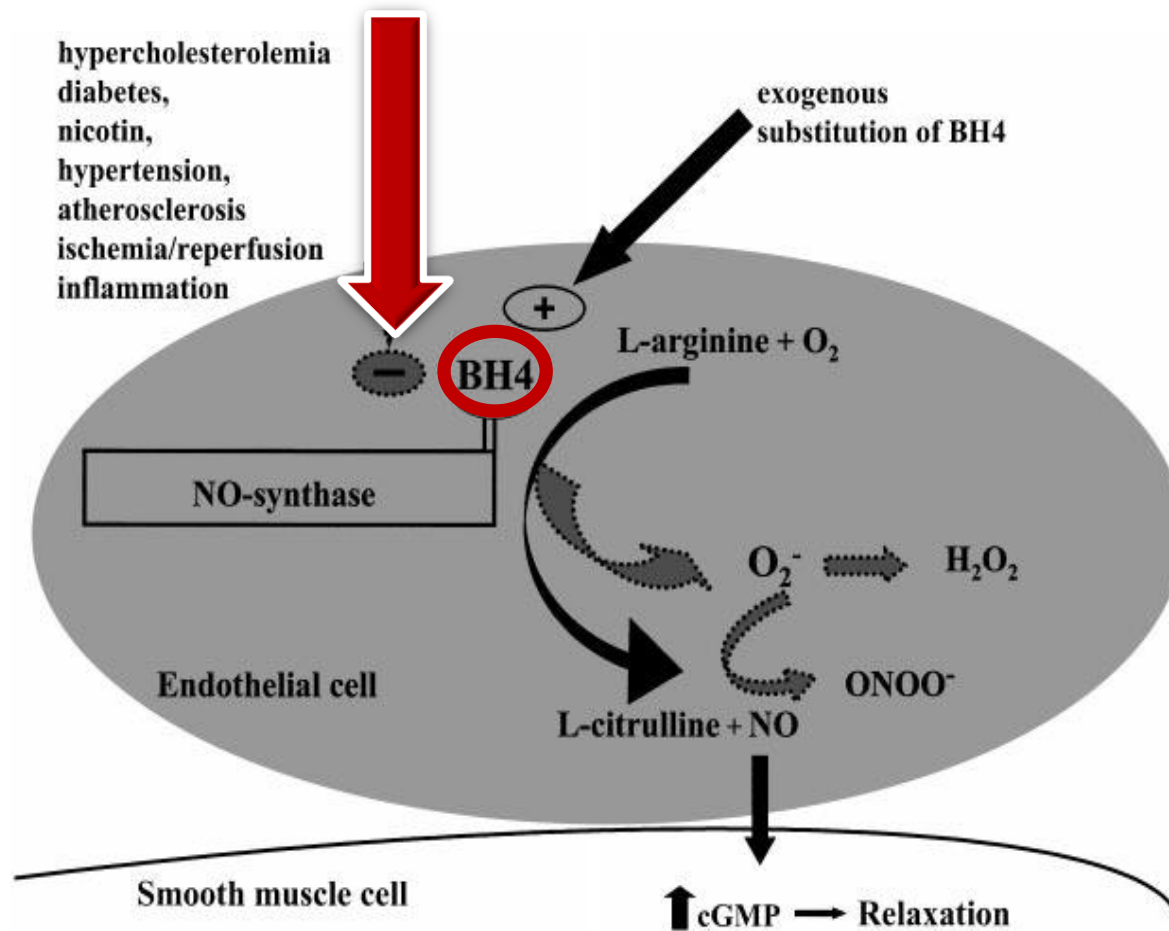
eNOS desacoplada

➤ Stroes *et al.*, 1997 - Diabetes

➤ Heitzer *et al.*, 2000 – Hipercolesterolemia / Tabagismo

Co-fatores → NO-sintase





➤ Milstien & Katusic, 1999

➤ Kawashima & Yokoyama, 2004



Desacopla eNOS

➤ Fostermann & Munzel, 2006

Chumbo



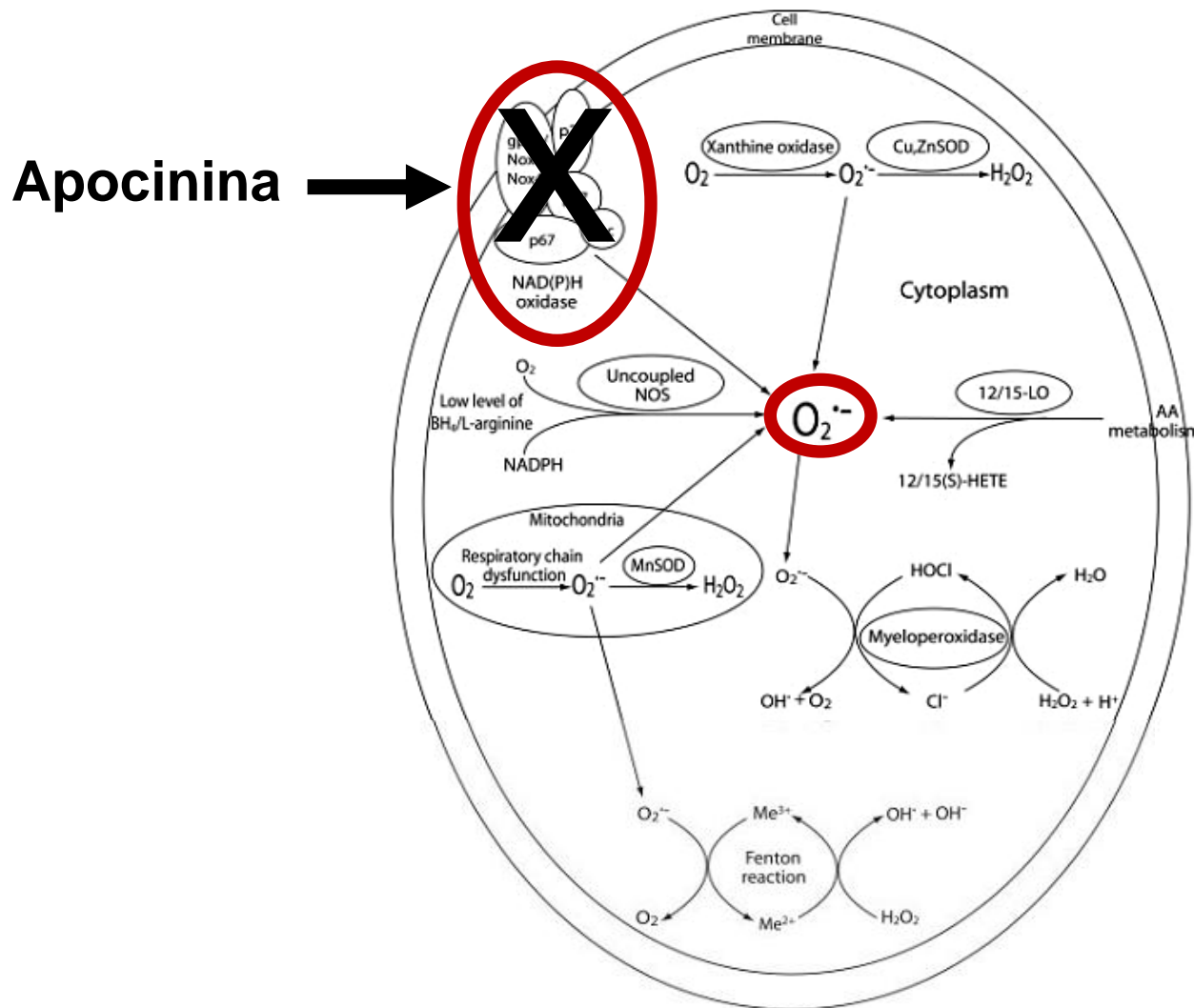
↑ Estresse Oxidativo

- Khalil-Manesh et al., 1994;
- Gonick et al., 1998
- Cai et al., 2000;
- Ding et al., 2000 e 2001;
- Libby, 2002;
- Shah, 2003
- Hansson, 2005;
- Dursun et al., 2005;
- Vaziri et al., 2006.

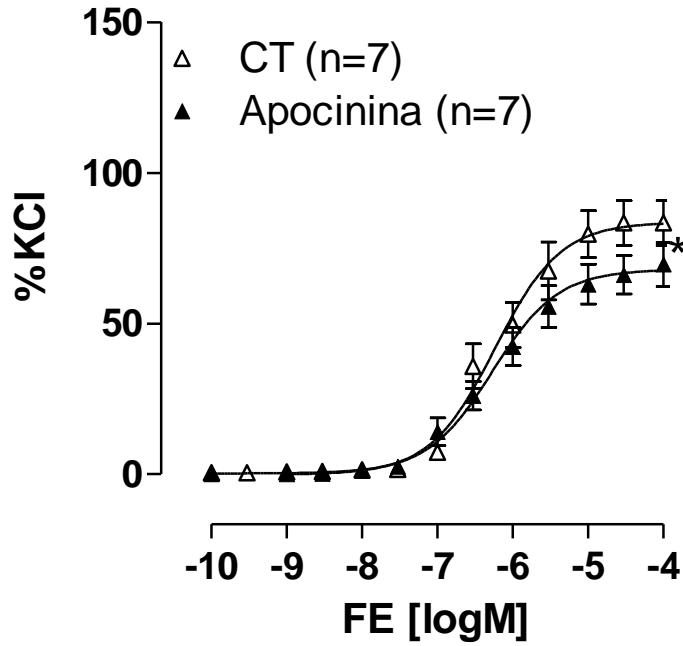
Chumbo**↑ Estresse Oxidativo****Estresse Oxidativo****Disfunção endotelial**

- Mugge, 1991;
- Jin *et al.*, 1991;
- Suzuki & Ford, 1992;
- Xin *et al.*, 2002;
- Chade *et al.*, 2004;
- Vaziri, et al 2004;
- Nageswara, et al., 2005
- Kim et al., 2006;
- Lavi *et al.*, 2008;
- Gao & Mann, 2009.

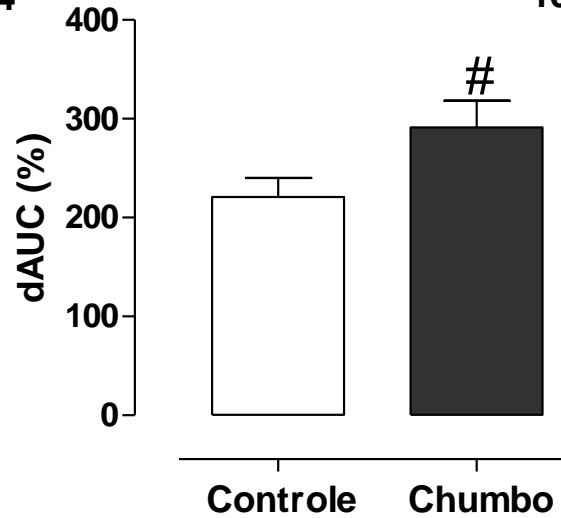
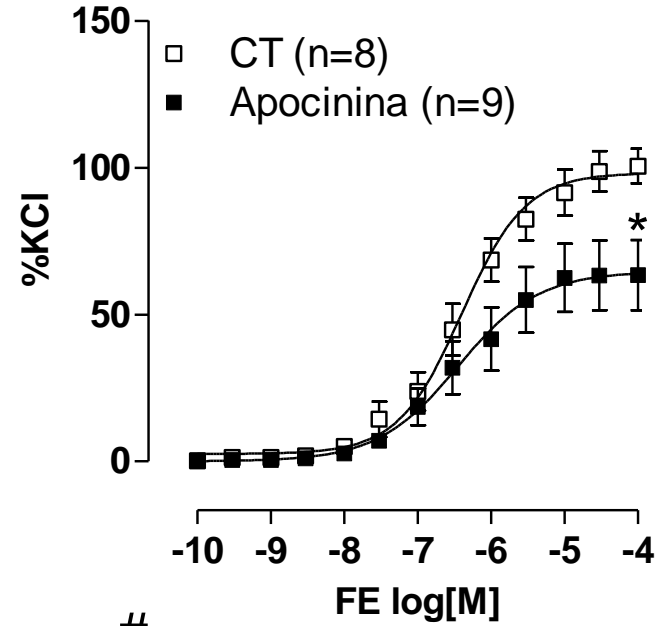
➤ Resposta à Fenilefrina → EROs (Apocinina)



Controle

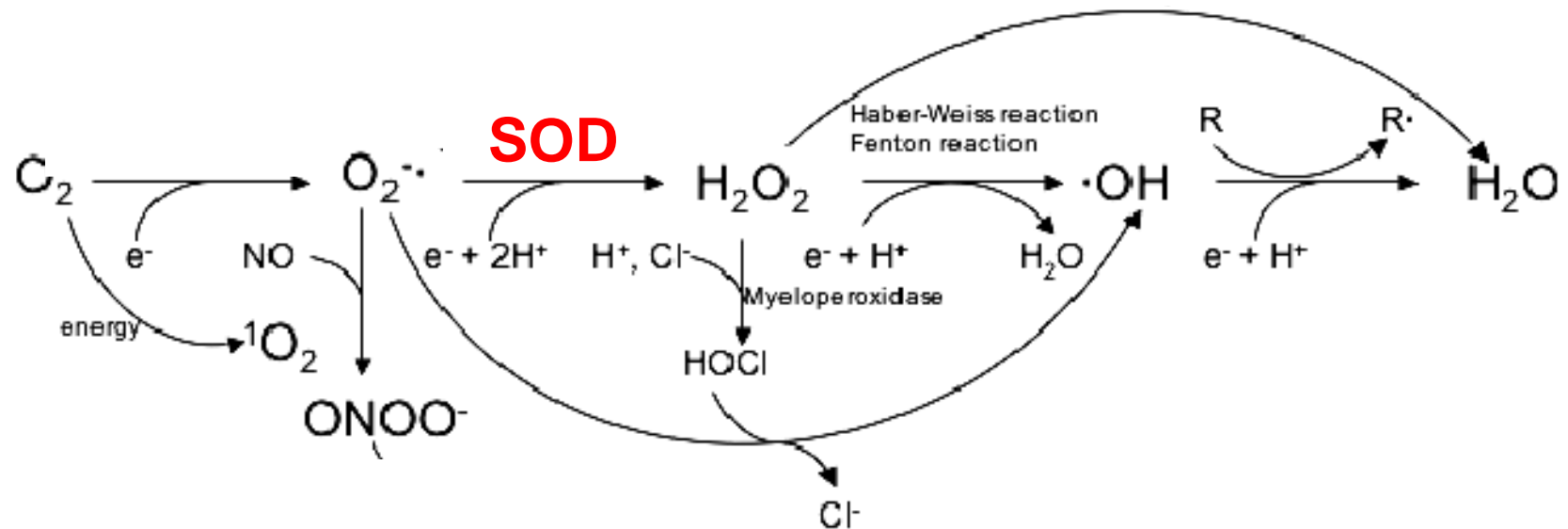


Chumbo

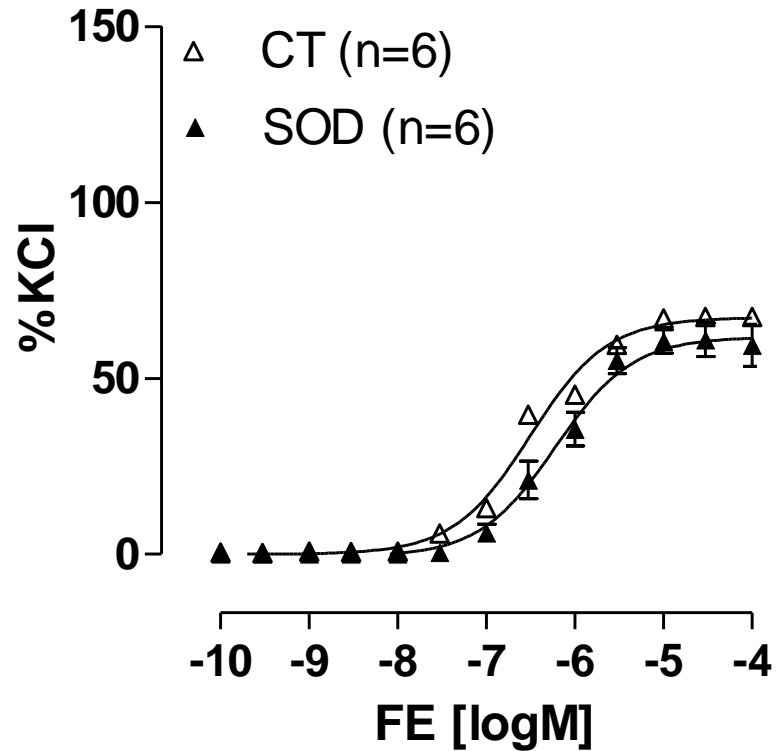


Média ± EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

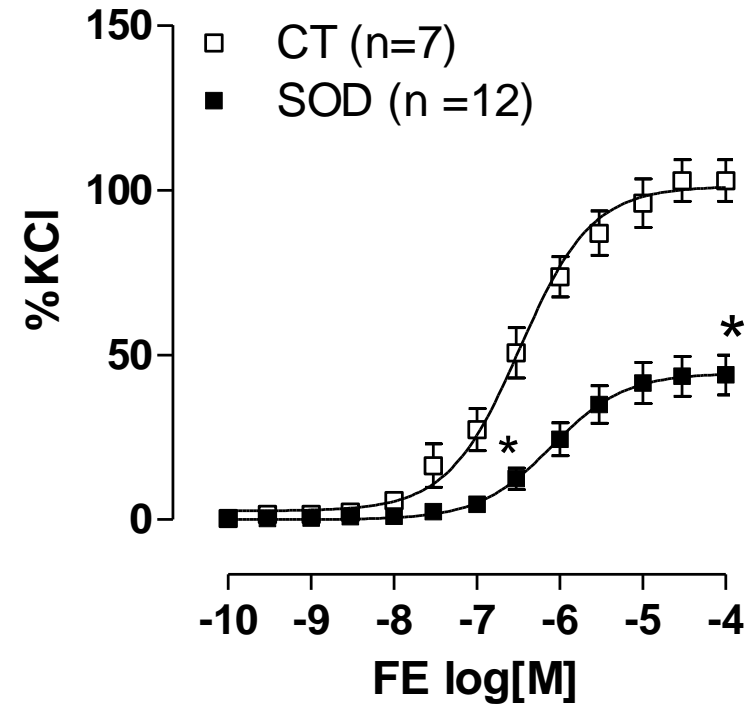
➤ Resposta à Fenilefrina → EROs (SOD)



Controle

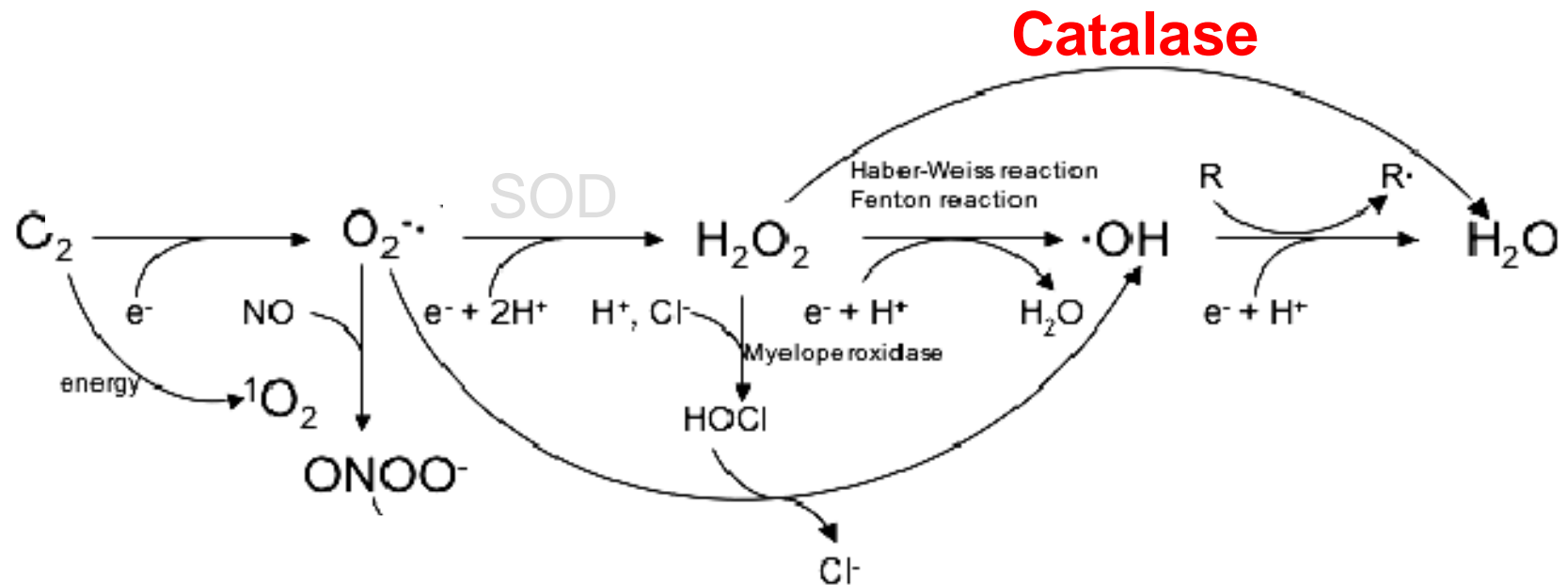


Chumbo

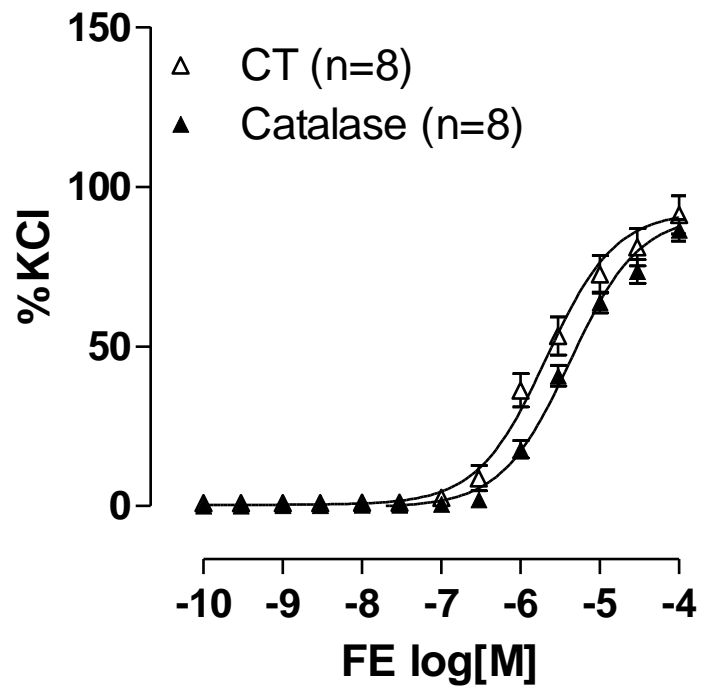


Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

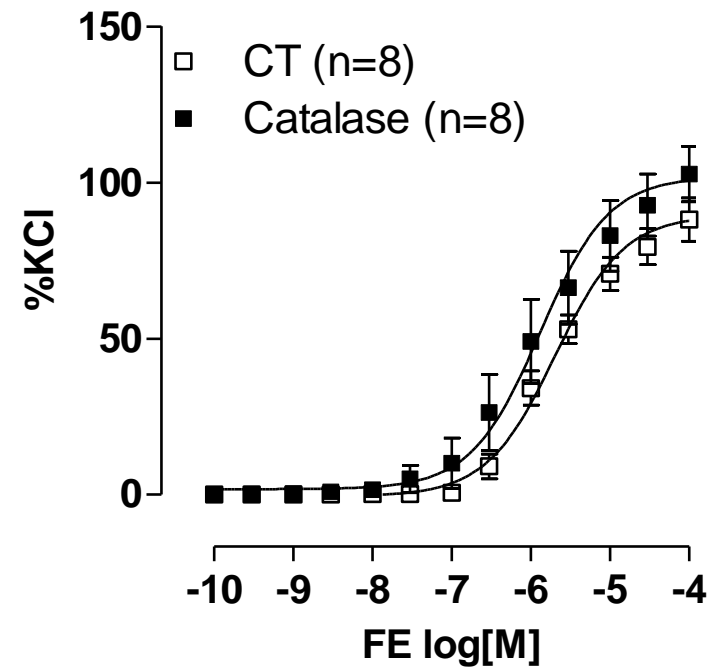
➤ Resposta à Fenilefrina → EROs (Catalase)



Controle

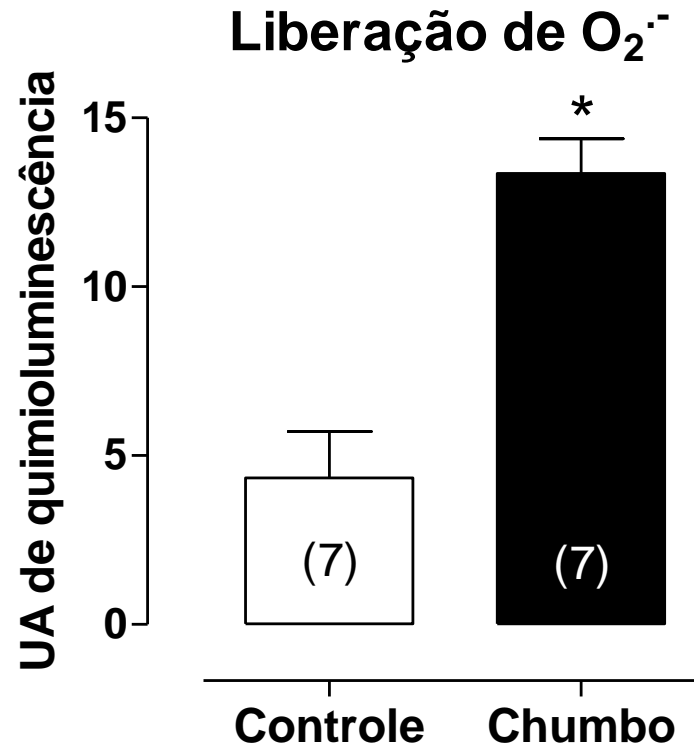


Chumbo



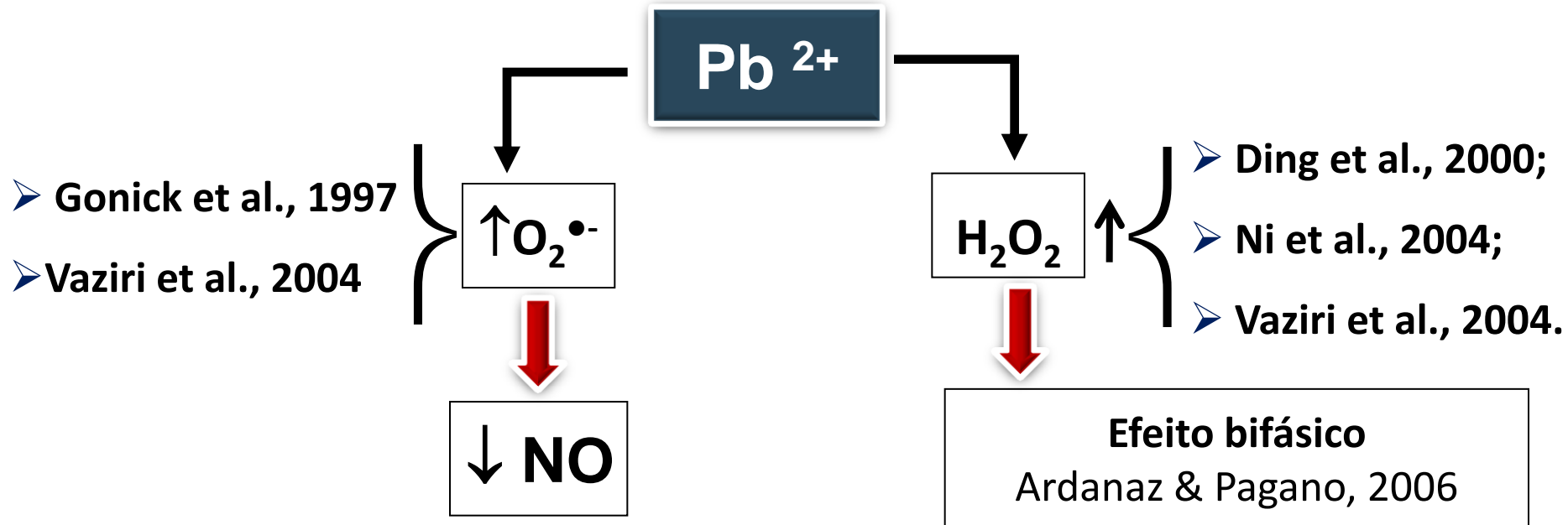
Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

Chumbo \rightarrow \uparrow ERO's \rightarrow \uparrow Resposta a Fenilefrina



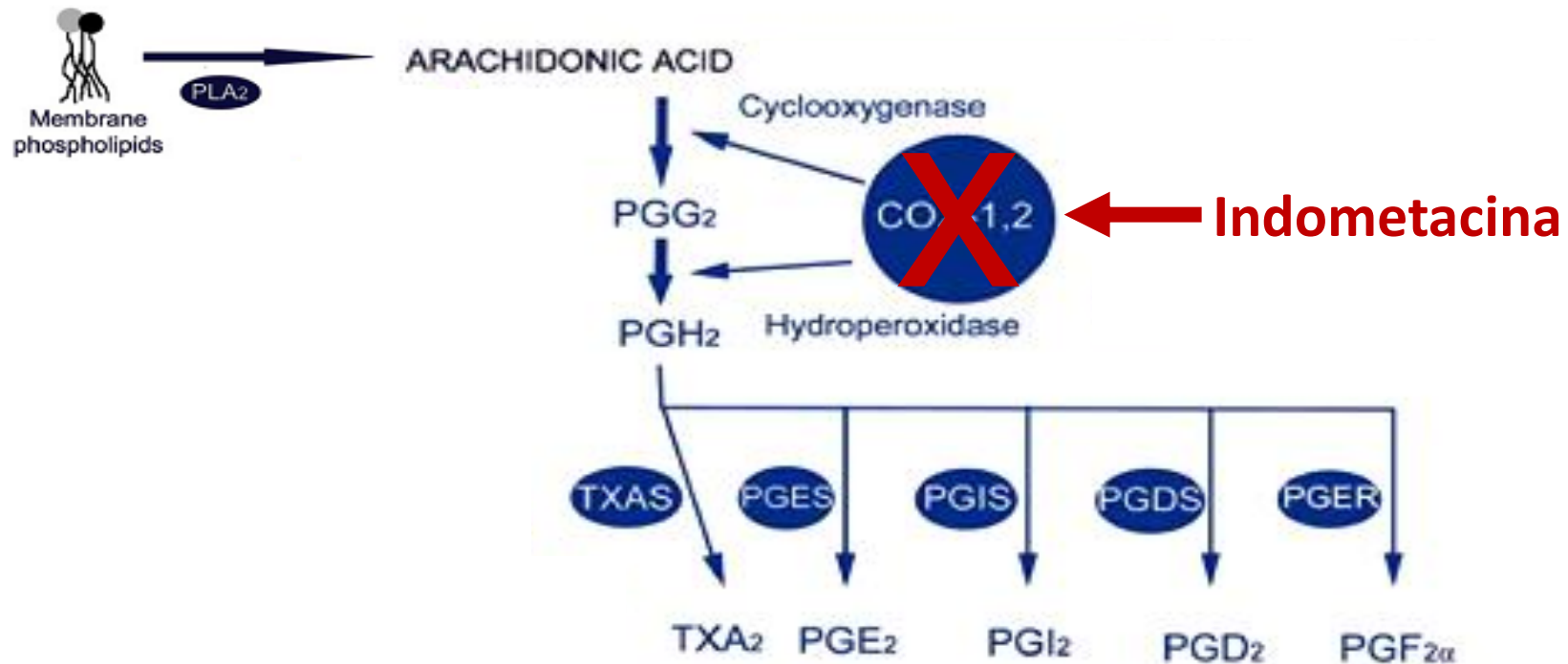
Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

30 dias de exposição à baixa dose de Pb

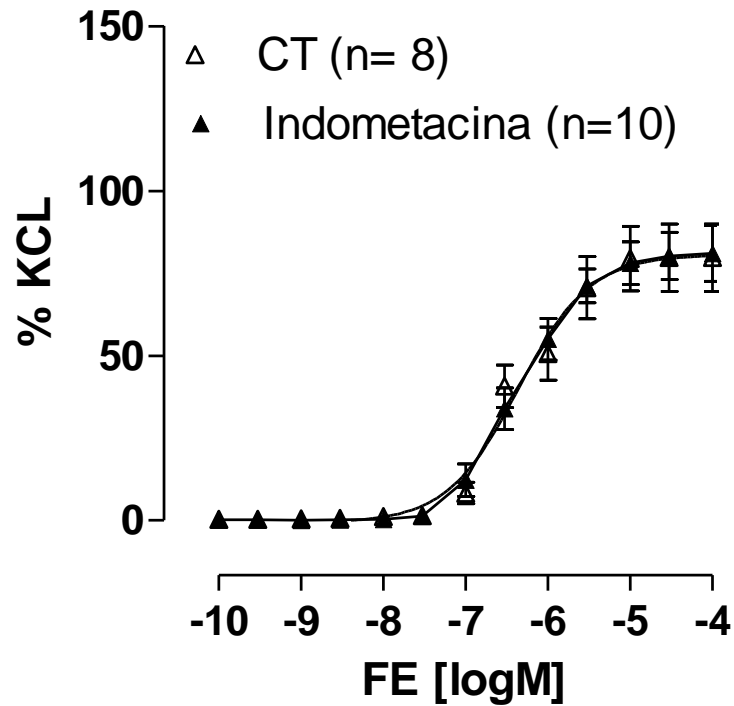


Outras vias poderiam estar envolvidas nos efeitos desse metal no nosso modelo experimental

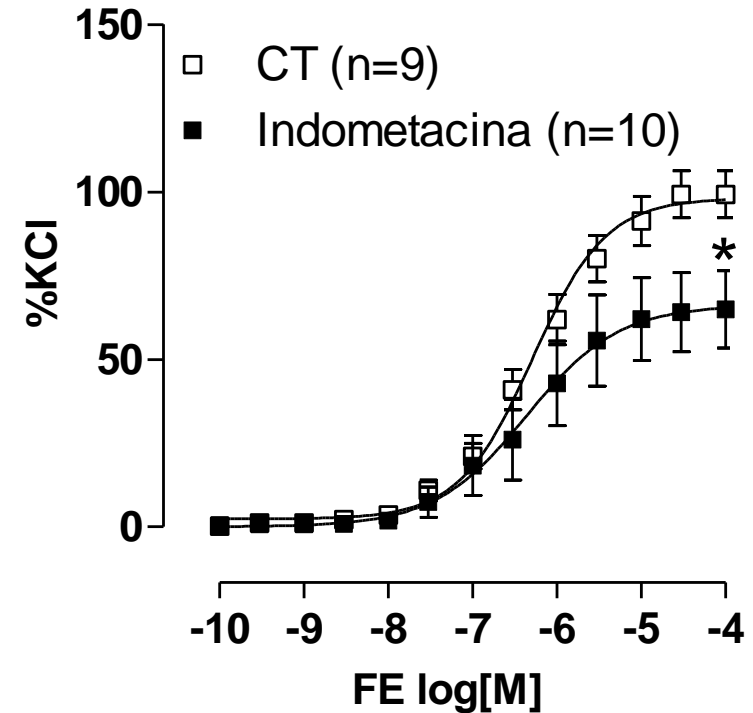
Resposta à Fenilefrina → COX (Indometacina)



Controle

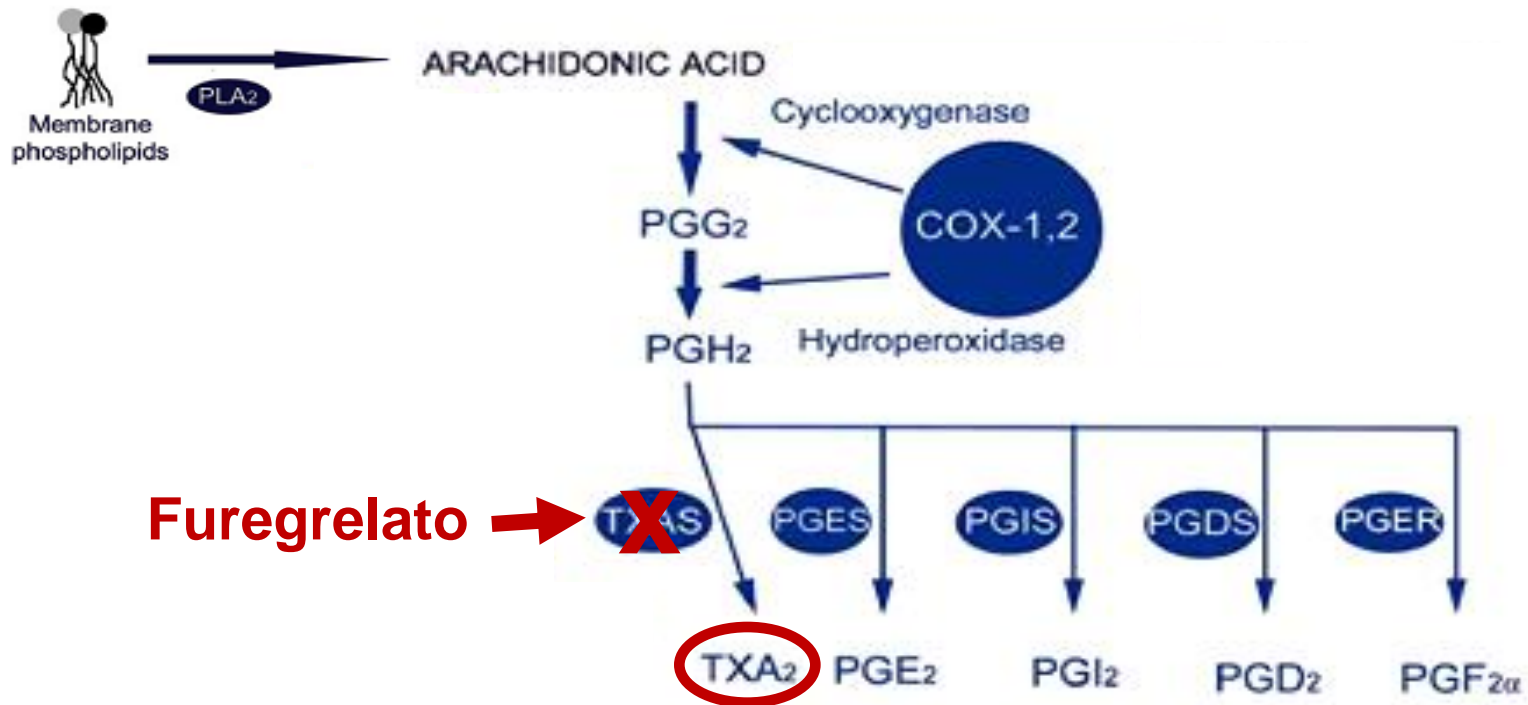


Chumbo

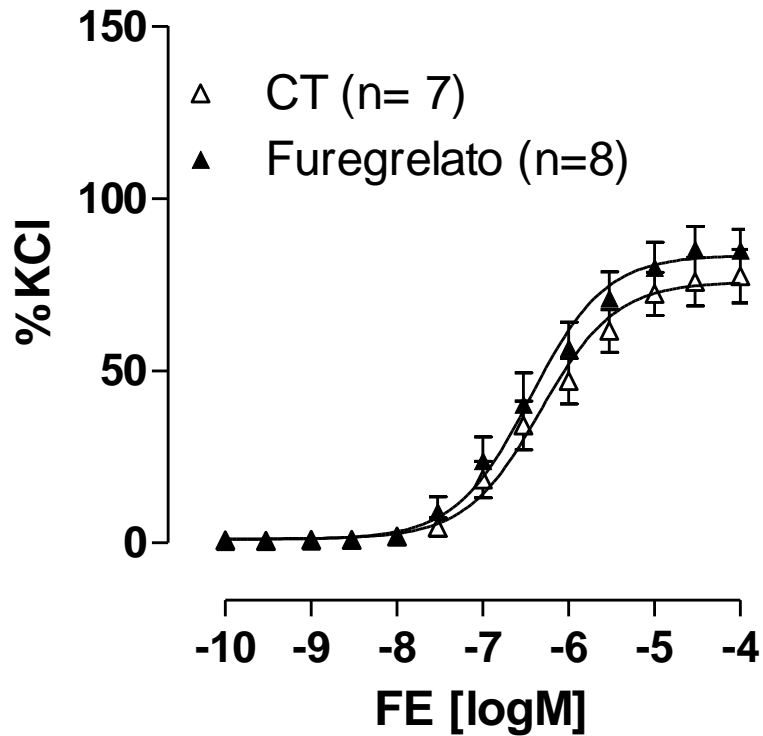


Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

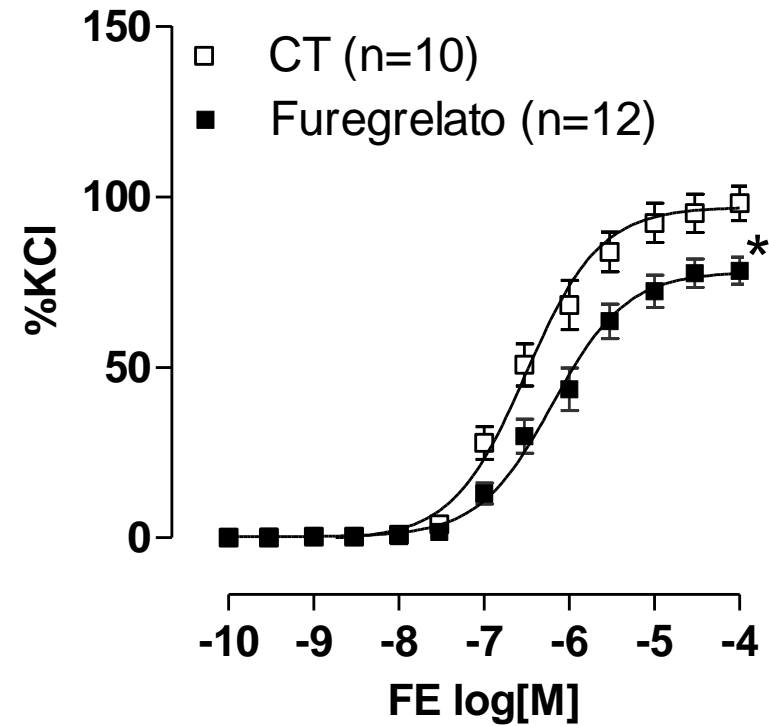
Resposta à Fenilefrina → COX (Furegrelato)



Controle



Chumbo

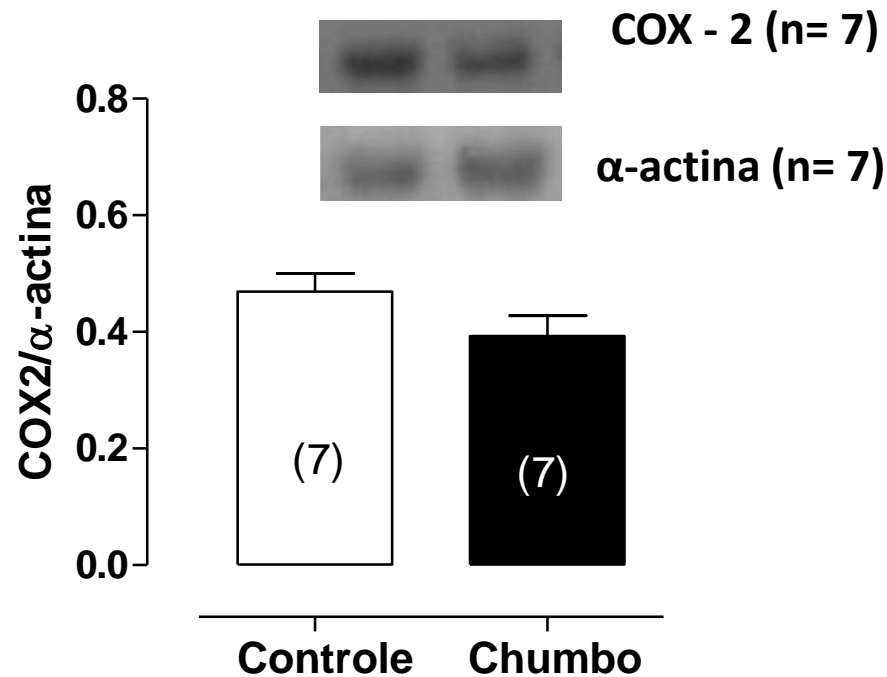


Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

COX – 2 vascular em processos patológicos

- Respostas inflamatórias e doenças como a aterosclerose e hipertensão arterial (Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005; Antman *et al.*, 2005);
- Disfunção endotelial associada à hipertensão e ao envelhecimento dos animais (Widlansky *et al.*, 2003; Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2009);
- Resposta vasoconstritora em ratos hipertensos (Zerrouk *et al.*, 1998; Adeagbo *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005);

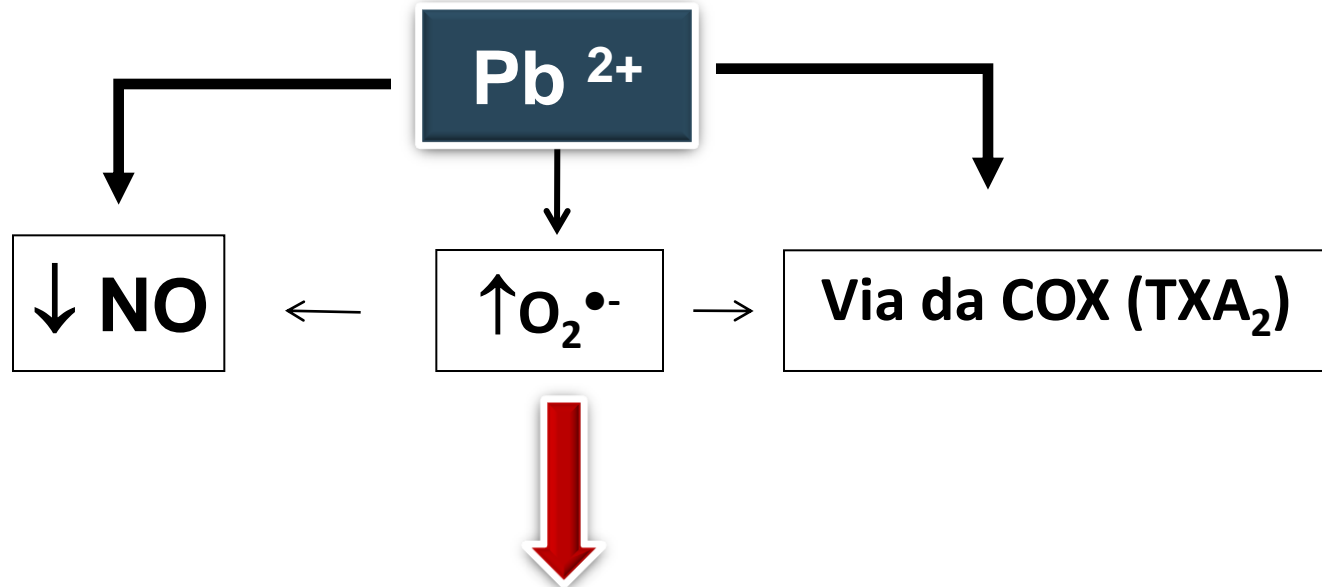
Efeito hipertensor do chumbo → COX – 2?



➤ Efeitos hipertensivos induzidos pelo chumbo → mecanismos celulares envolvidos com processos inflamatórios incluindo a COX-2 (Courtois *et al.*, 2003; Rodríguez-Iturbe *et al.*, 2005; Prozialeck *et al.*, 2008).

Média \pm EPM: expressos como relação entre a densidade das bandas da COX-2 e da α -actina.

30 dia de exposição à baixa dose de Pb



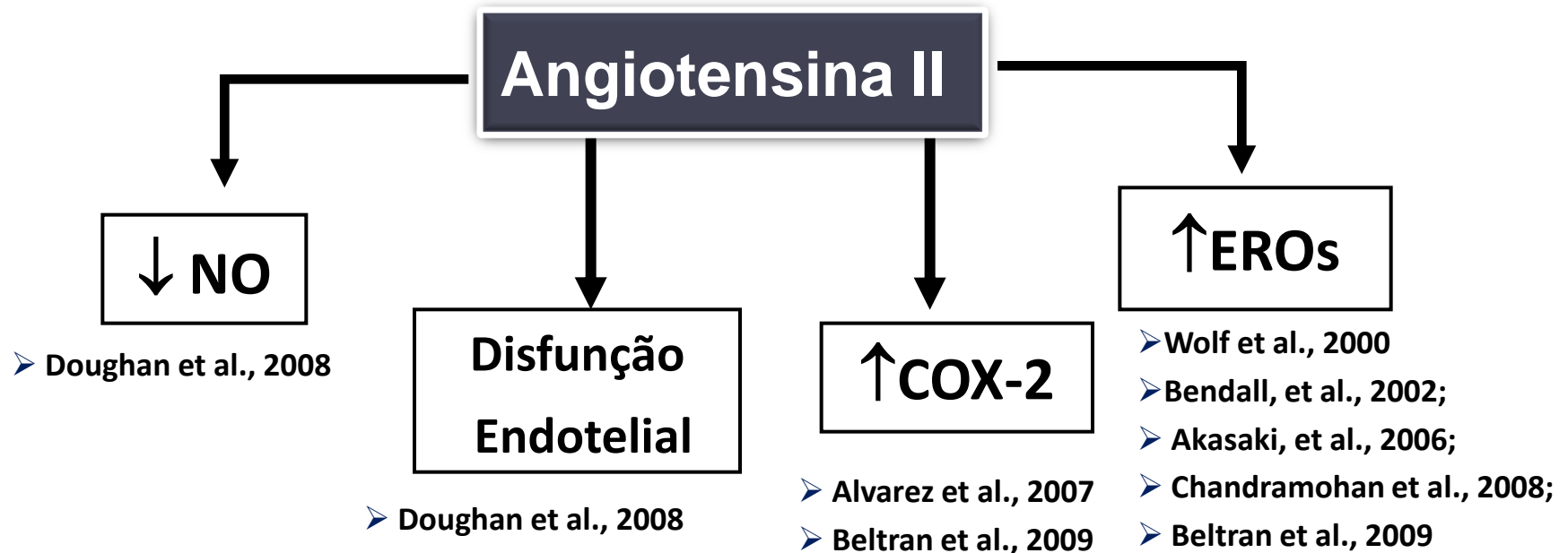
Sinalizador da Angiotensina II

George, et al., 2001

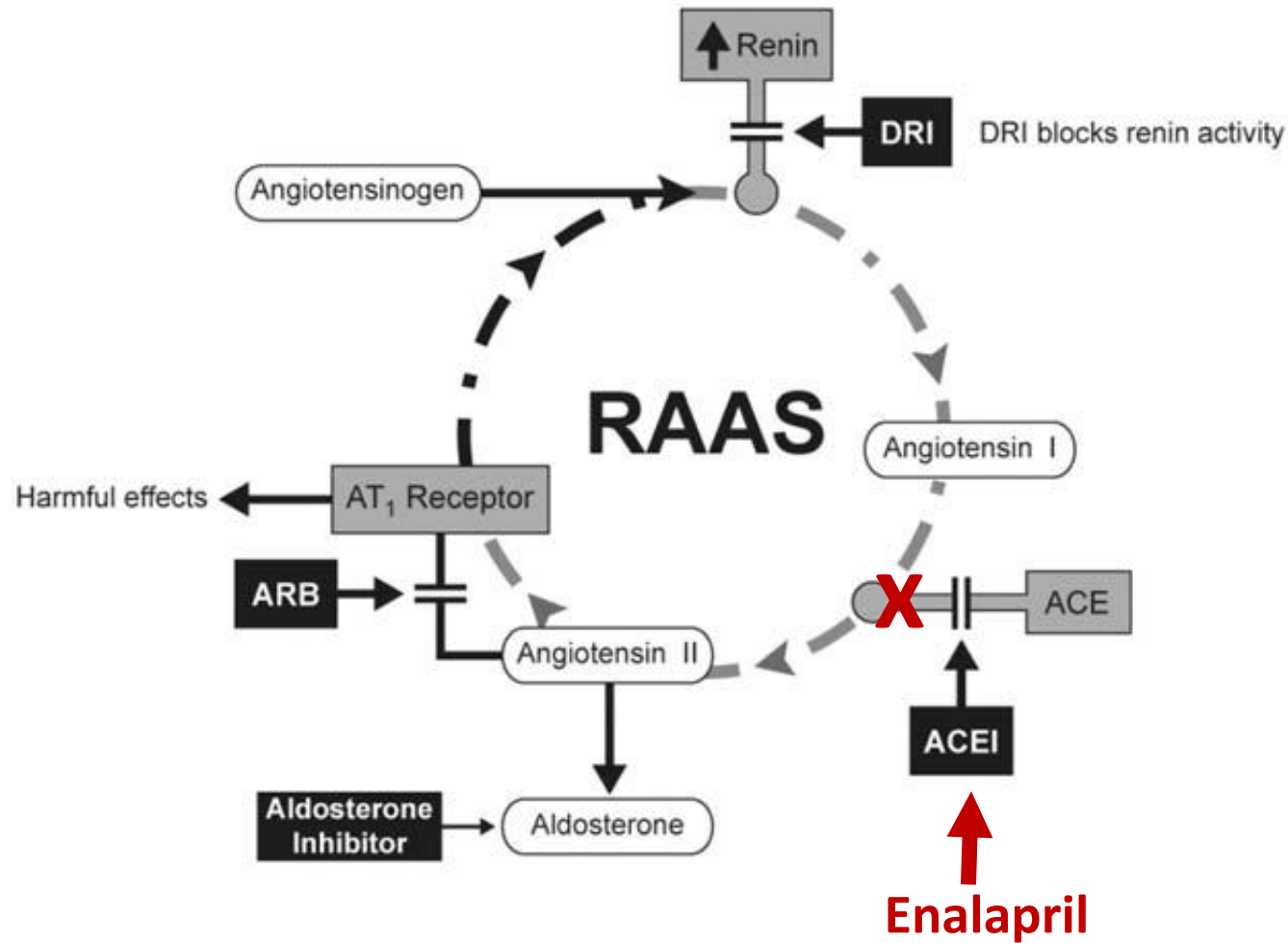
Remodelamento cardiovascular associado com Hipertensão, falência cardíaca e Diabetes Mellitus

Yusuf, et al., 2000; Garg & Yusuf, 1995

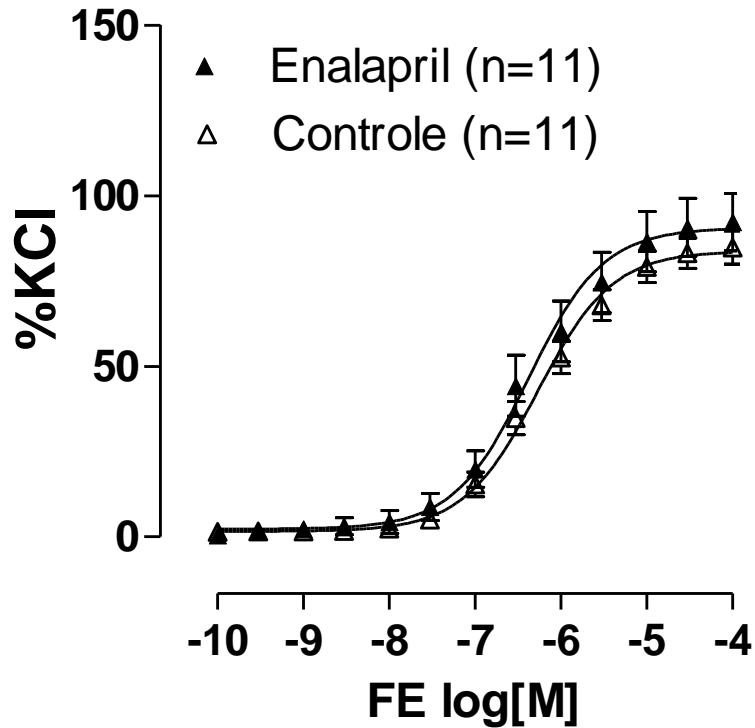
Sistema Renina-Angiotensina



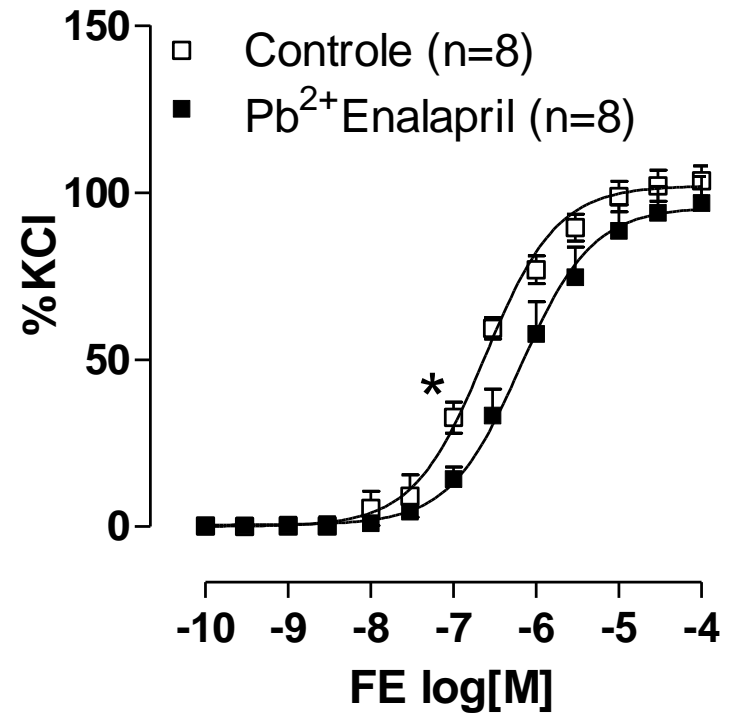
Resposta à Fenilefrina → Sistema Angiotensina



Controle

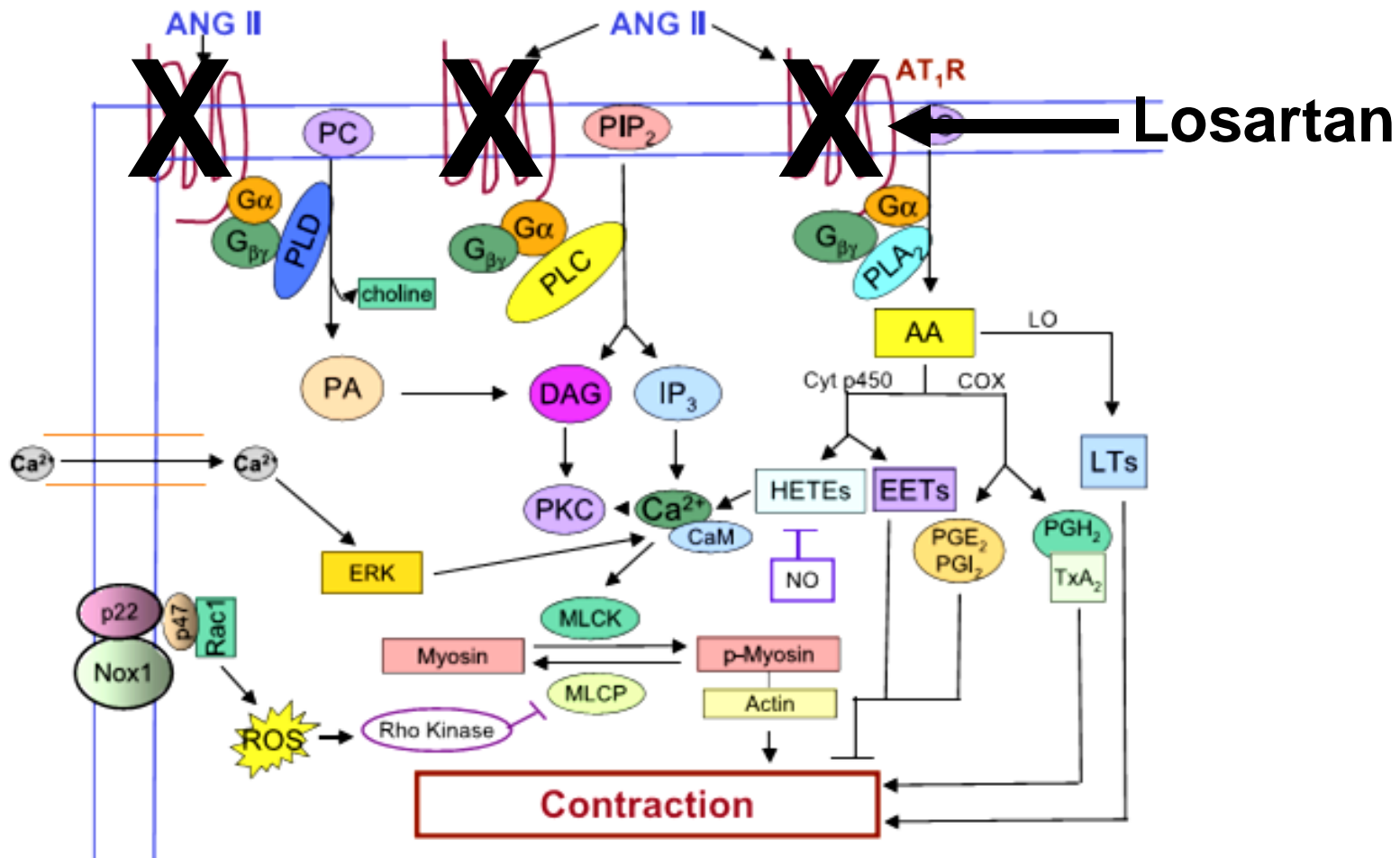


Chumbo

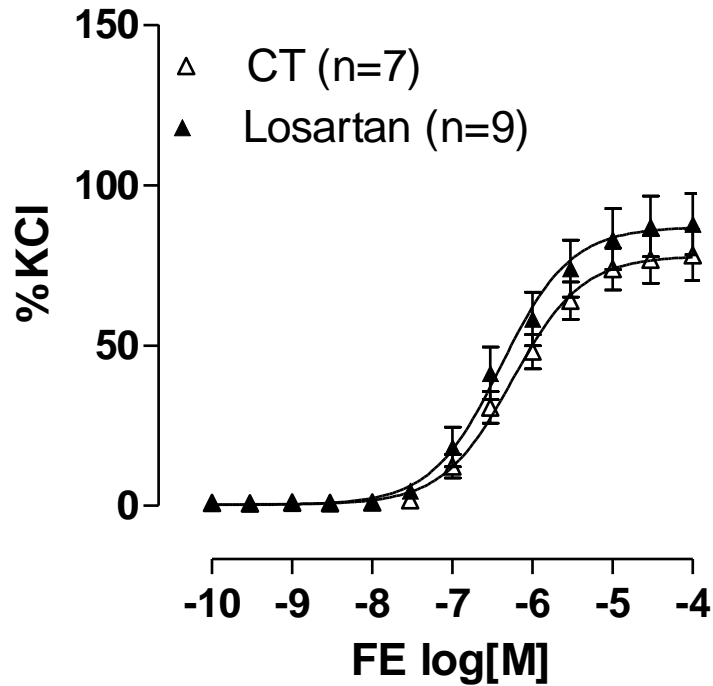


Média ± EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$

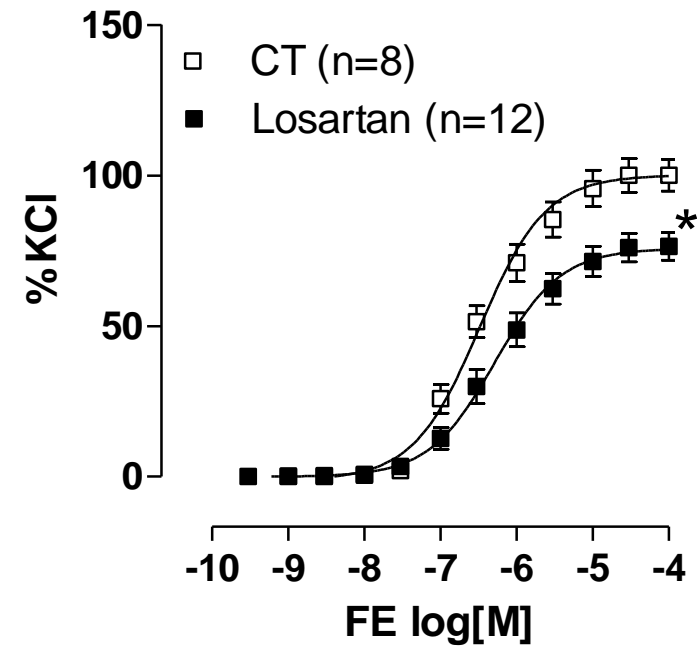
Resposta à Fenilefrina → Sistema Angiotensina



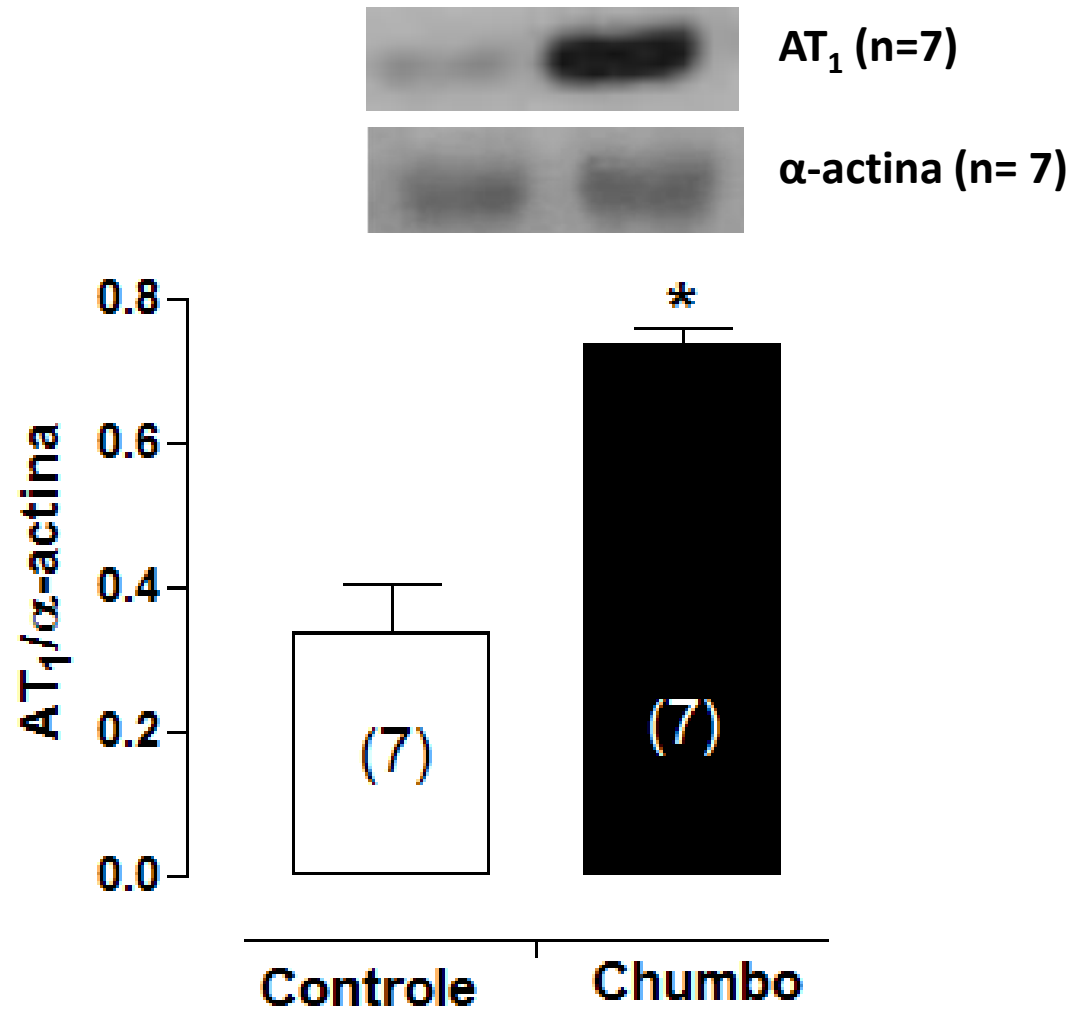
Controle



Chumbo

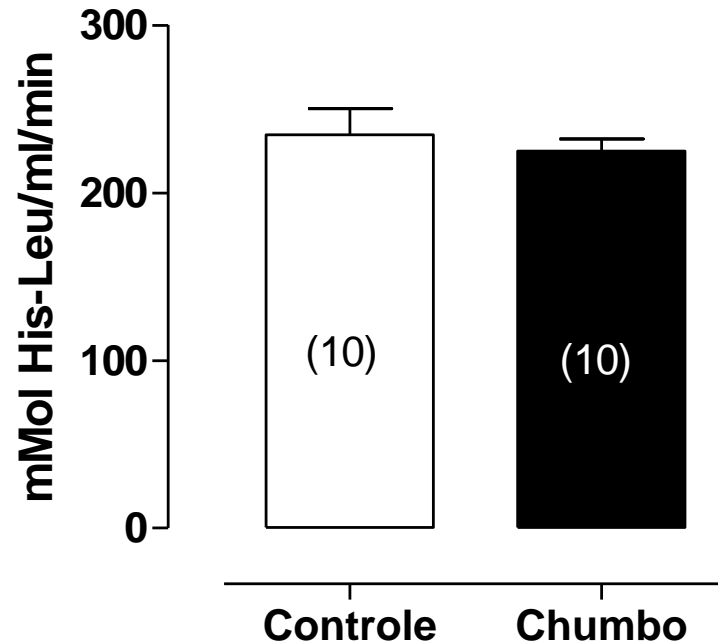


Média \pm EPM. Teste *t* não pareado: $P > 0,05$



Média \pm EPM: expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT_1 e da α -actina

Atividade plasmática da ECA



Chumbo → Aumenta atividade da ECA

- Campbell *et al* 1985 (humanos);
- Carmignani *et al.*, 1999 (ratos) ;
- Sharifi *et al.*, 2004 (ratos).

30 Dias de exposição ao chumbo

Pb²⁺



Sistema Renina-Angiotensina

- **Wouw, et al., 1978; Fleischer et al., 1980; Goldman et al., 1981; Keiser et al., 1983; Vicity et al., 1983; Metedith, et al., 1985; Rodríguez-Iturbe et al., 2005; Simões et al., 2010**

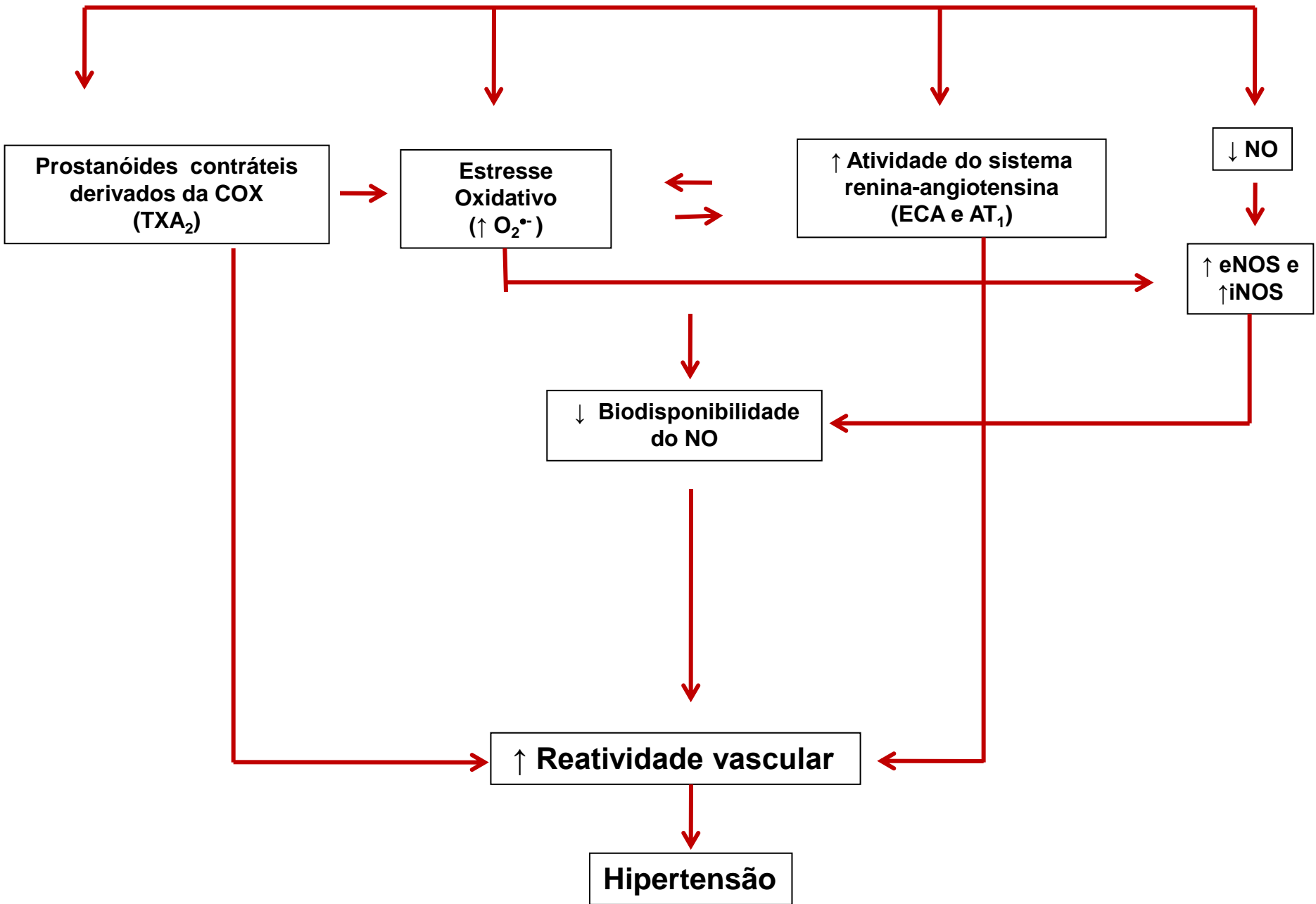
Sumarizando os resultados



Ratos expostos à baixa dose de chumbo – 30 dias

- Concentração sanguínea de chumbo → bem abaixo do valor aceitável, como valor de referência, para **indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente**;
- Alterações nos valores da PAS a partir do 7º dia e da PAS e PAD a partir do 30º dia de tratamento e alterou a reatividade vascular → aumento da resposta contrátil à fenilefrina nos anéis aórticos de ratos;
- Redução da biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio via NAD(P)H oxidase;
- Modulação endotelial negativa, envolvendo maior participação do ânion superóxido, dos prostanóides contráteis derivados da COX, especialmente o TXA₂ e participação do sistema renina-angiotensina;
- Aumento na expressão protéica das isoformas eNOS e iNOS e no receptor AT₁

Exposição a baixas doses de Chumbo



CONCLUSÃO



Exposição por trinta dias à baixa dose de acetato de chumbo provoca **alterações vasculares** consequentes à menor biodisponibilidade do óxido nítrico e maior produção de espécies reativas de oxigênio, maior liberação dos prostanóides contráteis derivados da COX e maior atividade do sistema renina-angiotensina. Nosso estudo reforça a idéia de que o **chumbo** deve ser considerado **fator de risco** para o desenvolvimento de **doenças cardiovasculares**. E seus **valores aceitáveis** como isentos de efeitos deletérios para o homem devem ser **reduzidos**.

Obrigada!

