

**Efeito agudo de baixa concentração de chumbo sobre a pressão arterial e reatividade pressórica: participação do sistema renina angiotensina, estresse oxidativo e da bomba de sódio**

**Maylla Ronacher Simões**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Fevereiro de 2011

# Efeito agudo de baixa concentração de chumbo sobre a pressão arterial e reatividade pressórica: participação do sistema renina angiotensina, estresse oxidativo e da bomba de sódio

**Maylla Ronacher Simões**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 24/02/2011 por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Couto Davel, UNICAMP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon, UFES

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg –  
Coordenador do PPGCF, UFES

---

**Simões, Maylla Ronacher, 1986**

**Efeito agudo de baixa concentração de chumbo sobre a pressão arterial e reatividade pressórica: participação do sistema renina angiotensina, estresse oxidativo e da bomba de sódio.** [Vitória] 2011

CXXX, 130 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc, Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Chumbo 2. Sistema renina-angiotensina 3. Estresse oxidativo 4. NKA

---

A Luiz, Ivete, Rakel e Rahone,  
que estiveram sempre ao meu  
lado me apoiando.

“Se tivéssemos explicação para tudo, não faríamos pesquisa”.

Dalton Valentim Vassallo

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me proporcionado a alegria de fazer um mestrado e poder fazer pesquisa, pela força, por ter me acompanhado dia a dia nesta caminhada, por ter sido sempre fiel. Obrigada Senhor!

Ao Dalton, por me proporcionar tudo isso que estou vivendo, por ter me recebido no LEMC desde antes do mestrado, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de pertencer a este grupo que tanto amo. Agradeço pelas orientações, pela amizade, pelos sábios ensinamentos de vida e pelos ótimos momentos de descontração. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelas palavras que sempre me tranquilizavam e por sempre acreditar em mim. Chefe, obrigada por realizar este sonho.

À Mirian o meu eterno agradecimento, esta conquista eu devo especialmente a você que acreditou em mim, desde o dia da prova do mestrado, me incentivando, confiando que eu ia passar na prova, muitas vezes mais confiante do que eu mesma. Obrigada sua pela amizade, pelos seus conselhos, pela disponibilidade quando mais precisava. Agradeço especialmente pelo projeto de mestrado, por você ter me orientado tão bem. Obrigada pelas oportunidades que você me proporcionou. Obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento e por acreditar em mim.

À Alessandra pela excelente orientação. Obrigada Alê por ter me aceitado como aluna, obrigada pelas suas colocações, sugestões e principalmente pela sua dedicação. Você foi fundamental para a realização deste trabalho. De coração eu te agradeço!

À Ivanita pela amizade e disponibilidade em todos os momentos que procurei sua ajuda. Principalmente nos momentos de dúvidas, as quais você esclarecia maravilhosamente, nas correções dos resumos, pôsteres e apresentações, correções estas tão perfeitas que nada ficava para trás. Obrigada Iva!

À Thaís, pela amizade, pelos ótimos momentos juntas e pelos conselhos que sempre vieram nas horas certas. Obrigada Thá por estar por perto e sempre disposta a me ouvir. Você é uma grande amiga!

À Lorena pela amizade e principalmente por ter me ajudando nesta dissertação e no paper. Lorinha muito obrigada por poder compartilhar seus conhecimentos e ter a sua amizade.

À Edna e Fabiana, pelos inúmeros momentos de diversão e descontração, sempre contagiando a todos com alegria.

Ao Rogério que me ensinou as várias técnicas realizadas na bioquímica. Obrigada Roger pelos dias intermináveis na bioquímica, que apesar do cansaço foram ótimos.

A Bruna e a Jonaína pelos momentos bons e ruins que dividimos desde antes da prova do mestrado. Valeu meninas!

Ao Thiago Mello, pela motivação e direção no início desta caminhada.

Aos amigos do LEMC que me proporcionaram maravilhosos dias de trabalho: Aurélia, Bianca, Brunella, Camila, Cristina, Eduardo, Felipe, Fernanda, Gilson, Gustavo, Jaicy, Jhuli Keli, Priscila, Juliana, Karina, Larissa, Netto, Núbia.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Ao meu amado pai Luiz e à minha amada mãe Ivete que são meus exemplos de vida. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim, por todos os ensinamentos ao longo da minha vida, por muitas vezes abdicarem de suas próprias vidas para tornar possíveis meus sonhos. Obrigada por estarem sempre presentes mesmo tão distantes. MUITO OBRIGADA!

À minha irmãzinha Rakel pela maravilhosa companhia ao longo de 3 anos. Obrigada Kel, sinto sua falta.

Ao meu amor, Rahone, que comemorou comigo todas as minhas vitórias e do meu lado estava nos momentos mais difíceis, me confortando e amparando. Sempre disposto a me aconselhar mesmo não entendendo nada do eu fazia no LEMC. Obrigada Amor, pelo seu amor e amizade.

Aos meus familiares que sempre estiveram por perto durante toda esta caminhada.

Ao Fonseca, pela disponibilidade de ajudar com as questões burocráticas. À Cláudia, à Maria, à equipe do biotério e a todos os demais funcionários do PPGCF, muito obrigada.

À CAPES, CNPq e à FAPES/FUNCITEC, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 CHUMBO.....	27
<b>1.1.1 História do chumbo.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.2 Características gerais.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.3 Fontes de exposição e utilização.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.4 Cinética do chumbo no organismo.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.5 Efeitos nos diversos órgãos e sistemas.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1.6 Efeitos no sistema cardiovascular.....</b>	<b>34</b>
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	37
1.3 NKA.....	40
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	43
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	50
<b>3.1.1 Tratamento agudo com acetato de chumbo – modelo experimental.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.2 Determinação da concentração de chumbo no sangue.....</b>	<b>51</b>
3.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	52



<b>3.2.1 Protocolos experimentais.....</b>	<b>52</b>
3.2.1.1 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após 120 minutos de exposição ao acetato de chumbo.....	52
3.2.1.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após administração aguda de acetato de chumbo.....	53
3.2.1.3 Avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina antes e após bloqueio ganglionar com hexametônio e após tratamento agudo com acetato de chumbo.....	54
3.2.1.4 Envolvimento do sistema renina angiotensina sobre as alterações hemodinâmicas e na reatividade pressórica induzida pelo chumbo.....	55
3.2.1.5 Influência da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase (NKA) sobre as alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.....	56
3.2.1.6 Envolvimento dos radicais livres sobre as alterações hemodinâmicas e reatividade pressórica induzidas pelo chumbo.....	56
<b>3.3 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.1 Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA).....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.2 Determinação da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.3 Medida de produção plasmática de malondialdeído (MDA).....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.4 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot.</b>	<b>59</b>
3.3.4.1 Western Blot para detecção de receptores AT1, AT2 e Subunidade $\alpha_1$ NKA.....	59
3.3.4.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....	59
3.3.4.3 Eletroforese e transferência das amostras.....	59

3.3.4.4 Incubação dos anticorpos.....	60
3.3.4.5 Detecção das proteínas.....	61
3.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
3.5 FÁRMACOS E REAGENTES.....	63
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO.....	66
4.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS - PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	66
<b>4.2.1 Efeito do acetato de chumbo sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.2 Efeito do hexametônio sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2.3 Efeito do losartan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.4 Efeito do enalapril sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>70</b>
<b>4.2.5 Efeito da canrenona sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.6 Efeito do tempol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>73</b>
4.3 REATIVIDADE PRESSÓRICA À FENILEFRINA.....	74
<b>4.3.1 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após</b>	

<b>tratamento agudo com o acetato chumbo.....</b>	<b>74</b>
<b>4.3.2 Efeito do hexametônio sobre a reatividade pressórica à fenilefrina da Pressão Artéria Sistólica, Diastólica e Frequência Cardíaca antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>75</b>
<b>4.3.3 Efeito do losartan sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3.4 Efeito do enalapril sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após o tratamento com chumbo.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3.5 Efeito do tempol sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>81</b>
<b>4.4 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4.1 Avaliação da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4.2 Medida da atividade plasmática da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....</b>	<b>83</b>
<b>4.4.3 Medida da produção plasmática de malondialdeído (MDA).....</b>	<b>84</b>
<b>4.4.4 Expressão protéica dos receptores de angiotensina AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, e da isoforma α<sub>1</sub> da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4.4.1 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4.4.2 Expressão protéica da subunidade α<sub>1</sub> da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.....</b>	<b>86</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>5.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1.1 Efeito do hexametônio sobre a pressão arterial, frequência cardíaca basal e reatividade pressórica à fenilefrina, antes e após tratamento agudo com o chumbo.....</b>	<b>92</b>

<b>5.1.2 Envolvimento do sistema renina angiotensina sobre as alterações hemodinâmicas arteriais induzida pelo Pb.....</b>	<b>93</b>
<b>5.1.3 Efeito da canrenona sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basais antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>97</b>
<b>5.1.4 Efeito do tempol sobre a pressão arterial, frequência cardíaca basal e reatividade pressórica à fenilefrina, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.....</b>	<b>99</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>128</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dosagem sanguínea de chumbo em ratos expostos e não expostos.....	66
Tabela 2: Alterações da Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC) antes e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo, (n=9).....	67
Tabela 3: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Hexa+Pb); (n=8).....	68
Tabela 4: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do losartan (Los) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Los+Pb); (n=7).....	69
Tabela 5: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Enalapril (Enal) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Enal+Pb); (n=6).....	71
Tabela 6: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Canrenona (Can) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Can+Pb); (n=7).....	72
Tabela 7: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Tempol (Temp) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Temp+Pb); (n=5).....	73
Tabela 8: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e	

sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, antes (Ct) e após (Pb) tratamento com 320 $\mu\text{g/Kg}$ de chumbo (n=11).....	74
Tabela 9: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ , mmHg) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 $\mu\text{g/Kg}$ de chumbo (Hexa + Pb); (n= 8).....	76
Tabela 10: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE) da FC antes (Ct), após a infusão de Hexametônio (Hexa) e após o chumbo (Hexa+Pb), (n=8).....	77
Tabela 11: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ , mmHg) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do losartan (Los) e após tratamento com 320 $\mu\text{g/Kg}$ de chumbo (Los + Pb), (n=7).....	78
Tabela 12: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ , mmHg) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do enalapril (Enal) e após tratamento com 320 $\mu\text{g/Kg}$ de chumbo (Enal + Pb); (n=6).....	80
Tabela 13: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima ( $R_{\text{max}}$ , mmHg) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do tempol (Temp) e após tratamento com 320 $\mu\text{g/Kg}$ de chumbo (Temp + Pb); (n=5).....	81

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Avaliação temporal da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), obtida em ratos anestesiados antes (Tempo 0) e após a administração intravenosa de Pb (320 µg/kg). ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$ , vs Ct (Tempo 0), (n=9)..... 67
- Figura 2: (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Hexa+Pb) (n = 8). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ct; + $p < 0,05$  Hexa vs Hexa+Pb..... 68
- Figura 3: (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Losartan (Los) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Los+Pb); (n = 7). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ct..... 70
- Figura 4: (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Enalapril (Enal) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Enal+Pb) (n =6). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ct..... 71
- Figura 5: (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de canrenona (Can) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb. (N = 7). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. + $p < 0,05$  Can vs Can+Pb..... 72
- Figura 6: (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Tempol (Temp) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb

(Temp+Pb); (n =5). Anova 1 via.....	73
Figura 7: Curvas dose-resposta à fenilefrina sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct) e após (Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg). Teste <i>t</i> -Student para comparação do Basal, pD2 e Rmax, *P<0,05 vs Ct.....	75
Figura 8: Curvas dose-resposta à fenilefrina sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após (Hexa + Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de post hoc de Tukey, para comparação do Basal, Rmax e pD2. *p<0,05 vs Ct; +p<0,05 Hexa vs Hexa+Pb.....	76
Figura 9: Avaliação da FC na curva dose-resposta à fenilefrina, antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após (Hexa + Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg) (n = 8). Anova 1 via para comparação do Basal, Rmax e pD2. *p<0,05 vs Ct.....	77
Figura 10: Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do losartan, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de losartan (Los) e após (Los+Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de post hoc de Tukey, para comparação do Basal, Rmax e pD2. *P<0,05 vs Ct.....	79
Figura 11: Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do enalapril, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de Enalapril (Enal) e após (Enal+Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de post hoc de Tukey, para comparação do Basal, Rmax e pD2. *p<0,05 vs Ct.....	80
Figura 12: Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do Tempol, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de Tempol (Temp) e após (Temp+Pb) 1 hora de exposição ao	



chumbo (320 µg/kg). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de post hoc de Tukey, para comparação do Basal, Rmax e pD2. *p<0,05 vs Ct.....	82
Figura 13: Efeito do tratamento agudo com chumbo sobre a atividade da NKA em corações de ratos. Ct (n = 4); Pb (n = 6). Teste t-Student. *p< 0,05 vs Ct.....	83
Figura 14: Efeito do tratamento agudo com chumbo sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. Ct (n = 7); Pb (n = 10). Teste t-Student. *p< 0,05 vs Ct.....	83
Figura 15: Concentração de Malondialdeído plasmático. Ct (n =8); Pb (n = 9). Teste t-Student: *p < 0,05.....	84
Figura 16: Expressão protéica de receptor angiotensinoginérgico AT <sub>1</sub> , por meio da técnica de Western Blot, em segmento de artéria aorta torácica (Ct = 7/Pb = 7), coração (Ct = 8/Pb = 6) e rim (Ct = 5/Pb = 6) de ratos. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT <sub>1</sub> e da α-actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT <sub>1</sub> e da α-actina. Teste <i>t-Student</i> .....	85
Figura 17: Expressão protéica de receptor angiotensinoginérgico AT <sub>2</sub> , por meio da técnica de Western Blot, em segmento de artéria aorta torácica (Ct = 6/Pb = 7), coração (Ct = 5/Pb = 7) e rins (Ct = 5/Pb = 6) de ratos. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT <sub>2</sub> , α-actina e do GAPDH. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT <sub>2</sub> , da α-actina e do GAPDH. Teste t-Student.....	86
Figura 18: Expressão protéica da subunidade α <sub>1</sub> da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase, por meio da técnica de Western Blot, em coração de ratos dos grupos controle (Ct, n = 5) e chumbo (Pb, n = 6). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da subunidade α <sub>1</sub> da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase e do GAPDH. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como	

relação entre a densidade de  $\alpha_1$  e do GAPDH. Teste t-Student..... 87

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C - graus celsius

μM - micromolar

AA - Ácido Araquidônico

ALAD - Ácido δ-amino Levulínico Dehidratase

APS - persulfato amônico

AT<sub>1</sub> - receptor de angiotensina do subtipo 1

AT<sub>2</sub> - receptor de angiotensina do subtipo 2

ATP - Adenosina Trifosfato

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BH<sub>4</sub> - tetrahidrobiopterina

Ca<sup>+2i</sup> - concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup>

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CEUA/EMESCAM - Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ct - grupo controle

DAG - diacilglicerol

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 - Enzima Conversora da Angiotensina II

EDHF - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

eNOS - isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

EPM - Erro Padrão da Média

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FAPES - Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo

FC - Frequência Cardíaca

FE - fenilefrina

FUNCITEC - Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia

GMPc - 3'5'-monofosfato cíclico de guanosina

GPx - glutadiona peroxidase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
HCl - ácido clorídrico  
Hip-His-Leu - Hipuril-l-histidil-l-leucina  
HOCl - ácido hipocloroso  
*i.p.* - intra peritonal  
IARC - Agency for Research on Cancer  
IBMP - índices Biológicos Máximos Permitidos  
IgG - imunoglobulina  
iNOS - isoforma induzível da sintase de óxido nítrico  
IP<sub>3</sub> - 1,4,5 – inositol trifosfato  
KCl- cloreto de potássio  
kDa - kilodalton  
Kg - kilograma  
L - litro  
M - molar  
MAPKs - mitogen-activated protein kinase  
MDA - malondialdeído  
mg - miligrama  
min - minuto  
mM - milimolar  
mmHg - milímetros de mercúrio  
Na<sup>+</sup> - sódio  
NaCl - cloreto de sódio  
NADPH - adenina dinucleotídeo fosfato  
Na<sup>+</sup><sub>i</sub> - concentração de sódio intracelular  
NCX - trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
NKA - bomba sódio-potássio  
nm - nanômetro  
NO - óxido nítrico  
NOS - óxido nítrico sintase  
NR7 - Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido

O<sub>2</sub> - oxigênio  
-OH - radical hidroxila  
ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
PA - Pressão Arterial  
PAD - Pressão Arterial Diastólica  
PAS - Pressão Arterial Sistólica  
Pb - chumbo  
Pb - grupo chumbo  
Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> - tetraetilchumbo  
Pb(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> - tetrametilchumbo  
PbCl<sub>2</sub> - cloreto de chumbo  
PbO - óxido de chumbo  
pD<sub>2</sub> - sensibilidade  
PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>  
Pi - fósforo inorgânico  
PIP<sub>2</sub> - fosfatidil inositol 4,5-bifosfato  
PKA - proteína quinase A  
PKC - proteína quinase C  
PKG - proteína quinase G  
PLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub>  
ppm - partes por milhão  
PVC - polivinila  
R<sub>máx</sub> - resposta máxima  
rpm - rotação por minuto  
-SH - radical sulfidril  
SNC - sistema nervoso central  
SNA - sistema nervoso autônomo  
SOD - superóxido dismutase  
SRA - Sistema Renina-Angiotensina  
SRAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo  
UI - unidades

V - volts

VSMCs - células do músculo liso vascular

WHO - World Health Organization

## RESUMO

O chumbo é um contaminante ambiental amplamente utilizado pelo homem. A exposição ao chumbo está relacionada com hipertensão e doenças cardiovasculares, porém os mecanismos pelos quais este metal exerce efeito tóxico sobre este sistema não estão totalmente elucidados. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental de exposição aguda a baixa concentração de chumbo buscando avaliar os efeitos deste metal sobre a pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e reatividade pressórica, bem como os possíveis mecanismos hipertensores precocemente ativados na hipertensão induzida pelo chumbo. Ratos Wistar (280 e 350 g) foram anestesiados com uretana (1,2 g/Kg) e submetidos à cirurgia de cateterização da carótida e jugular para a medida da pressão arterial e administração de fármacos, respectivamente. A PA, FC e a reatividade pressórica à fenilefrina (0,03 a 100 µg/Kg, *in bolus*) foram avaliadas antes e após a administração de Chumbo (*i.v.* doses *in bolus* de 320 µg/Kg). A influência do hexametônio (Hexa, 20 mg/Kg); do losartan (Los, 10 mg/Kg); do enalapril (5 mg/Kg); da canrenona (Can, 1mg/kg); e do tempol (12 mg/Kg), foi avaliada nas ações desse metal sobre a PAS, PAD, FC e reatividade pressórica. A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática, da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) cardíaca, a peroxidação lipídica (através da liberação do malondialdeído-MDA no plasma) e a expressão de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> e da subunidade α<sub>1</sub> da NKA em amostras de animais expostos e não-expostos ao chumbo foram mensurados. A exposição por 2 horas ao chumbo levou a uma concentração sanguínea de chumbo de 37 ± 1.7 µg/dL, a qual está abaixo da concentração sanguínea considerada segura para trabalhadores expostos. Esta concentração de chumbo promoveu o aumento da pressão arterial sistólica (PAS) (Ct: 109 ± 3 mmHg vs Pb: 120 ± 4 mmHg), porém não causou alterações na PAD e FC. Houve também redução da sensibilidade (PAS - Ct: -2,93 ± 0,08 vs Pb: -1,58 ± 0,51/ PAD - Ct: -3,53 ± 0,18 vs Pb: -2,86 ± 0,20) após exposição ao metal. O pré-tratamento com losartan, bloqueador de receptores AT<sub>1</sub> ou com enalapril, inibidor da ECA, bloquearam o aumento da pressão arterial sistólica promovido pelo chumbo neste modelo, assim como a canrenona, bloqueador da NKA e o tempol, mimético da SOD. No entanto, o hexametônio, bloqueador ganglionar, não preveniu este efeito. Diferentemente, a redução da sensibilidade

promovida pelo chumbo não foi restaurada por estes fármacos. A análise bioquímica revelou que a exposição aguda ao chumbo foi capaz de aumentar a atividade da ECA (27 % em relação ao Ct) e da NKA (125 % em relação ao Ct) e aumentar a peroxidação lipídica (23 % em relação ao Ct). Porém a expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, e da subunidade  $\alpha_1$  da NKA não foi diferente entre os grupos. Diante disso, a exposição aguda à baixa concentração de chumbo aumenta a pressão arterial sistólica por aumentar a atividade do sistema renina-angiotensina, a atividade da NKA e promover o estresse oxidativo. Esses achados oferecem evidências adicionais de que o chumbo, em baixas concentrações e em exposição aguda, pode desencadear mecanismos iniciais de desenvolvimento da hipertensão caracterizando-se como um fator de risco ambiental para a doença cardiovascular.



## ABSTRACT

Lead is an environmental contaminant widely used by man. Lead exposure is associated with hypertension and cardiovascular disease, but the mechanisms by which this metal promotes a toxic effect on the cardiovascular system are not fully elucidated. In this study an experimental model of acute exposure to low lead concentration was developed to evaluate the effects of this metal on arterial pressure, heart rate and pressure reactivity, as well the possible mechanisms that promotes an early activation of lead-induced hypertension. Wistar rats (280 to 350 g) were anesthetized with urethane (1.2 g/kg) and underwent surgery for catheterization of the carotid artery and jugular vein for blood pressure measurement and drug administration, respectively. AP, HR and pressure reactivity to phenylephrine (0.03 to 100 mg/kg, bolus) were assessed before and after administration of lead (iv bolus doses of 320 mg/kg). The influence of hexamethonium (Hexa, 20 mg/kg), losartan (Los, 10 mg/kg), enalapril (5 mg/kg), canrenone (1 mg/kg) and tempol (12 mg/kg), was evaluated in the actions of this metal on the SAP, DAP, HR and pressure reactivity. The activity of plasma angiotensin converting enzyme (ACE), of cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), lipid peroxidation (through the release of malondialdehyde-MDA in plasma) and the expression of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> and α<sub>1</sub> subunit of NKA in samples of animals exposed and not exposed to lead were measured. Lead exposure for 2 hours led to a blood lead concentration of 37 ± 1.7 mg/dL, which is below the blood concentration considered safe for exposed workers. This lead concentration promoted an increase in systolic arterial pressure (SAP) (Ct: 109 ± 3 mmHg vs Pb: 120 ± 4 mmHg) but did not cause changes in DAP and HR. There was also a reduction in sensitivity (PAS - Ct: -2.93 ± 0.08 vs. Pb: -1.58 ± 0.51 / PAD - Ct: -3.53 ± 0.18 vs. Pb: -2.86 ± 0.20) after exposure to lead. Pretreatment with losartan, an AT<sub>1</sub> receptor blocker or with enalapril, an ACE inhibitor, blocked the increase in systolic arterial pressure in this model promoted by lead, as well as canrenone, an NKA blocker, and tempol, a superoxide dismutase mimetic. However, hexamethonium, a ganglionic blocker, did not prevent this effect. Unlike, the reduction of the sensitivity promoted by lead was not restored by these drugs. Biochemical analysis revealed that acute exposure to lead was able to increase ACE (27 % compared to Ct) and NKA activity (125 % compared to Ct), and increased lipid

peroxidation (23% compared to Ct). However, the protein expression of AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, and the NKA  $\alpha_1$  subunit was not different between groups. Given this, the acute exposure to low concentration of lead, increases systolic blood pressure by increasing the activity of the renin-angiotensin system, the activity of NKA and promote oxidative stress. These findings provide further evidence that lead, at low concentrations and acute exposure may trigger mechanisms of early development of hypertension and may be an environmental risk factor for cardiovascular disease.

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CHUMBO

#### 1.1.1 História do chumbo

Historicamente o chumbo é conhecido como um dos mais antigos e nocivos metais, sendo usado pelos humanos por, pelo menos, 7000 anos. Os antigos egípcios o utilizavam na fabricação de armas, adornos e utensílios devido ao seu baixo ponto de fusão, durabilidade e facilidade em formar ligas metálicas. Os jardins suspensos da Babilônia apresentavam assoalhos com folhas de chumbo soldadas e as pedras das pontes ligadas por ganchos de ferro soldados com chumbo (Paoliello & Chasin, 2001; Capitani *et al.*, 2009).

Durante o império romano o chumbo era utilizado, na forma de óxidos, na conservação e correção do gosto de vinhos, sendo este um hábito mantido na Europa até poucas décadas atrás. Além disso, os romanos utilizavam o metal para a fabricação de canos, no século III a.C. e, ainda hoje, existem esses canos de chumbo em casas antigas e edificações erguidas antes de 1978. Era usado também na confecção de utensílios domésticos como copos, taças e recipientes para líquidos e alimentos (Capitani *et al.*, 2009).

No Brasil, a produção de chumbo metálico foi importante até a década de 90, devido a duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e em Adrianópolis. Após seu fechamento a produção de minério no país declinou (1996). Atualmente calcula-se que cerca de 90% do consumo nacional de chumbo metálico provenha de atividades de reciclagem (Capitani *et al.*, 2009).

A utilização do chumbo pelo homem é antiga sendo larga a sua aplicação, por isso este metal torna-se um objeto de estudo por estar diretamente relacionado às atividades humanas. Devido a sua elevada toxicidade, ações para prevenir e reparar contaminações ambientais são comuns nos tempos atuais, assim como o controle de seu uso.

#### 1.1.2 Características gerais

O chumbo é um metal cinza-azulado, brilhante, inodoro, maleável, insolúvel nos solventes orgânicos e muito resistente à corrosão. Ademais, esse cátion possui

baixo ponto de fusão, elevada densidade, alta opacidade aos raios X e gama, faz reação eletroquímica com o ácido sulfúrico e tem estabilidade química no ar, solo e água. Estas propriedades determinam sua ampla aplicação na indústria e grande importância comercial no mercado mundial (WHO, 1995).

Esse metal é encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com diversos outros metais. Pertence à família química dos metais do grupo IV b da tabela periódica. Seu número atômico é 82 e o símbolo químico é Pb derivado do latim *plumbum* (Paoliello & Chasin, 2001).

O chumbo inorgânico pode apresentar estados de oxidação +2 e +4. O íon estável do chumbo é o  $Pb^{2+}$  e combinado com o enxofre forma a galena ( $PbS = 86,6\%$  de Pb e  $13,4\%$  de S) um dos mais abundantes minérios e do qual é extraído quase todo o chumbo primário (DNPM, 2001). O  $Pb^{4+}$  forma os compostos orgânicos tetrametilchumbo  $Pb(CH_3)_4$  e tetraetilchumbo  $Pb(C_2H_5)_4$ , os mais importantes do ponto de vista comercial, visto que já foram amplamente empregados como aditivos em combustíveis (Conterato, 2007).

### 1.1.3 Fontes de exposição e utilização

O chumbo é relativamente abundante na crosta terrestre, apresentando uma concentração média no solo de 10 a 20 mg/kg. Na atmosfera, essa concentração foi estimada em cerca de  $0,0005 \mu g/m^3$  no ar e em águas superficiais a concentração natural do metal é em torno de  $0,02 \mu g/L$  (WHO, 1995).

O solo pode ser contaminado de forma natural, geológica, ou através de atividades exercidas pelo homem (antropogênicas) (Paoliello & Chasin, 2001). As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas e as fontes geológicas de chumbo são as rochas ígneas e metamórficas (WHO, 1995). As fontes antropogênicas são obtidas principalmente a partir da recuperação do metal de sucatas e rejeitos. No Brasil, o chumbo secundário é obtido, principalmente, da reciclagem de baterias automotivas, industriais e de telecomunicações (DNPM, 2007). Todas essas fontes provocam aumento das concentrações de chumbo no solo e na poeira em áreas vizinhas (WHO, 1995).

O chumbo é um metal essencial na fabricação de produtos utilizados pelo homem. Na forma de ligas e compostos é empregado na fabricação de produtos de alta tecnologia como, por exemplo, proteção de reatores nucleares, finas placas de componentes eletrônicos, bem como de baterias, tintas e corantes, cerâmicas, cabos e munição (Kreusch, 2005). Cerca de 40% do chumbo é usado como um metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1993; Parmeggiani, 1983).

Na forma de ligas, o chumbo é utilizado nos processos de soldagem. Na indústria eletrônica, além de promover a adesão de componentes à superfície de placas, têm a importante função de propiciar a ligação elétrica entre os componentes e os circuitos eletrônicos (Kreusch, 2005).

O chumbo metálico é usado na forma de lâmina, canos ou cabos, proporcionando maior flexibilidade e resistência à corrosão. Serve como protetor contra radiações ionizantes e também é utilizado como metalizante para coberturas protetoras, na manufatura de baterias (Kreusch, 2005).

Os óxidos de chumbo são usados nas placas de baterias elétricas e acumuladores, como componentes na manufatura de borracha (PbO), como ingredientes nas tintas (Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros. Estima-se que a manufatura da bateria representa cerca de 70% do consumo mundial desse metal (WHO, 1995).

A indústria química utiliza amplamente o chumbo. O arseniato de chumbo é empregado na fabricação de inseticida; o carbonato de chumbo é empregado na síntese do cloreto de polivinila (PVC); o acetato de chumbo tem importante uso como impermeabilizador, verniz, antiferrugem em pinturas, reagente analítico; o naftenato de chumbo é um secativo (Capitani *et al.*, 2009; Paoliello & Chasin, 2001). Este metal também é utilizado em fertilizantes ou adubos agrícolas, distribuindo-se no meio ambiente (ATSDR, 1993).

Os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos, porém muitos países têm restringido seu uso. Nos Estados Unidos concentrações de chumbo em tintas e pigmentos acima de 0,06% e na Nova Zelândia acima de 0,5% não são permitidas (WHO, 1995).

No Brasil durante muito tempo o chumbo tetraetílico foi usado na gasolina, desde 1978 foi proibido e no seu lugar utiliza-se o etanol (Paoliello & Chasin, 2001). A exposição da população, em geral, ao chumbo reduziu drasticamente após esta proibição (Pirkle *et al.*, 1998). Entretanto, em vários países, ainda há locais que são fontes permanentes de exposição a este metal.

Diante de várias fontes de exposição ao chumbo, alguns países estabeleceram concentrações máximas de chumbo no sangue para pessoas expostas e não expostas. A Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda uma concentração de chumbo sanguínea inferior 30 µg/dL em adultos não expostos como segura e em adultos expostos ocupacionalmente estes níveis não devem exceder 60 µg/dL.

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (1988) do Ministério do Trabalho, estabelece os valores de referência, para pessoas não ocupacionalmente expostas e os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP) em trabalhadores expostos, de 40 µg/dl e 60 µg/dl de sangue, respectivamente (Brasil, 1988; Jacob *et al.*, 2002). A NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), também determina o monitoramento anual dos efeitos tóxicos do chumbo através de exames médicos em trabalhadores expostos.

No entanto, é comprovado que níveis de chumbo no sangue, inferiores aos fixados por estes órgãos, podem provocar alterações de humor, disfunções da memória, da associação verbal, da inteligência visual e da atenção em trabalhadores expostos ao metal, assim como alterações cardiovasculares (Cordeiro *et al.*, 1996; Kasperczyk *et al.*, 2009).

Nos países desenvolvidos, o controle das fontes de poluição de chumbo vem sendo implementado gradativamente, com uma intensa atuação dos órgãos ambientais e da saúde pública. No Brasil, o controle é praticamente inexistente, devido à falta de dados sobre a real exposição da população. Por isso, são necessários estudos que forneçam as informações indispensáveis para melhor conhecimento da nossa realidade e, desse modo, subsidiar os órgãos de saúde pública e meio ambiente nas ações de controle (Moreira & Moreira, 2004).

#### **1.1.4 Cinética do chumbo no organismo**

O chumbo é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais. Esta ampla utilização proporciona a contaminação direta de pessoas ocupacionalmente expostas e, indiretamente, à população em geral. Assim, todos os seres humanos têm chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas (Moreira & Moreira, 2004). No entanto, este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo e seus efeitos tóxicos já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os órgãos e sistemas (Xie *et al.*, 1998).

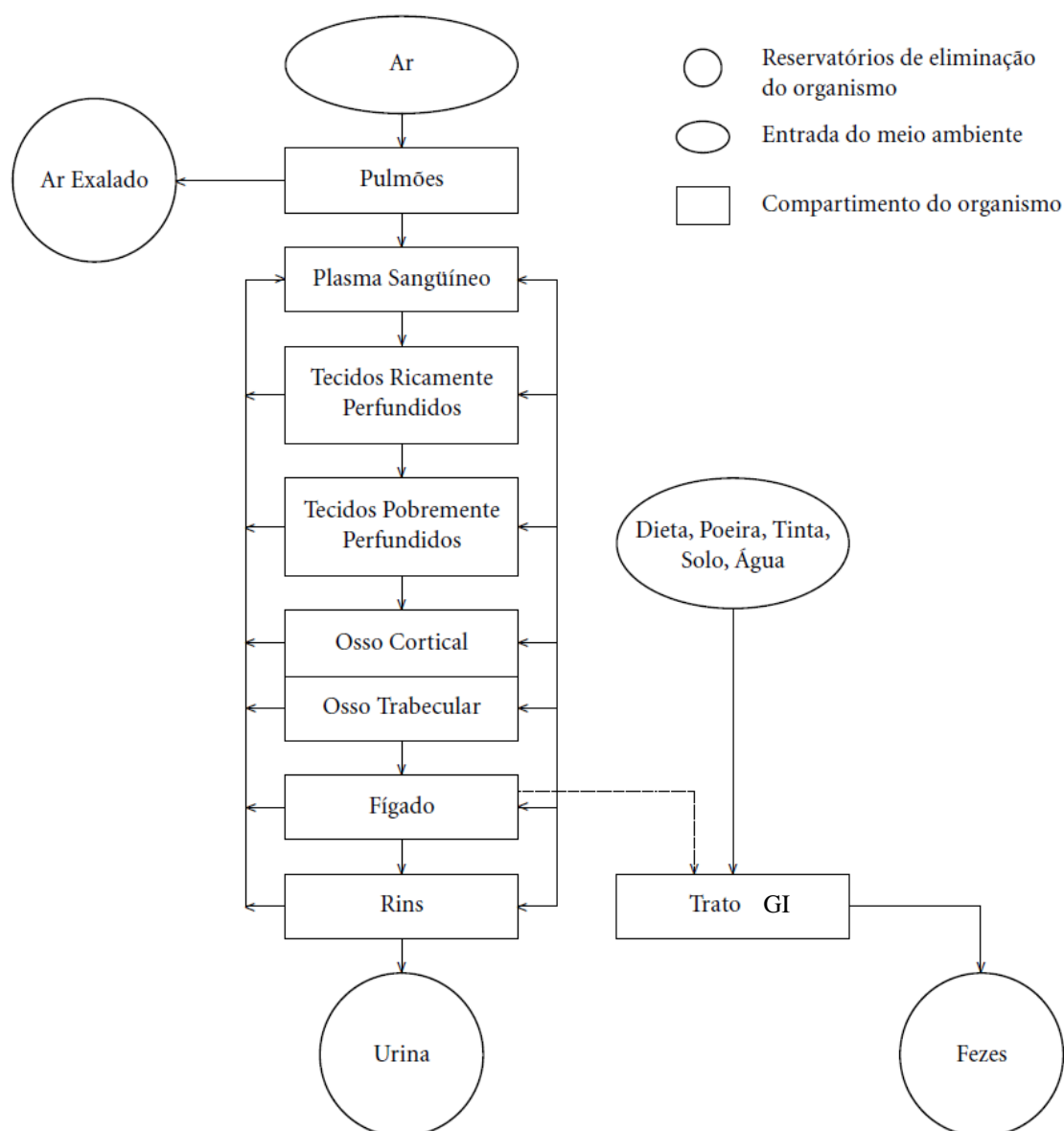
A maior parte do chumbo entra no organismo pelo trato respiratório e gastrointestinal. O chumbo inorgânico entra no organismo por inalação (principal forma da exposição ocupacional) ou ingestão (via predominante para a população em geral). Os compostos orgânicos de chumbo são capazes de penetrar através da pele íntegra, e os compostos de chumbo tetra alquila podem ser absorvidos por estas três vias. No organismo o chumbo não é metabolizado, e sim, complexado por macromoléculas, sendo diretamente absorvido, distribuído e excretado.

A absorção de chumbo proveniente de fontes ambientais é dependente da quantidade de metal, do seu estado físico e químico, além de ser influenciado por fatores relacionados ao hospedeiro (idade, genética, estado fisiológico) e condições nutricionais (Paoliello & Chasin, 2001). Uma vez absorvido, o chumbo se distribui entre o sangue, os tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos mineralizados (ossos e dentes) (ATSDR, 1992). Como o chumbo é qualitativamente um análogo biológico do cálcio, o seu sítio primário de armazenamento no organismo é o osso, que contém aproximadamente 90% a 95% do conteúdo corpóreo total de chumbo (Moreira & Moreira, 2004). A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo, sendo que 90% a 99,8% deste metal estão ligados à membrana e a frações de proteínas (principalmente à hemoglobina) das células vermelhas e o restante está no plasma ligado à albumina,  $\alpha_2$ -globulina ou como íons livres (Goyer, 1991; Sanín *et al.*, 1998). O plasma é o componente do sangue que contém chumbo livre para cruzar as membranas celulares e possivelmente causar seus efeitos tóxicos (Moreira & Moreira, 2004).

O chumbo é excretado por várias vias, porém a excreção renal e a gastrointestinal são as de maior importância prática. A excreção gastrointestinal acontece por secreção pancreática e biliar, possivelmente na forma de um complexo chumbo-



glutaciona. O chumbo não absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado nas fezes (cerca de 15 %) e o que foi absorvido é amplamente excretado pela urina, por filtração glomerular (75-80 %). No entanto, os mecanismos de eliminação pela bile e urina ainda não estão completamente elucidado (Moreira & Moreira, 2004). Outras possíveis formas de eliminação do chumbo se dão através do suor, descamação cutânea, cabelo, unhas (< 8%) e através do leite materno, estas em quantidades muito pequenas (Tsalev & Zaprianov, 1985).



**Figura 1:** Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty (O'Flaherty, 1998).

Fonte: Modificado de Moreira & Moreira, 2004.

### 1.1.5 Efeitos nos diversos órgãos e sistemas

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo. A intoxicação aguda pelo chumbo é bastante rara, mas muito perigosa, podendo levar a morte, enquanto que a intoxicação crônica é mais comum e bastante danosa ao organismo. A cronicidade da exposição ao chumbo pode gerar distúrbios gastrointestinais, neuromusculares e sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), além de alterar o sistema cardiovascular e o renal (Paoliello & Chasin, 2001; Jacob *et al.*, 2002).

O sistema nervoso é o sistema mais sensível a intoxicação por chumbo, sendo a encefalopatia um dos mais sérios desvios tóxicos induzidos pelo chumbo em crianças e adultos (Moreira & Moreira, 2004). Os sintomas de neurotoxicidade incluem irritabilidade, dor de cabeça, diminuição de atenção, perda de memória, déficit cognitivo, cefaléia, tremor muscular, alucinações, redução na velocidade de transmissão do impulso nervoso, tontura, fraqueza e parestesia (Paoliello & Chasin, 2001; Moreira & Moreira, 2004).

Hanninen *et al.* (1998) estudaram 54 trabalhadores de uma fábrica de baterias e concluíram que as alterações neuropsicológicas encontradas nos sujeitos com exposições passadas altas e presentes baixas indicam que concentrações de chumbo no sangue na faixa de 51,8 a 101,4 µg/dL podem causar danos prolongados, ou mesmo permanentes na função do sistema nervoso central. Outros estudos, controlados, demonstraram associação entre os altos valores de chumbo no sangue de crianças com aumento de delinqüência na juventude observada no final da infância e início da fase adulta (Dietrich *et al.*, 2001; Needleman *et al.*, 1996). Contudo, ainda não são bem conhecidos os níveis em que as primeiras anormalidades neurofisiológicas aparecem, mas alguns trabalhos sugerem que alterações leves já podem aparecer em concentrações abaixo do que se considera seguro pelo Índice Biológico Máximo Permitido para trabalhadores expostos (60 µg/dL) e pessoas não ocupacionalmente expostas (40 µg/dL).

Os efeitos tóxicos do chumbo sobre os rins ocorrem na presença de níveis relativamente altos de chumbo no sangue. Sabe-se que em trabalhadores expostos, a nefropatia por chumbo é bem documentada e caracterizada por redução da função renal e na maioria das vezes é acompanhada por hipertensão (Saryan & Zen, 1994;

WHO, 1995). A nefropatia aguda ocorre principalmente em crianças sob exposição aguda ao chumbo, sobretudo pela via oral e a nefropatia crônica é descrita principalmente em trabalhadores expostos, cuja exposição primária é por inalação (Paoliello *et al.*, 2003; Moreira & Moreira, 2004).

Segundo a Agency for Research on Cancer (IARC), há evidências relativas à carcinogenicidade do chumbo e seus compostos em animais, porém em humanos ainda é incerto. Essas evidências foram comprovadas em animais mediante estudos que apontam o acetato e fosfato de chumbo como causa de tumores em rins de ratos (Saryan, 1994; ATSDR, 1992). Assim, de acordo com a IARC, o chumbo e os compostos de chumbo foram classificados como “possivelmente carcinogênicos para humanos” (WHO, 1995).

Os sintomas intestinais que caracterizam a exposição ao metal aparecem como a cólica, caracterizada por espasmos intestinais que provocam dor abdominal intensa, associada com náuseas, vômito e perda de peso (Paoliello, 2003).

No sistema hematológico, a forte ligação do chumbo ao grupamento sulfidríla de proteínas, leva a alterações da via de síntese do heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que cerca de 99% do chumbo sanguíneo está ligado às células vermelhas (Lawton & Donaldson, 1991). Estas alterações são observadas nas enzimas ácido delta-aminolevulínico desidratase (ácido delta-ALAD), ferroquelatase e coproporfirinogênio oxidase, todas envolvidas na biossíntese do heme (Paoliello & Chasin, 2001). A interferência na produção do heme e a subsequente redução da sua quantidade corporal é uma das principais causas da patologia relacionadas ao chumbo, principalmente a inibição da eritropoiese, provocando anemias (Souza & Tavares, 2009).

#### **1.1.6 Efeitos no sistema cardiovascular**

A pressão arterial é regulada pela força propulsora cardíaca, a capacidade de dilatação da aorta e a resistência ao fluxo sanguíneo, exercida, pelas artérias de pequeno calibre e arteríolas (Irigoyen *et al.*, 2003). A pressão arterial é de natureza pulsátil e oscila entre um valor máximo e mínimo, onde o valor máximo de pressão é alcançado durante a sístole, e o valor mínimo, durante a diástole. A geração da pressão sistólica inicia-se durante o período que precede imediatamente a abertura

da válvula aórtica e início da fase de ejeção para, então, atingir o seu valor máximo. Já a pressão diastólica é gerada durante o relaxamento ventricular, e é dependente do volume de sangue que permanece dentro do vaso arterial, e este varia de acordo com a resistência vascular (Michellini, 1999). Para indivíduos adultos, consideram-se valores normais de pressão sistólica abaixo de 120 mmHg e a diastólica abaixo de 80 mmHg (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial).

Segundo a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial valores acima de 139 mmHg de sistólica e 89 mmHg de diastólica já caracterizam hipertensão arterial. A hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, sendo essas doenças atualmente responsáveis por um grande percentual de morbi-mortalidade em vários países. Estima-se que 20% da população mundial apresenta hipertensão arterial, e no Brasil esse percentual pode chegar em torno de 40 % em algumas regiões do país (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial). No entanto, o diagnóstico de hipertensão deve ser minucioso e outros fatores considerados de risco, além dos níveis de pressão, devem ser levados em consideração, como lesão de órgãos alvo e doenças associadas, visto que a hipertensão arterial é uma doença multifatorial.

A exposição a agentes tóxicos, incluindo chumbo e outros metais, pode contribuir para o surgimento ou agravo da hipertensão e de doenças cardiovasculares. Entretanto, após cem anos dos primeiros estudos que correlacionam a exposição ao chumbo às alterações nos parâmetros cardiovasculares, a contribuição do chumbo ainda não está completamente elucidada (Navas-Acien *et al.*, 2007).

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem uma relação entre exposição por chumbo, hipertensão e doenças cardiovasculares (Cheng *et al.*, 1998; Lustberg and Silbergeld, 2002; Maheswaran *et al.*, 1993; Moller & Kristensen, 1992; Schwartz, 1991). Seus efeitos na saúde humana dependem dos níveis sanguíneos e da duração da exposição. Diante disso, vários estudos são necessários para determinar: a correlação entre concentrações sanguíneas de chumbo e aumento da pressão arterial; as diferenças entre os efeitos das exposições agudas e crônicas sobre a pressão arterial; os mecanismos pelos quais o chumbo provoca estas alterações; se a magnitude da associação é diferente entre criança e adulto; e ainda, se há grupos populacionais mais ou menos vulneráveis.

Estudo *in vivo* e *in vitro* com animais vem mostrando que a exposição crônica ao chumbo causa hipertensão e doenças cardiovasculares por alterar o sistema renina-angiotensina, principalmente por aumentar a atividade da ECA (Carmignani *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 2004; Vander, 1988), inibir a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Weiler *et al.*, 1990), induzir o estresse oxidativo, reduzir a biodisponibilidade de NO (Gonick *et al.*, 1997; Grizzo & Cordelline, 2008; Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Vaziri, 2008), e esgotar as reservas de antioxidantes (Farmand *et al.*, 2005). O chumbo pode agir também como substituto do cálcio na via de sinalização do cálcio por interagir com calmodulina, PKC (proteína kinase C), com canais para potássio dependentes de cálcio (Goldstein, 1993; Watts *et al.*, 1995), além de estimular a proliferação das células do músculo liso vascular (Fujiwara *et al.*, 1998).

Vaziri e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento crônico por 12 semanas com 100 ppm de acetato de chumbo em água de beber, foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica no grupo de ratos que recebeu o metal. Em outro trabalho, este mesmo grupo de pesquisadores encontrou aumento de pressão arterial sistólica a partir da segunda semana de tratamento com 100 ppm de acetato de chumbo. Houve aumento progressivo da pressão arterial sistólica até a oitava semana, na qual atingiu valor aproximado de 180 mmHg (Sharifi *et al.*, 2004). Os trabalhos de Carmignani e colaboradores (1999 e 2000) demonstraram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica de ratos tratados por 10 meses com 60 ppm de acetato de chumbo na água de beber. Corroborando com estes achados, Roncal e colaboradores (2007) também demonstram que ratos submetidos ao tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo na água de beber, por 16 semanas, obtiveram aumento da pressão arterial sistólica.

Como relatado, muitos são os estudos crônicos que mostram a participação do chumbo nas alterações do sistema cardiovascular. No entanto, são poucos os relatos que mostram alterações cardiovasculares e pressóricas induzidas por tratamento agudo com este metal, principalmente *in vivo*. Trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram que a administração aguda de chumbo (100 µM) reduz a contratilidade miocárdica (Vassallo *et al.*, 2008). Contudo, outro estudo com os ratos expostos agudamente a baixa concentração de chumbo (8 µM) mostrou um aumento na pressão sistólica ventricular esquerda (Fioresi *et al.*, 2009). Silveira *et al.* (2010) mostraram que 100 µM de chumbo levou a alterações no endotélio, promovendo

maior liberação de vasoconstritores derivados da ciclooxigenase e de espécies reativas de oxigênio.

Como mencionado anteriormente, há estudos que demonstram a relação entre os efeitos do chumbo com o sistema renina-angiotensina, a NKA e uma estreita relação com estresse oxidativo. Em virtude disso, segue uma breve revisão sobre estes, os quais participam do controle da pressão arterial e estão implicados na hipertensão induzida pelo chumbo.

## 1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel vital na regulação dos processos fisiológicos do sistema cardiovascular. Inicialmente, o SRA foi descrito como um sistema circulante, porém, sabe-se que existe um SRA local presente em diferentes tecidos como: cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (Dzau, 1989; Danser, 1996; Bader *et al.*, 2001).

A angiotensina II é sintetizada a partir de um ciclo que começa através de um estímulo, onde as células justaglomerulares granulares das arteríolas aferentes renais vão sintetizar a pré-pró-renina que é um peptídeo não ativo que se transforma em pró-renina, que sob a ação de proteólise celular transforma-se em renina. Esta por sua vez, é liberada, age sobre o angiotensinogênio, convertendo-o em angiotensina I, um decapeptídeo, que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) origina a angiotensina II, um octapeptídeo com potente ação vasoconstritora (Costerousse *et al.*, 1992).

A ECA é uma metalopeptidase, consiste de dois domínios homólogos em cada porção terminal (domínio C- e N- terminal), onde contém sítios catalíticos que ligam o zinco (Sturrock *et al.*, 2004). Os dois sítios de ligação com o zinco apresentam ação catalítica como demonstrado por Fuchs e colaboradores (2007; 2010) sendo a porção C- terminal o principal sítio de clivagem da angiotensina I. Pode ser encontrada no plasma, no endotélio vascular, no interstício e no interior das células, estando presente principalmente nos pulmões e na maioria dos órgãos tais como, coração, cérebro, rins, fígado, dentre outros (Hollenberg *et al.*, 1998). A angiotensina II, pela ação da ECA2, pode ainda formar angiotensina 1-7 que tem propriedades vasodilatadoras (Ferreira & Santos, 2005; Lavoie & Sigmund, 2003).

A maioria dos efeitos fisiológicos conhecidos da angiotensina II são mediados pelo receptor de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>), que são amplamente distribuídos em todos os órgãos, incluindo fígado, glândulas supra-renais, cérebro, pulmão, rim, coração e vasos. Mesmo que a maioria dos efeitos vasoativos da angiotensina II ocorra via AT<sub>1</sub>, os receptores AT<sub>2</sub> mostram exercer ações anti-proliferativa e pró-apoptóticas em células do músculo liso vascular (VSMCs), principalmente por antagonizar os receptores AT<sub>1</sub> (Griendling *et al.*, 1996). Todos estes receptores estão acoplados a proteína G, inclusive os receptores para angiotensina 1-7, MAS.

A angiotensina II quando ligada ao receptor AT<sub>1</sub>, ativa via proteína G, que tem como mecanismo principal estimular a fosfolipase C, que por sua vez hidrolisa o PIP<sub>2</sub> (fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato) formando IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerol). O IP<sub>3</sub> estimula a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e aumenta o cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Já o DAG estimula a PKC que na membrana plasmática fosforila e ativa proteínas que interferem na função vascular promovendo contração do músculo liso vascular e crescimento celular (Khalil *et al.*, 1995; Capponi, 1996). Ainda a PKC pode ativar o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> e a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase promovendo aumento de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> intracelular culminando com constrição vascular (Touyz & Schiffrin, 2000).

Angiotensina II pode interagir com receptor e hidrolisar fosfatidilcolina em colina e ácido fosfatídico via ativação da fosfolipase D. O ácido fosfatídico é rapidamente convertido em DAG, levando a ativação sustentada da PKC e contração (Puja *et al.*, 2007). Outro efeito da angiotensina II via receptor AT<sub>1</sub> deve-se a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que leva a produção de ácido araquidônico (AA). Seus derivados estão envolvidos na modulação do tônus e da pressão arterial (Griendling *et al.*, 2000). Angiotensina II via lipooxigenase leva a formação de leucotrienos relacionados à vasoconstrição, hipertensão e doenças inflamatórias. Os ácidos hidroxieicosatetraenoico, metabólito do AA são pro-hipertensivos, contribuindo com a vasoconstrição do músculo liso vascular por facilitar a entrada de Ca<sup>2+</sup> na célula (Sarkis *et al.*, 2004).

Além destes mecanismos descritos, existem outros que mostram alterações no músculo liso vascular e cardíaco através da ativação de receptores AT<sub>1</sub>, fosforilação da tirosina-quinase e ativação da PKC e das MAPKs (Mitogen-activated protein kinase), influenciando o crescimento e o remodelamento (Garrido & Griendling,

2009; Beltrán *et al.*, 2009; Griendling *et al.*, 1996). Trabalhos também mostram que a angiotensina II aumenta a liberação de  $O_2^-$  por estimular a atividade da enzima NADPH oxidase, sendo este aumento maior em ratos hipertensos (Griendling *et al.*, 1994; Cruzado *et al.*, 2005).

Diferentemente, os receptores  $AT_2$ , ainda não tem todos os mecanismo elucidados, mas sabe-se que realizam vasodilatação via liberação de NO (Horiuchi *et al.*, 1999). Generalizando, pode-se dizer que o efeito da angiotensina II sobre os receptores  $AT_2$  determina relaxamento do músculo liso vascular, diferenciação e regeneração celular (Carey *et al.*, 2001).

A angiotensina (1-7) tem seus efeitos opostos ao da angiotensina II, pois promove vasodilatação, melhora a função endotelial e tem benefício em nível cardíaco. Seus efeitos parecem ser mediados pela produção de prostanóides vasodilatadores, NO e EDHF (Ferreira & Santos, 2005).

Nas 2 últimas décadas, o conhecimento sobre o SRAA foi expandido, com a identificação de novos peptídeos de angiotensina e caracterização de outros receptores (Griendling *et al.*, 1993). A angiotensina III, IV e a angiotensina-(1-12) foram recentemente descobertas como peptídeo de angiotensina bioativos, os quais estão envolvidos no aumento da pressão arterial. Da mesma maneira, novos receptores de angiotensina foram também recentemente caracterizados como os receptores tipo 3 ( $AT_3$ ), os quais ainda não foram completamente elucidados; receptores do tipo 4 ( $AT_4$ ), constituído por três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e não acoplado a proteína G e os receptores de renina e pro-renina (Stragier *et al.*, 2004; Varagic *et al.*, 2008; Ichihara *et al.*, 2008 ).

Vários estudos correlacionam o aumento da pressão arterial, animais expostos ao chumbo com alterações do sistema renina-angiotensina (Boscolo & Carmignani, 1988; Vaziri *et al.*, 2001; Sharifi *et al.*, 2004). Estes estudos demonstraram que a exposição ao chumbo aumenta a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese ou a liberação da mesma pelas células justaglomerulares (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani *et al.*, 1999), bem como, estimula a produção de angiotensina I, altera a atividade plasmática da ECA (Campbell *et al.*, 1985), fatores que culminam em maior produção de angiotensina II.



A angiotensina II é sem dúvida um dos mais importantes fatores vasoconstritores, produzidos pelas células endoteliais e realiza importante papel na regulação da pressão sangüínea, no remodelamento vascular, na regulação das funções renais e cardíacas (Timmermans *et al.*, 1993).

### 1.3 NKA

A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase, também conhecida como bomba de sódio (Skou *et al.*, 1957), é uma proteína integral de membrana, presente na maioria das células. Regula a homeostase de íons intracelulares, controlando o transporte ativo de sódio/potássio nas células (Holmgren *et al.*, 2002; Skou *et al.*, 1988).

A bomba de sódio é formada por duas grandes subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e uma pequena subunidade  $\gamma$  (Blanco & Mercer, 1998). A subunidade  $\alpha$ -catalítica, com peso molecular aproximado de 113 kDa, é composta de 6 domínios transmembranas. É responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima, contendo sítios de ligação para cátions, trifosfato de adenosina (ATP), e compostos digitálicos (Rose & Valdes, 1994). Já foram identificados 4 isoformas desta subunidade, a isoforma  $\alpha_1$  que é amplamente distribuída pelas diferentes células do organismo; ao passo que a  $\alpha_2$  é encontrada no músculo esquelético, no cérebro, no coração, adipócitos, músculo liso vascular, bem como em vários outros tecidos; a  $\alpha_3$  é encontrada no tecido neural, cardíaco e ovários; e a isoforma  $\alpha_4$  foi identificada somente em espermatozóides de ratos (Lingrel, 1992; Marín & Redondo, 1999).

A subunidade  $\beta$ , possui peso molecular de 55 kDa, possui apenas um domínio transmembrana hidrofóbico e é altamente glicosilada. Esta subunidade parece estar envolvida na modulação da afinidade da enzima ao  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , além de facilitar o ancoramento e estabilização da subunidade  $\alpha$  na membrana (Blanco & Mercer, 1998). Existem 4 isoformas da subunidade  $\beta$ , a  $\beta_1$ , largamente distribuída no organismo; a  $\beta_2$  expressa no cérebro, músculo esquelético e glândula pineal; a  $\beta_3$  presente em testículos, retina, fígado e pulmão; e a isoforma  $\beta_4$  relacionada a  $\text{H}^+\text{K}^+$ -ATPase, foi isolada e clonada em rãs, ratos e coelhos (Sweadner, 1989; Blanco & Mercer, 1998).

A subunidade  $\gamma$ , de peso molecular de aproximadamente 14 kDa, pertence a um grupo de sete proteínas recentemente descobertas, chamadas de "FXD2"

(Sweadner & Rael, 2000; Geering, 2006). Alguns estudos mostram que a presença da subunidade  $\gamma$  modifica o sítio externo de ligação do cátion à bomba de sódio, por um mecanismo direto ou alostérico, alterando assim, a sensibilidade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase ao potássio (Béguin *et al.*, 1997).

A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase funciona como um sistema de transporte ativo, responsável pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio através da membrana plasmática. Esta enzima, usa a energia da hidrólise de uma molécula de ATP, para transportar 3 íons sódio do meio intracelular e 2 íons potássio do meio extracelular. O gradiente eletroquímico gerado pela bomba de sódio é responsável pela manutenção do balanço osmótico da célula, pela manutenção do potencial de membrana da célula e pelas propriedades excitáveis das células musculares e nervosas (Horisberger, 2004). Além disso, fornece energia para os sistemas de transporte secundário, como o transporte de íons (cálcio, cloreto, fosfato, hidrogênio), e de substratos como a glicose e aminoácidos (Webb & Bohr, 1978; Haddy, 1983; Vassalle, 1987).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, através do controle da concentração citoplasmática de sódio, influencia as concentrações de cálcio, via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), participando então, da contração do músculo liso e cardíaco (Marín & Redondo, 1999; Geering, 2006).

Diversas substâncias podem promover sua inibição ou ativação. Hormônios, íons e fatores endoteliais podem regular a atividade da bomba de sódio. A ativação da via da ciclooxygenase, por exemplo, induz a formação de prostaglandina  $\text{E}_2$  (PGE<sub>2</sub>), potente inibidor da bomba de sódio (Marín & Redondo, 1999). A ativação de proteínas quinases (PKA) pode induzir a um aumento ou diminuição da atividade dessa enzima (Blanco & Mercer, 1998). Estudos mostraram que a PKA inibe a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase na alça de Henle e ducto coletor, e estimula no túbulo proximal, nos rins (Horiuchi *et al.*, 1993; Béguin *et al.*, 1996; Feraille *et al.*, 1995; Therien & Blostein, 2000).

Metais pesados como o chumbo também podem atuar inibindo ou estimulando a atividade desta enzima (Weiler *et al.*, 1990; Fioresi *et al.*, 2008). Weiler *et al.*, (1990) demonstraram inibição do funcionamento desta bomba em amostras tratadas com chumbo. Em oposição, Karai *et al.* (1982), relataram uma relação positiva entre o

chumbo sanguíneo e a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase de eritrócitos de trabalhadores expostos ao chumbo.

A ativação da proteína quinase C (PKC) também regula a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase, sua ação se dá através da ativação da via da fosfolipase A2 ou por fosforilação direta da subunidade  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase, levando à endocitose dessa enzima (Vasilets *et al.*, 1990; 1997). Outra proteína quinase envolvida é a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (Vaandrager & Jonge, 1996; Therien & Blostein, 2000). A PKG promove inibição da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase no músculo esquelético, cérebro, entre outros, e ativação dessa enzima em artérias, músculo liso pulmonar, entre outros. As tirosinas quinases também estão sendo mencionadas como moduladoras da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase. Especificamente, elas parecem ter um papel importante na estimulação da bomba de sódio promovida pela insulina nas células do túbulo proximal renal (Feraille *et al.*, 1999; Therien & Blostein, 2000).

Estudos mostram que a aldosterona é capaz de aumentar a expressão da bomba de sódio, sendo que este aumento de síntese protéica é dependente de mudanças na concentração citoplasmática de sódio (Bonvalet, 1998; Ikeda *et al.*, 1991). As catecolaminas também regulam a atividade da bomba de sódio. Trabalhos mostram que a dopamina promove inibição da atividade dessa enzima, enquanto as catecolaminas adrenérgicas, epinefrina e norepinefrina, estimulam sua atividade (Aperia *et al.*, 1992; Fryckstedt *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998). Além disso, os fatores derivados do endotélio como a angiotensina II, endotelina-1 e óxido nítrico agem estimulando, enquanto que a prostaciclina e prostaglandina E<sub>2</sub>, inibem a atividade da bomba de sódio (Gupta *et al.*, 1994b; Marin & Redondo, 1999). Zhang e Mayeux (2001) mostraram um aumento sustentado na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase causada pela angiotensina II. O aumento na atividade da NKA descrito por estes autores se deve a ação da angiotensina II em aumentar a captação de Na<sup>+</sup> pelas células, estimulando o trabalho da bomba (Dostanic-Larson *et al.*, 2006).

Sabendo, então, da importância da bomba de sódio para as funções vitais da célula, alterações na atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase através de modificações na sua expressão ou função, têm sido correlacionados com várias desordens, incluindo doenças cardiovasculares, neurológicas, renal e metabólica (Rose & Valdes, 1994; Laski & Kurtzman, 1996). Além disso, como a atividade da bomba de sódio está relacionada com a homeostasia do sódio, controle do tônus vascular e da força de

contração cardíaca, alterações na sua expressão e/ou atividade estão envolvidas então, com a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial. Alguns estudos demonstram que em alguns modelos de hipertensão a atividade e/ou expressão da bomba de sódio está alterada, como observamos no presente estudo (Webb & Bohr, 1979; David-Dufilho *et al.*, 1984; Rossoni *et al.*, 2002).

#### 1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

O aumento do estresse oxidativo é evidenciado em várias doenças do sistema cardiovascular, sendo caracterizado por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), os radicais hidroxil ( $OH^\cdot$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), dentre outros, e está associado com redução das defesas antioxidantes (Suzuki *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001).

A mitocôndria além de ser fonte geradora de energia (ATP) é também a principal geradora de espécies reativas de oxigênio em condições fisiológicas e patológicas, pela adição de um elétron a molécula de oxigênio (Lee & Wei, 2007). Outras importantes fontes de EROs são as xantina oxidases, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS na falta de substrato ou cofatores, e as enzimas da família das NADPHoxidases (NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Mueller *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh *et al.*, 2009).

Todos os tipos de células podem produzir EROs, que são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas que podem tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas. Participam da ativação e inativação de muitas vias de sinalização. Em condições normais, estas espécies são encontradas em baixos níveis no interior da célula e são constantemente geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário porque estas espécies modulam a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo ou por ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (Szasz *et al.*, 2007).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), a mais importante EROs. É formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPHoxidase e xantinas oxidases. Após ser formado o ânion superóxido além de exercer seus efeitos em diferentes vasos e órgãos pode dar origem a outras EROs. O  $O_2^-$  reage com o NO, inativa-o e dá origem ao peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), este contribui com a peroxidação lipídica (Atoclet *et al.*, 1999). A SOD dismuta o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio. O  $H_2O_2$  pode ser convertido em água por ação da glutathione peroxidase (GPx) ou da catalase. O  $H_2O_2$  também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila (OH). (Griedling *et al.*, 2000; Szocs *et al.*, 2002). O  $H_2O_2$  pode atuar tanto como vasoconstritor como vasodilatador, como observado em artérias mesentéricas (Gil-Longo & Gonzáles-Vazquez, 2005).

O  $O_2^-$ , o peroxinitrito e o radical hidroxila são as EROs mais instáveis e reativas enquanto o peróxido de hidrogênio é a mais estável (Droge, 2002; Taniyama & Griendling, 2003).

A NADPHoxidase, uma das principais fontes geradoras de ânion superóxido, é um heterodímero constituída por diferentes subunidades: gp91phox (mais conhecida como NOX), p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (proteína G de baixo peso molecular). A p22phox é a subunidade essencial para o adequado funcionamento da NADPHoxidase, principalmente na formação de  $O_2^-$  nas células. A gp91phox da NADPHoxidase é composta pela Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox 2 que são expressas em vários tecidos e estão ligadas a funções biológicas relacionadas com a defesa e o crescimento celular (Lassegue & Clempus, 2003; Geiszt, 2006; Lyle & Griendling, 2006).

Outra fonte geradora de EROs é a xantina oxidase que utiliza a xantina, hipoxantina ou a NADH na geração de EROs enquanto a mieloperoxidase além de formar EROs utiliza o NO para gerar espécies reativas de nitrogênio provocando redução da biodisponibilidade do NO e aumento do estresse oxidativo (Harrison, 2002; Gaut *et al.*, 2002). As três isoformas da NOS também podem promover a formação de  $O_2^-$  quando estão desacopladas. Na eNOS o desacoplamento é causado pela ausência dos co-fatores L-arginina e tetrahidrobiopterina (BH4) (Vásquez-Vivar *et al.*, 1998; Andrews & Mayer, 1999).

As três isoformas da SOD, a catalase e a glutathione peroxidase constituem o principal sistema antioxidante que se contrapõe a ação das EROs. As diferentes isoformas da SOD catalizam a reação que transforma o ânion superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . A glutathione peroxidase, que é importante em baixos níveis de estresse oxidativo, transforma o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ . Enquanto a catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetivo quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . (Sindhu *et al.*, 2005; Cai, 2005; Gongora *et al.*, 2006).

Quando há um desequilíbrio entre estes fatores citados, ou seja, aumento de EROS e redução do sistema antioxidante, surgem alterações e doenças em vários sistemas e órgãos especialmente o sistema cardiovascular (Griendling & Fitzgerald, 2003; Valko *et al.*, 2006). Segundo Patrick (2006) o aumento da produção de radicais livres e/ou depleção do sistema antioxidante podem ser os mecanismos pelos quais o chumbo induz o estresse oxidativo.

O chumbo tem a capacidade de se ligar ao radical sulfidril (-SH) de proteínas, alterando atividade enzimática como exemplo, da glutathione, a qual é inibida em situações de exposição ao metal. Estudos relatam que a concentração sanguínea de glutathione encontra-se reduzida em animais experimentais e humanos expostos ao chumbo (Patrick, 2006).

Corroborando estes achados, a expressão da catalase e glutathione peroxidases está reduzida na exposição ao chumbo, levando a maior formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , contribuindo com a inflamação e remodelamento cardiovascular. Como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é substrato para a produção de  $\text{OH}^-$ , este radical também está aumentado em animais expostos ao metal (Ding *et al.* 2000).

Alterações de fatores vasodilatadores e vasoconstritores observados na hipertensão podem estar relacionados com o aumento das EROs, uma vez que os radicais livres reagem com o óxido nítrico (NO) provocando oxidação ou inativação local deste fator relaxante derivado do endotélio (Ding *et al.*, 2000; Vaziri, 2008).

Gonick *et al.* (1997), mostraram que o aumento de radicais livres promove acúmulo de malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica, em rins de ratos expostos ao chumbo. Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos

graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica. Esta observação sustenta a presença do estresse oxidativo em animais expostos ao chumbo.

Estudos em trabalhadores expostos ao chumbo com aumento significativo da concentração sanguínea de chumbo evidenciaram o aumento da pressão arterial e das concentrações de MDA plasmáticas (Khan 2008; Kasperczyk *et al.*, 2008).

Diante do exposto, vários trabalhos relacionam a exposição ao chumbo com alterações cardiovasculares (Sharifi *et al.*, 2004; Vaziri, 2008) e aos demais órgãos e sistemas do organismo (Patrick, 2006). A revisão da literatura aqui apresentada demonstra também alterações no sistema renina-angiotensina, na atividade da NKA e nos estresse oxidativo promovidas pelo chumbo (Weiler *et al.*, 1990; Fioresi *et al.*, 2008; Gonick *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 2001). Porém, a maioria destes trabalhos refere a exposições crônicas ao metal, semelhante ao que ocorre em trabalhadores expostos em locais de trabalho.

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar as ações do chumbo na fase inicial da exposição e em concentrações menores do que as encontradas em trabalhadores expostos, uma vez que, todos os indivíduos apresentam chumbo em seus organismos como resultado da exposição a fontes exógenas, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua distribuição, sendo este um contaminante ambiental (Moreira & Moreira, 2004).

## ***OBJETIVOS***



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros pressóricos arteriais e reatividade pressórica em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Dosar a concentração sanguínea de chumbo após exposição aguda (120 minutos);  
Investigar os efeitos agudos do chumbo em animais expostos por 120 minutos sobre:
- 2) PAS, PAD e FC;
- 3) A reatividade pressórica à fenilefrina;
- 4) A PAS e PAD, frente a intervenções farmacológicas pela administração aguda de hexametônio, losartan, enalapril, canrenona e tempol;
- 5) A reatividade pressórica à fenilefrina, frente a intervenções farmacológicas pela administração aguda de hexametônio, losartan, enalapril e tempol;
- 6) A atividade da ECA plasmática e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase cardíaca;
- 7) A produção de molondialdeído plasmática em animais expostos e não expostos;
- 8) A expressão de receptores  $\text{AT}_1$  e  $\text{AT}_2$ , em tecidos (aorta, rim e coração) e  $\alpha_1$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em coração.

***MATERIAIS E  
MÉTODOS***

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos normotensos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 280 e 350 gramas (g) cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais (CEUA/EMESCAM) regulamentado pela portaria 003/2007 de 04 junho de 2007.

##### 3.1.1 Tratamento agudo com acetato de chumbo – modelo experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais, denominados: Controle e Chumbo. Os ratos do grupo Controle receberam agudamente, na hora da experimentação, água destilada (6,18 µL para cada 100 g de rato *i.v.*), e os ratos do grupo Chumbo receberam uma dose de acetato de chumbo (320 µg/kg - 6,18 µL para cada 100 g de rato *i.v.*). Esta dose administrada de acetato de chumbo foi calculada para atingir uma concentração plasmática de 160 µg/dL. Considerando que o chumbo se distribui igualmente no líquido extracelular e que para cada 100 g de animal há 20 mL de líquido neste compartimento, foram infundidos 32 µg de acetato de chumbo para cada 100g do animal (Fioresi, 2008).

A utilização de água destilada como veículo foi necessária uma vez que o acetato de chumbo reage com cloreto de sódio presente na solução salina. Quando adicionado acetato de chumbo à salina, formou-se o cloreto de chumbo (PbCl<sub>2</sub>) que se precipitou, pois este composto possui baixa solubilidade ( $K_{ps} = 1,6 \cdot 10^{-5}$ ).

### **3.1.2 Determinação da concentração de chumbo no sangue**

Com o intuito de determinar a real concentração sanguínea de chumbo após 120 minutos de exposição aguda, foram quantificados os níveis deste metal no sangue total. Os ratos passavam por uma incisão cirúrgica abdominal e a aorta abdominal foi puncionada para retirada de cerca de 5 ml de sangue. O sangue dos ratos controles foi coletado da mesma forma para comparar com os ratos expostos ao metal. As amostras coletadas foram colocadas em tubo de ensaio pré-tratados com heparina (50 UI / ml) e mantidas a -20° C.

As análises foram realizadas pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica como descrito por Sysalová (1997), através do Espectrometro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (AAS5 EA, Carl Zeiss, Alemanha).

## 3.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

### 3.2.1 Protocolos experimentais

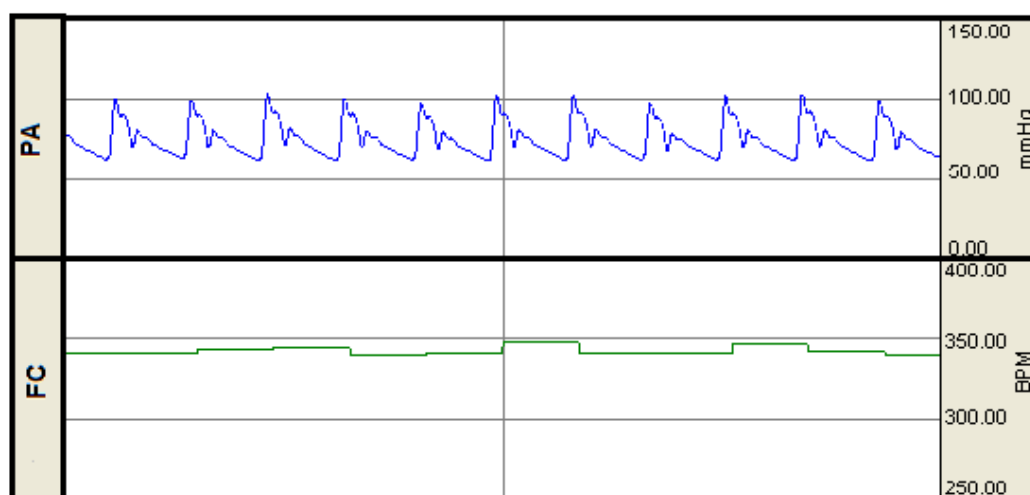
3.2.1.1 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após 120 minutos de exposição ao acetato de chumbo.

Os animais foram anestesiados com uretana (1.2 mg/kg *i.p.*), e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular esquerda e artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas, respectivamente. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, com testes como pinçar a cauda do animal, e o anestésico foi suplementado quando necessário. A canulação foi realizada com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (50 UI/ml). Após a cateterização, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) acoplado a um pré-amplificador, que por sua vez, estava conectado a um sistema Biopac de aquisição de dados que utilizava uma frequência de amostragem de 2000 hertz (MP100 Biopac Systems, Inc; CA). Foram feitos registros contínuos da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC), durante todos os protocolos experimentais.

Com a finalidade de avaliar o efeito agudo de baixa concentração de chumbo sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, após cerca de 30 minutos de estabilização, foram feitos registros controle de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca basais.

Após a estabilização foi realizada a administração aguda do acetato de chumbo (320 µg/Kg, *i.v.* em um volume de 6,18 µL/100 g de rato), e foram avaliados os seguintes parâmetros, obtidos no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 minutos: pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca.

Para verificar a estabilidade experimental, o mesmo protocolo acima foi realizado no grupo controle. Neste grupo, ao invés da administração de chumbo, foi administrada uma solução veículo (água destilada, *i.v.*), sendo que, o volume de água destilada administrado foi equivalente ao volume de chumbo utilizado nos animais do grupo tratado.



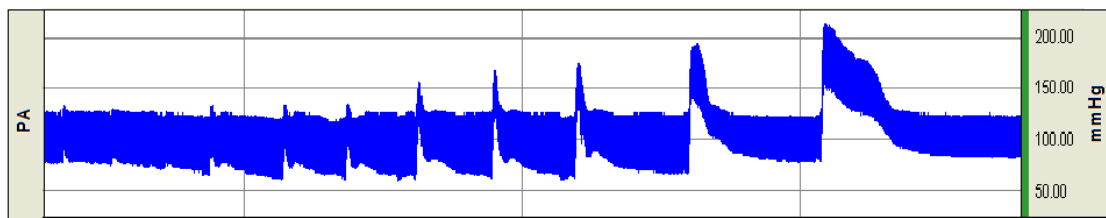
**Figura I:** Registro típico das medidas hemodinâmicas obtido em rato.

### 3.2.1.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após administração aguda de acetato de chumbo.

Foram utilizados protocolos com fenilefrina, um agonista  $\alpha_1$  adrenérgico, para avaliar possíveis alterações induzidas pela exposição aguda ao chumbo na reatividade pressórica.

Após cerca de 30 minutos de estabilização, doses crescentes de fenilefrina (0,03 a 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , *in bolus*, em um volume de 5  $\mu\text{L}/100\text{g}$ ) foram administradas para a obtenção de uma curva dose-resposta (curva Controle). Após a realização da curva dose-resposta à fenilefrina e estabilização da pressão arterial, foi realizado o tratamento agudo com o acetato de chumbo (320  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , *i.v.* em um volume de 6,18  $\mu\text{L}/100\text{g}$  de rato). Uma hora depois, uma segunda curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Chumbo).

Para verificar a estabilidade experimental, o mesmo protocolo acima foi realizado no grupo controle. Neste grupo, ao invés da administração do chumbo, foi administrada uma solução veículo (água destilada, *iv*), sendo que, o volume de água destilada administrado era equivalente ao volume de chumbo utilizado nos animais do grupo tratado.



**Figura II:** Registro típico de uma curva dose-resposta a fenilefrina.

3.2.1.3 Avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina antes e após bloqueio ganglionar com hexametônio e após tratamento agudo com acetato de chumbo.

O chumbo tem a habilidade de estimular rapidamente a atividade do sistema nervoso simpático como foi confirmado por Lai *et al.* (2002), usando injeção intratecal de  $PbCl_2$  em ratos. Este efeito simpático estimulatório do chumbo pode contribuir para seus efeitos deletérios no sistema cardiovascular. Diante destes fatos, este protocolo teve a finalidade de avaliar uma possível participação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) em modular as ações do chumbo sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina. Para tal, o hexametônio, um antagonista de receptores nicotínicos ganglionares autonômicos, foi utilizado.

Após 30 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida foi administrado o hexametônio (20 mg/kg *i.v.* em um volume de 5  $\mu$ l/100g de rato). Trinta minutos depois foram mensurados os parâmetros arteriais e frequência cardíaca, e uma curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Hexametônio). Quando estabilizada novamente a pressão, foi administrado agudamente o chumbo (320  $\mu$ g/Kg, *i.v.* em um volume de 6,18  $\mu$ L/100g de rato) e após 1 hora de exposição os valores de PAS, PAD e FC foram novamente aferidos e outra curva dose-resposta à fenilefrina realizada (curva Hexametônio + Pb).

A dose do hexametônio utilizada nesse protocolo foi baseada em estudos prévios do nosso laboratório (Machado *et al.*, 2007).

Um controle temporal foi realizado para verificar a estabilidade experimental. Após 30 minutos de estabilização, uma curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada

(considerando a primeira curva o Tempo 0), após 45 minutos da realização da primeira curva, uma nova curva era feita (considerando Tempo 45). Uma terceira curva foi realizada no Tempo 90.

3.2.1.4 Envolvimento do sistema renina angiotensina sobre as alterações hemodinâmicas e na reatividade pressórica induzida pelo Pb.

Neste experimento, o pré-tratamento com losartan (10 mg/Kg *i.v.* em um volume de 20 µl/100 g de rato), inibidor de receptor tipo 1 de angiotensina (AT<sub>1</sub>), foi realizado para determinar a participação da angiotensina II no bloqueio dos possíveis efeitos do chumbo sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e alteração na reatividade pressórica à fenilefrina.

Para isso, após o período de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida o losartan foi administrado. Trinta minutos depois da infusão, foram mensuradas a pressão arterial e a FC. Uma curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Losartan). Novamente estabilizada a pressão arterial, foi feito o tratamento com o chumbo *i.v.*, e após 1 hora de exposição foram obtidos registros da pressão arterial e FC e feita uma nova curva dose-resposta à fenilefrina (curva Losartan + Pb).

Ainda investigando a participação do sistema renina-angiotensina nas ações do chumbo sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina, foi realizado o pré-tratamento com enalapril, um bloqueador da ECA.

Após o período de estabilização foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida o enalapril (5 mg/Kg *i.v.* em um volume de 20 µl/100 g de rato) foi administrado. Ao final de 30 minutos foi feita nova medida da pressão arterial e FC. Em seguida, uma curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Enalapril) e quando estabilizada a pressão arterial, o chumbo *i.v.* foi administrado. Após 1 hora de exposição ao metal, obtinha-se o registro da pressão arterial, frequência cardíaca, seguido de nova curva dose-resposta à fenilefrina (curva Enalapril + Pb).

As doses do losartan e do enalapril utilizadas foram baseadas em estudos prévios do nosso laboratório (Padilha *et al.*, 2004; Siman *et al.*, 2010).



3.2.1.5 Influência da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) sobre as alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.

Esse protocolo teve como finalidade avaliar se a NKA está envolvida nas possíveis alterações de pressão e frequência cardíaca induzidas pela administração de chumbo. Para isso, foi utilizado canrenona, um metabólito da espironolactona que tem a propriedade de se ligar ao sítio de ligação do receptor dos digitálicos na bomba de sódio.

Para a realização deste protocolo, registros da PAS, PAD e FC basais foram realizados. Após o período de estabilização a canrenona (1 mg/kg *i.v.* em um volume de 10 µl/100 g de rato) foi administrada, e ao final de 30 minutos nova medida da pressão arterial e FC foram mensuradas. Estabilizada a pressão, o chumbo *i.v.* foi administrado e, após 1 hora, registros da pressão arterial e FC foram novamente obtidos.

A dose de canrenona utilizada nesse protocolo foi baseada em estudos prévios do nosso laboratório. Esta concentração de canrenona, de 1 mg/kg, é considerada uma baixa concentração, que não altera a contratilidade miocárdica, o tônus vascular e a pressão arterial (Vassallo *et al.*, 1998, Siman *et al.*, 2010).

3.2.1.6 Envolvimento dos radicais livres sobre as alterações hemodinâmicas e reatividade pressórica induzidas pelo chumbo.

Este protocolo foi realizado para verificar o efeito do agente antioxidante, Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil – 12 mg/Kg *i.v.* em um volume de 10 µl/100g de rato), um mimético da superóxido dismutase, em modular os efeitos induzido pelo tratamento agudo com chumbo sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e a reatividade pressórica à fenilefrina.

Após um período de estabilização (30 min), registros basais da pressão arterial e FC eram obtidos. Logo após, o Tempol foi administrado, e ao final de 30 minutos a pressão arterial e FC foram mensuradas. Em seguida, uma curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Tempol). Estabilizada a pressão, o tratamento com o chumbo *i.v.*, foi feito. Após 1 hora de exposição, registros da pressão arterial e FC foram obtidos e nova curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada (curva Tempol + Pb).

A dose do tempol utilizada foi baseada em estudos prévios do nosso laboratório (Machado *et al.*, 2007).

### 3.3 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

#### 3.3.1 Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA)

A ação do chumbo sobre a atividade da ECA foi mensurada por método fluorimétrico, de acordo com Oliveira *et al.*, (2000). As amostras de plasma em triplicata (3  $\mu\text{L}$ ) foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40  $\mu\text{L}$  de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Hipuril-I-histidil-I-leucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3. A reação foi interrompida pela adição de 190  $\mu\text{L}$  de 0,34 M NaOH. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17  $\mu\text{L}$  de 2% *o-phataldialdehyde* (OPA) em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 cavidades (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190  $\mu\text{L}$  de 0,34 M NaOH, 17  $\mu\text{L}$  de OPA.

#### 3.3.2 Determinação da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

As amostras do material enzimático utilizado para determinar se a exposição ao chumbo por 120 minutos é capaz de afetar a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) cardíaca, foi extraído como descrito por Stefanon *et al.* (2009). Os corações (n = 6) foram homogeneizados em 4 mL de solução contendo Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0), usando um homogeneizador de tecidos (Turrax, modelo NT138). O homogeneizado foi centrifugado a 8,800 rpm por 20 minutos usando uma centrífuga Eppendorf (584-R) refrigerada (4 °C), e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante resultante da centrifugação foi acrescentado mais 4 mL de solução

contendo Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0), e em seguida foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 hora. O precipitado foi ressuspenso em solução de Tris-HCl 20 mM pH 7.2, em um volume final que proporcionasse uma quantidade de 0,5 mg/mL de proteína (400 – 600 µL de solução). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase foi determinada pela diferença da liberação de Pi pela hidrólise de 30 mM ATP entre o meio contendo NaCl 125 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, KCl 20 mM e Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) e um meio idêntico acrescido de ouabaína, na concentração final de 5 mM. As enzimas foram pré-incubadas por 5 minutos a 37° C e a reação iniciada pela adição de ATP (30 mM). O tempo de reação foi de 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição do ácido tricloroacético 10 %. O fosfato liberado foi determinado pelo método descrito por Chain *et al.*, (1986). As amostras foram feitas em triplicata. A atividade foi expressa como nmol Pi liberado por minuto por mg de proteína.

### **3.3.3 Medida de produção plasmática de malondialdeído (MDA)**

Os níveis plasmáticos de malondialdeído foram mensurados por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (Rodríguez-Martínez & Ruiz-Torres, 1992). Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um bom indicador de peroxidação lipídica. Após centrifugação do sangue a 4500 rpm por 15 minutos a temperatura de 4° C (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha), o plasma foi retirado e misturado com ácido tricloroacético a 20 % em 0.6 M HCl (1:1, v/v), os tubos contendo o plasma foram mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 4500 rpm antes de adicionar o ácido tiobarbitúrico (TBA) (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97°C por 30 minutos. Medida espectrofotométrica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) foi realizada a 535 nm e 20° C.

### 3.3.4 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot

#### 3.3.4.1 Western Blot para detecção de receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e Subunidade $\alpha_1$ NKA

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre a expressão protéica em artéria aorta torácica, rim e coração de ratos dos grupos Controle e Chumbo. Foram medidas a expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e subunidade alfa-1 da NKA. A expressão protéica foi realizada a partir de órgãos retirados de animais sacrificados após exposição ao chumbo ou ao veículo, por 120 minutos.

#### 3.3.4.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

As amostras foram preparadas utilizando segmento de aorta torácica, rim e coração de ambos os grupos. Os órgãos eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de 4°C, com tampão de homogeneização contendo: Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH 7.4.

Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha): para artérias a centrifugação foi realizada a 4°C com 6.000 rpm, durante 10 minutos, e para rim e coração 12.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante era recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi feita a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) através de espectrofotômetro (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil).

Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:200). Em seguida foram aliquoteados os volumes para uma carga de 50  $\mu$ g de proteína para a aorta e 80  $\mu$ g para rim e coração, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39  $\mu$ M; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95°C durante 4 minutos.

#### 3.3.4.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram aplicadas (carregadas) em gel SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5M (pH = 8,8), SDS 10%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed) para AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e subunidade alfa-1NKA, previamente imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %), sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas. Isto promoveu a separação das proteínas no gel.

Após o término da eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente ativada com água durante 20 segundos.

Para a transferência o gel, a membrana, o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% e SDS 0.1 %) à temperatura ambiente por 1 hora usando uma corrente de 25 V em um Semi-dry (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

#### 3.3.4.4 Incubação dos anticorpos

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0.1 %, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 90 minutos, sob agitação com os anticorpos primários para AT<sub>1</sub> (anticorpos monoclonais de coelho anti-AT<sub>1</sub>, 1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA), AT<sub>2</sub> (anticorpos monoclonais de coelho anti-AT<sub>2</sub>, 1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA),  $\alpha_1$  NKA (anticorpo monoclonal de rato, 1:500, Millipore, San Francisco, U.S.A.),  $\alpha$ -actina (anticorpo monoclonal de rato anti- $\alpha$ -actina, 1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) e GAPDH (anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH, 1:5000, Abcam Cambridge MA, USA), diluídos em uma solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0.1 %, pH 7,5).

As membranas foram incubadas durante toda noite a 4 °C. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 30 minutos

com uma solução TBS-T para remoção do excesso dos anticorpos primários, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário, imunoglobulina IgG anti-camundongo para alfa-actina (1:5000, Sigma Chemical, Co, St Louis U.S.A.), imunoglobulina IgG anti-coelho para subunidade alfa-1 da NKA (1:5000, Millipore, San Francisco, U.S.A.) e para o receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, U.S.A.) durante 60 minutos.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) (as soluções eram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS).

#### 3.3.4.5 Detecção das proteínas

As proteínas correspondentes ao receptor AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, subunidade  $\alpha_1$  NKA,  $\alpha$ -actina e do GAPDH foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham<sup>TM</sup>, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram scaneadas. O programa Image J foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

### 3.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

A pressão arterial e frequência cardíaca basais correspondem aos valores obtidos após o período inicial de estabilização e/ou antes das curvas dose-resposta à fenilefrina.

As respostas vasopressoras induzidas pela fenilefrina sobre a pressão arterial foram expressas no momento do pico de pressão após administração de cada dose desse fármaco.

Para a determinação do valor basal da curva, da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e do  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ , que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas dose-resposta, utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A.).

Os resultados da expressão protéica do receptor  $AT_1$ ,  $AT_2$  e da subunidade alfa-1 da NKA foram expressas como a relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação à  $\alpha$ -actina (para vasos) e o GAPDH (para coração e rim).

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste  $t$  de *Student*, pareado e/ou não pareado, análise de variância (ANOVA), uma vias, medidas repetidas ou completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey quando a ANOVA apresentava significância (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.5 FÁRMACOS E REAGENTES

- Acetato de chumbo (Sigma)
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido etilodiaminotetracético (EDTA) (Merck)
- Ácido Orto-fosforico (Merck)
- Ácido Tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Adenosina trifosfato (ATP) (Sigma)
- Albumina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para GAPDH (Abcam)
- Anticorpo produzido em camundongo para  $\alpha$ -1NKA (Millipore)
- Anticorpo produzido em camundongo para alfa actina (Sigma)
- Anticorpo produzido em coelho para AT<sub>1</sub> (Sigma)
- Anticorpo produzido em coelho para AT<sub>2</sub> (Sigma)
- Azul brilhante de Coomassie G (Sigma)
- Azul de Bromofenol (Sigma)
- Canrenona (Sigma)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Diidrogenofotato de Amonio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (VETEC)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Enalapril, meleato (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Heparina (Roche)
- Hexamethonium, cloreto (Sigma)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Hip-His-Leu (Sigma)



- His-Leu (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- nitrato de magnésio  $Mg(NO_3)_2$  (VETEC)
- *o-phataldialdeído* (OPA) (Sigma)
- Ouabaína (Sigma)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Tempol (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- Triton X-100 (VETEC)
- Uretana (Sigma)
- 2-Hidroxietilmercaptano (-mercaptoetanol) (Sigma)

Todas as soluções, com exceção do ATP, foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a  $-20^{\circ}C$ . O ATP foi diluído em tampão Tris 0.1M.

## ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO

O sangue para a dosagem da concentração de chumbo foi retirado após 120 minutos de exposição ao metal e mantido a  $-20^{\circ}$  C até a análise. Os animais expostos ao chumbo apresentaram níveis sanguíneos de  $37 \mu\text{g/dL} \pm 1,7$  ( $n = 10$ ). Os ratos controles ( $n = 4$ ) apresentaram níveis abaixo do limite de detecção ( $0,5 \mu\text{g/dL}$ ) como representado na Tabela 1. As medidas foram realizadas por análise espectrométrica.

Tabela 1 – Dosagem sanguínea de chumbo em ratos expostos e não expostos:

Dosagem sanguínea de Chumbo		
Grupo	N	$\mu\text{g/dL}$
Ct	4	Abaixo do limite de detecção
Pb	10	$37 \mu\text{g/dL} \pm 1,7$

Os valores estão expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Teste *t-Student*:  $p < 0,05$  vs Ct.

### 4.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS - PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

#### 4.2.1 Efeito do acetato de chumbo sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal

O efeito da exposição aguda ao acetato de chumbo (Pb) nos parâmetros hemodinâmicos arteriais de ratos (*in vivo*) foi avaliado. Para verificar a estabilidade funcional da preparação, foi feito um grupo controle não exposto ao chumbo e sim à água destilada onde avaliamos os mesmos parâmetros. Após exposição por 60 minutos ao chumbo, houve aumento significativo da PAS que tornou-se ainda mais evidente ao final dos 120 minutos (Tabela 2 e Figura 1). Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na PAD e na FC (Tabela 2). O grupo não exposto ao chumbo manteve-se estável, para todos os parâmetros avaliados, em todo período experimental.

Tabela 2 – Alterações da Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC) antes e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo, (n=9):

	Ct (0 min)	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>PAS</b> (mmHg)	108 ± 3	113 ± 3	118 ± 3*	118 ± 3*	120 ± 4*
<b>PAD</b> (mmHg)	60 ± 3	60 ± 3	61 ± 3	62 ± 3	63 ± 4
<b>FC</b> (bpm)	334 ± 13	348 ± 14	370 ± 27	369 ± 23	365 ± 16

Os dados são expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey, para todas as análises. \*p<0,05 vs Ct (Tempo 0).

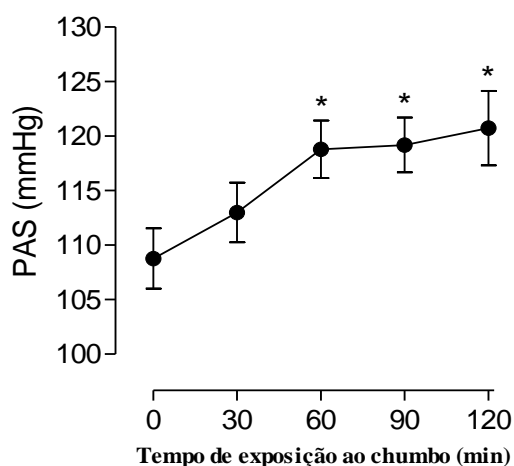


Figura 1. Avaliação temporal da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), obtida em ratos anestesiados antes (Tempo 0) e após a administração intravenosa de Pb (320 µg/kg). ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey. \*p<0,05, vs Ct (Tempo 0). (n=9).

#### 4.2.2 Efeito do hexametônio sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato chumbo.

Para avaliar uma possível participação do sistema nervoso autônomo no aumento da pressão de ratos expostos ao chumbo foi realizada uma co-exposição com um bloqueador glanglionar, o hexametônio.

Como esperado, o hexametônio reduziu a pressão arterial sistólica e diastólica basal, através do bloqueio ganglionar, porém não alterou a frequência cardíaca basal. A administração do chumbo, na presença de hexametônio levou ao aumento da pressão arterial sistólica, ou seja, o hexametônio não aboliu o efeito pressor do chumbo. Não houve alteração da FC como observado na Tabela 3 e Figura 2.

Tabela 3: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Hexa+Pb); (n=8).

	<b>PAS basal</b> <b>(mmHg)</b>	<b>PAD basal</b> <b>(mmHg)</b>	<b>FC basal</b> <b>(bpm)</b>
Ct	107 ± 4,1	70 ± 4,6	345 ± 16,1
Hexa	80 ± 2,5**	50 ± 2,6*	327 ± 7,6
Hexa+Pb	109 ± 4,0	61 ± 5,2	364 ± 12,1

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey; \*p<0,05 vs Ct; \*\*p<0,05 Hexa vs Hexa+Pb.

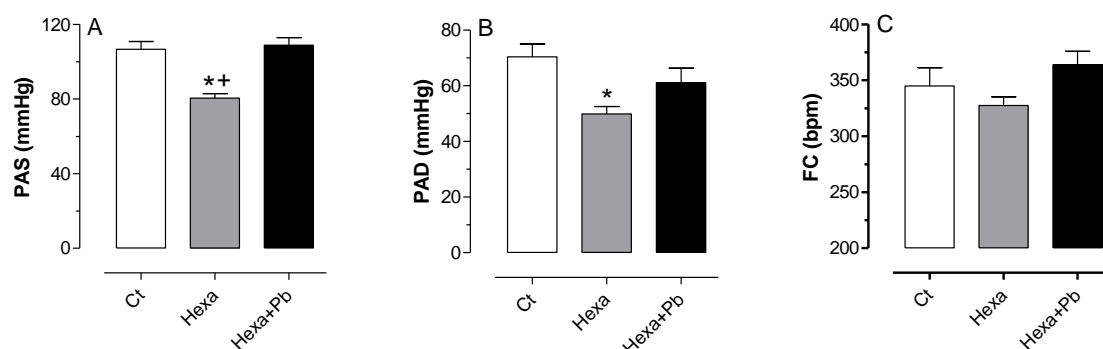


Figura 2. (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Hexa+Pb) (n = 8). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \*p<0,05 vs Ct; \*\*p<0,05 Hexa vs Hexa+Pb.

#### 4.2.3 Efeito do losartan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato chumbo

Com objetivo de avaliar o efeito da exposição aguda ao chumbo sobre o sistema renina-angiotensina e sua relação com a pressão arterial e frequência cardíaca basais foi realizado o co-exposição com losartan.

A administração do losartan provocou uma redução na pressão arterial sistólica e diastólica basal, sem alterar a frequência cardíaca. A administração do chumbo, na presença do antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, foi incapaz de aumentar a pressão arterial sistólica como anteriormente documentado (Tabela 2). Este resultado nos mostra o envolvimento do sistema renina-angiotensina no efeito hipertensor do chumbo (Tabela 4 e Figura 3). A administração de losartan também reduziu a PAD, em presença do chumbo esse parâmetro não foi modificado. Não foram observadas alterações na FC em nenhuma das condições experimentais (Tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do losartan (Los) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Los+Pb); (n=7).

	<b>PAS basal (mmHg)</b>	<b>PAD basal (mmHg)</b>	<b>FC basal (bpm)</b>
Ct	115 ± 3,6	76 ± 6,3	341 ± 16,6
Los	98 ± 6,2*	46 ± 5,6*	345 ± 28,7
Los+Pb	96 ± 4,6*	46 ± 3,0*	337 ± 22,5

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey.

\*p<0,05 vs Ct

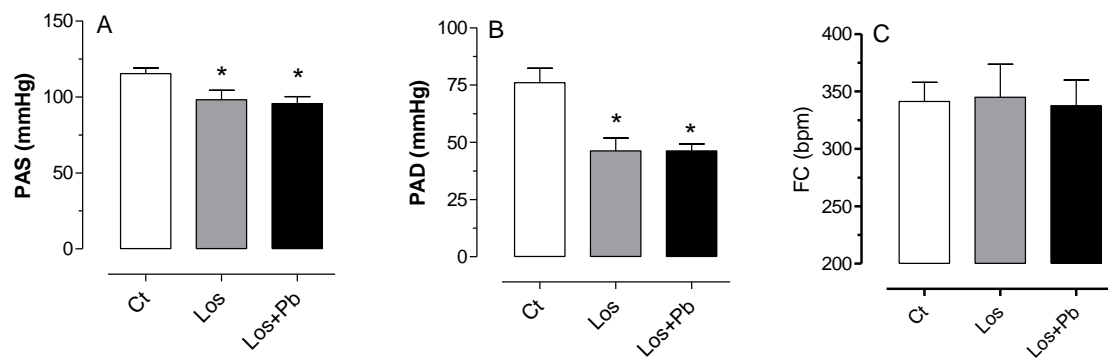


Figura 3. (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Losartan (Los) e após tratamento com 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Pb (Los+Pb); (n = 7). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ct.

#### 4.2.4 Efeito do enalapril sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo

Ainda, avaliando a ação do chumbo sobre o sistema renina-angiotensina, foi realizada uma co-exposição com um inibidor da ECA, o enalapril.

A administração do enalapril provocou redução na pressão arterial sistólica e diastólica basal, sem alterar a frequência cardíaca (Tabela 5 e Figura 4). A administração do chumbo, na presença do inibidor da ECA, foi incapaz de aumentar a pressão arterial sistólica como previamente visualizado (Tabela 2). Este resultado corrobora a hipótese de participação do sistema renina-angiotensina no aumento de pressão arterial sistólica induzido pela exposição aguda ao chumbo. Quanto à pressão arterial diastólica e à frequência cardíaca o chumbo, na presença do enalapril, não induziu alterações significantes (Tabela 5 e Figura 4).

Tabela 5: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Enalapril (Enal) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Enal+Pb); (n=6).

	PAS basal (mmHg)	PAD basal (mmHg)	FC basal (bpm)
Ct	116 ± 4,5	76 ± 2,7	365 ± 21,1
Enal	89 ± 3,9*	45 ± 4,1*	348 ± 25,6
Enal+Pb	95 ± 6,7*	50 ± 5,3*	375 ± 20,8

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \*p<0,05 vs Ct.

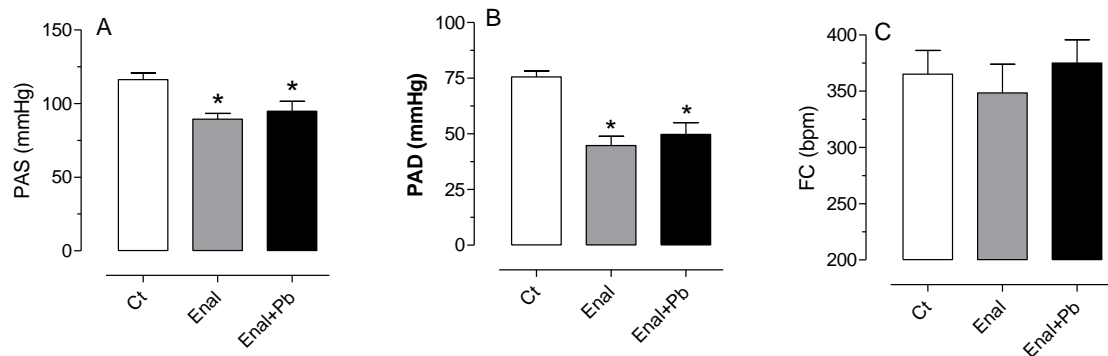


Figura 4. (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Enalapril (Enal) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Enal+Pb) (n =6). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. \*p<0,05 vs Ct.

#### 4.2.5 Efeito da canrenona sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo

Sabe-se que, dentre as inúmeras ações da angiotensina II, a ativação da NKA tem importante participação nas respostas cardíacas em virtude da ativação do Sistema renina-angiotensina. (Zhang & Mayeux, 2001; Brock *et al.*, 1982). Portanto, após a avaliação da influência do sistema renina-angiotensina sobre os efeitos pressores do chumbo, analisou-se a influencia da NKA, *in vivo*, através do co-tratamento com a canrenona, um inibidor da bomba em baixas concentrações.



Tabela 6: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Canrenona (Can) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Can+Pb); (n=7).

	PAS basal (mmHg)	PAD basal (mmHg)	FC basal (bpm)
Ct	106 ± 4,6	65 ± 5,9	372 ± 11,1
Can	110 ± 4,0	60 ± 6,6	350 ± 17,3
Can+Pb	100 ± 2,1 <sup>†</sup>	60 ± 4,2	357 ± 13,1

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey.

<sup>†</sup>p<0,05 Can vs Can+Pb.

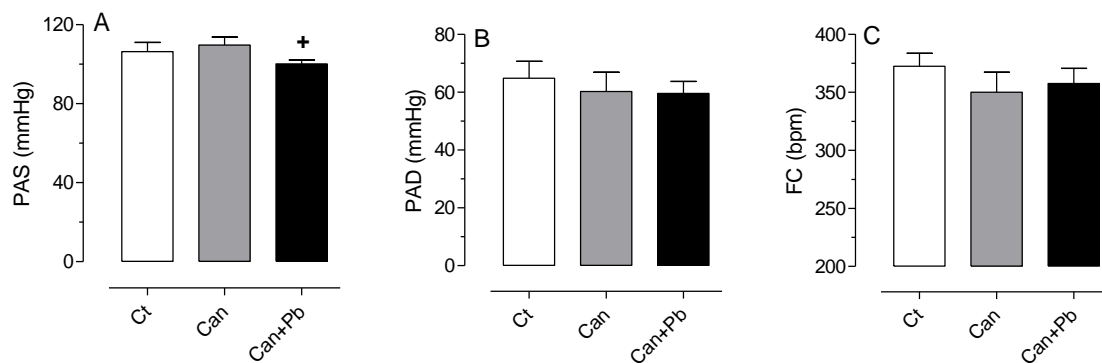


Figura 5. (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de canrenona (Can) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb. (N = 7). Anova 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey. <sup>†</sup>p<0,05 Can vs Can+Pb.

Como representado na Tabela 6 e Figura 5, a administração de canrenona não alterou a PAS e PAD basal, assim como a frequência cardíaca. O tratamento com chumbo, na presença da canrenona, não alterou a pressão arterial diastólica, porém a canrenona foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica para valores abaixo da condição controle, abolindo o efeito hipertensor causado pelo chumbo (Tabela 2). A FC não foi alterada após administração do chumbo na presença da canrenona.

#### 4.2.6 Efeito do tempol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basal, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo

Para verificar a participação do estresse oxidativo sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, o tempol, mimético da superóxido dismutase foi administrado. Após sua administração não houve alteração da PAS, PAD e FC. A administração do chumbo, na presença do tempol, foi incapaz de aumentar a pressão arterial sistólica como previamente visualizado (Tabela 2), assim como também não houve modificação da PAD e FC (Tabela 7 e Figura 6).

Tabela 7: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) antes (Ct), depois da administração do Tempol (Temp) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Temp+Pb); (n=5).

	<b>PAS basal (mmHg)</b>	<b>PAD basal (mmHg)</b>	<b>FC basal (bpm)</b>
Ct	106 ± 3,15	66 ± 7,41	361 ± 61,21
Temp	109 ± 3,17	66 ± 7,25	350 ± 53,31
Temp+Pb	108 ± 3,32	70 ± 5,32	349 ± 11,03

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via.

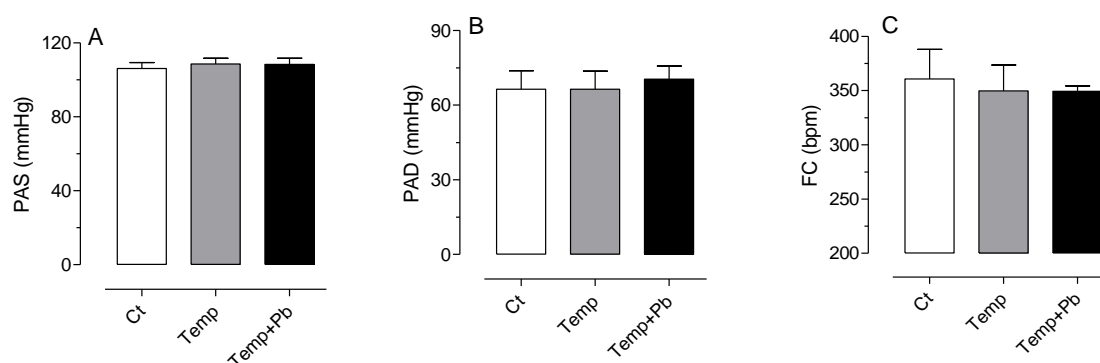


Figura 6. (A) Alterações da pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC), antes (Ct), depois da administração de Tempol (Temp) e após tratamento com 320 µg/kg de Pb (Temp+Pb); (n =5). Anova 1 via.

### 4.3 REATIVIDADE PRESSÓRICA À FENILEFRINA

#### 4.3.1 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após tratamento agudo com o acetato chumbo

O tratamento com 320 µg/Kg de chumbo não modificou a resposta máxima na PAS e PAD, porém reduziu a sensibilidade ao agonista alfa 1-adrenérgico (Figura 7). No entanto, na PAS, foi observado um efeito pressor causado pelo chumbo no valor basal da curva dose-resposta (Tabela 8, Figura 7).

Tabela 8: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, antes (Ct) e após (Pb) tratamento com 320 µg/Kg de chumbo; (n=11).

		Basal (mmHg)	Rmax (mmHg)	pD <sub>2</sub>
PAS	Ct	124 ± 5,3	219 ± 4,4	-2,93 ± 0,08
	Pb	133 ± 5,1*	214 ± 6,7	-1,58 ± 0,51*
PAD	Ct	82 ± 4,4	133 ± 3,6	-3,53 ± 0,18
	Pb	81 ± 6,8	128 ± 4,4	-2,86 ± 0,20*

Basal= valor basal da curva dose-resposta

Os resultados estão expressos em média ± EPM. Teste *t-Student* pareado \*p< 0,05 vs Ct.

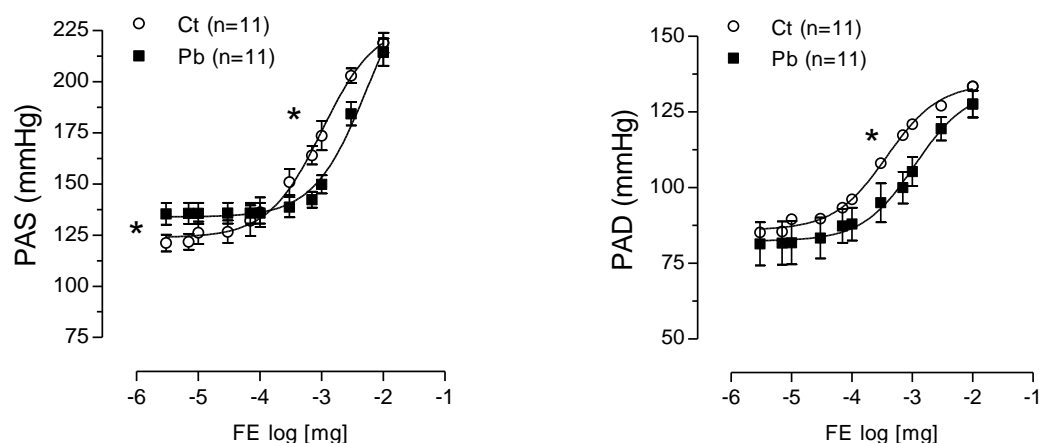


Figura 7. Curvas dose-resposta à fenilefrina sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct) e após (Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Teste *t-Student* para comparação do Basal,  $pD_2$  e  $R_{\text{max}}$ , \* $P < 0,05$  vs Ct.

#### 4.3.2 Efeito do hexametônio sobre a reatividade pressórica à fenilefrina da pressão artéria sistólica, diastólica e freqüência cardíaca antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.

O tratamento com hexametônio reduziu a reatividade pressora à fenilefrina tanto na PAS quanto na PAD. No entanto, a co-administração de Hexametônio + Pb elevou a resposta à fenilefrina apenas no valor basal da curva dose-resposta, sugerindo que o bloqueio ganglionar não suprimiu as ações do chumbo neste ponto (Tabela 9). Não houve efeito adicional na sensibilidade e na resposta máxima após a adição do chumbo.

A presença de Hexametônio ou Hexametônio + Pb não promoveu alterações significativas sobre a FC durante a reatividade à fenilefrina na sensibilidade e resposta máxima, porém no valor basal da curva dose-resposta, houve um aumento na sensibilidade quando administrado o chumbo (Hexa+Pb) (Tabela 9; Figura 8).

Tabela 9: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Hexa + Pb); (n= 8).

		Basal (mmHg)	Rmax (mmHg)	pD <sub>2</sub>
PAS	Ct	130 ± 7,8	219 ± 3,9	-2,93 ± 0,07
	Hexa	84 ± 2,8*	216 ± 5,2	-3,04 ± 0,06
	Hexa+Pb	109 ± 4,1* <sup>+</sup>	218 ± 4,4	-2,38 ± 0,11* <sup>+</sup>
PAD	Ct	82 ± 4,3	138 ± 6,3	-3,37 ± 0,08
	Hexa	56 ± 4,7*	155 ± 4,1	-3,23 ± 0,05
	Hexa+Pb	67 ± 5,5	145 ± 5,6	-2,90 ± 0,03* <sup>+</sup>

Basal= valor basal da curva dose-resposta.

Os resultados estão expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey para comparação do Basal, Rmax e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct; <sup>+</sup>p<0,05 Hexa vs Hexa+Pb.

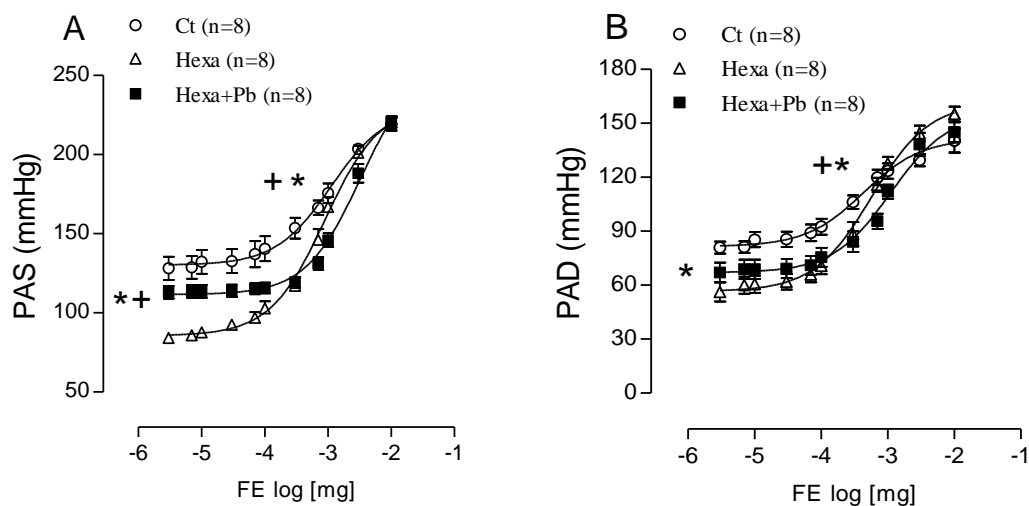


Figura 8. Curvas dose-resposta à fenilefrina sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após (Hexa + Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey, para comparação do Basal, Rmax e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct; <sup>+</sup>p<0,05 Hexa vs Hexa+Pb.

Tabela 10. Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE) da FC antes (Ct), após a infusão de Hexametônio (Hexa) e após o chumbo (Hexa+Pb), (n=8).

	Basal (bpm)	R <sub>máx</sub> (bpm)	pD <sub>2</sub>
Ct	388 ± 10,0	201 ± 26,8	-2,86 ± 0,25
Hexa	335 ± 7,2*	253 ± 18,3	-1,91 ± 1,15
Hexa+Pb	371 ± 7,8	180 ± 19,6	-2,44 ± 0,56

Basal= valor basal da curva dose-resposta.

Os resultados estão expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey para comparação do basal, R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct.

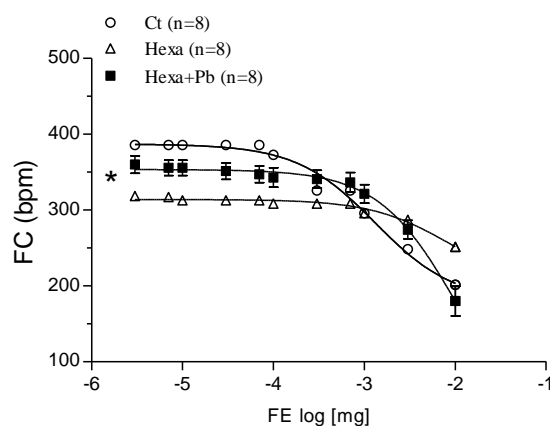


Figura 9. Avaliação da FC na curva dose-resposta à fenilefrina, antes (Ct), depois da administração de hexametônio (Hexa) e após (Hexa + Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320 µg/kg) (n = 8). Anova 1 via para comparação do basal, R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct.

#### 4.3.3 Efeito do losartan sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo

O losartan *per se*, alterou a reatividade pressórica à fenilefrina na PAS e PAD, assim como no valor basal da curva dose-resposta, mas a resposta máxima não foi diferente. Após o tratamento com chumbo, o losartan abole o efeito pressor do chumbo no valor basal da curva, não tendo efeito adicional do chumbo sobre a

sensibilidade que se manteve reduzida e nem sobre a resposta máxima a qual não foi alterada (Tabela 11; Figura 10).

Tabela 11: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do losartan (Los) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Los + Pb), (n=7).

		<b>Basal (mmHg)</b>	<b>Rmax (mmHg)</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>
PAS	Ct	130 ± 7,8	219 ± 3,9	-2,93 ± 0,07
	Los	104 ± 6,0*	210 ± 12,6	-2,25 ± 0,12*
	Los+Pb	99 ± 4,4*	198 ± 9,3	-2,20 ± 0,11*
PAD	Ct	78 ± 2,6	138 ± 6,3	-3,49 ± 0,17
	Los	48 ± 5,7*	127 ± 4,2	-2,83 ± 0,06*
	Los+Pb	47 ± 3,9*	122 ± 4,2	-2,72 ± 0,09*

Basal= valor basal da curva dose-resposta.

Os resultados estão expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey para comparação do basal, Rmax e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct.

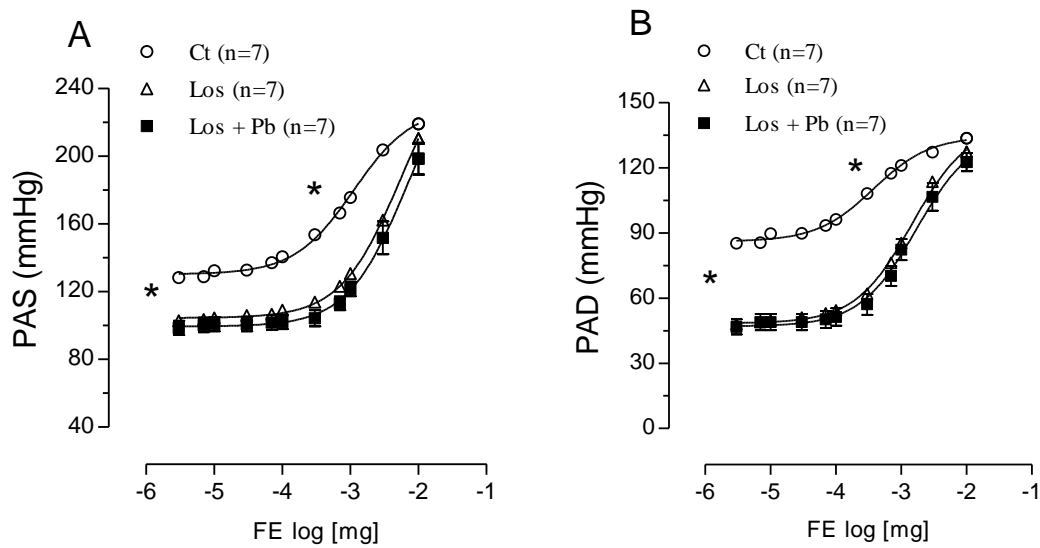


Figura 10. Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do losartan, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de losartan (Los) e após (Los+Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey, para comparação do basal, Rmax e pD2. \*P<0,05 vs Ct.

#### 4.3.4 Efeito do enalapril sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após o tratamento com chumbo.

O tratamento com enalapril reduziu a reatividade pressórica à fenilefrina tanto na PAS quanto na PAD, porém não alterou a resposta máxima. Após o tratamento com chumbo o enalapril aboliu o efeito pressor do chumbo no valor basal da curva dose-resposta, porém a reatividade pressórica se manteve reduzida tal qual observado quando administrado o enalapril. A resposta máxima na PAS e PAD se manteve inalterada na presença do chumbo (Tabela 12; Figura 11).



Tabela 12: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do enalapril (Enal) e após tratamento com 320  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de chumbo (Enal + Pb); (n=6).

		Basal (mmHg)	Rmax (mmHg)	$pD_2$
PAS	Ct	122 $\pm$ 3,0	219 $\pm$ 3,9	-2,93 $\pm$ 0,07
	Enal	100 $\pm$ 6,0*	208 $\pm$ 9,9	-2,40 $\pm$ 0,11*
	Enal+Pb	103 $\pm$ 4,8*	203 $\pm$ 9,8	-2,05 $\pm$ 0,16*
PAD	Ct	82 $\pm$ 4,4	139 $\pm$ 6,3	-3,49 $\pm$ 0,17
	Enal	49 $\pm$ 4,3*	128 $\pm$ 3,5	-2,90 $\pm$ 0,07*
	Enal+Pb	54 $\pm$ 2,4*	131 $\pm$ 8,7	-2,58 $\pm$ 0,06*

Basal= valor basal da curva dose-resposta.

Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey para comparação do basal, Rmax e  $pD_2$ . \* $p < 0,05$  vs Ct.

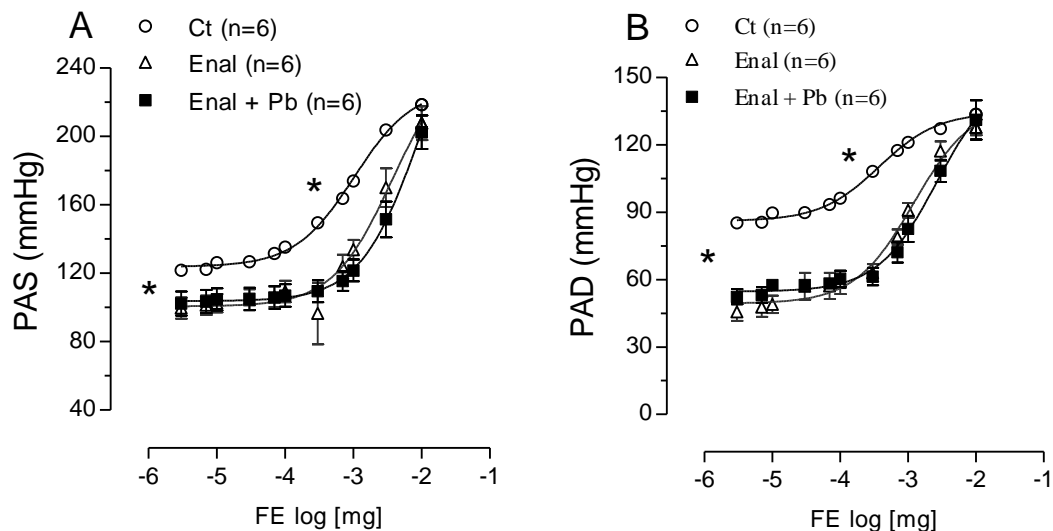


Figura 11. Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do enalapril, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de Enalapril (Enal) e após (Enal+Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey, para comparação do basal, Rmax e  $pD_2$ . \* $p < 0,05$  vs Ct.

#### 4.3.5 Efeito do tempol sobre a reatividade pressórica à fenilefrina antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo

O tratamento com tempol reduziu a reatividade pressórica à fenilefrina da PAS, inibindo o efeito pressórico do chumbo no valor basal da curva dose-resposta. Em relação à PAD, o tempol promoveu redução de sensibilidade e aumento de resposta máxima, sendo que esses efeitos não foram modificados pela adição do chumbo (Tabela 13; Figura 12).

Tabela 13: Parâmetros basais (mmHg), resposta máxima (Rmax, mmHg) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas dose-resposta à fenilefrina da PAS e PAD, na presença do tempol (Temp) e após tratamento com 320 µg/Kg de chumbo (Temp + Pb); (n=5).

		Basal (mmHg)	Rmax (mmHg)	pD <sub>2</sub>
PAS	Ct	130 ± 7,8	219 ± 3,9	-2,93 ± 0,07
	Temp	113 ± 2,7	224 ± 9,2	-2,37 ± 0,11*
	Temp + Pb	114 ± 3,2	224 ± 3,9	-2,03 ± 0,17*
PAD	Ct	83 ± 4,7	135 ± 3,6	-3,53 ± 0,18
	Temp	79 ± 9,8	170 ± 16,1*	-2,53 ± 0,28*
	Temp + Pb	78 ± 6,3	160 ± 6,4*	-2,51 ± 0,10*

Basal= valor basal da curva dose-resposta.

Os resultados estão expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via, seguida de *post hoc* de Tukey para comparação do basal, Rmax e pD<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs Ct.

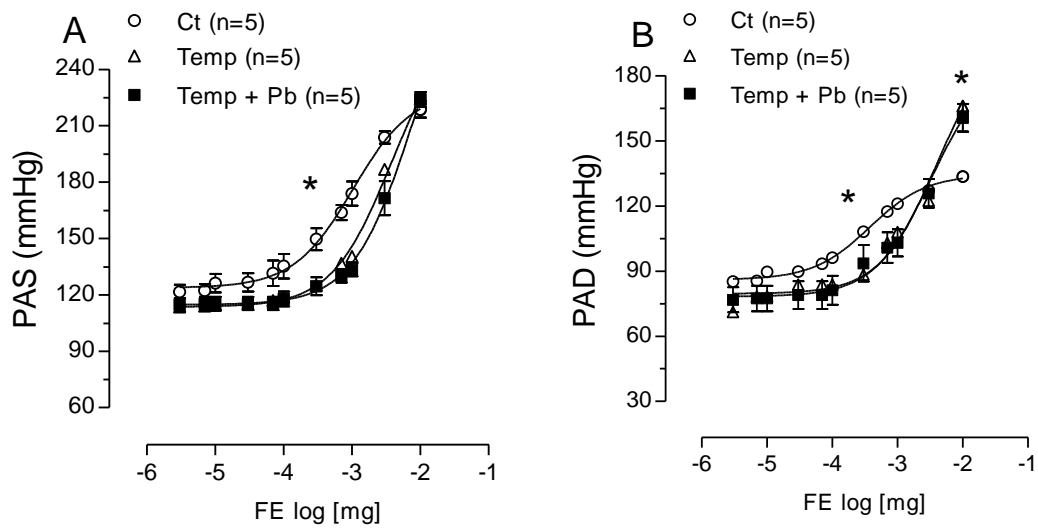


Figura 12. Curvas dose-resposta à fenilefrina na presença do Tempol, sobre a pressão arterial sistólica (A) e pressão arterial diastólica (B), antes (Ct), depois da administração de Tempol (Temp) e após (Temp+Pb) 1 hora de exposição ao chumbo (320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Análise foi realizada através de ANOVA 1 via seguida de post hoc de Tukey, para comparação do basal, Rmax e pD2. \* $p < 0,05$  vs Ct.

#### 4.4 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

##### 4.4.1 Avaliação da atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

A Figura 13 mostra o efeito do chumbo sobre a atividade, *in vitro*, da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . O tratamento com chumbo aumentou a atividade ATPásica desta bomba em relação ao controle.

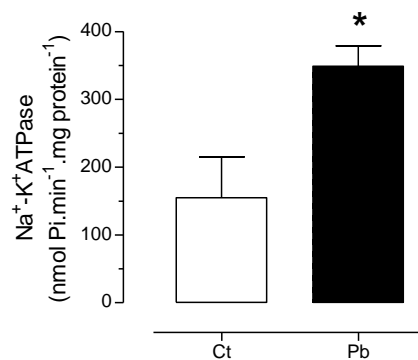


Figura 13. Efeito do tratamento agudo com chumbo sobre a atividade da NKA em corações de ratos. Ct (n = 4); Pb (n = 6). Teste *t-Student*. \* $p < 0,05$  vs Ct.

##### 4.4.2 Medida da atividade plasmática da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi significativamente maior no plasma dos animais expostos cronicamente ao chumbo quando comparados aos animais controle (Figura 14).

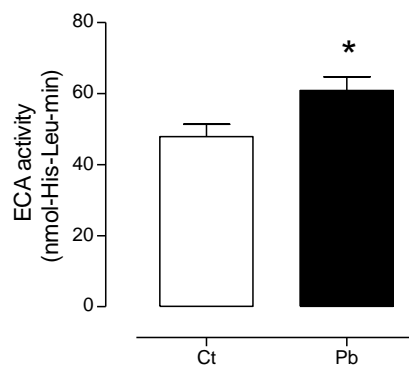


Figura 14. Efeito do tratamento agudo com chumbo sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. Ct (n = 7); Pb (n = 10). Teste *t-Student*. \* $p < 0,05$  vs Ct.

#### 4.4.3 Medida da produção plasmática de malondialdeído (MDA)

Com o intuito de verificar se o estado oxidante plasmático é alterado pelo tratamento com chumbo foram realizadas medidas da produção do malondialdeído plasmático.

Como se observa na Figura 15 o nível plasmático de malondialdeído está aumentado nos animais do grupo chumbo. Estes resultados indicam que o tratamento com este metal induz aumento do estresse oxidativo.

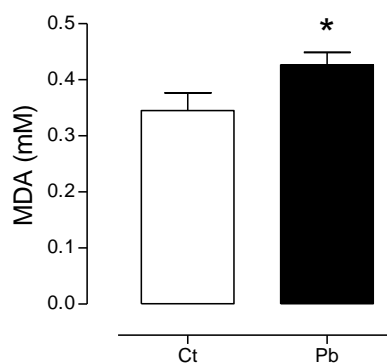


Figura 15. Concentração de Malondialdeído plasmático. Ct (n =8); Pb (n = 9). Teste *t-Student*. \*p < 0,05.

#### 4.4.4 Expressão protéica dos receptores de angiotensina AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, e da isoforma $\alpha_1$ da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase

##### 4.4.4.1 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>

A expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, foi feita através da técnica de Western Blot nos segmentos de aorta torácica, coração e rim dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica foi semelhante em todos os órgãos analisados dos animais dos grupos Controle e Chumbo para receptores AT<sub>1</sub> (Figura 16) e também para os receptores AT<sub>2</sub> (Figura 17).

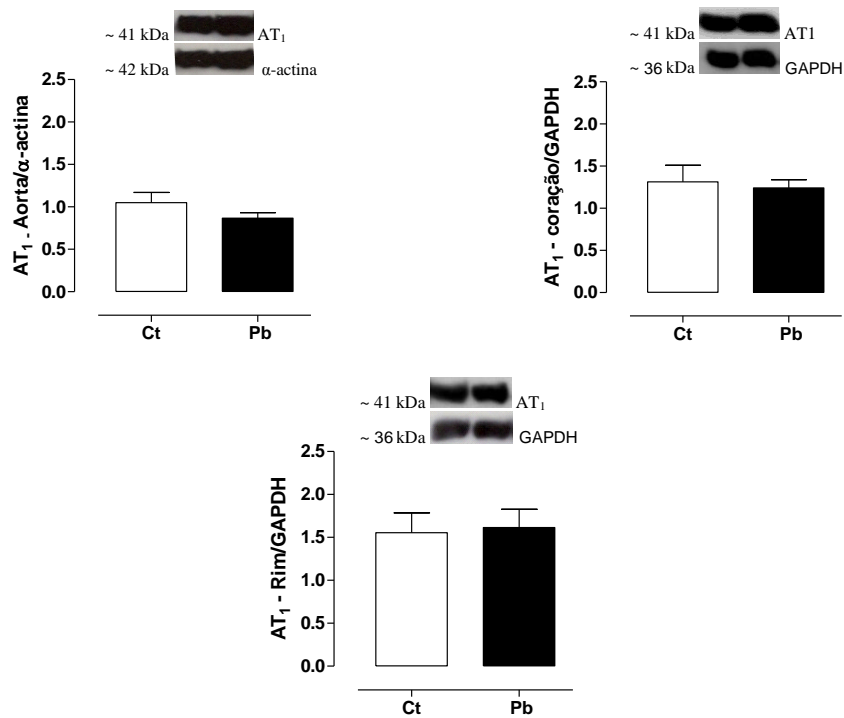


Figura 16. Expressão protéica de receptor angiotensinoginérico AT<sub>1</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmento de artéria aorta torácica (Ct = 7/Pb = 7), coração (Ct = 8/Pb = 6) e rim (Ct = 5/Pb = 6) de ratos. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>1</sub>, da  $\alpha$ -actina e do GAPDH. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT<sub>1</sub> e da  $\alpha$ -actina. Teste *t-Student*.

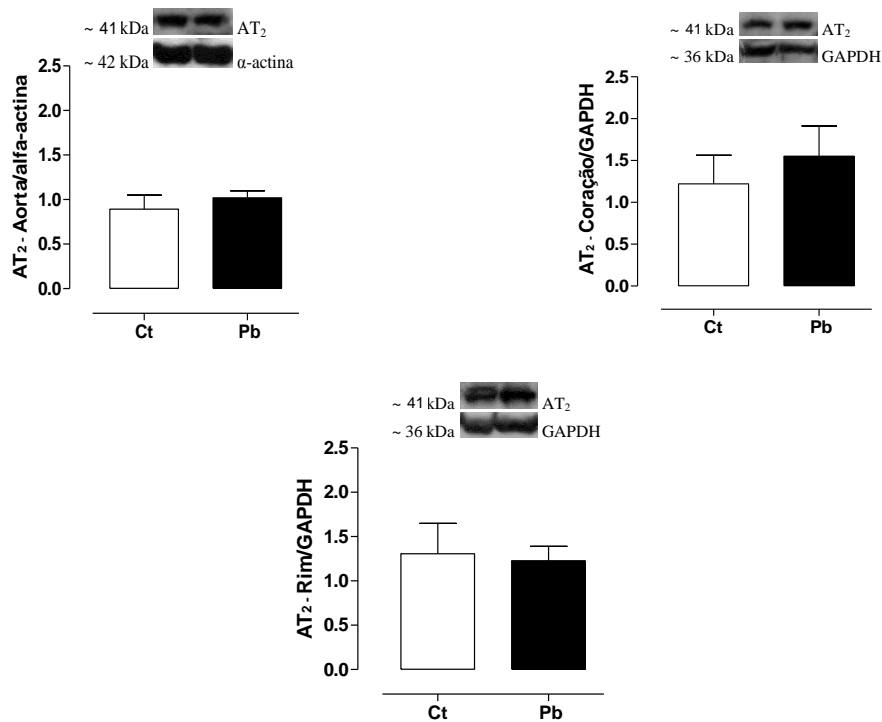


Figura 17. Expressão protéica de receptor angiotensinoginérico AT<sub>2</sub>, por meio da técnica de Western Blot, em segmento de artéria aorta torácica (Ct = 6/Pb = 7), coração (Ct = 5/Pb = 7) e rins (Ct = 5/Pb = 6) de ratos. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT<sub>2</sub>,  $\alpha$ -actina e do GAPDH. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT<sub>2</sub>, da  $\alpha$ -actina e do GAPDH. Teste *t-Student*.

#### 4.4.4.2 Expressão protéica da subunidade $\alpha_1$ da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Através da técnica de Western Blot a expressão protéica da subunidade alfa-1 da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi detectada em corações dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica foi semelhante nos corações dos animais dos grupos Controle e Chumbo, como mostra a Figura 18. Este resultado sugere que a exposição aguda ao chumbo não altera a expressão protéica da subunidade alfa-1 da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

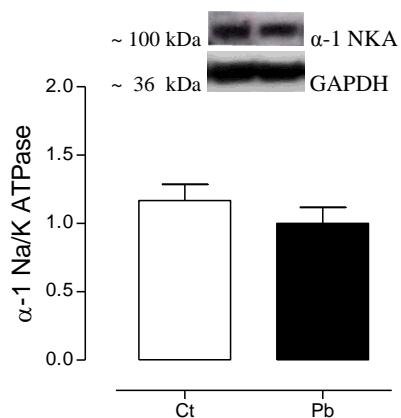


Figura 18. Expressão protéica da subunidade  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, por meio da técnica de Western Blot, em coração de ratos dos grupos controle (Ct, n = 5) e chumbo (Pb, n = 6). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da subunidade  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e do GAPDH. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade de  $\alpha_1$  e do GAPDH. Teste *t-Student*.



## ***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

O chumbo tem sido identificado como fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Navas-Acien *et al.*, 2007). A Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), estabelece como referência níveis de chumbo no sangue na concentração de 60 µg/dL, e quando excede esse valor deve ser feita a remoção da fonte de exposição ao metal (Patrick, 2006; Kosnett *et al.*, 2007). No entanto, a quantidade de chumbo utilizada no presente estudo alcançou uma concentração de chumbo sanguínea de 37 µg/dL após duas horas de exposição, onde se observou aumento de pressão arterial sistólica.

É bem estabelecido que ratos tratados cronicamente com altas concentrações de chumbo apresentam aumento de pressão arterial. Estudos realizados por Carmignani *et al.* (1999) mostram que exposição a 60 ppm de chumbo em água de beber por 10 meses aumenta pressão arterial sistólica e diastólica. Outros trabalhos demonstram o aumento da pressão arterial em ratos expostos a 100 ppm de chumbo em água de beber no período de 2 a 8 semanas (Sharifi *et al.*, 2004). Roncal *et al.* (2007) mostraram que a exposição a 150 ppm de chumbo em água de beber por 4 semanas, também aumenta a pressão arterial. Estudos em trabalhadores expostos ao chumbo são condizentes com os estudos em animais acima citados, pois mostraram que trabalhadores expostos ao chumbo também apresentaram aumento significativo da pressão arterial (Kasperczyk *et al.*, 2009; Ahamed *et al.*, 2008).

São várias as pesquisas que avaliam a ação do chumbo no sistema cardiovascular. Entretanto, os estudos que investigam os efeitos agudos de baixas concentrações *in vivo* são reduzidos. Buscando averiguar as ações pressoras e os mecanismos hipertensinogênicos de baixas concentrações de chumbo em ratos normotensos, o presente estudo mostrou que a exposição aguda (2 horas) a baixa concentração de chumbo (37 µg/dL de sangue), valor este abaixo dos níveis de referência, já promove aumento da pressão arterial sistólica sem, no entanto, alterar a pressão arterial diastólica.

Estes achados são condizentes com estudos recentes do nosso grupo onde os animais expostos ao chumbo por 120 minutos (320 µg/Kg de chumbo *i.v.*)

apresentaram aumento de pressão sistólica intraventricular e do inotropismo cardíaco. Os resultados apresentados também mostram que 2 horas de exposição não modificam a frequência cardíaca (FC), confirmando dados já demonstrados em nosso laboratório (Fioresi, 2008).

Estes resultados são consistentes com os estudos de Carmignani *et al.* (1999, 2000) que investigaram estes efeitos depois da exposição crônica a este metal, demonstrando aumento no inotropismo cardíaco sem, no entanto, alterar a frequência cardíaca. Boscolo & Carmignani (1988) mostraram aumento na pressão arterial e no inotropismo cardíaco com alta dose do metal, e novamente a frequência cardíaca não foi modificada. Entretanto, estes mesmos autores (Boscolo & Carmignani, 1988), demonstraram uma hiperatividade simpática central, redução na sensibilidade do baroreflexo e hipotonia vagal em ratos tratados cronicamente com chumbo. Embora tenham sido mostradas estas alterações, estes trabalhos foram obtidos em tratamentos crônicos.

Acredita-se que a toxicidade do chumbo no sistema cardiovascular seja multifatorial, principalmente por: reduzir competitivamente a absorção de minerais; alterar a homeostasia do cálcio; modificar fatores humorais; alterar a atividade da NKA; alterar o sistema renina-angiotensina, aumentando a atividade da ECA; deprimir as reservas de antioxidantes do organismo e/ou aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em aumento do estresse oxidativo; afetar atividade de enzimas (Ercal *et al.*, 2001).

Bernal e colaboradores (1997) demonstraram claramente a propriedade do chumbo em atuar como bloqueador de canal de cálcio do tipo L. Estes autores mensuraram a corrente de cálcio na exposição ao metal (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) e observaram redução progressiva da corrente correspondente ao aumento da concentração de chumbo na solução. Após a retirada do chumbo a corrente não voltou a seus valores basais, ou seja, mesmo após a retirada do metal os efeitos no canal de cálcio foram irreversíveis. Entretanto, Valencia e colaboradores (2001) avaliaram a contratilidade de anéis de aorta e demonstraram que este metal necessita entrar nas células pelos canais de cálcio do tipo L e exerce efeitos contráteis, diretamente, sobre no músculo liso. Estes autores especulam sobre a idéia que o chumbo possa substituir o cálcio e mimetizar os efeitos deste íon, visto que a atividade da proteína quinase C e da calmodulina foram estimuladas na presença do chumbo. Portanto, talvez este seja

um possível mecanismo envolvido na gênese da hipertensão encontrada em nosso estudo se aplicado ao músculo cardíaco.

Cumprir notar que o estudo agudo permite conhecer os mecanismos que disparam a hipertensão. Como as alterações não são totalmente similares às aquelas observadas com os estudos crônicos, vão permitir melhor compreensão da história natural da hipertensão chumbo-induzida e, conseqüentemente, do seu tratamento.

A exposição por 2 horas ao chumbo não alterou a pressão arterial diastólica, isso possivelmente se deve ao aumento da atividade da NKA vascular. Como também observamos o aumento da atividade desta enzima no músculo cardíaco, que resulta em hiperpolarização dos miócitos (Gupta *et al.*, 1994), podemos sugerir que tal evento ocorre nos vasos levando a hiperpolarização da célula do músculo liso vascular, contrabalanceando o aumento da pressão diastólica. Corroborando este achado, um estudo realizado recentemente em nosso laboratório avaliando a atividade funcional da NKA em anéis de aorta mostrou aumento da atividade desta bomba na exposição ao chumbo por 7 dias – 9,8 µg/dL de chumbo no sangue (Fiorim *et al.*, 2010).

Em relação à reatividade pressórica à fenilefrina, o tratamento agudo com chumbo em uma concentração sanguínea de 37 µg/dL, foi capaz de alterar o valor basal da curva dose-resposta e a sensibilidade (pD<sub>2</sub>). A redução da reatividade pressórica observada neste estudo está de acordo com estudos realizados por Fiorim *et al.* (2010) que demonstraram redução da reatividade vascular em anéis de aorta de ratos tratados com chumbo por 7 dias. Em outro estudo, Heydari e colaboradores (2006), evidenciaram o aumento do R<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub> em anéis de aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 8 a 12 semanas ao avaliar a reatividade vascular. Silveira *et al.* (2010), também demonstraram aumento da reatividade vascular à fenilefrina em artéria caudal quando administrado agudamente 100 µM de acetato de chumbo. Porém, vale ressaltar que estes trabalhos avaliaram a reatividade vascular *in vitro*, excluindo todos os mecanismos compensatórios existentes *in vivo*.

Um aspecto a ser considerado é que o chumbo reduz a reatividade pressórica à fenilefrina. Esta redução, de acordo com os dados descritos acima, promove queda da pressão diastólica em conseqüência da redução da resistência periférica. A

redução da resistência periférica leva como consequência a redução da perfusão coronariana gerando um efeito inotrópico negativo, razão pela qual a pressão sistólica na reatividade a fenilefrina também diminui (Tucci *et al.*, 1990; Vassallo *et al.*, 1998).

Como já descrito acima, o aumento da pressão arterial causado pelo chumbo em ratos normotensos pode ser resultado de vários mecanismos. Objetivando investigar quais seriam os mecanismos inicialmente envolvidos no aumento da pressão arterial e no valor basal da curva dose-resposta, e na redução da reatividade pressórica induzidos pelo chumbo, foram realizadas algumas intervenções farmacológicas que serão discutidas a seguir.

#### **5.1.1 Efeito do hexametônio sobre a pressão arterial, frequência cardíaca basal e reatividade pressórica à fenilefrina, antes e após tratamento agudo com o chumbo.**

A habilidade do chumbo em estimular rapidamente a atividade do sistema nervoso simpático foi confirmada por Lai *et al.* (2002) usando injeções de chumbo intra-tecal em ratos, demonstrando que este efeito estimulatório do chumbo contribui para os efeitos cardiovasculares da exposição ao metal.

No presente estudo, os efeitos pressores da administração aguda (*i.v.*) de baixa concentração de chumbo em animais normotensos, não foram abolidos quando administrado bloqueador ganglionar, o hexametônio. Podemos supor que nesta concentração de chumbo os reflexos autonômicos parecem não afetar seus efeitos, tendo evidenciado o aumento da pressão após o bloqueio ganglionar.

Assim sendo, estes resultados obtidos com hexametônio, sugerem a existência de um efeito periférico como um mecanismo precoce para o desenvolvimento de hipertensão, principalmente quando são usadas doses menores do metal.

A reatividade pressórica à fenilefrina foi testada após administração de hexametônio, onde foi observada redução de sensibilidade ao agente vasoconstritor na pressão arterial sistólica e diastólica. Quando na presença concomitante de hexametônio e chumbo os efeitos foram similares aos da reatividade apenas com chumbo, na PAS e PAD, não havendo diferença na sensibilidade após a retirada da influência do SNA.

Na mesma curva, ao avaliar o valor basal da curva dose-resposta, observamos que há uma redução deste com o hexametônio e após a administração do chumbo (Hexametônio + Pb), há um aumento deste valor basal. Estes resultados também sugerem que os efeitos do chumbo não foram totalmente abolidos quando se retirou a participação do sistema nervoso autônomo.

Para comparar a ação bloqueadora ganglionar pelo hexametônio, avaliamos a variação da frequência cardíaca em função das doses crescentes de fenilefrina. O aumento na concentração de fenilefrina provoca redução reflexa da frequência cardíaca (a partir da dose  $10^{-4}$  mg). Essa redução é visível somente a partir de  $10^{-2}$  mg de FE após o bloqueio ganglionar. Este efeito nos permite afirmar a efetividade do bloqueio ganglionar pelo hexametônio.

Após avaliação da influência dos efeitos centrais do chumbo, o próximo objetivo desse estudo foi avaliar se a ação hipertensora desse metal relaciona-se com sua propriedade em estimular o sistema renina-angiotensina.

### **5.1.2 Envolvimento do sistema renina-angiotensina sobre as alterações hemodinâmicas arteriais induzidas pelo chumbo.**

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) desempenha papel vital na regulação de processos fisiológicos do sistema cardiovascular, tendo função fundamental na regulação da pressão sangüínea e na homeostase (Sealy & Laragh, 1995). Sendo assim, diversos são os trabalhos que evidenciaram o envolvimento deste sistema nas ações pressoras do chumbo (Sharifi *et al.*, 2004; Vaziri *et al.*, 2008; Vander, 1988).

A principal molécula efetora deste sistema, a angiotensina II, é extremamente importante na modulação minuto a minuto das mudanças que ocorrem no nosso organismo. As funções da angiotensina II permitem o aumento da atividade do miocárdio (via aumento do inotropismo e cronotropismo), que parece ocorrer via aumento da corrente de  $Ca^{2+}$  através de canais tipo-L (Baker *et al.*, 1992). Tem efeitos diretos sobre as células do miocárdio, incluindo a hipertrofia (Dorn *et al.*, 2005, Lips *et al.*, 2003). Além disso, estimula a síntese e liberação de aldosterona e aumento na reabsorção de sódio renal. Embora a angiotensina II afete as células musculares lisas vasculares, ela também tem múltiplos efeitos sobre as células

endoteliais (Skena *et al.*, 1999). Em adição, recentes trabalhos documentaram que a angiotensina II é um potente mediador do estresse oxidativo e de sinalização oxidante (Touyz *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003). A angiotensina II ativa NADPH oxidases em células de músculo liso vascular gerando EROs como superóxidos e peróxido de hidrogênio (Rajagopalan *et al.*, 1996).

Estudos reportam que o sistema renina-angiotensina encontra-se alterado em animais com hipertensão induzida pelo chumbo (Vaziri *et al.*, 2008; Vander, 1988). Entretanto, diferentes são os dados referentes aos efeitos desse metal sobre essa via. Por um lado, pesquisas demonstram que a exposição crônica ao chumbo aumenta a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese ou a liberação da mesma pelas células justaglomerulares (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani *et al.*, 1999), bem como, estimula a produção de angiotensina I (Campbell *et al.*, 1985). Adicionalmente, Campbell *et al.* (1985) documentaram marcante aumento na atividade plasmática da ECA. Todavia, foi descrita redução na atividade da renina plasmática e diminuição na concentração de angiotensina II nos animais tratados cronicamente com o chumbo que apresentavam hipertensão persistente (Victery *et al.*, 1982; Skoczynska *et al.*, 1995).

Aumento significativo da atividade da ECA plasmática foi encontrado em ratos expostos a 60 ppm de chumbo por 10 meses, em estudos realizados por Carmignani *et al.* (1999). Em estudo subsequente, ratos expostos a 100 ppm de chumbo por um período de 2 a 8 semanas (Sharifi *et al.* 2004) encontraram aumento constante da atividade da ECA no plasma, aorta, rim e coração. Além disso, os efeitos da exposição ao chumbo sobre o sistema renina-angiotensina em animais experimentais parecem variar consoante a dose e a duração da exposição ao chumbo (Vaziri *et al.*, 2008).

Diante dos fatos apresentados, a participação do sistema renina-angiotensina foi investigada, especialmente a ação da angiotensina II sobre a pressão arterial. Foram utilizados fármacos específicos para esta análise como o losartan, bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> e enalapril, inibidor da atividade da ECA. Estes fármacos agiram reduzindo a pressão arterial sistólica basal na presença do chumbo, sugerindo o papel da angiotensina II em conduzir os efeitos agudos da exposição. Em seguida, avaliamos a atividade da ECA plasmática, corroborando achados de Carmignani *et al.* (1999) e Sharifi *et al.* (2004), quando no presente trabalho foi evidenciado

aumento da atividade da ECA após 2 horas de exposição ao chumbo, com concentração sanguínea de 37 µg/dL do metal.

Corot *et al.* (1994) mostraram que quelatos de gadolínio (Gd-DTPA e-Gd-DTPA-BMA), outro metal com características hipertensoras, inibiram fortemente a atividade catalítica da ECA. O potencial de inibição por complexos de gadolínio parece estar relacionado com a troca do metal, gadolínio pelo zinco (fenômeno conhecido como transmetalção), e quando há adição de um excesso de zinco ao meio a atividade da ECA é restaurada. Diferentemente, um estudo realizado em nosso laboratório mostrou estimulação da ECA com gadolínio em baixas concentrações (3µM) (Angeli, 2009). Baseado nisto, sugerimos que a ação do chumbo ao estimular a atividade da ECA, possa ser devido à transmetalção com o zinco em um dos sítios de ligação na estrutura da enzima, levando maior estimulação da ECA plasmática.

Corroborando esta idéia vários trabalhos mostram as ações do chumbo em exposições crônicas sobre o aumento da atividade da ECA (Campbell *et al.*, 1985; Carmignani *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 2004).

Nosso trabalho demonstrou que a exposição aguda ao chumbo em baixa concentração já causa aumento da atividade da ECA, mostrando que as ações do metal já se iniciam com pouco tempo de exposição. Com este resultado, um possível mecanismo envolvido no aumento da pressão arterial basal observado, se deva pela ativação do sistema renina-angiotensina especificamente pelo aumento da atividade enzimática da ECA, aumentando a disponibilidade de angiotensina II.

A expressão de receptores cardíacos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> também foi mensurada para avaliar se os efeitos do chumbo poderiam resultar de alterações nestes receptores. Quando ativados pela angiotensina II os receptores AT<sub>1</sub>, além da vasoconstrição, promovem a liberação de aldosterona, endotelina-1 e vasopressina e ainda são capazes de produzir aumento de radicais livres, crescimento e migração celular, produção de proteínas da matriz extracelular e inflamação, além de promover o tônus simpático e efeito inotrópico positivo (Weir & Dzau *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000; Touyz & Berry, 2002). Sabe-se que o aumento agudo dos níveis de angiotensina II leva ao aumento dos receptores AT<sub>1</sub>, porém exposição crônica a angiotensina II diminui a quantidade destes receptores (Griendling *et al.*, 1987).



Mesmo sabendo que a maior parte dos efeitos da angiotensina II ocorre via receptor  $AT_1$ , os receptores  $AT_2$  causam mudanças anti-proliferativa e pró-apoptótica em células do músculo liso vascular, principalmente por antagonizar receptores de  $AT_1$  (Griendling *et al.*, 1996). A ação reduzida em receptores  $AT_2$  pela angiotensina II, provavelmente deva-se a redução de sua expressão após o nascimento (Shanmugam *et al.*, 1996), porém sua expressão pode ser aumentada na vida adulta sobre condições patológicas. Estudos de autópsias em corações com insuficiência cardíaca crônica mostram que 50% dos receptores de angiotensina são  $AT_2$  e que receptores de  $AT_1$  encontram-se reduzidos (Tsutsumi *et al.*, 1998).

Todavia, nossos resultados mostram que a expressão destes receptores não foi alterada pela exposição ao chumbo. Sendo assim, as alterações observadas neste trabalho, provavelmente não foram mediadas por alterações nos receptores. Este resultado também pode ser explicado pelo curto período de exposição ao chumbo (2 horas) ainda não ter sido suficiente para causar alterações na expressão destes receptores.

Os resultados de reatividade pressórica à fenilefrina demonstram que o bloqueio do SRA com losartan/enalapril não restaurou a hiporreatividade induzida pelo chumbo, sugerindo que este sistema não participa da hiporreatividade ao metal. A diminuição da sensibilidade a fenilefrina na pressão arterial sistólica e diastólica não foi diferente na presença do Losartan + Pb e/ou Enalapril + Pb daquela observada apenas na presença dos fármacos, onde vemos efeito do Losartan/Enalapril e não do chumbo. No entanto, em se tratando do valor basal da curva dose-resposta, o losartan e o enalapril foram capazes de abolir o efeito pressor do chumbo na PAS, sugerindo que o aumento deste valor basal da curva, antes observado é dependente do sistema renina-angiotensina.

Contraopondo estes resultados, estudo prévio em nosso laboratório, ao avaliar a reatividade vascular em artéria caudal de animais expostos ao chumbo (100  $\mu$ M), mostrou aumento da reatividade vascular, porém o losartan e o enalapril foram capazes de bloquear os efeitos do chumbo sobre a reatividade (Silveira, 2007).

Uma explicação para a redução acentuada da reatividade pressórica à fenilefrina e da pressão basal após administração de Losartan/Enalapril seria redução do efeito pressor da angiotensina II. Outro mecanismo para esta redução seria uma possível

estimulação de receptores AT<sub>2</sub> pela angiotensina II, já que os receptores AT<sub>1</sub> estão bloqueados pelo losartan (Vander *et al.*, 1988).

Trabalhos demonstram que o bloqueio de receptores AT<sub>1</sub>, favorece a ligação da angiotensina II nos receptores AT<sub>2</sub> (Masaki *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 2001). Isto antagoniza os efeitos inotrópicos positivos e vasoconstritores da estimulação de receptores AT<sub>1</sub>, o que justificaria a redução da reatividade pressórica à fenilefrina da pressão arterial sistólica e diastólica observada no presente estudo, como também a redução da pressão arterial sistólica basal.

Acredita-se que a angiotensina-(1-7), pode também mediar alguns efeitos relacionados a inibidores da ECA, sendo demonstrado que o aumento dos níveis de angiotensina (1-7) em animais e cultura de células se deve a esta inibição (Campbell *et al.*, 1994, Kohara *et al.*, 1991, Yamada *et al.*, 1998). Trabalhos sugerem que a angiotensina (1-7) inibe a atividade da ECA, antagoniza receptores AT<sub>1</sub>, aumenta efeitos induzidos pela bradicinina, estimula a produção de prostanóides e estimula o óxido nítrico através de receptores de angiotensina (1-7), receptores MAS (Paula *et al.*, 1995; Muthalif *et al.*, 1998; Ferreira & Santos, 2005). Assim, a angiotensina (1-7) realiza efeitos opostos aos da angiotensina II, pois promove vasodilatação, melhora a função endotelial e tem benefício a nível cardíaco.

De tal modo, a inibição da ECA, levando ao acúmulo de angiotensina I, poderia resultar em formação de angiotensina (1-7), via ECA-2, o que também justifica a redução da reatividade pressórica à fenilefrina observada nesse estudo, e igualmente a redução da pressão arterial sistólica basal.

Sabendo que angiotensina II e o chumbo podem alterar a atividade da bomba de sódio (Karai *et al.*, 1982; Dostanic-Larson *et al.*, 2006) e diante dos resultados acima apresentados, fomos investigar a participação desta bomba na exposição aguda ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos.

### **5.1.3 Efeito da canrenona sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basais antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.**

Diversos trabalhos avaliaram a atividade da NKA em animais expostos ao chumbo, porém as ações deste metal sobre a atividade desta enzima não são consoantes por todos os autores (Weiler *et al.*, 1990; Karai *et al.*, 1982).

Weiler *et al.* (1990) demonstraram inibição do funcionamento desta bomba em amostras de córtex cerebral de ratos tratados com chumbo. Em oposição, Karai *et al.* (1982), relataram uma relação positiva entre a concentração de chumbo sanguíneo e a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de eritrócitos de trabalhadores expostos.

Diante disso, objetivando avaliar se o efeito hipertensor causado pelo chumbo administrado agudamente e em baixa concentração é dependente de alterações da bomba de sódio, foi utilizada canrenona, um metabólito da espironolactona, inibidor competitivo da aldosterona, que compete com ouabaína pela ligação a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no sítio de ligação para os digitálicos e, por si só inibe a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Pamnani MB *et al.*, 1990; Finotti & Palatini, 1981; Balzan *et al.*, 2003).

Entretanto, sua ação sobre a bomba de sódio é dependente da concentração utilizada. Assim, baixas concentrações de canrenona são capazes de inibir a bomba de sódio (Finotti & Palatini, 1981) ao contrário de altas concentrações, que a estimula (Garay *et al.*, 1985). Portanto, baseado em estudos anteriores do nosso grupo (Vassallo *et al.*, 1998; Siman *et al.*, 2010), o presente estudo utilizou baixas concentrações de canrenona, conhecidas por não alterar a contratilidade miocárdica, o tônus vascular e a pressão arterial.

Nossos resultados demonstram que houve bloqueio dos efeitos do chumbo pela canrenona sobre a pressão arterial sistólica basal, indicando a importância da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase nas ações do chumbo sobre a pressão arterial. Em acordo com Karai *et al.* (1982) nossos achados também demonstram incremento da atividade ATPásica da bomba de sódio no coração de ratos expostos ao chumbo por 2 horas.

Estudos experimentais evidenciam que a angiotensina II estimula a bomba de sódio em eritrócitos de trabalhadores expostos ao chumbo, e este aumento pode ser atribuído pela fosforilação da NKA pela ativação da PKC (Yingst *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Como mencionado anteriormente, o sistema renina-angiotensina está ativado na exposição ao chumbo. Possivelmente as alterações encontradas neste estudo podem estar relacionadas com as ações da angiotensina II em promover aumento sustentado na atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Brock *et al.*, 1982; Muscella *et al.*, 1997; Zhang e Mayeux, 2001).

Gelband e colaboradores (1975) demonstraram que a hiperpolarização (pela acetilcolina) foi capaz de resultar em efeito inotrópico positivo e sugeriram que este

efeito era devido ao melhor sincronismo da contração dos cardiomiócitos. Assim, o aumento da atividade da NKA resulta em hiperpolarização, que por sua vez, aumenta a velocidade de condução e melhora sua uniformidade temporal, o que favorece o sincronismo da contração dos cardiomiócitos e possibilita aumento do pico de força desenvolvida e da pressão arterial, como observado em nosso estudo.

Ainda com a finalidade de investigar a participação da NKA sobre o aumento de pressão observada neste modelo, tendo em vista o aumento da sua atividade, avaliamos a expressão protéica da isoforma  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no músculo cardíaco, uma vez que esta isoforma está amplamente distribuída no tecido cardíaco de vários animais estudados inclusive homem e rato (Sweadner *et al.*, 1994).

Estudos prévios com camundongos modificados geneticamente para não expressarem a isoforma  $\alpha_1$ , apresentaram diminuição da contratilidade cardíaca (Dostanic-Larson *et al.*, 2004). Contudo, não observamos nenhuma alteração da expressão da isoforma  $\alpha_1$ . Estes dados sugerem que a expressão da isoforma  $\alpha_1$  da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pode ser tempo dependente, tendo em vista que duas horas de exposição não foram suficiente para alterar sua expressão.

Como anteriormente citado, o estresse oxidativo pode ser ativado de várias formas, sendo a angiotensina II e o chumbo as vias de aumento da liberação de EROs preconizadas por este trabalho (Vaziri *et al.*, 2008; Vaziri *et al.*, 1999; Rajagopalan S *et al.*, 1996). Assim, investigamos a participação do chumbo sobre o aumento da produção de radicais livres.

#### **5.1.4 Efeito do tempol sobre a pressão arterial, frequência cardíaca basal e reatividade pressórica à fenilefrina, antes e após tratamento agudo com o acetato de chumbo.**

O estresse oxidativo desempenha um papel crítico na patogênese de muitas doenças aguda e crônica, como as doenças cardiovasculares incluindo aterosclerose, insuficiência cardíaca, e hipertensão arterial (Cai & Harrison 2000; Lyle & Griending, 2006).

Vários estudos verificaram o envolvimento de radicais livres nos efeitos pressores induzidos pelo chumbo. Neste trabalho o uso do Tempol, um mimético da superóxido dismutase (SOD), substância conhecida por “varrer” ânion superóxido

(Mitchell *et al.*, 1990; Ledenev *et al.*, 1998), foi usada para avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio nos efeitos pressores produzidos pelo chumbo. E de fato, o tempol foi capaz de prevenir os efeitos do chumbo sobre a pressão arterial sistólica basal, indicando que os radicais livres possuem um papel significante nas ações induzidas pelo metal.

Corroborando nossos resultados Vaziri *et al.* (2003) demonstraram a participação do estresse oxidativo na patogênese da hipertensão de ratos expostos ao chumbo, em experimentos que mostraram normalização da pressão arterial após infusão do tempol.

Quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), normalmente são produzidas no curso do metabolismo do oxigênio e são contidas pelo sistema de defesa antioxidante. No entanto, o resultado de uma variedade de condições fisiopatológicas resulta em elevar a produção de EROs e/ou prejudicar a capacidade antioxidante, culminam no estresse oxidativo (Kukreja & Hess, 1992; Lee & Wei, 2007).

Assim sendo, as ações do chumbo estão associadas ao estresse oxidativo, *in vivo*, por promover a geração de espécies reativas de oxigênio com subseqüente dano oxidativo em vários órgãos e sistemas e por alterar as defesas antioxidantes celulares (Vaziri *et al.*, 2008).

O chumbo por ser um cátion divalente e possuir forte afinidade pelo radical sulfidril (-SH), pode inibir enzimas antioxidante ao se ligar a radicais -SH destas, como a catalase, SOD e glutathiona peroxidase (GSH) (Lynes *et al.*, 2007). Por exemplo, o metabolismo da glutathiona é alterado pelo chumbo, que entre outras funções, é responsável pela neutralização de radicais livres. Patrick (2006) mostrou redução na concentração sanguínea de glutathiona em animais experimentais e humanos expostos ao chumbo. Isto foi comprovado por Ding *et al.* (1998) quando mostraram redução da pressão arterial induzida pelo chumbo após administração oral de um antioxidante o DMSA (ácido dimercaptosuccínico) por 2 semanas.

Kasperczyk *et al.* (2009), reportaram aumento na atividade sérica de enzima antioxidante, a glutathiona peroxidase, e também da SOD em indivíduos normotensos expostos ao chumbo, sugerindo que mecanismos antioxidantes podem ser ativados

em ratos expostos ao chumbo para proteger as células contra o aumento das espécies reativas de oxigênio. Kasperczyk *et al.* (2004) demonstraram que baixas concentrações de chumbo (25-40 µg/dL) aumentam atividade da glutathione peroxidase prevenindo peroxidação lipídica, enquanto concentrações maiores (acima de 40 µg/dL) induziram aumento da concentração de malondialdeído (MDA) em eritrócitos, como resultado da redução da atividade da GSH.

Cumprido ressaltar que o estresse oxidativo pode limitar a biodisponibilidade de NO por vários mecanismos, incluindo rápida inativação ou seqüestro de NO por EROs, redução do co-fator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) da NOS, e desacoplamento da eNOS (Forstermann *et al.*, 2006). Tal efeito poderia contribuir para o aumento da pressão arterial por nós observado.

Estudos realizados por Vaziri *et al.* (1999), na tentativa de continuar explorar o mecanismo no qual o chumbo provoca a redução da disponibilidade de NO, examinaram a expressão de isoformas da NOS, onde encontraram uma associação entre a redução da biodisponibilidade de NO com aumento acentuado na NOS endotelial (eNOS) e abundância da NOS induzida (iNOS) nos rins e tecidos cardiovasculares em animais tratados. Corroborando estes achados, Dursun *et al.* (2005) encontraram redução de NO, através da excreção urinária de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>, em ratos tratados diariamente com acetato de chumbo (8 mg/kg *i.p.*) por 2 semanas.

A redução da biodisponibilidade de NO contribui para o desenvolvimento de hipertensão por vários mecanismos, incluindo: diminuição da vasodilatação mediada pelo NO; redução da inibição central do efluxo simpático mediada pelo NO; atenuação da diurese mediada pelo NO culminando com a expansão do volume extracelular; e o remodelamento vascular, que normalmente é inibida pelo NO e facilitada por EROs (Vaziri & Gonick, 2008).

Outro importante achado do presente estudo foi à avaliação da liberação de malondialdeído plasmática através da peroxidação lipídica pelas espécies reativas de oxigênio nos ratos expostos ao chumbo. Esta avaliação foi realizada por meio de espectrofotometria, onde encontramos aumento do MDA plasmático indicando aumento do estresse oxidativo pela exposição ao chumbo. Corroborando nossos achados, Vaziri *et al.* (1997) encontraram aumento de malondialdeído no plasma, em animais com hipertensão induzida pelo chumbo, apontando manutenção da

hipertensão. Trabalhos em humanos suportam essa idéia. Kasperczyk *et al.* (2009) mostraram que trabalhadores expostos por mais de 20 anos ao chumbo, apresentando uma concentração sanguínea de chumbo de 43 µg/dL, apresentaram concentração plasmática de MDA elevada em relação a trabalhadores não exposto ao metal, evidenciando o aumento do estresse oxidativo.

Corroborando estes trabalhos crônicos, nossos resultados sugerem que o tratamento agudo e com baixa concentração de chumbo, já é capaz de aumentar o estresse oxidativo promovendo o aumento da pressão arterial sistólica basal, como foi observada neste estudo, sendo comprovada pelo aumento de MDA plasmático.

Avaliando a reatividade pressórica à fenilefrina na presença do tempol, observamos que houve uma redução da sensibilidade, e esta redução se manteve na presença do chumbo (Tempol + Pb), porém esta redução foi de igual magnitude à ação direta do chumbo sobre a reatividade pressórica. Este achado sugere então que o estresse oxidativo não está influenciando a redução da sensibilidade provocada pelo metal. Podemos explicar o aumento da resposta máxima na PAD como efeito do tempo. Contrapondo-se a sensibilidade, o tempol foi capaz de abolir o efeito pressor do chumbo no valor basal da curva dose-resposta, assim como foi observado na pressão arterial sistólica basal. Estes dados mostram o envolvimento do estresse oxidativo nas ações do chumbo com consequente efeito pressor.

**CONCLUSÕES**



## 6. CONCLUSÕES

O principal achado deste estudo é que a exposição aguda a baixa concentração de chumbo (37 µg/dL), inferiores ao que se preconiza como concentração segura para pessoas expostas, foi capaz de promover aumento da pressão arterial sistólica basal, redução da reatividade pressórica à fenilefrina *in vivo*, aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina e da NKA, aumento da peroxidação lipídica (MDA).

Como evidenciado nos dados funcionais e comprovado pelas análises bioquímicas, há participação do sistema renina-angiotensina, da bomba de sódio e do estresse oxidativo no efeito pressor promovido pelo chumbo sobre a pressão arterial basal.

Embora os nossos resultados não consigam explicar a redução da sensibilidade causada pelo chumbo, às intervenções farmacológicas permitiram entender o aumento dos valores basais de pressão das curvas dose-resposta a fenilefrina.

As análises bioquímicas revelaram que a exposição aguda ao chumbo foi capaz de aumentar a atividade da ECA plasmática e a atividade da NKA cardíaca. Porém a expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, e da subunidade α<sub>1</sub> da NKA não foi diferente entre os grupos neste modelo de exposição ao metal. A análise bioquímica da peroxidação lipídica feita através da medida de malondialdeído (MDA) estava aumentada no grupo tratado.

Diante do exposto, este estudo reveste-se de relevância, pois, até o momento não se havia estudado, *in vivo*, os efeitos tóxicos da exposição aguda a baixa concentração de chumbo nos parâmetros hemodinâmicos arteriais de ratos, mostrando quais mecanismos estão precocemente ativados na gênese da hipertensão causada pela exposição a este metal. O presente estudo mostrou que neste modelo experimental, o aumento de pressão arterial sistólica basal se deve ao envolvimento do SRA, da NKA e do estresse oxidativo.

Os resultados aqui apresentados fornecem orientações para a revisão das concentrações consideradas seguras e que causam toxicidade por este metal, uma vez que já se observam efeitos no sistema cardiovascular com baixas doses e pouco tempo de exposição ao chumbo.

## ***REFERÊNCIAS***

## 7 REFERÊNCIAS

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Case studies in environmental medicine – lead toxicity*. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta; 1992.

\_\_\_\_\_. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for lead*. US Department of Health and human services, Public Health Service, Atlanta, 1993.

[DNPM] Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2001. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/sm2001.html>>. Acesso em 14/mai/2010.

\_\_\_\_\_. Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2007. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/sm2010.html>>. Acesso em: 14/ mai/ 2010.

Ahamed M, Fareed M, Kumar A, Siddiqui WA, Siddiqui MK. Oxidative stress and neurological disorders in relation to blood lead levels in children. *Redox Rep* 2008; 13(3): 117-22.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn F. Localization and function of angiotensina AT<sub>1</sub> receptors. *American Journal of Hypertension* 2000; 13: 31S-38S.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-531.

Aperia A, Ibarra F, Svensson LB, Klee C, Greengard P. Calcineurin mediates  $\alpha$ -adrenergic stimulation of Na-K-ATPase activity in renal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7394–7397.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue reninangiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79: 76-102.

Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 227-41.

- Balzan S, Nicolini G, Bellitto L, Ghione S, Biver P, Montali U. Effect of canrenone on the digitalis site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in human placental membranes and in erythrocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42(1): 32-36.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313.
- Béguin P, Wang X, Firsov D, Puoti A, Claeys D, Horisberger JD, Geering K. The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na, K-ATPase and modulates its transport function. *The EMBO Journal* 1997; 16: 4250-4260.
- Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 2009; 27(1): 142-154.
- Blanco G, Mercer RW. Isoenzymes of the Na, K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology* 1998; 275: F633-F650.
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiological Reviews* 1999; 79: 763-854.
- Bonvalet JP. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl* 1998; 65: S49–S56.
- Boscolo P, Carmignani M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environmental Health Perspective* 1988; 78: 101–106.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 218-254.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. *Norma Regulamentadora nº 7*. In: Pimenta, A.L. & Capistrano, F. D., org. Saúde do trabalhador. Hucitec: São Paulo; 1988.
- Brock TA, Lewis LJ, Smith JB. Angiotensin increases Na<sup>+</sup> entry and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1982; 79: 1438-1442.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840–844.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas Res* 2005; 68: 26-36.

Campbell BC, Meredith PA, Scott JJ. Lead exposure and changes in the renin–angiotensin–aldosterone system in man. *Toxicology Letters* 1985; 25: 25–32.

Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 1994; 23: 439–449.

Capponi AM. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Blood Pres Suppl* 1996; 2: 41-46.

Carey RM, Jin XH, Seragy HM. Role of the angiotensin AT<sub>2</sub> receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am J Hypertens* 2001; 14: 985-1025.

Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial HTN following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology* 1999; 44: 105–110.

Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 2000; 68: 401-415.

Carson P, Giles T, Higginbotham M, Hollenberg N, Kannel W, Siragy HM. Angiotensin Receptor Blockers: Evidence for Preserving Target Organs. *Clin. Cardiol* 2001; 24: 183–190.

Cheng Y, Schwartz J, Vokonas PS, Weiss ST, Aro A, Hu H. Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (The Normative Aging Study). *Am J Cardiol* 1998; 821: 594–599.

Conterato GMM. Efeitos do chumbo sobre a atividade da Tio redoxina Redutase Citosólica (TrxR1) e parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratos. 2007. 70 f.

[Dissertação] – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.

Cordeiro R, Lima Filho EC, Salgado PET. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue I: Neuropatia periférica. *Revista de Saúde Pública* 1996; 30: 248-55.

Corot C, Hentsch AM, Curtelin L. Interaction of gadolinium complexes with metal-dependent biological systems. *Invest Radiol* 1994; 29: S164-S167.

Costerousse O, Jaspard E, Allegrini J, Wei L, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I converting enzyme (Kininase II). (1992). Molecular organization and regulation of its expression in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 (supl 9): S10-S15.

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *American Journal of Hypertension* 2005; 18: 81-87.

Danser AH. Local rennin-angiotensin systems. *Molecular and cellular Biochemistry* 1996; 157: 211-216.

David-Dufilho M, Devynck MA, Beugras JP, Meyer P. Quantitative changes in cardiac Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -adenosine triphosphatase of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6(2): 273-280.

de Capitani EM, Paoliello MMB, Costa de Almeida GR. Fontes de exposição humana de chumbo no Brasil. *Medicina* 2009; 42(3): 301-308.

Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead Promotes Hydroxyl Radical Generation and Lipid Peroxidation in Cultured Aortic Endothelial Cells. *American Journal of Hypertension* 2000; 13: 552–555.

Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced HTN. II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res* 1998; 76: 107–113.

Dorn GW 2nd. Physiologic growth and pathologic genes in cardiac development and cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15(5): 185-199.

Dostanic-Larson I, Lorenz JN, Van Huysse JW, Neumann JC, Moseley AE, Lingrel JB. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290(3): R524-528.

Dostanic-Larson I, Schultz JEJ, Lorenz JN, Lingrel J. The  $\alpha$ 1 Isoform of Na,K-ATPase Regulates cardiac contractility and functionally interacts and colocalizes with the Na/Ca exchanger in heart. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 54053-54061.

Droge W. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

Dursun N, Arifoglu C, Suer C, Keskinol L. Blood pressure relationship to nitric oxide, lipid peroxidation, renal function, and renal blood flow in rats exposed to low lead levels. *Biol Trace Elem Res* 2005; 104: 141–150.

Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensina production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. *Journal of hypertension* 1989; 7: 933-936.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 529-539.

Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res* 2005; 98: 33-39.

Feraille E, Carranza ML, Gonin S, Béguin P, Pedemonte C, Rousselot M, Caverzasio J, Geering K, Martin PY, Favre H. Insulin-induced stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit at Tyr-10. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 2847–2859.

- Feraille E, Carranza ML, Buffin-Meyer B, Rousselot M, Doucet A, Favre H. Protein kinase C-dependent stimulation of Na, K-ATPase in rat proximal convoluted tubule. *American Journal of Physiology* 1995; 268(37): C1277-C1283.
- Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(4): 499-507.
- Finotti P, Palatini P. Canrenone as a partial agonist at the digitalis receptor site of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 217(3): 784-790.
- Fioresi M. Efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)] – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2008.
- Fioresi M, Furieri LB, Simões MR, Ribeiro Junior RF, Frizzera EM, Fernandes AA, Stefanon I, Vassallo DV. Acute lead exposition increases myocardial contractility in rats. *Biological Research* 42 (supplement A) 2009; R-104.
- Fiorim J, Ribeiro Junior RF, Silveira EA, Padilha AS, Vescovi MV, Jesus HC, Vassallo DV. Sete dias de exposição ao chumbo aumenta a PAS e diminui a reatividade vascular em aorta de ratos. *Anais: IV Congresso de Ciências da Saúde* 2010; 4: 189 (resumo).
- Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113: 1708–1714.
- Fryckstedt J, Svensson LB, Linden M, Aperia A. The effect of dopamine on adenylate cyclase and Na-K-ATPase activity in the developing rat renal cortical and medullary tubule cells. *Pediatr Res* 1993; 34: 308–311.
- Fuchs S, Xiao HD, Hubert C, Michaud A, Campbell DJ, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Bernstein KE. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension* 2008; 51(2): 267-274.



Fuchs S, Xiao HD, Hubert C, Michaud A, Campbell DJ, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Bernstein KE. Angiotensin-Converting Enzyme C-Terminal Catalytic Domain Is the Main Site of Angiotensin I Cleavage In Vivo. *Hypertension* 2010; 267-274.

Fujiwara Y, Watanabe S, Sakamoto M, Kaji T. Repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells after simultaneous exposure to lead and zinc. *Toxicol Lett* 1998; 94: 181–188.

Garay R. Hypotensive action of canrenone in a model of hypertension where ouabain-like factors are present. *J Hypertens Suppl* 1985; 3(3): S73-75.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 302: 148-158.

Garvin JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 1146–1152.

Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carrol JA, Hotchkiss RS, Belaaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 2002; 109: 1311-1319.

Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F241–F250.

Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 289-299.

Gil-Longo J, Gonzalez-Vazquez C. Characterization of four different effects elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat aorta. *Vasc Pharmacol* 2005; 43: 128–138.

Goldstein GW. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology* 1993; 14: 97–101.

Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison, DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 2006; 48: 473-481.

Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND. Lead-induced HTN: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 1997; 30: 1487-1492.

Goyer RA. Toxic effects of metals – Lead, p. 639-646. In Mary O. Amdur, J.D.; Curtis D.K. *Casareh and Doull's toxicology – the basic science of poisons*. Editora Pergamon Press, USA, 1991.

Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 14555–14562.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 281–306.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494–501.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 1994; 74: 1141-1148.

Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol Sci* 2008; 103: 207-14.

Gupta S, Mc Arthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal of Physiology* 1994; 266 (35): H2146-2151.

Haddy FJ. Potassium effects on contraction in arterial smooth muscle mediated by Na, K-ATPase. *Fed. Proc* 1983; 42: 239-245.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyr M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37 [part 2]: 529-534.

Hanninen H, Aitio A, Kovala T, Luukkonen R, Matikainen E, Mannelin T. Occupational exposure to lead and neuropsychological dysfunction. *Occupational and Environmental Medicine* 1998; 55: 202-209.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now: *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-797.

Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, et al. Effects of short term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett* 2006; 6: 180-189.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 1998; 32(3): 387-92.

Horisberger JD. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology* 2004; 19: 377–387.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; 33(2):613-21.

Horiuchi A, Takeyase K, Mouradian MM, Jose PA, Felder RA. D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity through protein kinase A. *Molecular Pharmacology* 1993; 43: 281-285.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Inorganic and organic lead compounds. Volume-87 (Genova: World Health Organization Press). 2006.

Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Kaneshiro Y, Itoh H. Involvement of (pro)renin receptor in the glomerular filtration barrier. *J Mol Med* 2008; 86: 629-635.

Ikeda U, Hyman R, Smith TW, Medford RM. Aldosterone-mediated regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiomyocytes. *J. Biol. Chem* 1991; 266: 12058-12066.

Irigoyen MC, Lacchini S, Angelis K, Michelini LC. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos? *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 2003; 1: 20-45.

- Jacob LCB, Alvarenga KF, Morata TC. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Otorrinolaringol* 2002; 68 (4): 564-569.
- Karai I, Fukumoto K, Horiguchi S. An increase in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity of erythrocyte membranes in workers employed in a lead refining factory. *Br J Ind Med* 1982; 39: 290-294.
- Kasperczyk A, Kasperczyk S, Horak S, Ostalowska A, Grucka-Mamczar E, Romuk E, Olejek A, Birkner E. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228(3): 378-384.
- Kasperczyk S, Kasperczyk A, Ostalowska A, Dziwisz M, Birkner E. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biological Trace Element Research* 2004; 102(1-3): 61-72.
- Kasperczyk S, Kasperczyk J, Ostalowska A, Zalejska-Fiolka J, Wielkoszyński T, Swietochowska E, Birkner E. The role of the antioxidant enzymes in erythrocytes in the development of arterial hypertension among humans exposed to lead. *Biol Trace Elem Res* 2009; 130(2): 95-106.
- Khalil R, Menice CB, Wang CLA, Morgan KG. Phosphotyrosine- dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circ Res* 1995; 76: 1101-1108.
- Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced HTN: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens* 1993; 6: 723–729.
- Khan DA, Qayyum S, Saleem S, Khan FA. Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers. *Toxicol Ind Health* 2008; 24(9): 611-618.
- Koh KK, Oh PC, Wuon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research* 2009; 81: 649-659.
- Kohara K, Brosnihan KB, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Angiotensin-(1–7): a member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 1991; 17: 131–138.

Kosnett MJ, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL, Schwartz BS, Hu H, Woolf A. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 463-471.

Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection: *Cardiovasc. Res* 1992; 26: 641 – 655.

Ledenev AN, Konstantion AA, Popova E, Riuge EK. A simple assay of the superoxide generation rate with iron as an ESP-visible radical scavenger. *Biochem Int* 1998; 13: 391 – 396.

Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, Russo A. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochem* 1990; 29: 2802 – 2807.

Skoczyńska A. [Renin-angiotensin-aldosterone system in chronic poisoning of rats with lead and cadmium]. *Med Pr* 1995; 46(3): 239-46.

Kreusch MA. Avaliação com propostas de melhoria do processo industrial de reciclagem do chumbo e indicação de aplicabilidade para a escória gerada. [Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)] – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Matérias e Processos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Lai CC, Lin HH, Chen CW, Chen SH, Chiu TH. Excitatory action of lead on rat sympathetic preganglionic neurons in vitro and in vivo. *Life Sci* 2002; 71(9): 1035-1045.

Laski ME, Kurtzman NA. The renal adenosine triphosphatases-functional integration and clinical significance. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22: 410–422.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 2003; 285: R277-R297.

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview : Overview of the renin-angiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144: 2179-2183.

Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research* 1991; 28: 83-97.

Lee C-H, Wei Y-H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 2007; 232: 592-606.

Lee DI, Klein MG, Zhu W, Xiao RP, Gerzanich V, Xu KY. Activation of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase modulates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel function. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 774-781.

Lingrel JB. Na, K ATPase: isoform structure, function, and expression. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1992; 24: 263-270.

Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 2003; 24(10): 883-896.

Lustberg M, Silbergeld E. Blood lead levels and mortality. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2443-2449.

Lyle AN and Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 269-280.

Lynes M, Kang J, Perdrizet G. Heavy metal ions in normal physiology, toxic stress and cytoprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences. Stress Responses in Biology and Medicine* 2007; 1113: 159-172.

Machado AC, Padilha AS, Wiggers GA, Siman FDM, Stefanon I, Vassallo DV. Small doses of Mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environ toxicology and Pharmacol* 2007; 24: 92-97.

Maheswaran R, Gill JS, Beevers DG. Blood pressure and industrial lead exposure. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 645-653.

Marín J, Redondo J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacology & Therapeutics* 1999; 84: 249-271.

- Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor causes attenuated response to AT<sub>1</sub> receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 1998; 101: 527–535.
- Michellini LC. Regulação da pressão arterial: mecanismos neuro-humorais. In: Ayres MM. *Fisiologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p 473-488.
- Moller L, Kristensen TS. Blood lead as a cardiovascular risk factor. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1091-1100.
- Moreira FR, Moreira JC. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 2004; 9: 167-181.
- Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications. *Revista Panamericana del Salud Publica* 2004; 15: 119-129.
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 2: 274-278.
- Muscella A, Marsigliante S, Carluccio MA, Vinson GP, Storelli C. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J Endocrinol* 1997; 155: 587–593.
- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1–7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 388 –398.
- Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 472–482.
- Needleman HL, Riess JA, Tobin MJ, Biesecker GE, Greenhouse JB. Bone lead levels and delinquent behavior. *JAMA* 1996; 275(5): 363-369.

- Oliveira EM, Santos RAS, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 755-764.
- Pamnani MB, Whitehorn WV, Clough DL, Haddy FJ. Effects of canrenone on blood pressure in rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 1990; 3(3): 188-195.
- Paoliello MMB, Capitana EM. *Chumbo*. São Paulo; 2003. 353p. (Azevedo FA, Chasin AM, editores. *Metais: Gerenciamento da Toxicidade*).
- Paoliello MMB and Chasin AAM. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental* 2001; v.3. Salvador: CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS-CREA.
- Parmeggiani L. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*, 3<sup>a</sup> ed. Geneva: *International Labour Office* 1983; 2: 1200-1209.
- Patrick L. Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review* 2006; 11: 2-22.
- Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* 1995; 26: 1154 – 1159.
- Pirkle JL, Kaufmann RB, Brody DJ, Hickman T, Gunter EW, Paschal DC. Exposure of the US population to lead, 1991–94. *Environmental Health Perspective* 1998; 106: 745–750.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison D. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(8): 1916-1923.
- Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev* 1992; 66: 213-22.



Rodríguez-Iturbe B, Sindhu RK, Quiroz Y, Vaziri ND. Chronic exposure to low doses of lead results in renal infiltration of immune cells, NF-kappaB activation, and overexpression of tubulointerstitial angiotensin II. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(9-10): 1269-1274.

Roncal C, Um W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, et al. Lead, at low levels, accelerates arteriolopathy and tubulointerstitial injury in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: 1391- 1396.

Rose AM, Valdes RJ. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clinical Chemistry* 1994; 40 (9): 1674-1685.

Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ouabain-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology* 2002; 135 (3): 771-7781.

Sanín LH, González-Cossío T, Romieu I, Hernández-Avila M. Accumulation of lead in bone and its effects on health. *Salud Publica Mex* 1998; 40(4): 359-368.

Sarkis A, Lopez B, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13: 205–214.

Schena M, Mulatero P, Schiavone D, Mengozzi G, Tesio L, Chiandussi L, Veglio F. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes. *Am J Hypertens* 1999; 12(4 Pt 1): 388-97.

Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ Health Perspect* 1991; 91: 71–75.

Sealey JE, Laragh JH. Commentary: plasma renin methodology. *J Hypertens*. 1995; 13(3): 371.

Shanmugam S, Corvol P, Gasc JM. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension* 1996; 28: 91–97.

- Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced HTN. *Toxicol Lett* 2004; 153: 233–238.
- Silveira EA, Lizardo JH, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV. Acute lead-induced vasoconstriction in the vascular beds of isolated perfused rat tails is endothelium-dependent. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 492-499.
- Silveira EA. Efeito da administração aguda de 100 µM de acetato de chumbo na reatividade vascular a fenilefrina no leito vascular caudal de ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)] – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2007.
- Siman FD, Stefanon I, Vassallo DV, Padilha AS. A low concentration of ouabain (0.18 microg/kg) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the Na<sup>+</sup> pump and activating the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43(8): 767-776.
- Sindhu RK, Ehdai A, Farman F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Varizi ND. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1743: 86-92.
- Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957; 23(2): 394-401.
- Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. *Medicina* 2009; 42(3): 327-30.
- Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 902-911.
- Stragier B, Sarre S, Vanderheyden P, Vauquelin G, Fournié-Zaluski MC, Ebinger G, Michotte Y. Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *J Neurochem* 2004; 90(5): 1251-1257.
- Sturrock ED, Natesh R, van Rooyen JM, Acharya KR. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(21): 2677-2686.

- Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25: 1083-1089.
- Sweadner KJ, Rael E. The FXFD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 2000; 68(1): 41-56.
- Sweadner KJ. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 185-220.
- Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. *Exp Biol Med* 2007; 232: 27-37.
- Szocs K, Lassegue B, Soresc D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 21-27.
- Sysalová JK. Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GFAAS. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56: 321-329.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081.
- Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C541–C566.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45(2): 205-51.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 639–672.
- Touyz Rm, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35: 1001-1015.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology* 2004; 122: 339-352.

Tsalev DL & Zaprianov ZK. *Lead*, 1985 p. 137-150. In: Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. CRC Press, Flórida.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 1998; 83: 1035–1046.

Tucci PJF, Spadaro J, Cicogna AC, Bregagnollo EA. Coronary perfusion pressure as a determinant of ventricular performance. *Experientia* 1980; 36: 974-975.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. DBH VI. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2010; 17(1): 4.

Vaandrager AB, de Jonge HR. Signalling by cGMPdependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1996; 157: 23–30.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1-40.

Vander AJ. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 77-83.

Varagic J, Trask AJ, Jessup Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med* 2008; 86: 663-671.

Vasilets LA, Schmalzing G, Madefessel K, Haase W, Schwarz W. Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 1990; 118: 131–142.

Vasilets LA, Fotis H, Gartner EM. Regulatory phosphorylation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by protein kinases. Characterization of the phosphorylation site for PKC. *Ann NY Acad Sci* 1997; 834: 585–587.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220-9225.

Vassalle M. Contribution of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump to the membrane potential. *Experientia* 1987; 43: 1135-1140.

Vassallo DV, Lebach EC, Moreira CM, Wiggers GA, Stefanon I. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 789-795.

Vassallo PF, Stefanon I, Rossoni LV, França A, Vassallo DV. Small doses of canrenone block the effects of ouabain on the mechanical activity of the heart and vessels of the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32(5): 679-685.

Vassallo PF, Stefanon I, Rossoni LV, Tucci PJF, Vassallo DV. The left ventricular contractility of the rat heart is modulated by changes in flow and  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1353-1359.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick H. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension. *Kidney International* 1997; 52: 1042-1046.

Vaziri ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *The Indian Journal Medical Research*. 2008; 128: 426-435.

Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International* 1999; 56: 1492-1498.

Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. Superóxido dismutase, catalase, glutathione, peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney International* 2003; 63: 186-194.

Vaziri ND. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H454-H465.

Vaziri ND, Ding Y. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension* 2001; 37: 223-226.

- Victory W, Vander A J, Shulak JM, Schoeps P, Julius S. Lead, hypertension, and the rennin-angiotensin system in rats. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1982; 99(3): 354-362.
- Wang Y, Gao J, Mathias RT, Cohen IS, Sun X, Baldo GJ.  $\alpha$  -Adrenergic effects on Na-K pump current in guineapig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1998; 509: 117–128.
- Watts SW, Chai S, Webb RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology* 1995; 99: 55–65.
- Webb RC, Bohr DF. Mechanism of membrane stabilization by calcium in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1978; 235(5): C227-32.
- Webb RC, Bohr DF. Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1979; 16(2): 71-79.
- Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick HC. Effects of lead and a low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci* 1990; 79: 185-192.
- Weir MR, Dzau VJ. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management. *American Journal of Hypertension* 1999; 12: 205S–213S.
- World Health Organization (WHO). IPCS. Environmental Health criteria-165-Inorganic Lead. Geneva, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.
- Wu R, Millette E, Wu L, De Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19: 741-748.

- Xie Y, Chiba M, Shinohara A, Watanabe H, Inaba Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Ind Health* 1998; 36: 234-239.
- Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1998; 32: 496-502.
- Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1): 26-36.
- Yingst DR, Doci TM, Massey KJ, Rossi NF, Rucker E, Mattingly RR. Angiotensin II stimulates elution of Na/K-ATPase from a digoxin-affinity column by increasing the kinetic response to ligands that trigger the decay of E2-P. *American Journal Physiology Renal Physiol* 2008; 294: 990-1000.
- Yingst DR, Massey KJ, Rossi NF, Mohanty MJ, Mattingly RR. Angiotensin II directly stimulates activity and alters the phosphorylation of Na-K-ATPase in rat proximal tubule with a rapid time course. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F713-F721.
- Zhang C, Mayeux PR. NO/cGMP signaling modulates regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by angiotensin II in rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F474-479.

***ANEXO***



## ANEXO I

Artigo submetido:

### **Acute exposure to low lead concentration increases arterial pressure: Role of the renin-angiotensin system**

Maylla Ronacher Simões<sup>1</sup>, Rogério F. Ribeiro Júnior<sup>1</sup>, Marcos V. A. Vescovi<sup>2</sup>, Honório C. de Jesus<sup>2</sup>, Alessandra S. Padilla<sup>1</sup>, Ivanita Stefanon<sup>1</sup>, Dalton V. Vassallo<sup>1,4</sup>, Mercedes Salaices<sup>5</sup>, Mirian Fioresi,<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Physiological Sciences Post-Graduation Program, Federal University of Espírito Santo, Vitoria, ES, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Vitoria, ES, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Nursing, Federal University of Espírito Santo, Vitoria, ES, Brazil.

<sup>4</sup>Health Science Center of Vitória-EMESCAM, Vitória, ES, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain.

**Corresponding author:** Dr. Dalton Valentim Vassallo

Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências as Saúde, UFES,

Av. Marechal Campos, 1468

29040-095 Vitória, ES, Brasil. Fax: +55-27-3335-7330

E-mail: [daltonv2@terra.com.br](mailto:daltonv2@terra.com.br)

## **Abstract**

**Background:** Chronic lead exposure causes hypertension and cardiovascular disease. Our purpose was to evaluate the effects of acute exposure to a low concentration of lead on arterial pressure and elucidate the early mechanisms involved in the development of lead-induced hypertension.

**Methodology/Principal Findings:** Wistar rats were treated with lead acetate (i.v. bolus dose of 320  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), and systolic arterial pressure, diastolic arterial pressure and heart rate were measured during 120 min. An increase in arterial pressure was found, and potential roles of the renin-angiotensin system,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and the autonomic nervous system in this change in the increase of arterial pressure found were evaluated. In anesthetized rats, lead exposure: 1) produced blood lead levels of  $37 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{dL}$ , which is below the reference blood concentration; 2) increased systolic arterial pressure (Ct:  $109 \pm 3 \text{ mmHg}$  vs Pb:  $120 \pm 4 \text{ mmHg}$ ); 3) increased ACE activity (27% compared to Ct) and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity (125% compared to Ct); and 4) did not change the protein expression of the  $\alpha 1$ -subunit of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{AT}_1$  and  $\text{AT}_2$ . Pre-treatment with an  $\text{AT}_1$  receptor blocker (losartan, 10 mg/kg) or an ACE inhibitor (enalapril, 5 mg/kg) blocked the lead-induced increase of arterial pressure. However, a ganglionic blockade (hexamethonium, 20mg/kg) did not prevent lead's hypertensive effect.

**Conclusion:** Acute exposure to low concentration of lead below the reference blood concentration increases systolic arterial pressure by increasing angiotensin II levels due to ACE activation. These findings offer further evidence that lead, even at low concentrations and in acute exposure, can trigger early mechanisms of hypertension development and might be an environmental risk factor for cardiovascular disease.

**Keywords:** Lead Exposure; Arterial Pressure; Renin-angiotensin System;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

## **Introduction**

Lead is a common environmental contaminant that affects all the organs and systems of the body and causes numerous acute and chronic illnesses [1,2]. All humans have lead in their body as a result of exposure to exogenous sources [3]. This exposure occurs during the manufacture of ammunition, batteries, sheet lead, solder, ceramic glazes, caulking, bronze plumbing, military equipment, drinking water and some surgical equipment [3,4]. Experimental and epidemiological studies suggest a close relationship between lead exposure, hypertension and cardiovascular disease [5,6,7,8,9].

The effects of lead on human health depend on blood levels and on the duration of the exposure. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) considered the reference blood lead concentration level to be 60 µg/dL, and concentrations that exceed these values require removal from lead exposure [10,11]. Nevertheless, individuals with baseline blood lead levels of 46.8 µg/dL or 67 µg/dL have shown increases in arterial pressure [12,13].

*In vivo* and *in vitro* studies with animals have shown that chronic lead exposure causes hypertension and cardiovascular disease by altering the renin-angiotensin system due to elevated ACE activity [14-16], inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase [17], induction of oxidative stress, reduction of nitric oxide bioavailability [1,18-21] and depletion of antioxidant reserves [22]. Lead might also act as a calcium substitute in Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling pathways by interacting with calmodulin, protein kinase C (PKC) and calcium-dependent potassium channels [23,24] and stimulating vascular smooth muscle cell proliferation [25]. Certain peripheral and central nervous system mechanisms such as increased sympathetic nerve activity, reduced baroreflex sensitivity and reduced parasympathetic tone have also been implicated in chronic lead-induced hypertension [26,27,28].

The effect of chronic exposure to lead on arterial pressure was evaluated by several studies. Carmignani et al. [14,27], Sharifi et al. [15] and Roncal et al. [29] showed that arterial pressure was significantly increased by chronic exposure to lead. However, few reports have evaluated effects of acute exposure to this metal on arterial pressure. Our group found that acute administration of high lead concentration (100  $\mu$ M) reduces myocardial contractility [30] and affects the endothelium, releasing cyclooxygenase-derived vasoconstrictors and involving reactive oxygen species [31]. However, rats acutely exposed to low lead concentration showed an increase in left ventricular systolic pressure [32].

The current study aimed to explore the effects of acute low-concentration lead exposure on arterial pressure and to elucidate the mechanisms involved in the very early development of lead-induced hypertension in rats. We accordingly developed an experimental model of acute exposure to low-concentration lead acetate in rats that produces blood lead levels below the reference blood concentration [10,33]. We then analyzed the effects of this treatment on: 1) the renin-angiotensin system; 2) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity; and 3) the participation of the autonomic nervous system in the increased arterial pressure that occurs in response to lead exposure. Our findings provide the first evidence that acute exposure to low lead concentration causes an increase in arterial pressure that is due to increased renin-angiotensin system activity.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

The studies were performed on 64 male Wistar rats (280-330 g). All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology (Protocols numbers 003/2007). The rats were housed at constant room temperature, humidity, and light cycle (12:12-hr light-dark) with free access to water and were fed rat chow *ad libitum*.

The protocols were performed with anesthetized rats due to the duration of the experiment and the necessity of maintaining stable arterial pressure. To investigate the acute effects of lead on arterial pressure, a bolus dose of lead (320 µg/kg) was injected intravenously. Lead levels were measured in blood by dilution with a polymer (Triton X-100) and samples were measured in triplicate by atomic fluorescence spectrometry (AAS5 EA, Carl Zeiss, Germany) as previously described [34]. The detection limit of this equipment is 0.5 µg/dL.

### *Hemodynamic Measurements*

The rats were anesthetized with urethane (1.2 mg/kg IP), and the carotid artery and jugular vein were cannulated with a polyethylene catheter (PE-50/ *Clay-Adams*) and filled with heparin (50 U/ml) in saline. The cannulas were connected to pressure transducers (TSD 104A- Biopac) connected to a preamplifier and to an acquisition system (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA) for pressure measurements. The following parameters were analyzed: systolic (SAP) and diastolic (DAP) arterial pressure and heart rate (HR).

All animals (n =10) were followed up for 120 min and SAP, DAP and HR were recorded before (control condition – time 0) and at 30, 60, 90 and 120 min after lead administration. To ensure that the effects were not dependent on time, a time control experiment (n = 5) was performed under the same conditions with the administration of distilled water. After these protocols, the heart and plasma were removed and stored at -80°C until being used for biochemical measurements.

To assess the participation of the renin-angiotensin system in the blood pressure increase induced by lead exposure, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor (enalapril maleate, 5 mg/kg) and an AT1 receptor antagonist (losartan, 10 mg/kg) were used. To assess the possible influence of the autonomic nervous system on arterial pressure, we also performed a co-treatment with the ganglionic blocker hexamethonium (20 mg/kg). The animals were anesthetized with urethane (1.2 mg/kg IP), their carotid artery was cannulated to measure arterial parameters and their jugular vein was cannulated for drug infusion. After 20 min of arterial pressure stabilization, enalapril maleate (n = 5), losartan (n = 7) or hexamethonium (n = 9) was injected intravenously and after 30 min the following parameters were measured: SAP, DAP and HR. In the same animal, lead was injected intravenously and these data were measured after 1 h of exposure. During the measurement of arterial pressure, the value reached by the systolic blood pressure after 60 min of exposure was not different from that at 120 min. Given this, the influence of other drugs on arterial pressure were investigated only during 60 min of exposure to lead.

## Biochemical Measurements

### *Plasma ACE activity*

The effect of lead on plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity was determined as previously described [35], after 120 min of exposure. Briefly, triplicate plasma samples (3  $\mu$ L) were incubated with 40  $\mu$ L of assay buffer containing 5 mM Hip-His-Leu (Hippuryl-Histidine-Leucine, ACE substrate) (Sigma Chemical) in 0.4 M sodium borate buffer and 0.9 M NaCl pH 8.3 for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 190  $\mu$ L of 0.34 N NaOH. The product, His-Leu, was measured fluorometrically at 365 nm excitation and 495 nm emission with a fluoro-colorimeter (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) after the addition of 17  $\mu$ L of o-phthaldialdehyde (2%) in methanol. To correct for the intrinsic fluorescence of the plasma, blanks were included by adding Hip-His-Leu, NaOH and o-phthaldialdehyde. The activity calculations were based on Michaelis-Menten first-order kinetics. A calibration curve with ACE substrate was included in each plate (n = 19).

### *Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity*

To determine if lead exposure for 120 min was capable of affecting Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, the enzymatic material was extracted as previously described [36]. The heart (n = 10) was homogenized in a solution containing 20 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 7.0. The homogenized tissue was centrifuged at 8,800 rpm for 20 min and the precipitate was discarded. To the supernatant, the same volume of the solution was added and it was centrifuged at 10,000 rpm again for 1 hr. The precipitate was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.2 to a final volume of 400  $\mu$ L.

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was assayed by measuring Pi liberation from 3 mM ATP in the presence of 125 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). The enzyme was preincubated for 5 min at 37°C and the reaction was initiated by adding ATP (30 mM). Incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the measurements were made in the linear part of the reaction. The reaction was stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid. Controls containing enzyme preparation added after the addition of trichloroacetic acid were used to correct for non-enzymatic hydrolysis of the substrate. All samples were in triplicate. The specific activity was reported as nmol Pi released per min per mg of protein unless otherwise stated. The specific activity of the enzyme was determined in the presence and absence of 5 mM ouabain. Protein concentrations were measured using the Bradford method [37] with bovine serum albumin as the standard. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is the difference between the activity with and without ouabain in µmol fluorescein (mg protein)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

#### *Western blot analysis*

After the experiments, the hearts were homogenized and proteins (80 µg) were separated by 10% SDS-PAGE gels for AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> and the α-1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase subunit. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated with mouse monoclonal antibodies for AT<sub>1</sub> (1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA), AT<sub>2</sub> (1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA) or Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase α-1 (1:500, Millipore, San Francisco, U.S.A.). After being washed, the membranes were incubated with anti-mouse (1:5000, Sigma Chemical, Co, St Louis U.S.A.) immunoglobulin antibody conjugated to horseradish peroxidase. After being washed thoroughly, immunocomplexes were detected using an enhanced horseradish peroxidase/luminal chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International, Little Chalfont, UK) and film (Hyperfilm ECL International). Signals on the



immunoblot were quantified with the National Institutes of Health Image V1.56 computer program. The same membrane was used to determine  $\alpha$ -actin expression using a mouse monoclonal antibody for  $\alpha$ -actin (1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA), and after being washed, it was incubated with anti-mouse (1:5000, Sigma Chemical, Co, St Louis U.S.A.). All reagents for western blotting were purchased from Sigma Chemical Co.

### **Drugs Used**

The following drugs were used: heparin (Roche Q.F.S.A., Brazil), urethane, bovine serum albumin, lead acetate, hexamethonium hydrochloride, losartan, enalapril maleate and ouabain (Sigma Chemical Co., USA). All other reagents used were of analytical grade from Sigma (St Louis, USA) and E. Merck (Germany).

### **Data analysis and statistics**

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the number of animals used in each experiment. The results were analyzed using the completely randomized Student's t-test and one-way ANOVA. When ANOVA showed a significant treatment effect, Tukey's *post hoc* test was used to compare individual means. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The data was analyzed and the figures were plotted with GraphPad Prism™ (Version 2.0, GraphPad Software, USA).

### **Results**

*Effect of lead exposure on hemodynamic parameters*

The effect of acute exposure to lead on hemodynamic parameters was assessed in anesthetized rats, as shown in Table 1. Lead caused a significant increase in SAP after 60 min. However, no significant change in DAP or HR were observed. The blood lead level 2 hr after exposure was  $37 \pm 1.7 \mu\text{g/dL}$  ( $n = 12$ ). Control rats ( $n = 4$ ) had levels below the detection limit.

*Role of the renin angiotensin system in the arterial pressure increase induced by lead exposure*

Previous reports have demonstrated that chronic lead administration increases arterial pressure and that this is related to renin-angiotensin system activity [15-16]. We asked whether acute lead exposure has similar effects on RAS activity in rats. For this, losartan and enalapril were administered (10 mg/Kg and 5 mg/kg IV, respectively) 30 min prior to lead exposure. Losartan and enalapril reduced SAP and DAP (Figure 1.). In addition, SAP and DAP did not change after lead administration in rats previously treated with losartan or enalapril. Pressure values in the presence of lead remained below the control values, showing that lead did not increase arterial pressure after losartan or enalapril administration.

To investigate the possible mechanisms underlying the role of the RAS in lead-induced hypertension, plasma ACE activity was measured. ACE activity was higher in lead-treated than in untreated rats (27% relative to Ct) (Figure 2. C). However, lead exposure did not change the expression of the AT<sub>1</sub> or AT<sub>2</sub> receptors (Figure 2. A-B).

*Role of the autonomic nervous system in the arterial pressure increase induced by lead exposure*

To determine whether the autonomic nervous system plays a role in the pressure changes after lead treatment, the ganglionic blocker hexamethonium was used. Hexamethonium reduced the baseline systolic and diastolic arterial pressure as expected, but these parameters increased after lead treatment, attaining values similar to the control condition, as shown in Figure 3.

#### *Effect of lead exposure on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity*

To evaluate the function of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, the activity of this pump was measured and a significant increase was observed in lead-exposed rats (125% relative to Ct) (Figure 4. A). However, the protein levels of the  $\alpha$ -1 subunit of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase were not different between the Ct and Pb groups. These results suggest that acute lead exposure increases the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump's activity, but it does not alter the level of the  $\alpha$ -1 subunit.

## **Discussion**

Lead has been identified as a hazard and a risk factor for hypertension development and other cardiovascular diseases [38]. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) considered the reference blood lead concentration level to be 60  $\mu\text{g/dL}$  [10,11]. However, the results presented here demonstrate that acute administration of low lead concentration results in a concentration (37  $\mu\text{g/dL}$ ) below the reference blood lead concentration capable of enhancing systolic arterial pressure without altering diastolic pressure or heart rate. Our results also suggest that lead activates ACE and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity.

It is well established that rats chronically treated with high-concentration of lead show increased arterial pressure. Studies by Carmignani et al. [14] have shown that exposure to 60

ppm of lead in drinking water for 10 months increases systolic and diastolic arterial pressure. Other reports have demonstrated an increase of arterial pressure after 2-8 weeks of exposure to lead at 100 ppm [15]. Roncal et al. [29] showed that exposure to 150 ppm of lead in drinking water for 4 weeks increases arterial pressure.

In accordance with those findings, we demonstrate that acute exposure (2 hours) to low lead concentration (37 µg/dL), below the reference blood concentration, also increased SAP. DAP did not change, as also observed by Roncal et al. [29]. Our results also showed that 2 hr of lead exposure did not alter heart rate (HR). This finding is consistent with the studies of Carmignani et al. [14,27], who upon investigating the effects of chronic exposure to this metal demonstrated increased cardiac inotropism but no changes in heart rate. Boscolo and Carmignani [26] also showed an increase in arterial pressure and cardiac inotropism with a higher dose of lead, but heart rate was not modified. These authors also demonstrated central sympathetic nervous system hyperactivity, reduced baroreflex sensitivity and vagal hypotonia in rats treated chronically with lead. Similarly, Carmignani et al. [27] reported that lead appears to increase sympathetic nerve activity by central mechanisms. Our results show that the increase of SAP induced by lead was not modified by hexamethonium. This finding also suggests the existence of a peripheral effect as an early mechanism in hypertension development.

The effects of lead exposure on the circulating renin-angiotensin system in experimental animals appears to vary depending on the dose and duration of lead exposure [1]. Carmignani et al. [14] found a significant increase in plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in rats exposed to lead for 10 months. In a subsequent study of young adult rats exposed to lead for 2-8 weeks, Sharifi et al. [15] found a steady rise in ACE activity in the plasma, aorta, kidney and heart. To our knowledge, there are no studies analyzing the participation of the renin-angiotensin system in a rat model of acute exposure to low

concentration of lead. We found an increase of plasma ACE activity in rats acutely exposed to low concentrations of lead. To further investigate the participation of the renin-angiotensin system in the effect of lead on arterial pressure, we used losartan, an AT<sub>1</sub> receptor blocker, and enalapril, an ACE activity blocker. These drugs reduced the baseline systolic arterial pressure, suggesting a role of angiotensin II in the acute lead-exposure effects. The expression of the cardiac AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors was also monitored to determine whether lead's effects could result from changes in these receptors. However, we found that lead was not capable of modifying the expression of these receptors.

Karai et al. [39] reported a strong positive relationship between blood lead and erythrocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in lead-exposed workers. Lee et al. [40] showed that the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase induced a positive inotropic effect. This was attributable to increased Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels and subsequent sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release via activation of the Src/Erk1/2 signaling cascade. Our results showed an increase of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity that was independent of the increased expression of the alpha-1 subunit of this pump. Brock et al. [41], Muscella et al. [42], and Zhang and Mayeux [43] demonstrated a sustained increase in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity caused by Angiotensin II. Thus, the increase of ATPase activity we found in our experimental conditions could be associated with the activation of RAS also found in this study.

In summary, we found that acute exposure to low lead concentration induced an increase in systolic arterial pressure that was associated with increased angiotensin II levels due to ACE activation. These findings also indicate that blood lead concentrations lower than the reference concentration are a risk factor capable of affecting cardiovascular function. Thus, the results presented here provide guidance for revising the lead concentrations considered to be safe and to be toxic.

## References

1. Vaziri ND (2008) Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H454-H465.
2. Xie Y, Chiba M, Shinohara A, Watanabe H, Inaba Y (1998) Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Ind Health*. 36: 234-239.
3. Levin SM, Goldberg M (2000) Clinical evaluation and management of lead-exposure construction workers. *Am J Ind Med* 37: 23-43.
4. Renner R (2009) Out of plumb: when water treatment causes lead contamination. *Environ Health Perspect*. 117(12): A542-547.
5. Cheng Y, Schwartz J, Vokonas PS, Weiss ST, Aro A, Hu H (1998) Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (The Normative Aging Study). *Am J Cardiol* 82: 594–599.
6. Lustberg M, Silbergeld E (2002) Blood lead levels and mortality. *Arch Intern Med*. 162: 2443–2449.
7. Maheswaran R, Gill JS, Beevers DG (1993) Blood pressure and industrial lead exposure. *Am J Epidemiol*. 137(6): 645-53.
8. Moller L, Kristensen TS (1992) Blood lead as a cardiovascular risk factor. *Am J Epidemiol*. 136(9): 1091-100.
9. Schwartz J (1991) Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ Health Perspect* 91: 71–75.
10. Patrick L (2006) Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review* 11: 2-22.
11. Kosnett MJ, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL, Schwartz BS (2007) Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ Health Perspect* 115(3): 463-71.

12. Andrzejak R, Poreba R, Derkacz A (2004) Effect of chronic lead poisoning on the parameters of heart rate variability. *Med Pr* 55(2):139-144.
13. Malvezzi CK, Moreira EG, Vassilieff I, Vassilieff VS, Cordellini S (2001) Effect of L-arginine, dimercaptosuccinic acid (DMSA) and the association of L-arginine and DMSA on tissue lead mobilization and blood pressure level in plumbism. *Braz J Med Biol Res.* 34: 1341-1346.
14. Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR (1999) Kininergic system and arterial HTN following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology* 44: 105–110.
15. Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A (2004) Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced HTN. *Toxicol Lett.* 153: 233–238.
16. Vander AJ (1988) Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ Health Perspect* 78: 77-83.
17. Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick HC (1990) Effects of lead and a low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci* 79: 185-192.
18. Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND (1997) Lead-induced HTN: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 30: 1487-1492.
19. Grizzo LT, Cordelline S (2008) Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol Sci* 103: 207-214.
20. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA (1993) Lead-induced HTN: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens* 6: 723–729.
21. Vaziri ND, Ging Y (2001) Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension* 37: 223-226.

22. Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK (2005) Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res* 98: 33-39.
23. Goldstein GW (1993) Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology* 14: 97–101.
24. Watts SW, Chai S, Webb RC (1995) Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology* 99: 55–65.
25. Fujiwara Y, Watanabe S, Sakamoto M, Kaji T (1998) Repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells after simultaneous exposure to lead and zinc. *Toxicol Lett* 94: 181–188.
26. Boscolo P, Carmignani M (1988) Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environ Health Perspect* 78:101-106.
27. Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, et al. (2000) Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 68: 401-415.
28. Tsao D, Chang H, Yu H, Ho C (2000) The Change of  $\beta$ -Adrenergic System in Lead-Induced Hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164: 127–133.
29. Roncal C, Um W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN, et al. (2007) Lead, at low levels, accelerates arteriopathy and tubulointerstitial injury in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293: 1391- 1396.
30. Vassallo DV, Lebarch EC, Moreira CM, Wiggers GA, Stefanon I (2008) Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz J Med Biol Res.* 41: 789-795.
31. Silveira EA, Lizardo JH, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV (2010) Acute lead-induced vasoconstriction in the vascular beds of isolated perfused rat tails is endothelium-dependent. *Braz J Med Biol Res.* 43: 492-499.



32. Fioresi M, Furieri LB, Simões MR, Ribeiro Junior RF, Frizzera EM, et al. (2009) Acute lead exposition increases myocardial contractility in rats. *Biological Research* 42 (supplement A), R-104.
33. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. US. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2005. Boscolo, P., Carmignani, M., 78: 101-106.
34. Sysalová JK (1997) Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GFAAS. *Biol Trace Elem Res* 56: 321-329.
35. Oliveira EM, Santos RAS, Krieger JE (2000) Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res.* 33: 755-764.
36. Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP (2009) Ventricular performance and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res.* 42: 902-911.
37. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 218-254.
38. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ (2007) Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review. *Environ Health Perspect* 115: 472-482.
39. Karai I, Fukumoto K, Horiguchi S (1982) An increase in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity of erythrocyte membranes in workers employed in a lead refining factory. *Br J Ind Med* 39: 290-294.
40. Lee DI, Klein MG, Zhu W, Xiao RP, Gerzanich V (2009) Activation of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase modulates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel function. *Mol Pharmacol* 75: 774-781.
41. Brock TA, Lewis LJ, Smith JB (1982) Angiotensin increases Na<sup>+</sup> entry and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79: 1438-1442.

42. Muscella A, Marsigliante S, Carluccio MA, Vinson GP, Storelli C (1997) Angiotensin II AT1 receptors and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J Endocrinol* 155: 587–593.
43. Zhang C, Mayeux PR (2001) NO/cGMP signaling modulates regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by angiotensin II in rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 280: F474-479.

## Legends for figures

**Figure 1. Changes in arterial pressure.** Changes in systolic arterial pressure-SAP (A and C) and diastolic arterial pressure-DAP (B and D) before (Ct) and after Losartan (Los) or Enalapril (Enal) administration and following lead exposure (Los + Pb; Enal + Pb). A and B show the Losartan protocol; C and D show the Enalapril protocol. \* $p < 0.05$  compared with untreated controls. The number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 2. Effects of lead on protein expression and ACE activity.** Effects of lead exposure on the protein expression of the (A) AT1 and (B) AT2 receptors and on (C) ACE activity. \* $p < 0.05$  compared with untreated controls. The number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 3. Changes in arterial pressure.** Changes in systolic arterial pressure (SAP) and diastolic arterial pressure (DAP) before (Ct) and after Hexamethonium (Hexa) administration and following lead exposure (Hexa + Pb). \* $p < 0.05$  compared with untreated controls. The number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 4. Effects of lead on protein expression and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity.** Effects of lead exposure on (A) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and (B) the protein expression of the  $\alpha 1$  subunit of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. \* $p < 0.05$  compared with untreated controls. The number of animals used is indicated in parentheses.

## Table

**Table 1** Hemodynamic parameters upon acute lead exposure.

	<b>Ct (0 min)</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>90 min</b>	<b>120 min</b>
<b>SAP</b> (mmHg)	108 ± 3	113 ± 3	118 ± 3*	118 ± 3*	120 ± 4*
<b>DAP</b> (mmHg)	60 ± 3	60 ± 3	61 ± 3	62 ± 3	63 ± 4
<b>HR</b> (bpm)	334 ± 13	348 ± 14	370 ± 27	369 ± 23	365 ± 16

SAP- systolic arterial pressure, DAP- diastolic arterial pressure, HR- heart rate, Ct- Control. The results are expressed as the mean ± SEM. \*p< 0.05 compared with controls (time 0); n=10.

Figure 1

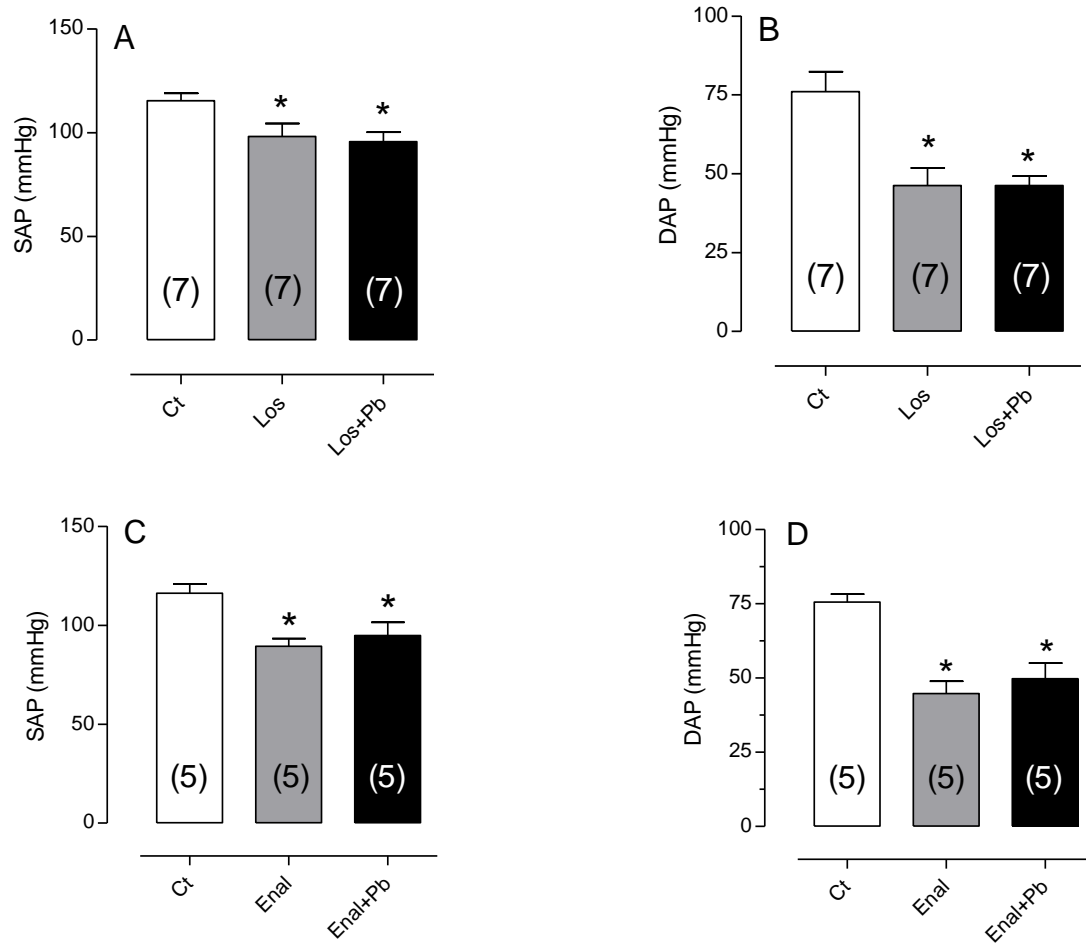


Figure 2

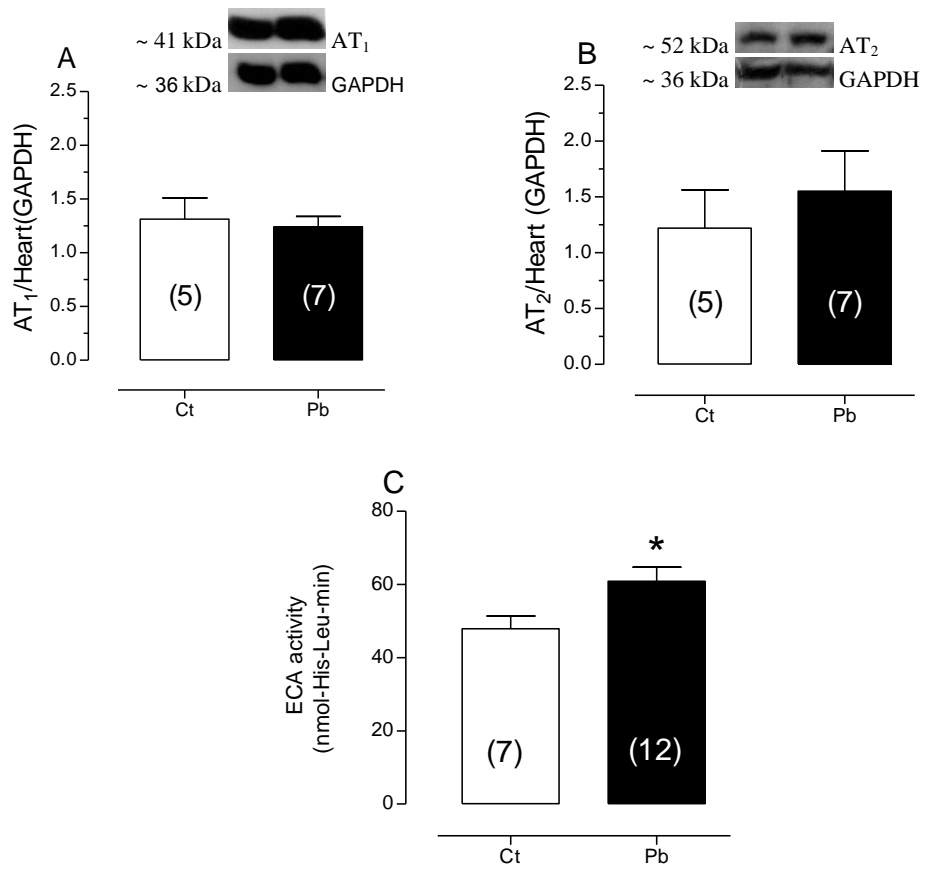


Figure 3

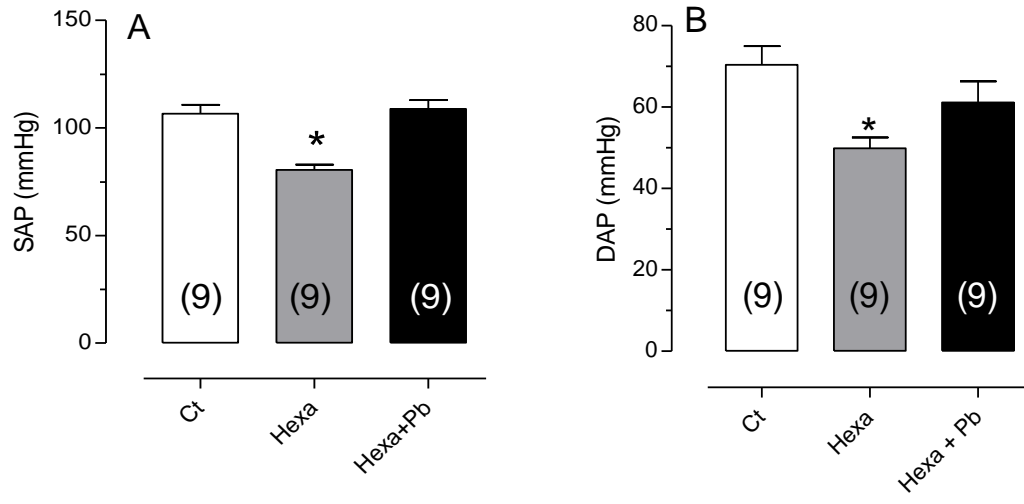


Figure 4

