

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MIRIAN FIORESI

**EXPOSIÇÃO AO CHUMBO, POR 30 DIAS: IMPLICAÇÕES NA
PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA**

VITÓRIA

2011

MIRIAN FIORESI

**EXPOSIÇÃO AO CHUMBO, POR 30 DIAS: IMPLICAÇÕES NA
PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.

Orientador: Prof^o Dr^o Dalton Valentim Vassallo

VITÓRIA

2011

Fioresi, Mirian

Exposição ao chumbo, por 30 dias: implicações na pressão arterial e na
contratilidade miocárdica / Mirian Fioresi – 2011

124f.

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências da Saúde

1.Chumbo. 2.Pressão arterial. 3.Contratilidade miocárdica. I. Vassallo,
Dalton Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III Título.

MIRIAN FIORESI

EXPOSIÇÃO AO CHUMBO, POR 30 DIAS: IMPLICAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 08 de julho de 2011.


COMISSÃO EXAMINADORA

Prof° Dr° Dalton Valentim Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profª Drª Ivanita Stefanon
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof° Dr° José Geraldo Mill
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Leila Massaroni
Universidade Federal do Espírito Santo



Profª Drª Maria Jesus Alonso
Universidade Rey Juan Carlos - Espanha

A Deus,

Pela presença constante em minha vida!

Aos meus pais, Zilma e Jeremias,

*Nada mais merecido do que homenagear os
responsáveis pela minha vida e pelo meu
sucesso!*

Ao meu esposo Marcelo,

*Por compartilhar comigo esta trajetória,
valorizando e incentivando cada esforço e
cada conquista!*

A minha amada Família,

*Madrinha Tânia, João Alaor, Maria Gabriela,
André, Maruza, Rogério, Emanoelly, Romário,
Simone e Isabela,*

*Por todo amor, torcida e orações recebidas
em mais esta etapa!*

"Acho que nos momentos de grande tristeza
tem-se a necessidade de olhar para o céu ao
invés de chorar"

Santa Terezinha do Menino Jesus

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, presença constante em minha vida. Obrigada Senhor por realizar, diariamente, os milagres que eu peço e aqueles que eu nem saberia pedir. Obrigada, ainda, por me capacitar para todos os papéis que o Senhor me elegeu.

Agradeço ao meu orientador, conselheiro e amigo. **Chefe**, obrigada pela orientação e prazerosa convivência nos últimos sete anos de minha vida. Seu exemplo exerce profunda influência sobre meu desenvolvimento profissional e pessoal. Serei, eternamente, uma admiradora da sua inteligência e de sua alegria.

À Prof^a Dr^a **Ivanita** pela amizade e momentos de aprendizado; pelo carinho e disponibilidade em todos os momentos que “bati na porta” de sua sala.

Àquela que Deus colocou no meu caminho e que, embora sem laços de sangue, tornou-se minha irmã, minha confidente e minha amiga. Lorena, ou melhor, **Lora**, obrigada por estar sempre disponível.

À **Maylla**, Anjo que Deus disponibilizou em minha vida para me mostrar a força da doação pessoal gratuita. May, obrigada pela disponibilidade de me ajudar com a bioquímica nos preciosos finais de semana e por tantas outras contribuições profissionais e pessoais.

Ao **Gilson** pela agradável companhia e pela ajuda com a pletismografia de cauda.

Ao **Vinícius** pela alegria que sempre acompanha sua presença e ao **LQA** pelo auxílio na quantificação do chumbo por espectrometria.

À **Larissa** pela disponibilidade e ajuda com o tratamento dos animais.

Aos **queridos amigos do LEMC**: Alessandra, Aurélia, Bruna, Carol, Cindy, David, Edna, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Fernanda, Jonaína, Kamila, Kelly, Leonardo, Priscila, Rogério, Sâmia, Teca e Thaís. Vocês transformam nossos trabalhos em momentos de prazer. Obrigada pelas deliciosas gargalhadas, principalmente naqueles momentos que o experimento não dava certo e a vontade era de chorar. Não consigo imaginar o quão difícil seria esta pós-graduação sem a companhia de vocês, meus grandes amigos.

Aos **amigos que já passaram pelo LEMC** e que ajudaram a escrever esta parte da minha história: Edu, Evandro, Giulia, Franck, Jú, Karina, Saulo, Núbia e Vivi.

Aos amigos que desde nossa aprovação no mestrado transformam o PPGCF em um ambiente amável: **Lú Passamani, Fagna, Renata, Patrick, Mariana e Helena.**

Aos **professores** do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Aos **funcionários** do PPGCF pela eficiência e atenção.

Ao **Departamento de Enfermagem** que carinhosamente me acolheu e reduziu minha carga horária para propiciar esta escrita.

À **Tereza** e ao **Telém**, que hoje também são minha família. Obrigada pelo apoio, confiança, dedicação e amizade durante esta jornada.

À minha linda família: **Madrinha Tânia, João Alaor, Maria Gabriela, André, Maruza, Rogério, Emanoelly, Romário, Simone e Isabela.** Se hoje me faço Doutora é porque vocês acreditaram em mim, até mais do que eu mesma. Não sei como agradecer a paz, o conforto e a confiança que vocês representam em minha vida, mesmo quando a distância impede de nos abraçarmos. Amo todos vocês!

À minha mamãe **Zilma** que me faz sentir amada, com um amor incondicional e gratuito. Mãe, eu sinto suas orações na minha vida. Obrigada por me contagiar com sua vontade de me ver cada vez mais feliz e realizada.

Ao meu pai **Jeremias**, que não está mais fisicamente entre nós. Pai, os seus olhos azuis transpareciam o orgulho que o senhor sente de mim e a certeza que hoje eu estaria aqui, exatamente como estou. Sei que mesmo depois de sua partida, você se faz presente. Obrigada pelas muitas coisas que o senhor e a mamãe abdicaram em função de minhas necessidades.

Ao amor da minha vida, meu esposo **Marcelo.** Amor, só nós sabemos o quanto dói esta saudade semanal que é causada pela distância entre nossos trabalhos. Acredito que esta defesa favorecerá o fim desta saudade! Obrigada por confiar em mim e me proporcionar tudo para meu crescimento profissional. Obrigada por ser o equilíbrio entre o incentivo, o descanso e a diversão, em todos os momentos. Obrigada pela paciência na espera de estarmos juntos todos os dias. Por eu ser incapaz de agradecer de maneira adequada, simplesmente quero dizer que te amo eternamente.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição por 30 dias ao chumbo, enfocando sua ação direta sobre a contratilidade miocárdica.

Foram utilizados ratos Wistar separados aleatoriamente em dois grupos: controle (Ct) e tratados com 100 ppm de chumbo na água de beber (Pb). A pressão arterial (PA) foi mensurada semanalmente. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados para avaliação hemodinâmica, *in vivo*. Após este procedimento os ratos foram sacrificados para a avaliação, *in vitro*, da contratilidade miocárdica e amostras teciduais e sanguíneas foram devidamente armazenadas para posterior investigação bioquímica. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística usada foi ANOVA uma ou duas vias ou teste t de Student não-pareado. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A concentração sanguínea de chumbo no grupo tratado foi de 13 $\mu\text{g/dL}$, valor inferior ao índice biológico máximo permitido no Brasil (60 $\mu\text{g/dL}$) e o tecido ósseo mostrou-se como o sítio de maior deposição deste metal. Desde a primeira semana de exposição a PA do grupo Pb mostrou-se elevada e assim permaneceu ao longo das quatro semanas seguintes. A avaliação hemodinâmica, aos 30 dias, evidenciou aumento da pressão arterial sistólica (Ct: $96 \pm 3,79$ vs Pb: $116 \pm 1,37$ mmHg), da diastólica (Ct: $60 \pm 2,93$ vs Pb: $70 \pm 3,38$ mmHg), da ventricular esquerda (Ct: $104 \pm 5,85$ vs Pb: $120 \pm 2,51$ mmHg) e da frequência cardíaca (Ct: 307 ± 10 vs Pb: 348 ± 16 bpm). *In vitro*, o tratamento com chumbo não alterou o estado inotrópico (força contrátil e derivadas temporais de força). Entretanto, nossos resultados são sugestivos de alterações na cinética do cálcio (Ca^{++}) no cardiomiócito. Estas alterações são elucidadas pelo aumento do influxo de Ca^{++} transarcolemal, pela menor recaptção de Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático e pela maior extrusão via sarcolema. Coligadas, estas respostas mostram que, apesar do chumbo induzir aumento do influxo de Ca^{++} , o miócito dispõe de mecanismos reguladores que impedem o aumento de força, como visualizado *in vivo*.

Nosso trabalho demonstrou que a exposição ao chumbo resulta em aumento de PA, da FC e do inotropismo ventricular. Além disso, foi desmonstrado, pela primeira vez, que a exposição ao chumbo promove alterações no ciclo de cálcio do cardiomiócito que podem contribuir com os efeitos deletérios deste metal no sistema cardiovascular.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the cardiovascular effects of exposure to lead for 30 days, emphasizing its direct action on myocardial contractility.

Male Wistar rats were sorted randomly into two groups: control (Ct) and treated with 100 ppm of lead in drinking water (Pb). Blood pressure (BP) was measured weekly. At the end of treatment, animals were anesthetized and hemodynamic parameters were measured. After this procedure the rats were sacrificed for myocardial contractility assessment, *in vitro*. Blood and tissue samples were properly stored for further biochemical investigation. Statistical analysis: mean \pm SEM; one or two-way ANOVA or Student's t-test were used. $p < 0.05$ was considered significant.

The blood concentration of lead in the treated group was approximately 13 mg/dL, below the maximum allowable biological index in Brazil (60 mg/dL) and bone showed to be the site of highest deposition of this metal. The BP in Pb group was higher than the Ct group since the first week of exposure to lead and remained like that over the next four weeks. Hemodynamic evaluation, at 30 days, showed an increase in systolic blood pressure (Ct: 96 ± 3.79 vs. Pb: 116 ± 1.37 mmHg), diastolic (Ct: 60 ± 2.93 vs. Pb: 70 ± 3.38 mmHg), left ventricular (Ct: 104 ± 5.85 vs. Pb: 120 ± 2.51 mmHg) and heart rate (Ct: 307 ± 10 vs. Pb: 348 ± 16 bpm). *In vitro*, lead treatment did not change the inotropic state (contraction force and time derivatives of force). However, our results are suggestive of changes in the kinetics of calcium (Ca^{++}) in the cardiomyocyte. These changes are explained by the increased transsarcolemmal Ca^{++} influx, associated with the lower Ca^{++} uptake by the sarcoplasmic reticulum and high extrusion by sarcolemma. Altogether, these results show that despite the increased Ca^{++} influx induced by lead, the myocyte had regulatory mechanisms that prevent the increase of force, as seen *in vivo*.

Our work has shown that lead exposure results in high blood pressure as well as increase on HR and ventricular inotropism. In addition, it showed for the first time, that lead exposure causes changes in the calcium cycle of cardiomyocytes. Such changes may contribute to the deleterious effects of this metal on the cardiovascular system.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Normalização e apresentação de trabalhos científicos e acadêmicos / Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. -Vitória, ES: A Biblioteca, 2006.

Normalização de Referências: NBR: 6023:2002 / Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. -Vitória, ES: A Biblioteca, 2006.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty.....	29
Figura 2: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos Wistar.....	40
Figura 3: Registro típico de força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares dissecados do VE de ratos Wistar.....	42
Figura 4: Registro típico de PPP de músculos papilares dissecados do VE de ratos Wistar.....	43
Figura 5: Registro típico da curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares dissecados do VE de ratos Wistar.....	44
Figura 6: Registro típico de contração tetânica de músculos papilares dissecados do VE de ratos Wistar.....	45
Figura 7: Registro típico de curva concentração-resposta ao isoproterenol obtida na preparação de músculos papilares dissecados do VE de ratos Wistar.....	46
Figura 8: Concentração tecidual de chumbo nos ratos do grupo Ct e Pb.....	58
Figura 9: Distribuição tecidual de chumbo, nos animais do grupo tratado, ao final dos 30 dias de exposição ao metal.....	59
Figura 10: Comparação entre o peso corporal dos grupos Ct e Pb ao longo das quatro semanas de exposição ao metal.....	60
Figura 11: Comparação entre o peso das câmaras ventriculares direita e esquerda, corrigidas pelo peso corporal dos respectivos animais, dos grupos Ct e Pb ao final do tratamento.....	61
Figura 12: Avaliação da pressão arterial sistólica dos grupos Ct e Pb ao longo das quatro semanas de exposição ao metal.....	62
Figura 13: Avaliação, <i>in vivo</i> , de parâmetros pressóricos arteriais e FC dos ratos do grupo Ct e Pb.....	64
Figura 14: Avaliação, <i>in vivo</i> , de parâmetros hemodinâmicos ventriculares esquerdo dos ratos dos grupos Ct e Pb.....	65
Figura 15: Avaliação, <i>in vivo</i> , de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito dos ratos dos grupos Ct e Pb.....	66
Figura 16: Peso dos músculos papilares dos grupos Ct e Pb.....	67
Figura 17: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de VE dos ratos dos grupos Ct e Pb.....	68
Figura 18: Avaliação, <i>in vitro</i> , das derivadas positivas e negativas de força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb.....	69

Figura 19: Avaliação, <i>in vitro</i> , de parâmetros temporais da contração de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb.....	69
Figura 20: Avaliação, <i>in vitro</i> , das potenciações relativas após pausas de 15, 30 e 60 segundos de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb....	70
Figura 21: Avaliação, <i>in vitro</i> , da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular.....	71
Figura 22: Avaliação indireta, <i>in vitro</i> , do influxo de cálcio transarcolemal avaliado pela “ <i>post rest contraction</i> ” de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb.....	72
Figura 23: Avaliação, <i>in vitro</i> , da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb no pico e no platô das contrações tetânicas na ausência e na presença do verapamil (Ver).....	73
Figura 24: Avaliação, <i>in vitro</i> , da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb frente a estimulação β -adrenérgica.....	74
Figura 25: Atividade da enzima conversora de angiotensina no plasma (A) e no coração (B) dos ratos dos grupos Ct e Pb.....	75
Figura 26: Atividade da bomba de sódio e potássio no coração dos ratos dos grupos Ct e Pb.....	76
Figura 27: Expressão protéica ventricular da bomba de cálcio do RS (SERCA 2) de ratos dos grupos Ct e Pb.....	77
Figura 28: Expressão protéica ventricular do PLB de ratos dos grupos Ct e Pb.....	78
Figura 29: Expressão protéica ventricular das subunidades fosfo-Tre ¹⁷ -PLB (A) e fosfo-Ser ¹⁶ -PLB (B) e as razões fosfo-Tre ¹⁷ -PLB/PLB (C) e fosfo-Ser ¹⁶ -PLB/PLB (D) de ratos dos grupos Ct e Pb.....	78
Figura 30: Expressão protéica ventricular do trocador sódio/cálcio (NCX) de ratos dos grupos Ct e Pb.....	79
Figura 31: Expressão protéica da subunidade α -1 da NKA de ventrículos ratos dos grupos Ct e Pb.....	80
Figura 32: Mecanismo proposto pelo qual a exposição ao chumbo altera o ciclo de cálcio no cardiomiócito.....	111

LISTA DE SIGLAS

[Ca⁺⁺]_i: Concentração de cálcio intracelular

[Na⁺]_i: Concentração de sódio intracelular

ALA: delta ácido aminolevulínico

ALAD: ácido aminolevulínico desidratase

ANOVA: análise de variância

ATP: Trifosfato de adenosina

bpm: batimentos por minuto

CaMKII: Proteína cinase II dependente de Ca-calmodulina

CEUA / EMESCAM: Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

Ct: Controle

delta-ALAD: delta ácido aminolevulínico desidratase

dF/dt: Derivadas temporais de força

dP/dt (-): Derivada temporal de pressão negativa

dP/dt (+): Derivada temporal de pressão positiva

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS: Oxido nítrico sintase endotelial

F: Força desenvolvida pelos músculos papilares

FC: Frequência Cardíaca

fosfo-Ser¹⁶-PLB: Fosfolambam fosforilado na serina-16

fosfo-Tre¹⁷-PLB: Fosfolambam fosforilado na treonina-17

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ILZSG: International Lead Zinc Study Group

IM: intra-muscular

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

L_{max} : Comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima

LQA: Laboratório de Química Analítica

NCX: Trocador sódio/cálcio

NKA: Na^+, K^+ -ATPase

NO: óxido nítrico

$O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido

OH^{\cdot} : radical hidroxila

$ONOO^-$: peroxinitrito

ONU: Organização das Nações Unidas

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

Pb: Tratamento com chumbo.

Pb-S: concentração de chumbo no sangue

PDfVD: Pressão diastólica final do ventrículo direito

PDfVE: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PKA: Proteína quinase dependente de AMPcíclico

PLB: Fosfolambam

PPP: Potenciações relativas pós-pausa

PRC: Contrações após repouso de 10 minutos

PSVD: Pressão sistólica do ventrículo direito

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PVC: Cloreto de polivinila

RDW: "Red Cell Distribution Width"

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RS: Retículo sarcoplasmático

SERCA 2: Bomba de Ca^{++} do RS

sGC: Guanilato ciclase solúvel.

-SH: Radical sulfidril

SRA: Sistema renina-angiotensina

TnC: Troponina C

TnI: Troponina I

TnT: Troponina T

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VCM: Volume corpuscular médio

VD: Ventrículo Direito

VE: Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 CHUMBO.....	21
1.1.1 ASPECTOS GERAIS.....	21
1.1.2 PRODUÇÃO E CONSUMO MUNDIAL.....	21
1.1.3 USO INDUSTRIAL E EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....	23
1.1.4 CINÉTICA NO ORGANISMO HUMANO.....	27
1.1.5 EFEITOS NOS DIFERENTES SISTEMAS.....	29
1.1.6 EFEITOS CARDIOVASCULARES DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	36
3.1.1 ANIMAIS.....	36
3.1.2 MODELO EXPERIMENTAL.....	36
3.2 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA.....	37
3.2.1 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO TECIDUAL.....	37
3.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA PELA TÉCNICA DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA.....	38
3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	39

3.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA PELA TÉCNICA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS.....	41
3.5.1 MONTAGEM DA PREPARAÇÃO.....	41
3.5.2 FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E CINÉTICA CONTRÁTIL.....	42
3.5.3 AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.....	42
3.5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE A MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR.....	43
3.5.5 MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSARCOLEMAL PELA MANOBRA “ <i>POST REST CONTRACTION-PRC</i> ”.....	44
3.5.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL NAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS E O BLOQUEIO COM VERAPAMIL.....	45
3.5.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE À ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA.....	45
3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	47
3.6.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ECA PLASMÁTICA E CARDÍACA.....	47
3.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	48
3.7 BIOLOGIA MOLECULAR.....	49
3.7.1 WESTERN BLOT PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	49
3.7.2 PREPARAÇÃO DO TECIDO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	49
3.7.3 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DAS AMOSTRAS.....	50
3.7.4 INCUBAÇÃO COM OS ANTICORPOS.....	50
3.7.5 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	52
3.8 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	53
4 FÁRMACOS E REAGENTES.....	55

5 RESULTADOS.....	57
5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO TECIDUAL.....	57
5.2 AVALIAÇÃO PONDERAL.....	60
5.2.1 AVALIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	60
5.2.3 AVALIAÇÃO PONDERAL DAS CÂMARAS CARDÍACAS.....	61
5.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO...	62
5.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	63
5.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	67
5.5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL DOS PAPILARES.....	67
5.5.2 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E CINÉTICA CONTRÁTIL.....	68
5.5.3 AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.....	69
5.5.4 MEDIDA DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE A MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR.....	70
5.5.5 AVALIAÇÃO INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSARCOLEMAL.....	71
5.5.6 AVALIAÇÃO DAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS E DO BLOQUEIO COM VERAPAMIL.....	72
5.5.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE À ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA.....	73
5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	75
5.6.1 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	75
5.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	75

5.7 BIOLOGIA MOLECULAR.....	77
5.7.1 AVALIAÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	77
5.8 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	81
6 DISCUSSÃO.....	82
6.1 EFICÁCIA DO TRATAMENTO EM PROMOVER UM MODELO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....	83
6.2 DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO CHUMBO.....	84
6.3 EXPOSIÇÃO AO CHUMBO: FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	86
6.3.1 POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....	88
6.3.1.1 Interferência na homeostasia do cálcio.....	88
6.3.3.2.Alterações na regulação neuro-humoral.....	89
6.3.3.3 Promoção do estresse oxidativo e alterações nas respostas vasculares.....	91
6.3.3.4 Surgimento de danos renais.....	95
6.4 EXPOSIÇÃO AO CHUMBO: IMPLICAÇÃO NOS FATORES REGULADORES DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	96
6.4.1 POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	98
6.4.1.1 Mecanismos envolvidos no aumento do inotropismo cardíaco encontrado na preparação <i>in vivo</i>	98
6.4.1.2 Resposta inotrópica obtida na preparação <i>in vitro</i>	102

6.4.1.3 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência no funcionamento dos canais do tipo L para cálcio.....	104
6.4.1.4 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência no funcionamento do RS.....	106
6.4.1.5 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência nos mecanismos sarcolemais envolvidos na extrusão do cálcio citoplasmático.....	108
6.4.1.6 Mecanismo proposto para os efeitos do chumbo no ciclo de cálcio do cardiomiócito.....	110
7 CONCLUSÃO.....	112
8 REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

O chumbo é um dos metais mais antigos utilizados pelo homem, sendo que seu uso remonta aos antigos egípcios, que o utilizam há mais de oito mil anos, e muitas das suas aplicações têm sido preservadas através dos séculos.

É um metal cinzento, azulado brilhante, não elástico, maleável, trabalhável a frio, razoável condutor de calor e eletricidade e com a propriedade singular de absorver radiações de ondas curtas, como as produzidas pelos raios-X. Estas características demonstradas e a facilidade de se combinar com outros metais fazem do chumbo um dos elementos de maior emprego na indústria moderna, tanto puro, como sob a forma de compostos (BRASIL, 2011).

Corresponde ao sexto metal de maior utilidade industrial. O uso principal do chumbo é na produção de baterias automotivas e industriais, que abrange em torno de 90 % do consumo mundial deste metal (BRASIL, 2011).

1.1.2 PRODUÇÃO E CONSUMO MUNDIAL

De acordo com as estimativas do “International Lead Zinc Study Group” (ILZSG, 2011), a produção mundial de minério de chumbo primário, nos onze primeiros meses do ano de 2010, atingiu um total de 3,75 milhões de toneladas. Os principais produtores de chumbo primário são geralmente os países detentores das maiores reservas do mundo. São eles, na ordem decrescente das reservas: Austrália, China e Estados Unidos.

A produção mundial de chumbo metálico primário, proveniente das minas, associada à produção secundária, obtida a partir da recuperação do metal de sucatas, alcançaram 8,5 milhões de toneladas nos 11 primeiros meses do ano de 2010, sendo a Ásia e América os maiores produtores (ILZSG, 2011).

Em 2008, as reservas aprovadas (medidas e indicadas) no Brasil alcançaram, em termo de metal contido (chumbo puro), 671 mil toneladas, valor correspondente a

0,39 % da reserva global. Estas reservas estão distribuídas nos estados de São Paulo (SP), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Tocantins (TO), Bahia (BA) e Minas Gerais (MG) (BRASIL, 2009).

A produção brasileira primária (*Mine Production*), em 2006, foi de 15.395 toneladas, correspondente a 0,5 % da mundial. Esta produção de chumbo primário é subproduto da extração de zinco, que é o principal produto da Mina de Morro Agudo, no município de Paracatu, Minas Gerais, e é totalmente exportada. No ano de 2008 a exportação do chumbo brasileiro teve como principal destino a China (BRASIL, 2009).

As usinas metalúrgicas brasileiras que beneficiavam o concentrado de chumbo foram desativadas, em dezembro de 1995, salvo aquelas ligadas às empresas de reciclagens, o que torna o Brasil dependente da importação do metal semimanufaturado. A Votorantim Metais, em Juiz de Fora/MG, está instalando uma pirometalúrgica com previsão de início de funcionamento para este ano de 2011.

No Brasil, o consumo do chumbo metálico em 2008 foi de 182.200 toneladas. Este consumo está direcionado, principalmente, aos fabricantes de baterias automotivas (85 %) e às indústrias (10,24 %) (BRASIL, 2009). O consumo aparente do metal tende a crescer continuamente devido ao desenvolvimento do país e às previsões de investimento das montadoras de automóveis com intuito de elevar a produção nacional de veículos nos próximos anos (BRASIL, 2011).

O chumbo secundário é obtido, principalmente, da reciclagem de baterias automotivas, industriais e das telecomunicações, em usinas refinadoras nos estados de Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro. No Brasil, a produção secundária do chumbo metálico em 2008 foi de 96 mil toneladas, que corresponde a 10 milhões de novas baterias, isto em um universo de 12 milhões de baterias vendidas para o mercado de reposição, ou seja, 84,6 % de eficiência na coleta de baterias automotivas (BRASIL, 2009).

O consumo mundial de chumbo cresceu 32,66 % no período de 2000 a 2008, enquanto o consumo deste metal na Ásia cresceu 128,07 % (BRASIL, 2011). A produção do minério de chumbo do continente oriental, no mesmo período, acompanhou o crescimento do consumo, partindo de uma produção minério de chumbo, em metal contido, de 805 mil toneladas, em 2000, para 1.777 mil toneladas,

em 2008, registrando um crescimento de 120,75 %. O contrário ocorreu na América e na Europa onde se registrou uma redução significativa no consumo do chumbo refinado. Esta redução está relacionada à crise econômica que atingiu estes continentes nos últimos anos (BRASIL, 2011).

1.1.3 USO INDUSTRIAL E EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

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 proteção de reatores nucleares, finas placas de componentes eletrônicos, bem como baterias, tintas e corantes, cerâmicas, cabos e munições (KREUSCH, 2005).

Além de ser usado como matéria-prima, o chumbo é muito importante nos processos de soldagem. Na forma de ligas serve como elemento de adesão de superfícies. 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 eletroeletrônicos. Através desta dupla função, as soldas feitas com ligas contendo chumbo apresentam um papel essencial na exploração espacial, na conservação de energia e nas telecomunicações. Portanto, os materiais à base de chumbo facilitam o desenvolvimento de computadores rápidos e televisores de alta definição, beneficiando também a tecnologia para confecção de tubos de raios catódicos usados em telas de televisores, computadores e radares (KREUSCH, 2005).

O chumbo metálico é usado na forma de lâmina ou canos, nos quais a flexibilidade e resistência à corrosão são características requeridas, em indústrias químicas e da construção. É usado também como material de revestimento na indústria automotiva. É um valioso material protetor contra radiações ionizantes (KREUSCH, 2005). Cerca de 40 % do chumbo é usado como metal, 25 % em ligas e 35 % em compostos químicos (ATSDR, 2007).

Os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos. Muitos países têm restringido seu uso, no Brasil, a Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008, fixa o limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares (BRASIL, 2008). Apesar da

legislação, existente no Brasil, sobre chumbo em tintas de brinquedos, há grande preocupação com a falta de controle na importação de brinquedos asiáticos, principalmente chineses que, muitas vezes, não estão adequados aos limites estabelecidos (CAPITANI et al., 2009).

No Brasil o uso do chumbo tetraetílico na gasolina foi proibido desde 1978 e no seu lugar utiliza-se o etanol. No entanto, existem outros países que ainda utilizam esse aditivo na gasolina, o qual é encontrado em quantidade considerável na biosfera uma vez que o chumbo não é um produto degradável (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

Estima-se que o chumbo seja utilizado em mais de 200 processos industriais diferentes com destaque para a produção de acumuladores elétricos. Este segmento abriga além de grandes empresas com melhor controle das condições ambientais de trabalho, pequenas empresas, muitas das quais instaladas em regiões residenciais, e funcionando à margem da legislação trabalhista, ambiental e de saúde (BRASIL, 2006).

A bateria é um aparato eletroquímico que fornece energia elétrica mediante o uso controlado de reações químicas. As baterias de chumbo-ácido utilizam reações químicas reversíveis, podendo ser recarregadas. As placas de uma bateria são constituídas de estruturas de chumbo metálico, cobertas por uma pasta de dióxido de chumbo (placas negativas) e pasta de chumbo metálico poroso (placas positivas).

Na reciclagem da bateria chumbo-ácido estão envolvidos três processos: quebra da bateria, redução e refinamento do chumbo. Dentre as fontes comuns de impacto ambiental desses processos, destacam-se: poeiras contaminadas com chumbo, chumbo particulado, detritos contaminados e produção de escória (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

As fundições primárias e secundárias de chumbo e as fábricas e reformadoras de baterias são as fontes mais significativas de emissões industriais deste metal, provocando o aumento das concentrações no solo e na poeira em áreas vizinhas (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

Na indústria de acumuladores, as baterias de automóveis consumiram 85% e as industriais 10,24 % das 182.200 toneladas de chumbo metálico consumidas pelo Brasil, em 2008 (DNPM, 2007).

Genericamente, a exposição da população ao chumbo ocorre de duas maneiras: a exposição ocupacional e não-ocupacional. As principais atividades ocupacionais que expõem os trabalhadores ao risco de intoxicação são: exposições ocupacionais a poeiras de chumbo; extração, concentração e refino de minérios contendo chumbo; fundição de chumbo; produção, reforma e reciclagem de acumuladores elétricos; manuseio de sucatas de chumbo; instrução e prática de tiro; produção de cerâmicas; jateamento de tintas antigas à base de chumbo; soldas à base de chumbo; produção de cristais; corte a maçarico de chapas de chumbo ou pintadas com tintas à base de chumbo; demolição de instalações antigas com fornos de chumbo; produção de pigmentos contendo chumbo; operações de polimento de materiais contendo chumbo (ATSDR, 2007; BRASIL, 2006).

A exposição da população em geral reduziu drasticamente após a remoção do chumbo na gasolina e sua redução nas tintas e soldas. Entretanto, como o chumbo não é degradado e continua sendo lançado no ambiente por ações humanas, a exposição não-ocupacional ainda ocorre nas seguintes situações: residências nas vizinhanças de empresas que manuseiam ou manusearam chumbo; uso de medicações que contêm chumbo; utilização de vasilhames de estanho contendo chumbo; presença de projéteis de arma de fogo no organismo; ingestão de água ou alimentos contaminados com chumbo; contato com solo contaminado com pesticidas contendo chumbo; consumo de bebidas alcoólicas contaminadas com chumbo; uso de utensílios de cloreto de polivinila (PVC), nos quais o chumbo age como estabilizante na polimerização ou está presente nos pigmentos coloridos; uso de tinturas de cabelo; manuseio de brinquedos pintados com tintas a base de chumbo (ATSDR, 2007; BRASIL, 2006; CAPITANI et al., 2009).

Em vários países existem locais que são fontes permanentes de exposição ao chumbo. A cidade de Santo Amaro da Purificação, no Recôncavo Baiano, figura como um sítio historicamente contaminado. Nesta cidade, entre as décadas de 1960 e 1990, ocorreram atividades mineradoras de fundição primária de chumbo, as quais poluíram intensamente a cidade. Os trabalhadores da fundição, seus filhos e os moradores de regiões próximas à usina foram particularmente afetados. Esta empresa deixou como herança um passivo ambiental de, aproximadamente, 500 mil toneladas de escória com alta concentração de chumbo espalhadas por toda cidade. A escória era doada aos moradores e à prefeitura local que freqüentemente a usava

para pavimentar os quintais de suas casas e muitas ruas e lugares públicos de Santo Amaro da Purificação. Atualmente, o passivo ambiental da fundição de chumbo ainda permanece como um fator de risco relevante para a concentração sanguínea desse metal dos moradores (CARVALHO et al., 2003).

Recentemente, na Nigéria, foram denunciados casos de intoxicação por chumbo na garimpagem ilegal de ouro no estado de Zamfara. A garimpagem atrai agricultores empobrecidos que costumam escavar a rocha com as próprias mãos. O minério retirado em torno das suas aldeias contém elevadas concentrações de chumbo, contaminando o ar, o solo e a água. A intoxicação resultou na morte de cerca de 400 crianças entre março de 2010 e outubro deste mesmo ano. A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que 18 mil pessoas possam ter sido afetadas pelo metal na região (TATTERSALL; BROCK, 2011).

O chumbo é considerado o principal metal contaminante que resulta da reciclagem de lixo eletrônico, uma vez que está presente em monitores, cabos de PVC, baterias, soldas e outros componentes. Na China, e em outros países Asiáticos e Africanos, a reciclagem deste lixo eletrônico ocorre por processos primitivos, empregando, principalmente, processos manuais centrados nas famílias. Huo e colaboradores (2007) analisaram a exposição de crianças residentes próximas das áreas de reciclagem e constataram que a concentração de chumbo sanguíneo nestas crianças apresenta-se elevada e que esta elevação está diretamente relacionada à reciclagem de circuitos eletrônicos.

A China tem registrado uma série de incidentes ligados à poluição por metais, principalmente pelo chumbo. Em janeiro de 2011, foi divulgado que mais de 200 crianças foram contaminadas com o chumbo de usinas de baterias localizadas muito próximas de suas casas no leste do país. Em 2009, no centro da China 1354 crianças apresentaram intoxicação por chumbo. Estas crianças vivem perto de uma fundição de magnésio na província de Hunan. Outro caso, divulgado neste mesmo ano, na província de Shaanxi, no norte do país revelou que 615 das 731 crianças residentes próximas de uma empresa de fundição tiveram resultado positivo em teste de envenenamento por chumbo (WILLS; BLANCHARD, 2011; CHAN, 2011).

As cifras dos casos de intoxicação por chumbo, certamente, são maiores das divulgadas pelos meios de comunicação, visto que a contaminação ocorre, na maioria dos casos, em locais sob baixa fiscalização ou através de atividades

primitivas na manufatura de baterias, na reciclagem de circuitos eletrônicos, na fundição e na mineração. No Brasil não existem registros ou estimativas confiáveis do número de indivíduos expostos ocupacional e ambientalmente ao metal, embora a literatura especializada venha apontando grupos de trabalhadores intoxicados principalmente entre os envolvidos na produção, reforma e reciclagem de baterias automotivas (BRASIL, 2006).

1.1.4 CINÉTICA NO ORGANISMO HUMANO

Todos os indivíduos possuem chumbo em seus organismos como resultado da exposição a fontes exógenas. Entretanto este metal não possui nenhuma atividade fisiológica e exerce efeitos tóxicos em todos os sistemas do organismo cuja grandeza das manifestações clínicas dependerá da intensidade, do tempo de exposição e da sensibilidade individual (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A maior parte do chumbo entra no organismo humano pelos tratos respiratório e gastrointestinal e, somente em sua forma orgânica, pode penetrar no organismo por via cutânea (BRASIL, 2006). Após a absorção pode ser encontrado no sangue, tecidos moles e mineralizados. A meia-vida do chumbo nos três compartimentos é bastante diferente, sendo estimada em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles e 27 anos para os ossos, de acordo com o modelo de Rabinowitz e colaboradores (1976).

Como o chumbo é, qualitativamente, um análogo biológico do cálcio, o sítio primário da deposição do chumbo é o tecido ósseo o qual possui cerca de 95% do conteúdo corporal em adultos (MOREIRA; MOREIRA, 2004). No passado este depósito era considerado um depósito inerte de chumbo, mas atualmente, sabe-se que há mobilização deste metal dos ossos para o sangue expondo, cronicamente, os tecidos moles (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo. Nas células vermelhas, ligado a proteínas de baixo peso molecular, estão de 90 % a 99,8 % do metal sanguíneo, e o restante encontra-se no plasma provavelmente ligado à albumina, α 2-globulina ou como íons livres disponíveis para o transporte aos tecidos. É possível que esta última fração tenha maior importância toxicológica, quando comparado ao chumbo nos eritrócitos, por estar mais

biodisponível para atingir os sítios-alvo da ação toxicológica. Entretanto, as concentrações plasmáticas de chumbo raramente têm sido mensuradas devido às dificuldades analíticas e, por isso, sua relação com as manifestações tóxicas não está claramente definida (BERGDAHL et al., 1997; TSAIH et al., 1999).

Embora a concentração sanguínea do metal seja aceita como indicador de exposição, alguns dados sugerem que a concentração sanguínea não representa adequadamente a concentração deste metal nos ossos e, conseqüentemente, não pode ser utilizada como indicador de exposição crônica ao chumbo (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

O organismo acumula chumbo durante toda a vida e elimina de forma lenta, devido a sua afinidade pelo tecido ósseo. Conseqüentemente, após uma única exposição, a concentração sanguínea de uma pessoa pode voltar ao normal e, no entanto, o conteúdo corpóreo total pode ainda estar elevado. O conteúdo total de chumbo no organismo é que está relacionado com o risco de efeitos adversos (ATSDR, 1992).

O chumbo é excretado por várias rotas, porém só a excreção renal e a gastrintestinal são de importância prática (MOREIRA; MOREIRA, 2004). Todo chumbo não absorvido pelo trato gastrintestinal é eliminado pelas fezes, inclusive aquele proveniente do ar que foi engolido e não absorvido. O metal não retirado do organismo é eliminado pelos rins ou excretado pela bile para o trato gastrintestinal. No entanto, os mecanismos de eliminação pela bile e urina ainda não estão completamente elucidados (MOREIRA; MOREIRA, 2004). A figura 1 esquematiza a cinética do chumbo no organismo humano.

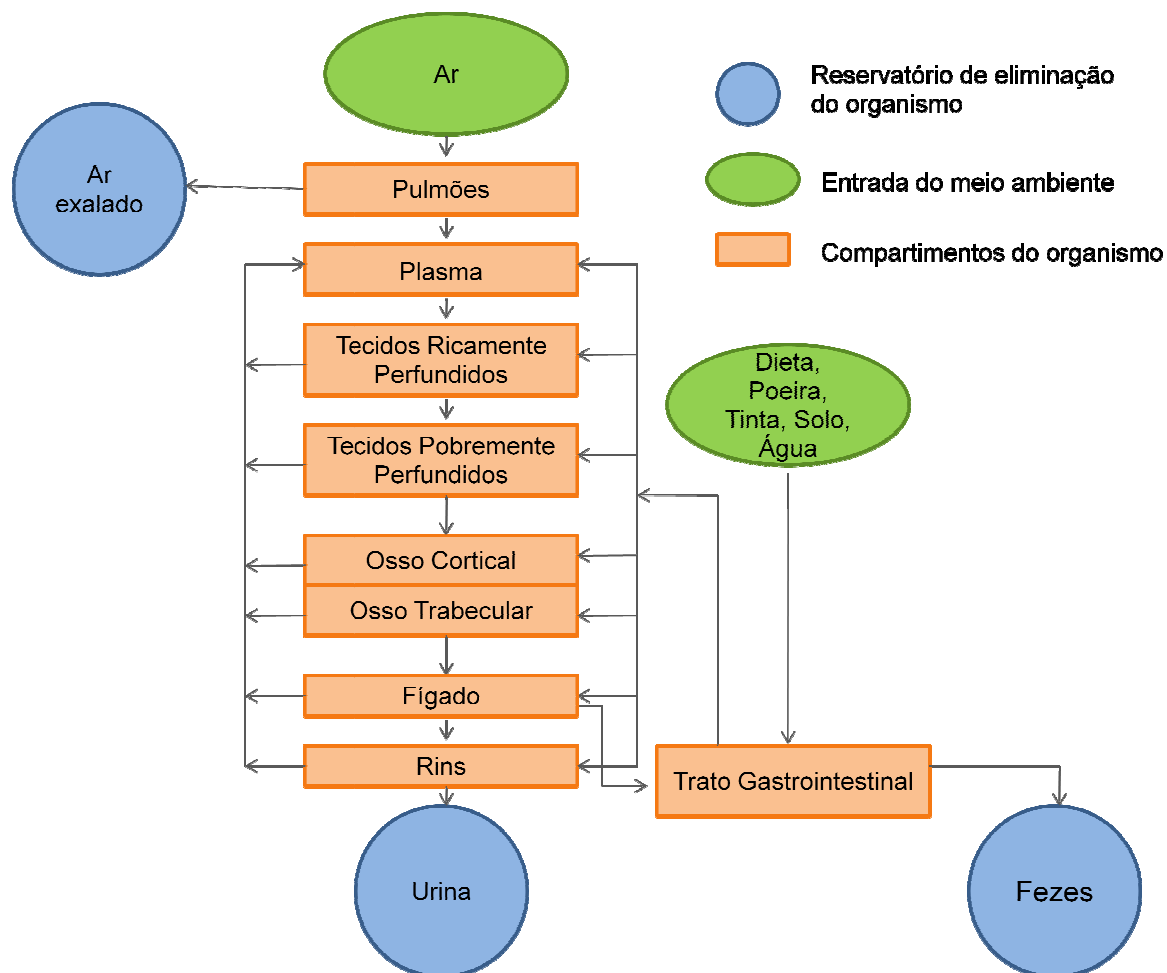


Figura 1: Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty .

Fonte: Modificado de MOREIRA; MOREIRA, 2004.

1.1.5 EFEITOS NOS DIFERENTES SISTEMAS

A intoxicação aguda pelo chumbo é bastante rara, mas muito perigosa, podendo levar a morte, enquanto que a intoxicação crônica é mais comum e possui efeitos deletérios nos diferentes órgãos e sistemas do organismo.

A toxicidade do chumbo resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio. As interações bioquímicas do chumbo com grupamentos sulfidril ($-SH$) são consideradas de grande significado toxicológico, visto que, se tal alteração ocorrer em uma enzima sua atividade pode ser alterada e resultar em efeitos tóxicos (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

Nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada aos efeitos neurotóxicos do chumbo em crianças enquanto que na população adulta os estudos estão voltados para os efeitos cardiovasculares da exposição a este metal. Ainda, vários estudos têm procurado elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações promovidas por este metal no intuito de verificar precocemente alterações significativas e suavizar seus efeitos para o organismo humano.

Na intoxicação por chumbo, as alterações no sistema nervoso ocorrem em concentrações sanguíneas menores que 10 µg/dL, em crianças, e aparece nos adultos em concentrações em torno de 40 µg/dL (CORDEIRO et al., 1996; PATRICK, 2006). É importante ressaltar que estes valores sanguíneos de plumbemia, nos quais as alterações nervosas aparecem, estão abaixo dos limites de referência para intoxicação no Brasil (BRASIL, 1978) assim como nos Estados Unidos da América (KOSNETT et al., 2007). Ambos os países consideram somente plumbemia acima de 60 µg/dL um fator de risco para danos à saúde, ou seja, somente a ultrapassagem deste valor significa exposição excessiva. No entanto, a literatura mostra que a exposição a concentrações inferiores ao valor de referência já promove resultados danosos ao sistema nervoso.

Os sintomas precoces da neurotoxicidade incluem irritabilidade, cefaléia, déficit de atenção, perda de memória, redução da cognição e alterações periféricas com comprometimento motor (MOREIRA; MOREIRA, 2004). A neurotoxicidade do chumbo ocorre, principalmente, por sua competição ou mimetização da ação do íon cálcio. Por este mecanismo, o chumbo promove alterações na entrada do cálcio na célula modificando a sinalização neuronal. O resultado consiste no aumento da liberação espontânea de neurotransmissores. Esta neurotoxicidade é, particularmente, danosa ao desenvolvimento do sistema nervoso fetal, pois o chumbo se liga a proteínas que formam a mielina, interferindo na formação da barreira hematoencefálica. Deste modo, o chumbo altera permanentemente a estrutura e a função cerebral (PATRICK, 2006; MOREIRA; MOREIRA, 2004)

Quanto à nefrotoxicidade do chumbo, sabe-se que tanto exposições agudas quanto crônicas causam danos morfofuncionais renais que podem resultar em doença renal progressiva e irreversível. As características de uma nefropatia aguda induzida pelo chumbo abrangem alterações e disfunções dos túbulos proximais manifestadas por aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria, aumento da excreção renal de sódio e redução

da excreção de ácido úrico. Na nefropatia crônica induzida pelo chumbo observa-se fibrose intersticial progressiva, dilatação dos túbulos, hiperplasia das células tubulares, redução da taxa de filtração glomerular, perda de capilares peritubulares, injúria tubular e presença de infiltrado inflamatório (RONCAL et al., 2007).

Os principais estudos que correlacionam a exposição ao chumbo, seus efeitos renais e a hipertensão mostram aumento da densidade de receptores beta adrenérgicos renais resultando em aumento da produção de renina (TSAO et al., 2000) e acréscimo da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (SHARIFI et al., 2004).

Os sintomas gastrintestinais são, há muito tempo, considerados característicos de envenenamento por chumbo, sendo a cólica abdominal um sintoma precoce. A cólica abdominal é considerando um importante sintoma de envenenamento de crianças por chumbo. Este quadro é observado em pumbemia entre 40 e 200 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

A anemia é uma descoberta extraordinária quanto às repercussões da intoxicação por chumbo no sistema hematopoiético. Geralmente, é de leve a moderada em adultos e, algumas vezes, é severa em crianças. A anemia observada na intoxicação pelo chumbo resulta de dois mecanismos principais: prejuízo na biossíntese do grupo heme, por interferência na transformação da protoporfirina em heme pela inibição da ferroquelatase, e aumento da destruição das hemácias. Os limiares do chumbo em sangue necessários para induzir um decréscimo dos níveis de hemoglobina em adultos e crianças estão estimados em, respectivamente, 50 e 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (PAOLIELLO; CHASIN, 2001; MOREIRA; MOREIRA, 2004; PATRICK, 2006).

O chumbo possui alta afinidade pelo grupamento sulfidrílico de proteínas e o efeito mais conhecido desta propriedade de ligação do chumbo com o grupo $-\text{SH}$ é a interferência na síntese do grupo heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que o chumbo possui alta afinidade pelos eritrócitos (cerca de 99% do chumbo sanguíneo estão ligados às células vermelhas) (LAWTON; DONALDSON, 1991). Esta alteração ocorre principalmente na enzima delta ácido aminolevulínico desidratase (delta-ALAD). A interferência na produção do grupo heme e a conseqüente redução na concentração sanguínea de hemoglobina são uns dos mais conhecidos efeitos do chumbo no organismo humano. O ácido aminolevulínico desidratase (ALAD) consiste em uma enzima crucial na intoxicação por chumbo,

pois a redução da ALAD resulta na diminuição da síntese do grupamento heme e no aumento do substrato delta ácido aminolevulínico (ALA), que por sua vez, gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido (O_2^-) (PATRICK, 2006). Associado a este efeito, o referido metal possui efeito desestabilizante das membranas celulares e nas células vermelhas do sangue reduz a fluidez das membranas e aumenta a porcentagem de hemólise. Esta hemólise parece resultar em aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) por peroxidação lipídica (LAWTON; DONALDSON, 1991).

Os efeitos sobre o sistema nervoso ocorrem sempre que a concentração de chumbo no sangue (Pb-S) forem da mesma ordem de grandeza daqueles que alteram a síntese da hemoglobina. Por isso, os distúrbios na biossíntese do grupo heme servem como “indicador metabólico” para a detecção precoce de exposição perigosa ao chumbo antes do aparecimento de sintomas clínicos (PATRICK, 2006).

1.1.6 EFEITOS CARDIOVASCULARES DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde as doenças cardiovasculares são, atualmente, a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo (WHO, 2011) e a exposição a agentes tóxicos, incluindo chumbo e outros metais, pode contribuir para o surgimento ou agravamento destes processos patológicos. Os estudos populacionais dos efeitos cardiovasculares do chumbo estão focados na associação entre sua exposição e o desenvolvimento de hipertensão arterial enquanto os estudos com animais experimentais procuram elucidar, além do efeito hipertensor, os mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares promovidas por este metal (NAVAS-ACIEN, 2007).

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos apontam uma associação entre a exposição ao chumbo e altos valores pressóricos e as evidências são suficientes para inferir uma relação causal entre estas duas variáveis (DEN et al., 2002; NAVAS-ACIEN, 2007). Um dos trabalhos pioneiros na investigação da associação entre exposição ao chumbo e altos valores pressóricos foi realizado PIRKLE e colaboradores (1985), utilizando o banco de dados do segundo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES II), realizado entre 1976 e 1980. Esta relação foi avaliada para homens brancos com idade entre 40-59 anos e foi

constatada uma associação positiva entre a concentração sanguínea de chumbo e os valores de pressão arterial sistólica e diastólica. No entanto, nem todos os estudos apresentam consenso na avaliação desta associação. Por exemplo, VUPPUTURI e colaboradores (2003) estudaram 10548 homens brancos e 4404 negros e sugeriram a existência de associação entre concentração sanguínea de chumbo e aumento de pressão sanguínea sistólica e diastólica em homens negros, mas não em homens brancos.

Portanto, após cem anos dos primeiros estudos que correlacionam a exposição ao chumbo às alterações nos parâmetros cardiovasculares, a contribuição deste metal ainda não está completamente elucidada (NAVAS-ACIEN, 2007) visto que muitos fatores dificultam o isolamento do chumbo como um fator de risco para a hipertensão arterial. Entre estes fatores está a quantidade de antioxidantes da dieta, a exposição ambiental a outras toxinas (como o hábito de fumar) e as dietas ricas em sal, açúcar, gordura e álcool (PATRICK, 2006). Um estudo desenvolvido por PETERS e colaboradores (2007) exemplifica esta dificuldade. Eles avaliaram 2280 homens da grande Boston e concluíram que o efeito do chumbo na hipertensão é mais pronunciado em indivíduos altamente estressados, demonstrando que o chumbo, acrescido de outros fatores, pode ser um agravante das alterações cardiovasculares.

As pesquisas desenvolvidas com animais experimentais procuram eliminar os fatores que dificultam o isolamento do chumbo como um mecanismo hipertensor. Diversos trabalhos, utilizando modelos animais de exposição crônica, têm demonstrado que a exposição ao chumbo consiste em um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial (VAZIRI et al., 1997; FARMAND et al., 2005; SHARIFI et al., 2004; VAZIRI et al., 1999; CARMIGNANI et al., 1999; GRIZZO; CORDELLINI, 2008). No entanto, recentemente, trabalhos do nosso laboratório mostraram que a exposição a baixas concentrações de chumbo, por curto período de tempo, é capaz de induzir aumento da pressão arterial em animais. (FIORIM et al., 2011; SIMÕES et al., 2011)

Os raros estudos que investigaram os efeitos cardíacos da exposição ao chumbo, diretos sobre a maquinaria contrátil sem interferência sistêmica, estão concentrados em nosso laboratório. Vassallo e colaboradores (2008) estudaram preparação de tiras isoladas de ventrículo direito (VD) submetidas à exposição aguda ao chumbo e

registraram redução da força isométrica e apontam o chumbo como um fator de risco capaz de alterar o funcionamento cardíaco. Concomitantemente, Fioresi e colaboradores (2009) investigaram os efeitos agudos do chumbo na contração isométrica de músculos papilares isolados do ventrículo esquerdo (VE) de ratos. Estes autores demonstraram, pela primeira vez, que o aumento da pressão ventricular induzida pela exposição aguda ao chumbo possui, além do envolvimento vascular, alterações diretas na contratilidade miocárdica. No entanto, devido à carência de estudos, ainda existem muitas incógnitas sobre os efeitos e mecanismos envolvidos com as ações diretas do chumbo sobre o coração.

Frente à escassez de estudos que investigam os efeitos diretos do chumbo sobre a maquinaria contrátil cardíaca, acrescida às divergências entre os estudos populacionais e às incógnitas em relação aos efeitos e mecanismos sobre a pressão arterial, são necessários estudos para determinar: a magnitude das diferenças entre os efeitos e os mecanismos envolvidos nas exposições agudas e crônicas; as concentrações sanguíneas determinantes para o aumento da pressão arterial; a interferência direta do referido metal sobre a contratilidade miocárdica e os mecanismos pelos quais ele provoca estas alterações.

No intuito de sanarmos estas carências, ainda que parcialmente, o presente estudo visa avaliar o comprometimento cardiovascular da exposição por 30 dias ao chumbo. O enfoque desta pesquisa está direcionado ao coração, visto que ainda existem muitas incertezas sobre os efeitos cardíacos diretos da exposição a este metal. Por fim, objetiva-se investigar os possíveis mecanismos prejudiciais à contratilidade miocárdica que contribuem com os efeitos deletérios do chumbo no sistema cardiovascular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo, enfocando sua ação direta sobre a contratilidade miocárdica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar, semanalmente, a pressão arterial dos animais.
- 2) Mensurar, por espectrometria de absorção atômica, a concentração sanguínea de chumbo dos animais e a distribuição tecidual deste metal, ao final dos 30 dias de exposição.
- 3) Investigar, *in vivo*, ao final do tratamento, os efeitos do chumbo na função ventricular direita e esquerda, assim como na pressão arterial e na frequência cardíaca.
- 4) Estudar os efeitos da exposição ao chumbo na contratilidade miocárdica, através da avaliação: do inotropismo cardíaco, dos parâmetros temporais da contração, da atividade do retículo sarcoplasmático, da permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio, da resposta das proteínas contráteis ao cálcio e, por fim, da participação da ativação β -adrenérgica nos músculos papilares do ventrículo esquerdo.
- 5) Avaliar, por medidas bioquímicas, os efeitos da exposição crônica ao chumbo sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase cardíaca e da enzima conversora de angiotensina cardíaca e plasmática.
- 6) Investigar, pela técnica de Western blot, a expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de cálcio no miócito cardíaco, após exposição por 30 dias ao chumbo.
- 7) Quantificar, através do hemograma, parâmetros celulares da linhagem vermelha sanguínea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

3.1.1 ANIMAIS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Estes animais foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controle de temperatura, com livre acesso à ração e água.

Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivissecção de animais de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

Os protocolos experimentais se adéquam aos princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA / EMESCAM) e estão inscritos neste comitê sob números 007/2007 e 003/2007.

3.1.2 MODELO EXPERIMENTAL

Com o intuito de desenvolvermos um modelo de exposição ao chumbo, os ratos Wistar, com aproximadamente dois meses de idade, eram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (Ct) e grupo tratado (Pb).

Os animais destinados ao grupo tratado recebiam, por um período de 30 dias, água de beber destilada acrescida de 100 ppm de acetato de chumbo (KARIMI et al., 2002). Os animais do grupo controle recebiam, pelo mesmo período descrito acima, água de beber destilada sem o acréscimo do acetato de chumbo. Cada grupo era alojado em gaiolas independentes, de forma que os animais do grupo controle não eram expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado.

3.2 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

3.2.1 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO TECIDUAL

Acredita-se que os efeitos deletérios promovidos pela exposição ao chumbo estão correlacionados à concentração de chumbo no sangue e sua deposição nos diversos órgãos (NAVAS-ACIEN et al., 2007).

No intuito de mensurar a concentração de chumbo no sangue e em outros tecidos, ao final do tratamento os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*) e submetidos à laparotomia. A artéria aorta abdominal foi puncionada para a coleta de cerca de 5 mL de amostra sanguínea. O sangue coletado foi armazenado em tubos de ensaio de PVC, pré-tratados com heparina (50 U / mL de sangue) e resfriados em geladeira (4 °C).

Além de amostra sanguínea, retiravam-se os seguintes órgãos e/ou tecidos: cérebro, aorta, coração, fígado, rim e tibia. Estes eram lavados com solução de salina 0,9 % para remoção do excesso de sangue, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados a -20 °C. Posteriormente, o sangue e os órgãos eram encaminhados, a 4 °C, ao Laboratório de Química Analítica (LQA) da UFES.

A análise da deposição tecidual e da concentração sanguínea do chumbo foi realizada através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica como descrito por Korecková-Sysalová (1997), através do espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (AAS5 EA, Carl Zeiss, Alemanha).

3.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA PELA TÉCNICA DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais de ambos os grupos foi verificada semanalmente, de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Este protocolo foi executado com a finalidade de avaliar os efeitos da exposição ao chumbo sobre os valores pressóricos dos animais acordados, ou seja, sem possíveis efeitos depressores dos anestésicos.

A metodologia utilizada nesse protocolo seguiu as recomendações do fabricante. Portanto, antes do início das medidas pressóricas os animais eram submetidos a um período de três dias de aclimatização. Esta adaptação era efetuada colocando-se os animais no aparelho e mimetizando-se a técnica de mensuração da pressão arterial. Esta aclimatização é necessária para reduzir o estresse dos animais durante seu confinamento no cilindro de acrílico para a aquisição dos dados e, conseqüentemente, amenizar possíveis interferências ambientais nos valores pressóricos obtidos dos animais.

No dia do registro pressórico os animais eram colocados em um cilindro de acrílico (*holter*). A cauda dos animais era conectada ao sensor de pressão do manguito (*cuff*) que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior do aquecedor a 37 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. Eram realizadas três medidas testes para verificar se todas as condições estavam adequadas para iniciar o procedimento. Como quesitos de avaliação para condição ideal eram observados: posição, adaptação e relaxamento do animal; temperatura e posição do *cuff* e ausência de evacuação durante o procedimento. Depois de confirmada a adequação, dez novas medidas eram realizadas e destas, as três com menos interferências eram escolhidas para calcular a média aritmética da PAS de cada animal.

3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A avaliação direta dos efeitos do chumbo nos parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares foi realizada ao final dos 30 dias de exposição ao metal. Após o período de tratamento, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*). O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose do anestésico utilizado.

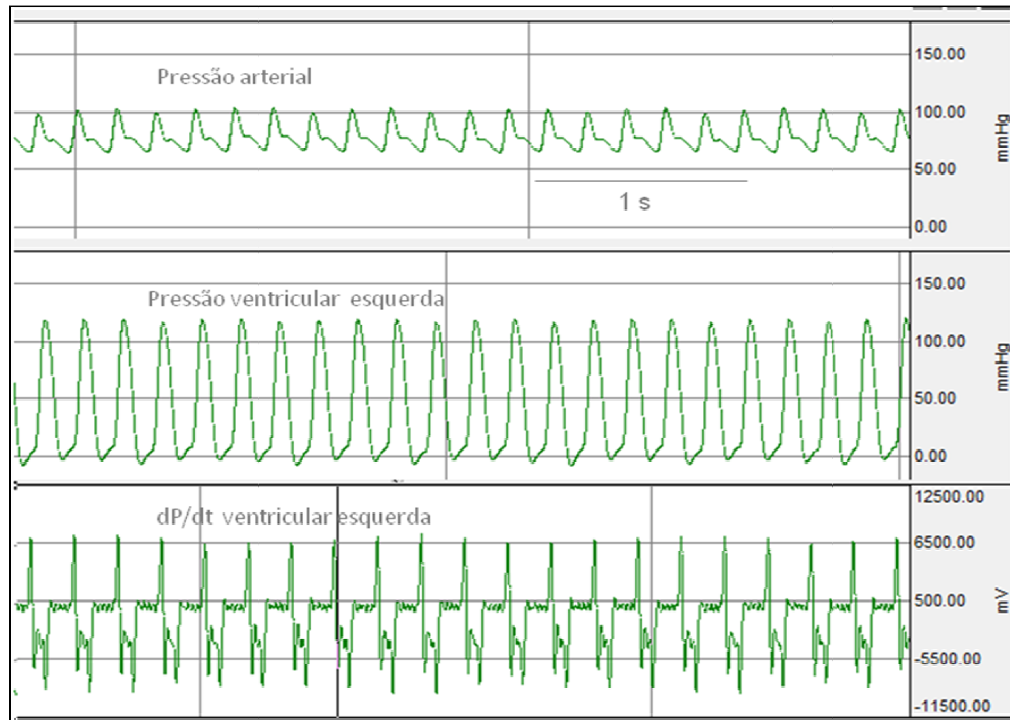
Após o procedimento anestésico, os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares. Para esta cateterização foram utilizadas cânulas de polietileno (*PE 50 Clay-Adams*) preenchidas com salina heparinizada (50 U/ml).

Os cateteres, já introduzidos nos vasos sanguíneos dos animais, eram acoplados a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador) interligado ao sistema Biopac, o qual permitia que as pressões arteriais, ventriculares e a frequência cardíaca (FC) fossem registradas (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA) e processadas por um computador. Para o processamento dos dados foi utilizado taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo.

A pressão ventricular direita foi medida pela introdução do cateter até o ventrículo direito, perfazendo o circuito via veia jugular direita. Já a aquisição da pressão intraventricular esquerda foi obtida com a introdução do cateter através da artéria carótida direita.

Após 20 minutos de estabilização da pressão arterial (PA) e FC foram registrados os seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM); FC; pressões sistólicas e diastólicas intraventriculares direita (PSVD; PDfVD) e esquerda (PSVE; PDfVE); derivadas de pressão intraventricular (dP/dt) positiva (+) e negativa (-), estas obtidas a partir dos registros de ondas de pressão intraventricular em função do tempo. As variações de dP/dt (+) foram utilizadas como índice de ações inotrópicas e as variações de dP/dt (-) foram utilizadas como índice de ações lusitrópicas. A figura 2 ilustra os registros típicos destes parâmetros hemodinâmicos avaliados.

A)



B)

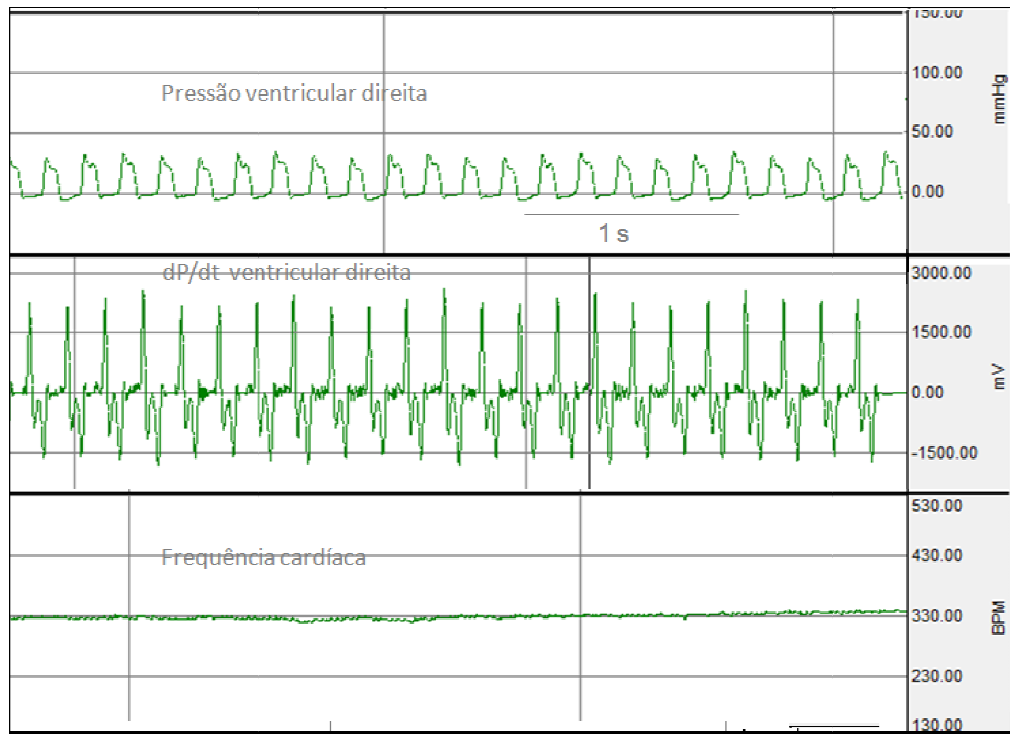


Figura 2: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. A) Registro da pressão arterial, da pressão ventricular esquerda e da onda da derivada temporal de pressão do ventrículo esquerdo. B) Registro da pressão ventricular direita, da onda da derivada temporal de pressão do ventrículo direito e da frequência cardíaca estabilizada.

3.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA PELA TÉCNICA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

3.5.1 MONTAGEM DA PREPARAÇÃO

Os efeitos diretos na contratilidade miocárdica da exposição ao chumbo por 30 dias foram avaliados pela técnica de registro de força isométrica de músculos papilares isolados. Ao final dos 30 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p*) e submetidos à toracotomia. Em seguida, os corações eram removidos e perfundidos com solução de *Krebs-Henseleit* (em mM: NaCl 120; KCl 5,4; CaCl₂ 1,25; MgCl₂ 1,2; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1,2; NaHCO₃ 24 e glicose 11) gaseificada com mistura carbogênica (5% de O₂ e 95 % de CO₂), pH 7,4, para dissecação dos músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE). Os músculos papilares removidos eram fixados por argolas, e então presos em uma extremidade fixa e outra ligada a um transdutor de força, em câmaras de vidro com volume de 20 mL de solução de *Krebs-Henseleit*. Para reduzir a possibilidade de hipóxia, os experimentos foram realizados sob baixa temperatura (26° C), como previamente descrito por Vassallo e Carvalho (1979), e continuamente gaseificados com mistura carbogênica.

Estimulavam-se eletricamente os músculos papilares do VE através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo (pulsos retangulares com duração de 12 ms e voltagem 1,5 vezes o limiar). A frequência de estimulação padrão era de 0,5 Hz (condição-estabilizada). Os músculos eram, então, estirados até o comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima (L_{max}). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de, pelo menos 40 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais.

A força contrátil foi mensurada através de um transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Byopac Systems, Inc; CA) e registrada por um sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA) através de um microcomputador. Para a aquisição dos dados foi utilizado taxa de amostragem de 500 amostras / segundo.

3.5.2 FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E CINÉTICA CONTRÁTIL

Para investigar se a exposição por 30 dias ao chumbo interfere no funcionamento da musculatura cardíaca, após o período de estabilização nas condições previamente descritas, foram mensuradas a força desenvolvida (F) (Figura 3), os tempos de ativação e relaxamento e as derivadas temporais de força (dF/dt) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares. Estes parâmetros foram avaliados em ambos os grupos experimentais.

A força desenvolvida foi considerada como a razão entre a amplitude da contração, em miligramas (mg), e o peso do músculo que desenvolveu a relativa força, em mg. Esta correção foi realizada com a finalidade de se evitar variações promovidas pela diferença no tamanho dos músculos utilizados.

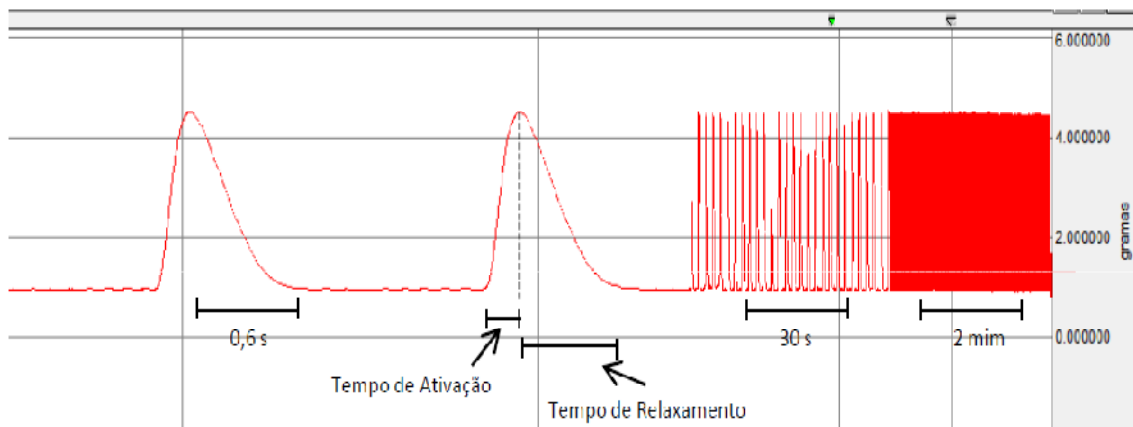


Figura 3: Registro típico de força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do VE de ratos Wistar submetidos à frequência de estimulação de 0,5 Hz e banhados com solução *Krebs-Henseleit*. O pico da deflexão positiva corresponde a força isométrica desenvolvida.

3.5.3 AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

O retículo sarcoplasmático (RS) é um importante sítio de regulação do ciclo de cálcio no miocárdio, colaborando tanto com sua contração quanto com seu relaxamento. Os íons cálcio entram no cardiomiócito via canais do tipo L para cálcio e ativam a liberação de cálcio do RS, via receptores de rianodina (ou canais para cálcio do RS). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na contração dos cardiomiócitos. Para que o músculo relaxe é necessário que haja extrusão destes íons, principalmente via trocador sódio e cálcio, e recaptação de cálcio para o RS, por ação da Ca-ATPase (SERCA 2) do RS (WIER; BALKE, 1999; BERS, 2005).

O protocolo das potenciações relativas pós-pausa (PPP) foi realizado no intuito de se obter, indiretamente, inferências quanto aos efeitos do chumbo na atividade funcional do RS. Estas potenciações foram obtidas com a reestimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos no estímulo elétrico aplicado no músculo (VASSALLO; MILL, 1988).

As PPP foram avaliadas como potenciações relativas, calculadas como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração anterior à pausa. Este procedimento tornou-se necessário para evitar variações promovidas pelo estado inotrópico diferenciado das contrações anteriores às pausas. A figura 4 ilustra um registro típico de PPP.

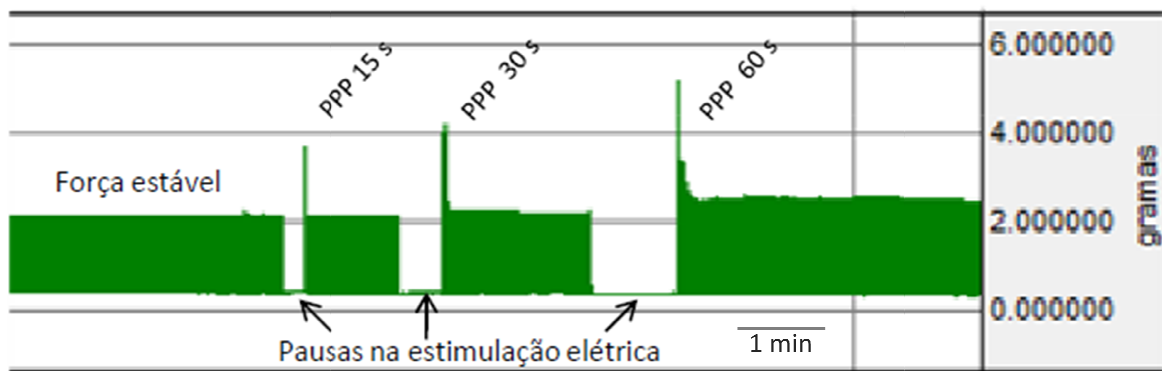


Figura 4: Registro típico de PPP de músculos papilares do VE de ratos Wistar obtidas com a reestimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos no estímulo elétrico aplicado no músculo.

3.5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE A MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR

Já está bem estabelecida a importância do íon cálcio no acoplamento excitação-contração cardíaco e, conseqüentemente, no inotropismo cardíaco (ENDO, 2006).

Para investigar se o tratamento crônico com chumbo alterou a resposta contrátil ao cálcio, foi realizada uma curva concentração-resposta a crescentes concentrações de deste íon no espaço extracelular (0,5 a 2 mM).

A resposta inotrópica na curva concentração-resposta foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada após o acréscimo na concentração extracelular de cálcio (figura 5).

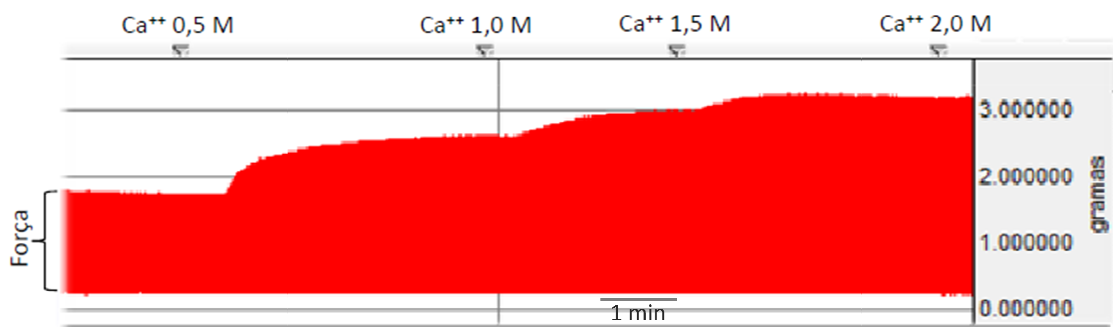


Figura 5: Registro típico da curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares do VE de ratos Wistar. A curva foi obtida com frequência de estimulação de 0,5 Hz e na presença de solução *Krebs-Henseleit*.

3.5.5 MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSSARCOLEMAL PELA MANOBRA “POST REST CONTRACTION-PRC”

O objetivo dessa manobra foi avaliar a interferência do tratamento com chumbo no influxo de cálcio transsarcolemal. Para tal, foi utilizada a solução “Krebs” previamente descrita, livre de cálcio (Ca^{++} free) e acrescida de 10 mM de cafeína, com a finalidade de depletar o conteúdo de cálcio intracelular e do RS.

A cafeína, na concentração utilizada, mantém os canais de rianodina abertos favorecendo a depleção do Ca^{++} presente no RS (LEITE et al., 1995) e, a ausência de Ca^{++} na solução favorece a extrusão deste do meio intra para o extracelular.

Os músculos foram lavados, por duas vezes, com solução sem Ca^{++} (Ca^{++} free) até as contrações serem abolidas (RINGER, 1883), então o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Segundos antes da estimulação reiniciar, as preparações foram reperfundidas com solução *Krebs-Henseleit* gaseificada nas condições padrões previamente descritas.

As contrações obtidas após repouso de 10 minutos, também chamadas de “post rest contraction” (PRC), foram calculadas como porcentagem da primeira contração após a pausa em relação à amplitude da contração estabilizada anterior à pausa.

3.5.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL NAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS E O BLOQUEIO COM VERAPAMIL

As contrações tetânicas representam uma maneira prática de investigar a resposta contrátil de preparações de miocárdio intacto com o retículo sarcoplasmático não-funcional (LEITE et al., 1995). Deste modo, através das contrações tetânicas podem-se inferir informações sobre o influxo de cálcio transsarcolemal e a responsividade das proteínas contráteis ao cálcio.

No intuito de avaliar possíveis efeitos do chumbo nestes mecanismos as contrações tetânicas foram realizadas após 30 minutos de tratamento com solução de “Krebs” acrescida de 10 mM de cafeína, a uma freqüência de estimulação de 10 Hz e duração de 15 segundos, como descrita previamente (LEITE et al., 1995).

As contrações tetânicas foram obtidas antes e após o bloqueio do influxo de cálcio transsarcolemal. Para este bloqueio, o verapamil (10 μ M) foi acrescido ao banho, por 20 minutos, antes da realização da próxima contração tetânica (LEITE et al., 1988). Para fins experimentais utilizamos a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações corrigidas pelo peso dos músculos papilares (figura 6).

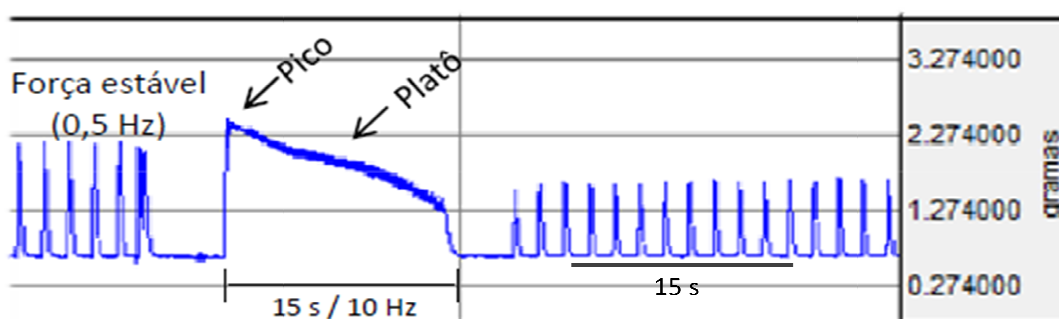


Figura 6: Registro típico de contração tetânica de músculos papilares do VE de ratos Wistar. Esta contração foi realizada na presença de cafeína a uma freqüência de estimulação de 10 Hz e duração de 15 segundos no estímulo elétrico. Está apontada na figura a força correspondente ao pico e ao platô desta contração.

3.5.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE À ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA

In vivo, a ativação simpática cardíaca, através da estimulação dos receptores β -adrenérgicos, resulta em efeitos inotrópico, lusitrópico e cronotrópico positivos (BERS, 2002). Para investigar se o tratamento crônico com chumbo alterou a

resposta simpática cardíaca foi realizada uma curva concentração-resposta ao isoproterenol (10 μ M a 10 mM), um agonista β -adrenérgico.

Para realização deste protocolo foi utilizada solução nutritora de “Krebs” com $[Ca^{++}]$ extracelular em 0,62 mM, pois preparações isoladas de ratos exibem melhores respostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de Ca^{++} (VASSALLO et al., 1994).

A resposta inotrópica induzida pelo agonista β -adrenérgico foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada após cada dose do agonista (Figura 7).

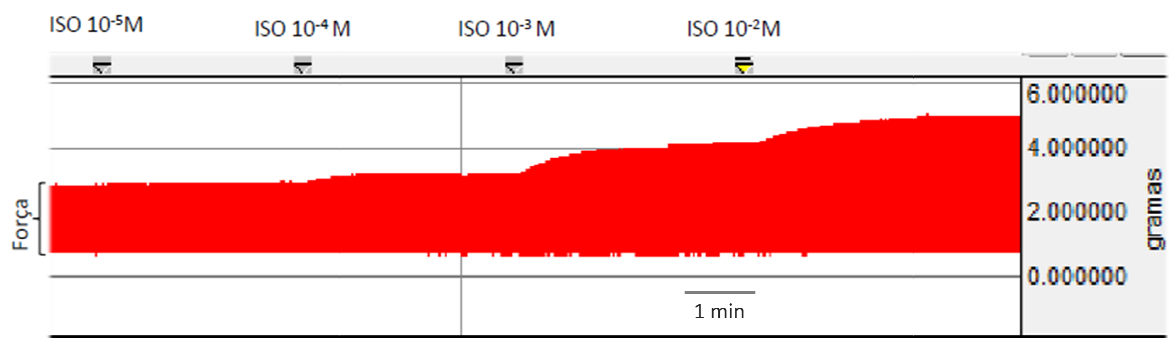


Figura 7: Registro típico de curva concentração-resposta ao isoproterenol obtida na preparação de músculos papilares do VE de ratos Wistar. Esta curva foi realizada pelo acréscimo de concentrações crescentes e isoproterenol à solução e Krebs-Henseleit com $[Ca^{++}]$ extracelular de 0,62 mM.

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ECA PLASMÁTICA E CARDÍACA

O efeito do tratamento com chumbo sobre a atividade da ECA foi mensurado por método fluorimétrico, de acordo com Oliveira e colaboradores (2000).

Para avaliação da atividade plasmática as amostras de plasma, em triplicata (3 μL), foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 μL "buffer" contendo o substrato da ECA, Hip-His-Leu 5 mM (Hipuril-l-histidil-l-leucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4 M e NaCl 0,9 M pH 8,3. A reação foi cessada pela adição de 190 μL de NaOH 0,34 M. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 μL 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 μL "buffer" contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4 M e 0,9 M NaCl pH 8,3, 190 μL de 0,34 M NaOH, 17 μL de OPA.

Para avaliação da atividade da ECA cardíaca amostras de ventrículos foram processadas em solução de homogeneização (4 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 e NaCl 0,9 M). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas. O homogeneizado do coração sofreu centrifugação a 12000 rpm, por 20 minutos à 4° C. Após centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C. A quantificação protéica das amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e os volumes aliqüotados de cada amostra foram ajustados para atingir uma carga de proteína igual a 80 μg .

As amostras aliqüotadas foram incubadas com a mesma solução contendo o substrato da ECA (5 mM Hip-His-Leu) utilizado para avaliação da atividade plasmática. O método utilizado para avaliar a atividade foi idêntico ao previamente descrito na avaliação da atividade plasmática e a quantificação da atividade tecidual

foi calculada como uma razão entre a atividade enzimática e a concentração total de proteínas nas amostras.

3.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na⁺,K⁺-ATPase

As amostras do material enzimático utilizado para determinar se o tratamento com chumbo é capaz de afetar a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (NKA) cardíaca foram extraídas como descrito por Stefanon et al. (2009). Os corações foram homogeneizados em 4 mL de solução contendo Tris-HCl 20 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (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-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) 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 recentrifugado a 10.000 rpm por 1 hora. O precipitado foi ressuspensionado 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 NKA foi determinada pela diferença da liberação de Pi pela hidrólise de 30 mM ATP entre o meio contendo NaCl 125 mM, MgCl₂ 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 min a 37 °C e a reação iniciada pela adição de trifosfato de adenosina (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 Chan et al. (1986). As amostras foram feitas em triplicata. A atividade foi expressa como nmol de Pi liberado por minuto por mg de proteína.

3.7 BIOLOGIA MOLECULAR

3.7.1 WESTERN BLOT PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

A técnica de Western blot foi utilizada para investigar se a exposição ao chumbo altera a expressão de proteínas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica. Foram mensuradas as expressões das seguintes proteínas: Ca⁺⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a); fosfolambam (PLB); fosfolambam fosforilado na serina-16 (fosfo-Ser¹⁶-PLB); fosfolambam fosforilado na treonina-17 (fosfo-Tre¹⁷-PLB); trocador sódio/cálcio (NCX); e a subunidade alfa-1 da NKA.

3.7.2 PREPARAÇÃO DO TECIDO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As amostras foram preparadas utilizando ventrículo esquerdo de ambos os grupos. Os órgãos eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até o momento do experimento. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de 4 °C, com tampão de homogeneização contendo: Tris- HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C a 12.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante era recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, era feita a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) através de espectrofotometria (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 80 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Aliquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95 °C.

3.7.3 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DAS AMOSTRAS

As amostras para quantificação das proteínas foram aplicadas (carregadas) em gel SDS-poliacrilamida 10 % (acrilamida 40 %; Tris HCl 1,5 M pH = 8,8; SDS 10 %; persulfato amônico –APS- 10 % e Temed). As proteínas de menor peso molecular (fosfolambam e suas subunidades fosforiladas) foram carregadas em gel SDS-poliacrilamida 15 %. Previamente à aplicação das proteínas, os géis foram imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) a qual permanecia dentro de um recipiente com gelo. Assim as proteínas eram submetidas à eletroforese através de corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura), durante aproximadamente duas 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 papel Whatman, a membrana e o gel 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 4 °C por uma hora usando uma corrente de 25 V em um “Semi-dry” (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

3.7.4 INCUBAÇÃO COM OS ANTICORPOS

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5 %, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 90 minutos, sob agitação com os seguintes anticorpos primários diluídos em uma solução a 5 % de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5):

- SERCA-2a: anticorpos monoclonais de camundongo anti-SERCA2 ATPase, 1:1000, Thermo Scientific, Rockford, USA. Ca⁺⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático (RS) responsável pela recapturação dos íons Ca⁺⁺ do citosol pelo RS.

- PLB: anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLB, Thermo Scientific, 1:1000, Rockford, USA. É uma proteína de 52 aminoácidos que regula a Ca^{++} ATPase do RS. Sob a estimulação adrenérgica o PLB é fosforilado na serina 16 e treonina 17 e estimula o transporte de cálcio através da membrana do RS, favorecendo portanto, o relaxamento.
- fosfo-Ser¹⁶-PLB: anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-Ser¹⁶-PLB, 1:5000, Badrilla, West Yorkshire, UK. Subunidade fosforilável sob ação direta da proteína quinase dependente de AMPcíclico (PKA), durante a estimulação simpática.
- fosfo-Tre¹⁷-PLB: anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-Tre¹⁷-PLB, 1:5000, Badrilla, West Yorkshire, UK. Subunidade fosforilável sob ação direta da proteína quinase dependente de Ca^{++} -calmodulina (CaMKII)
- NCX: anticorpos monoclonais de camundongo anti-NCX, 1:1000, Thermo Scientific, Rockford, USA. Principal mecanismo de extrusão de cálcio da célula. Carreia três íons Na^+ para o citoplasma para cada Ca^{++} extruído.
- α -1 NKA: anticorpo monoclonal de rato anti- α -1 NKA, 1:500, Millipore, San Francisco, USA. Esta subunidade compõe 88 % da corrente total gerada pela atividade da NKA e está expressa, predominantemente, na superfície do sarcoplasma.
- GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase): anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH, 1:5000, Abcam Cambridge MA, USA. Usado para corrigir a expressão das proteínas estudadas.

As membranas foram incubadas com anticorpo primário durante toda noite a 4 °C. Após o período de incubação, 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 cinco minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos secundários: imunoglobulina IgG anti-camundongo ou anti-coelho (1:5000, Assay Designers , Hines Drive, Ann Arbor, MI). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do excesso de anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20.

3.7.5 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas correspondentes a SERCA-2a, PLB, fosfo-Ser¹⁶-PLB, fosfo-Tre¹⁷-PLB, NCX, subunidade alfa-1 da NKA e ao GAPDH foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, 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 ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

3.8 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

O hemograma foi realizado por processo automático através de leitura de luz e de impedância elétrica. O aparelho mediu a série vermelha quanto à hemoglobina, ao VCM (volume corpuscular médio) e o RDW (*Red Cell Distribution Width*), índices referentes à concentração de hemoglobina, ao tamanho das hemácias e a porcentagem de variação dos volumes obtidos, respectivamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de Student não pareado, análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias. Quando a análise de variância apresentava significância, esta era seguida pelos testes *post-hoc* de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, para a ANOVA uma ou duas vias.

A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA) e o GB-STAT (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD, USA).

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 FÁRMACOS E REAGENTES

- 2-Hidroxiethylmercaptano (-mercaptoetanol) (Sigma)
- 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 fosfolambam (Thermo Scientific)
- Anticorpo produzido em camundongo para NCX (Thermo Scientific)
- Anticorpo produzido em camundongo para SERCA-2 (Thermo Scientific)
- Anticorpo produzido em camundongo para α -1 NKA (Millipore)
- Anticorpo produzido em coelho para fosfolambam fosforilado na serina 16 (Badrilla)
- Anticorpo produzido em coelho para fosfolambam fosforilado na treonina 17 (Badrilla)
- Anticorpo produzido em rato para GAPDH (Abcam)
- Azul brilhante de coomassie G (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Cafeína (B.HERZOG)
- Cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Cloridrato de verapamil (Teuto)

- Diidrogenofotato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (VETEC)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Heparina (Roche)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Hip-His-Leu (Sigma)
- His-Leu (Sigma)
- Imunoglobulina IgG anti-camundongo para GAPDH (Assay Designers)
- Imunoglobulina IgG anti-coelho (Millipore)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Isoproterenol (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- Nitrato de magnésio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (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)
- Tris-HCl (Sigma)
- Triton X-100 (VETEC)
- Uretana (Sigma)

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO TECIDUAL

Para avaliarmos a eficácia do tratamento em promover um modelo de exposição ao chumbo, ao final dos 30 dias de exposição, amostras de sangue e tecidos dos animais foram colhidas para dosagem espectrométrica da concentração de chumbo nestas repartições. Na tabela 1 observa-se que os animais do grupo tratado apresentaram uma concentração sanguínea de chumbo de aproximadamente 13 µg/dL, enquanto os animais do grupo controle apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do aparelho, que consiste em 0,5 µg/dL.

Os valores encontrados nos animais do grupo tratado são inferiores ao índice biológico máximo permitido no Brasil, que consiste em 60 µg/dL, de acordo com Norma Regulamentadora n° 7 do Ministério do Trabalho (BRASIL, 1978). Esta lei dispõe sobre o programa de controle médico e saúde ocupacional e limita para 60 µg/dL o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não correm risco de dano à saúde, ou seja, somente a ultrapassagem deste valor significa exposição excessiva.

Tabela 1: Dosagem sanguínea de chumbo

Dosagem sanguínea de chumbo		
	µg/dL	n
Ct	< 0,5	6
Pb	13,6 ± 1,07*	6

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t-Student*. * $p < 0,05$ vs Ct. Limite detecção: 0,5 µg/dL.

Na figura 8 está expressa a deposição de chumbo nos seguintes órgãos e tecidos avaliados: rim (A), coração (B), osso (C), pulmão (D), cérebro (E) e aorta (F). Evidencia-se o acúmulo deste metal nos tecidos dos animais do grupo tratado em comparação aos do grupo controle, com exceção do cérebro, que apresentou concentração similar entre os grupos.

A concentração de chumbo no pâncreas, no baço e nos testículos também foi avaliada, entretanto, estes se mostraram como sítios de baixa deposição do metal, visto que a concentração, nos animais do grupo tratado, não excedeu 0,04 $\mu\text{g/g}$ (dados não mostrados).

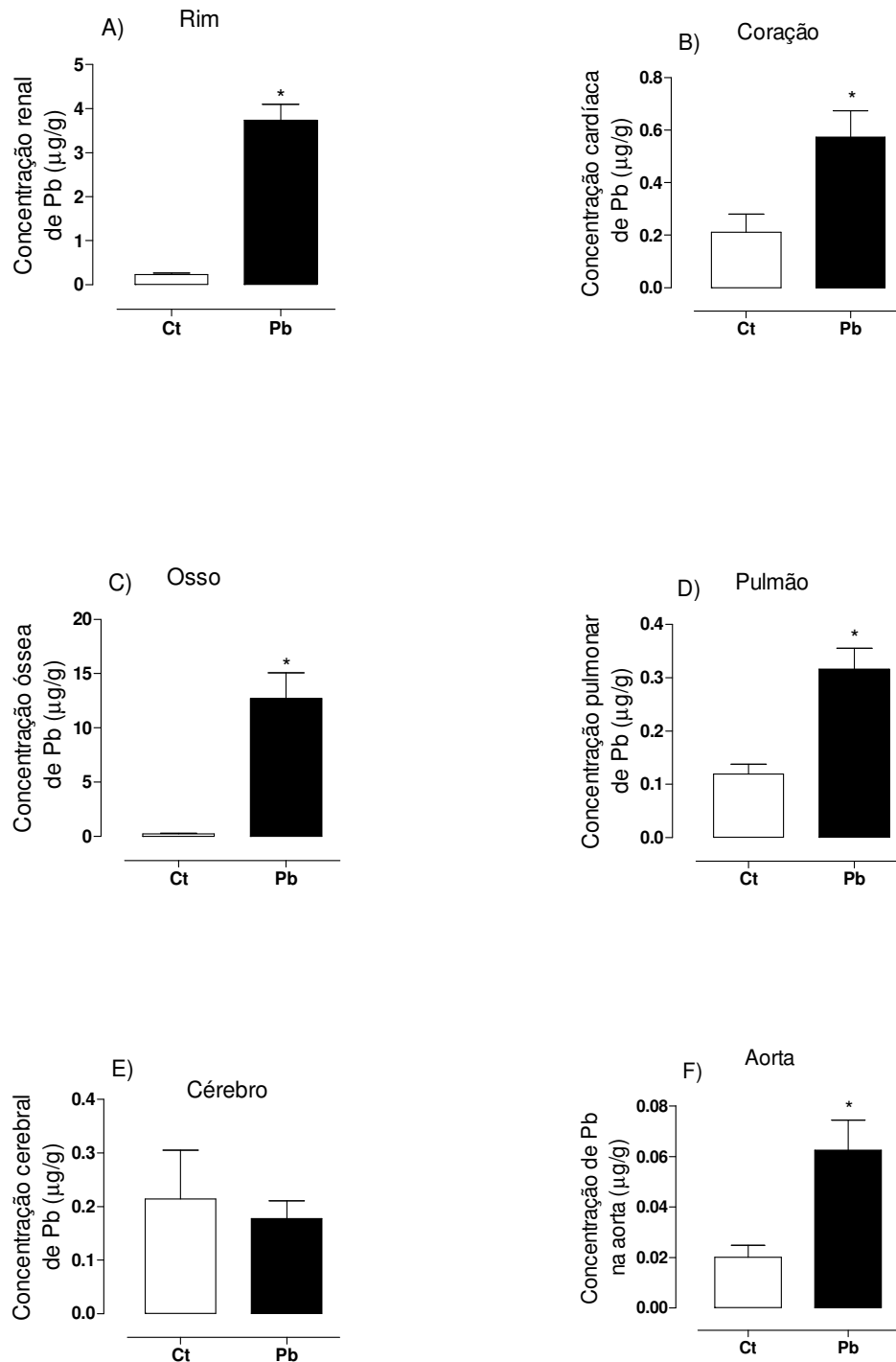


Figura 8: Concentração tecidual de chumbo nos ratos dos grupos Ct e Pb após 30 dias de tratamento com chumbo ou água. $n = 7$. * $p < 0,05$ vs Ct. Teste *t de Student* não-pareado.

A figura 9 ilustra a distribuição deste metal entre os tecidos estudados. Esta distribuição foi corrigida pela proporção da massa tecidual obtida, visto que não foi extraído todo o tecido ósseo do animal, por exemplo, para calcularmos a quantidade de chumbo neste tecido. O que foi considerado é a capacidade que o tecido possui em acumular chumbo, portanto, não corresponde ao total de chumbo em determinado compartimento, mas sim a porcentagem relativa de chumbo que existe neste compartimento em comparação aos demais compartimentos avaliados. O sítio de maior acúmulo foi o tecido ósseo com valor correspondente a 72 % do total de chumbo entre os órgãos avaliados. O segundo sítio de maior concentração foi os rins, com 21 % do conteúdo de chumbo. O coração, objeto central de nossa pesquisa, apresenta cerca de 3 % do conteúdo de chumbo.

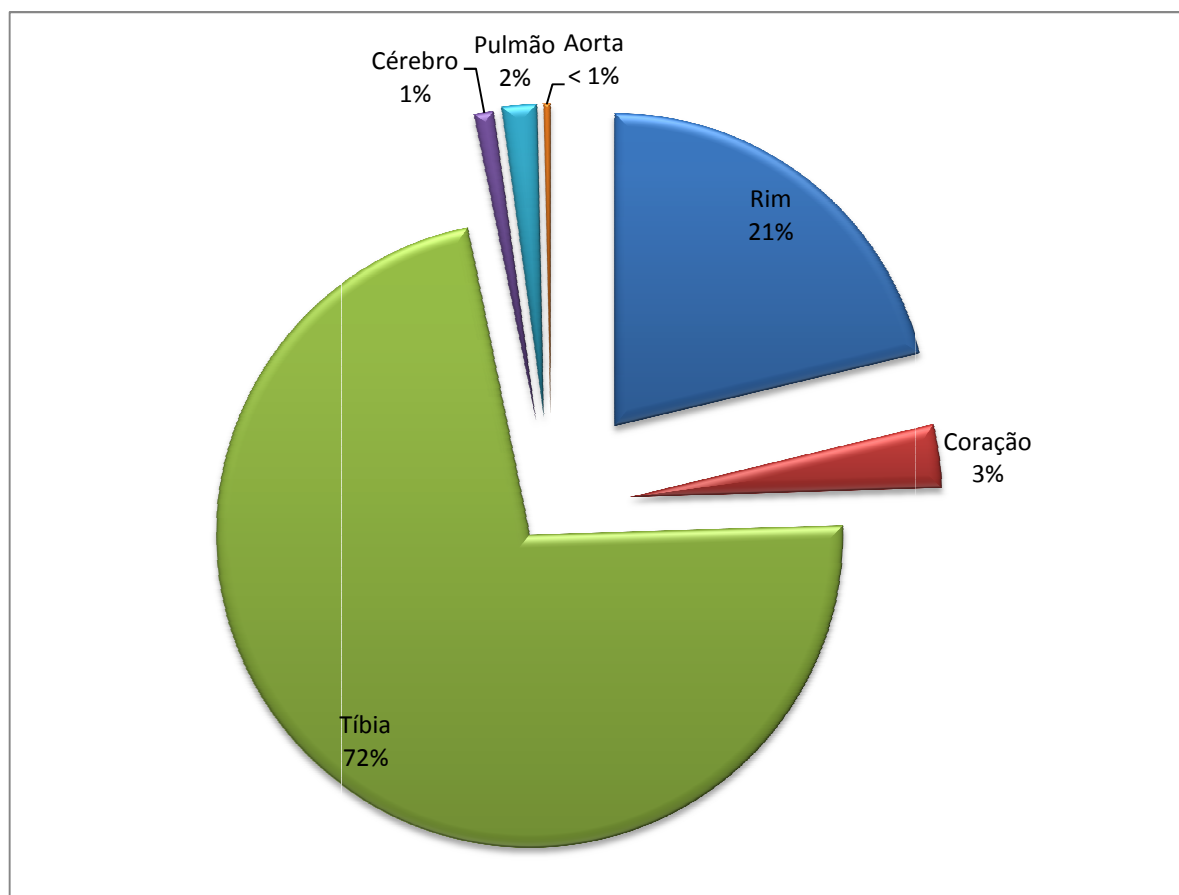


Figura 9: Proporção tecidual de chumbo, nos animais do grupo tratado, ao final dos 30 dias de exposição ao metal. Esta proporção foi calculada como porcentagem relativa de chumbo que existe em cada compartimento em comparação aos demais compartimentos avaliados.

5.2 AVALIAÇÃO PONDERAL

5.2.1 AVALIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O peso dos animais foi registrado imediatamente antes do início do tratamento (peso inicial) e ao longo das quatro semanas seguintes de exposição ao chumbo. Na tabela 2 e na figura 10 estão apresentadas as medidas dos pesos médios semanais dos animais. O peso corporal era similar entre os grupos no início do tratamento e a exposição ao chumbo não promoveu variações no ganho de peso dos animais. Ao final dos 30 dias de tratamento, os animais apresentaram um incremento similar de, aproximadamente, 40 % em relação ao peso inicial.

Tabela 2: Parâmetros ponderais de ratos expostos ou não-expostos ao chumbo.

	Peso inicial	Peso na 1ª semana (g)	Peso na 2ª semana (g)	Peso na 3ª semana (g)	Peso na 4ª semana (g)
Ct (n=10)	197 ± 8,8	247 ± 6,8	288 ± 7,4	317 ± 6,5	335 ± 11
Pb (n=10)	188 ± 4,8	246 ± 4,1	285 ± 6,0	319 ± 6,5	336 ± 12

Avaliação do peso corporal entre os grupos Ct e Pb antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição. $p > 0,05$. ANOVA 2 vias.

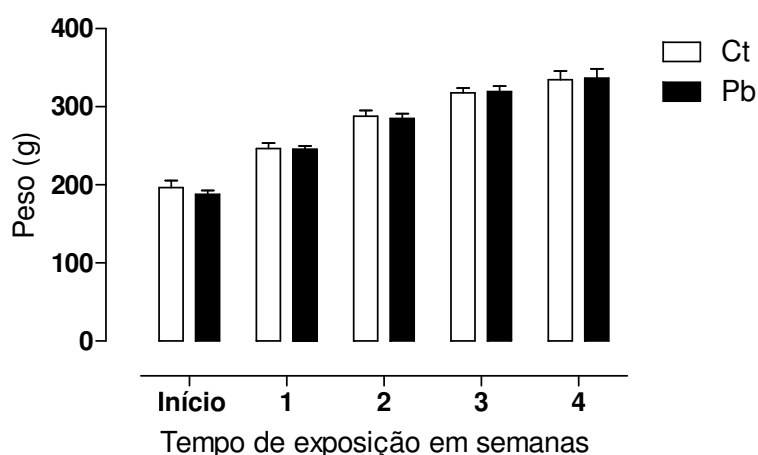


Figura 10: Comparação entre o peso corporal dos grupos Ct e Pb ao longo das quatro semanas de exposição ao metal. Os resultados estão expressos em média ± EPM. $n = 10$ em ambos os grupos. $p > 0,05$. ANOVA 2 Vias.

5.2.3 AVALIAÇÃO PONDERAL DAS CÂMARAS CARDÍACAS

Os parâmetros ponderais das câmaras cardíacas foram obtidos ao final dos 30 dias de tratamento. Para obtenção destes dados os ventrículos direito e esquerdo foram dissecados, lavados em solução salina (NaCl 0,9 %), enxugados em papel toalha para retirada do excesso de líquidos e pesados. Para evitar possíveis “falsos resultados” em detrimento do tamanho dos ventrículos, o peso das câmaras foi corrigido pelo peso corporal de cada animal correspondente. A figura 11 mostra que a exposição ao chumbo não modificou a razão entre as câmaras ventriculares direita (Figura 11A) e esquerda (Figura 11B) e o peso corporal total.

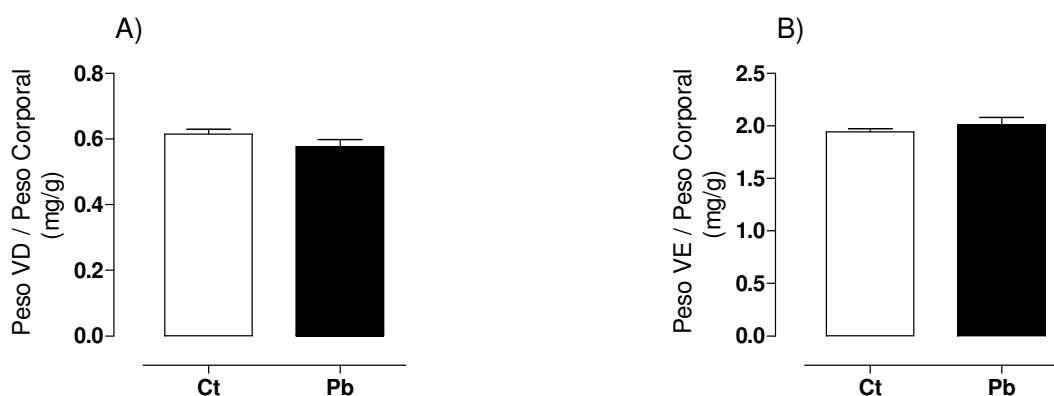


Figura 11: Comparação entre o peso das câmaras ventriculares direita e esquerda, corrigidas pelo peso corporal dos respectivos animais, dos grupos Ct e Pb, ao final do tratamento. $n=7$ em ambos os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. $p > 0,05$. Teste *t* de *Student* não-pareado.

5.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO

A avaliação semanal da pressão arterial sistólica foi realizada por pletismografia de cauda. A figura 12 elucida o perfil pressórico dos animais ao longo das quatro semanas de tratamento. Visualiza-se que a pressão arterial sistólica era estatisticamente igual entre ambos os grupos no início do tratamento (Ct= $123 \pm 3,1$ mmHg; Pb= $124 \pm 2,4$ mmHg). No entanto, desde a primeira semana de exposição ao metal os animais do grupo tratado apresentaram incremento na pressão, fato que não foi verificado nos animais do grupo controle (Ct= $124 \pm 3,3$ mmHg; Pb= $141 \pm 2,4$ mmHg). A pressão arterial sistólica dos animais tratados com chumbo manteve-se elevada nas semanas seguintes. Ao final do tratamento os valores foram, aproximadamente, de 127 mmHg e 140 mmHg, respectivamente, para os animais do grupo controle e tratado.

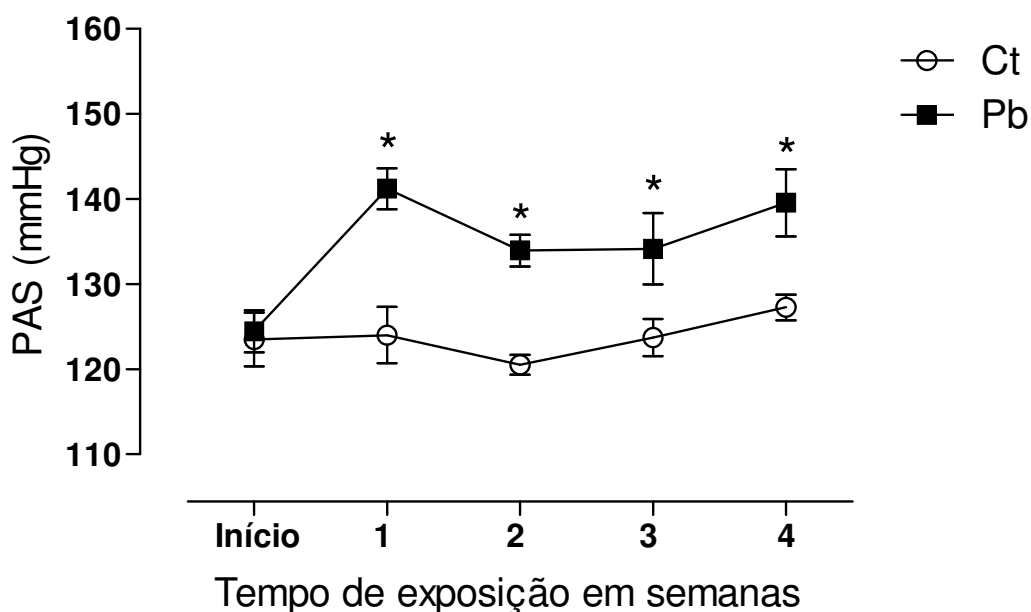


Figura 12: Avaliação da pressão arterial sistólica dos grupos Ct e Pb ao longo das quatro semanas de exposição ao metal. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. ANOVA 2 vias seguida de pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs mesmo período de exposição no grupo controle Ct.

5.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Os parâmetros arteriais e o desempenho ventricular *in vivo* foram avaliados através de medidas hemodinâmicas dos animais anestesiados, ao final dos 30 dias de exposição. Estes parâmetros estão apresentados na tabela 3 e nas figuras 13, 14 e 15.

Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos expostos e não-expostos ao chumbo.

	Controle	n	Chumbo	n	<i>p</i>
PAS (mmHg)	96 ± 3,79	12	116 ± 1,37*	11	0,0001
PAD (mmHg)	60 ± 2,93	12	70 ± 3,38*	10	0,0388
PAM (mmHg)	74 ± 3,34	12	86 ± 2,19*	10	0,0104
PSVE (mmHg)	104 ± 5,85	10	120 ± 2,51*	12	0,0152
PDfVE (mmHg)	2,56 ± 0,67	10	2,33 ± 0,71	12	0,8213
dP/dt + VE (mmHg/s)	3795 ± 332	10	5558 ± 235*	12	0,0175
dP/dt - VE (mmHg/s)	-4928 ± 253	9	-6464 ± 295*	12	0,0013
PSVD (mmHg)	30 ± 1,56	9	30 ± 1,73	9	0,7954
PDfVD (mmHg)	1,85 ± 0,67	9	0,94 ± 0,50	9	0,2937
dP/dt + VD (mmHg/s)	1363 ± 200	9	1480 ± 209	9	0,6914
dP/dt - VD (mmHg/s)	-1550 ± 134	9	-1689 ± 147	9	0,4936
FC (bpm)	307 ± 10	12	348 ± 16*	12	0,0450

Pressão Arterial Sistólica (PAS); Pressão Arterial Diastólica (PAD); Pressão Arterial Média (PAM); Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); pressão diastólica final do VE (PDfVE); derivada temporal positiva de pressão do VE (dP/dt + VE) e negativa (dP/dt - VE); pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); pressão diastólica final do VD (PDfVD); derivada temporal positiva de

pressão do VD ($dP/dt + VD$) e negativa ($dP/dt - VD$) e frequência cardíaca (FC). Os resultados estão expressos em média \pm EPM. Teste *t de Student* não-pareado. * $p < 0,05$ vs Ct.

Os animais tratados com chumbo apresentaram elevação nos parâmetros pressóricos arteriais e na FC (Figura 13). Na figura 13A observa-se que o tratamento com acetato de chumbo promoveu aumento aproximado de 20 mmHg na PAS, enquanto nas pressões arteriais diastólica e média este aumento foi cerca de 10 mmHg (figura 13B e 13C). A FC dos animais do grupo tratado mostrou-se elevada em relação ao grupo controle em aproximadamente 50 bpm (Figura 13D).

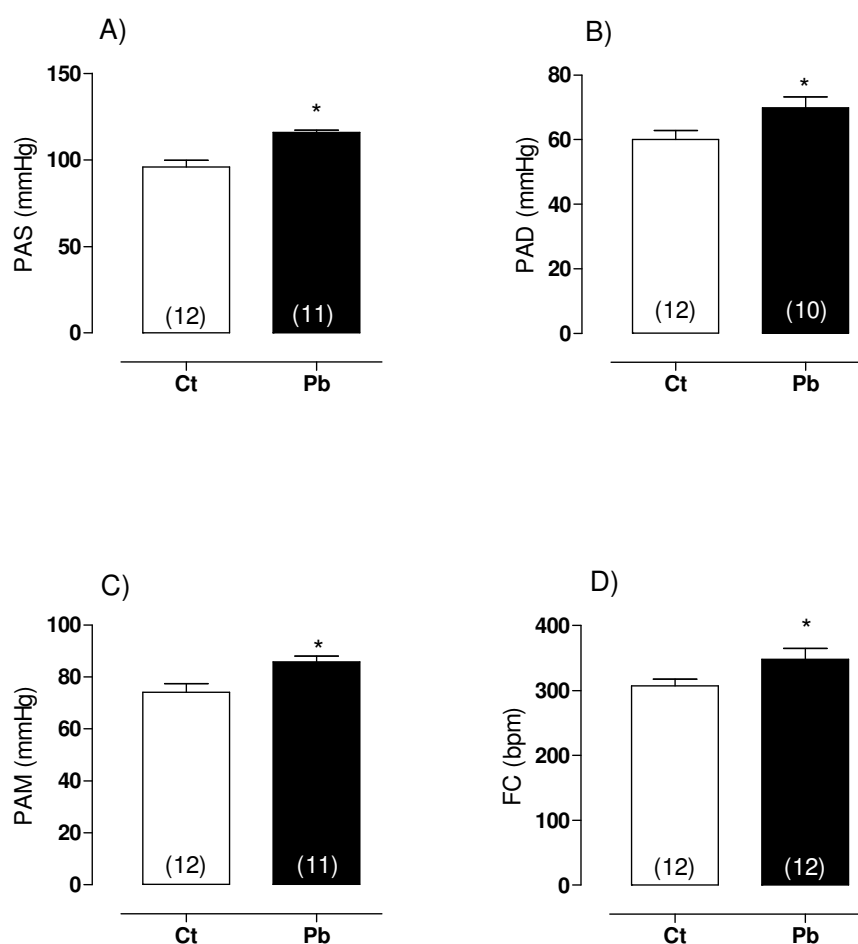


Figura 13: Avaliação, *in vivo*, de parâmetros pressóricos arteriais e FC dos ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. * $p < 0,05$ vs Ct. Teste *t de Student* não-pareado.

A avaliação do desempenho ventricular esquerdo, elucidado na figura 14 e tabela 3, mostra que a exposição ao chumbo foi capaz de elevar a PSVE, assim como as derivadas temporais de pressão, tanto a positiva (figura 14A) que é um índice de contratilidade, como a negativa, que é um índice de relaxamento (figura 14B).

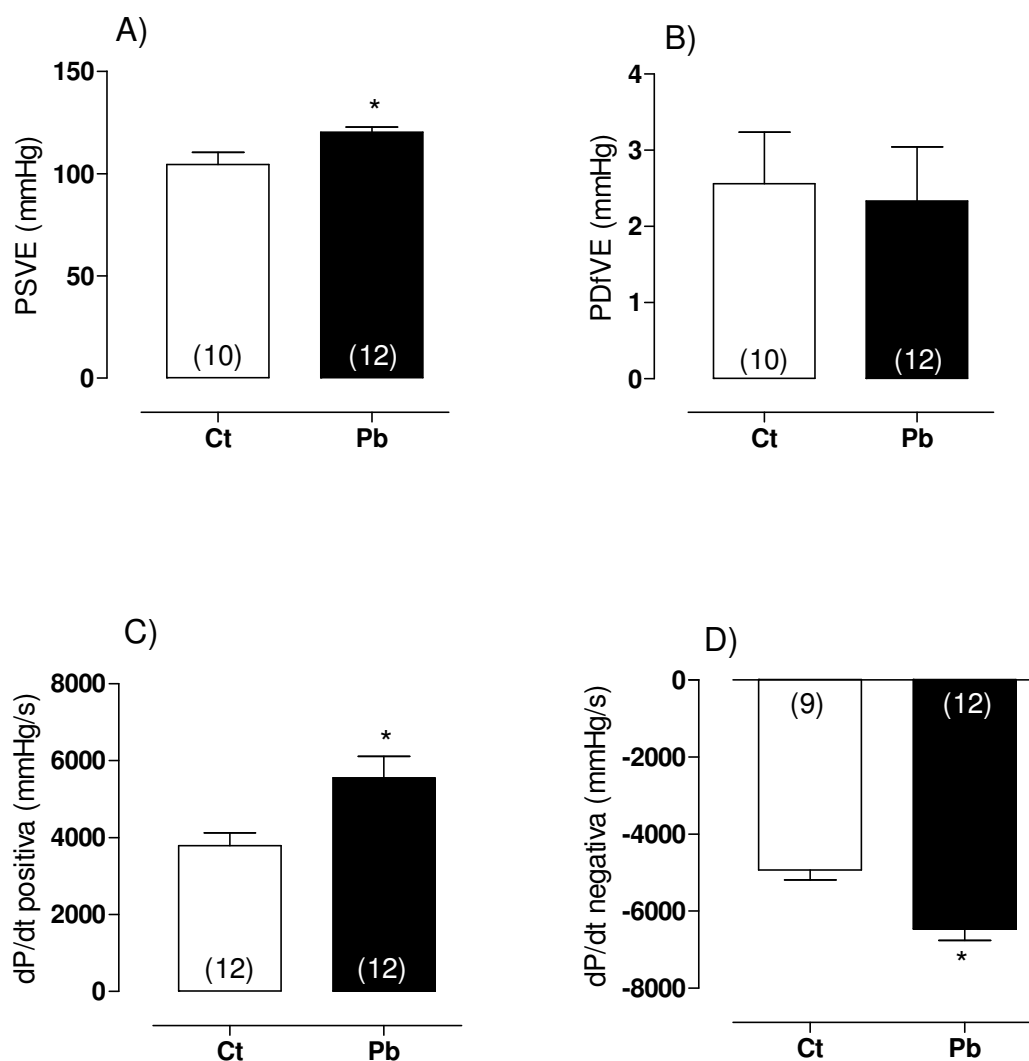


Figura 14: Avaliação, *in vivo*, de parâmetros hemodinâmicos ventriculares esquerdo dos ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. *p < 0,05 vs Ct. Teste *t de Student* não-pareado.

Quando investigados os efeitos do chumbo nos parâmetros pressóricos e contráteis do ventrículo direito (VD) *in vivo*, observa-se, na figura 15, que o tratamento com chumbo não modificou os parâmetros avaliados nesta câmara.

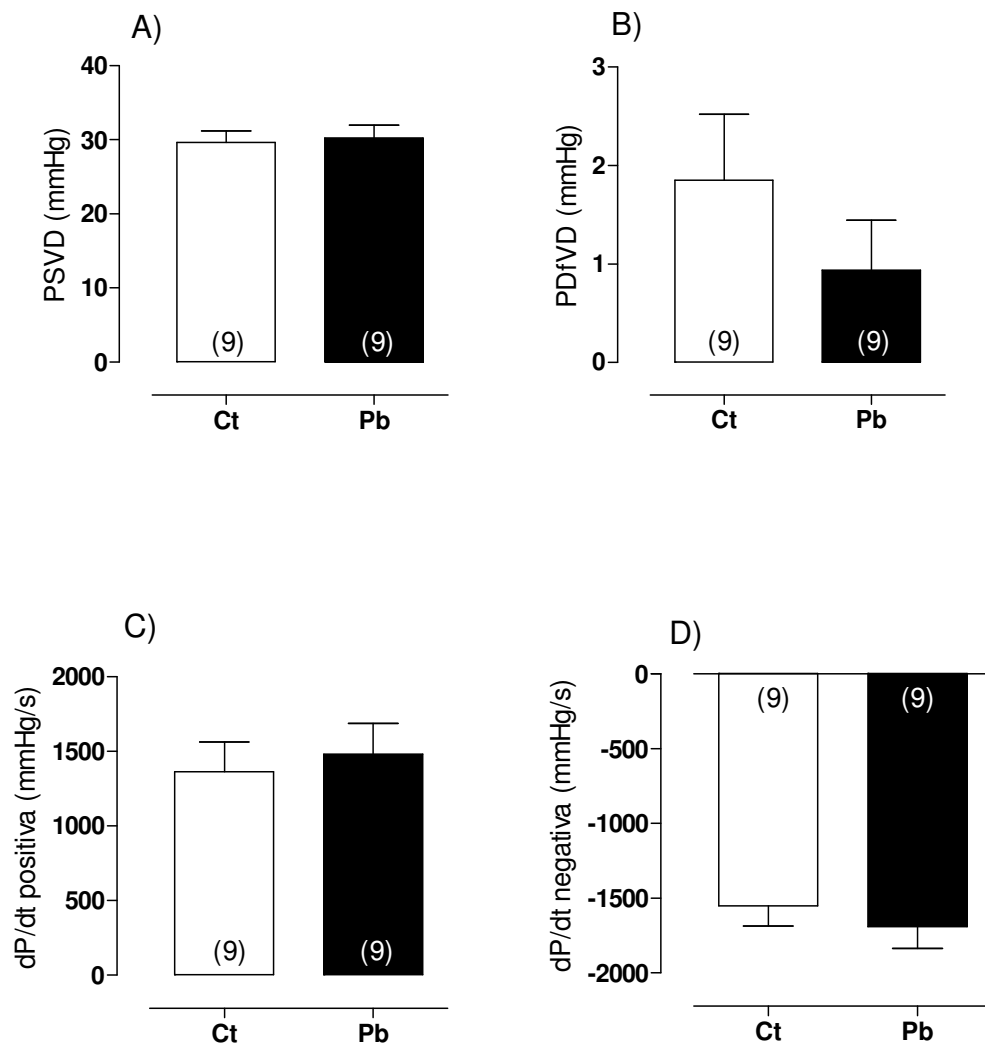


Figura 15: Avaliação, *in vivo*, de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito dos ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. $p > 0,05$. Teste *t* de Student não-pareado.

5.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

5.5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL DOS PAPILARES

O peso dos papilares foi obtido ao final de todos os protocolos experimentais realizados *in vitro* e estão apresentados na figura 16. Na preparação de músculos papilares isolados três protocolos experimentais foram realizados para avaliação concomitante dos seguintes parâmetros:

1° Protocolo: avaliação da força contrátil, do inotropismo cardíaco, dos parâmetros temporais da contração, das PPP e da curva concentração-resposta ao cálcio extracelular.

2° Protocolo: avaliação das PPP, da PRC e da curva concentração resposta ao isoproterenol.

3° Protocolo: avaliação das PPP e das contrações tetânicas.

Portanto, devido à realização de protocolos experimentais independentes, o número amostral varia entre os parâmetros estudados na preparação de músculos papilares isolados do VE.

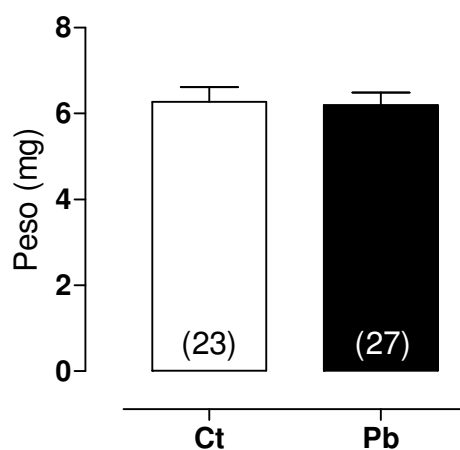


Figura 16: Peso úmido dos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p > 0,05$. Teste *t de Student* não-pareado.

5.5.2 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E CINÉTICA CONTRÁTIL

A figura 17 demonstra os efeitos do tratamento com 100 ppm de chumbo, por 30 dias, na força contrátil de músculos papilares do VE. Apesar da exposição ao chumbo culminar em aumento de PAS e PSVE (Figuras 12, 13 e 14) a força contrátil dos músculos papilares isolados manteve-se inalterada.

Pela avaliação dos índices de contratilidade e relaxamento, avaliados pelas dF/dt positivas e negativas, pode-se observar (Figuras 18A e 18B) que a exposição ao chumbo, do mesmo modo que no desenvolvimento de força isométrica, não modificou estes parâmetros inotrópicos.

Em relação aos parâmetros temporais da contração, observa-se nas figuras 19A e 19B que os tempos de ativação e relaxamento destes músculos também se mantiveram inalterados.

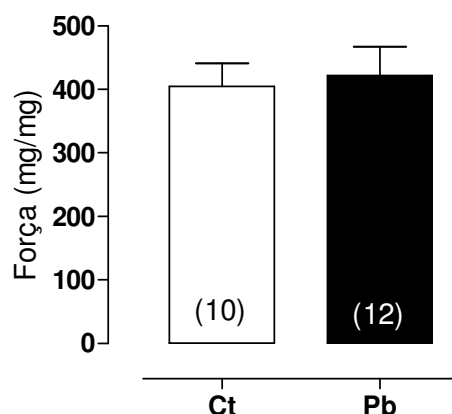


Figura 17: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de VE dos ratos dos grupos Ct e Pb após estabilização em solução de Krebs Henseleit com $[Ca^{++}]$ extracelular 1,25 mM e frequência de estimulação de 0,5 Hz. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p > 0,05$. Teste *t de Student* não-pareado.

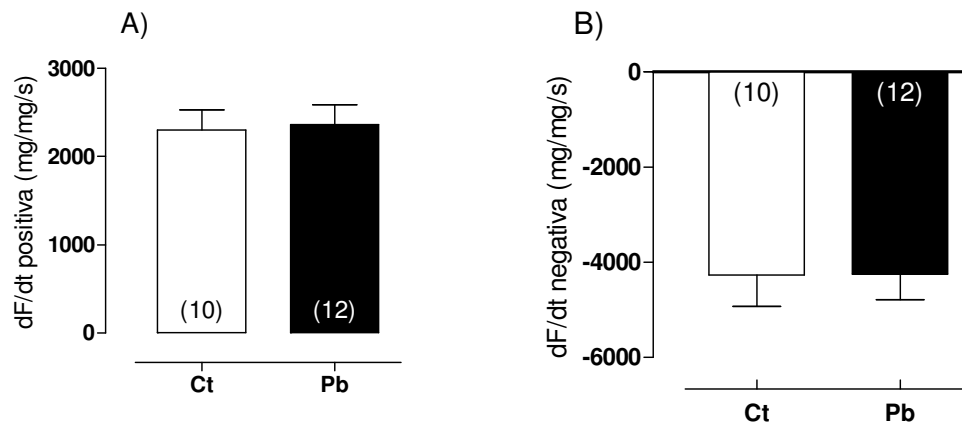


Figura 18: Avaliação, *in vitro*, das derivadas positivas e negativas de força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p > 0,05$. Teste *t de Student* não-pareado

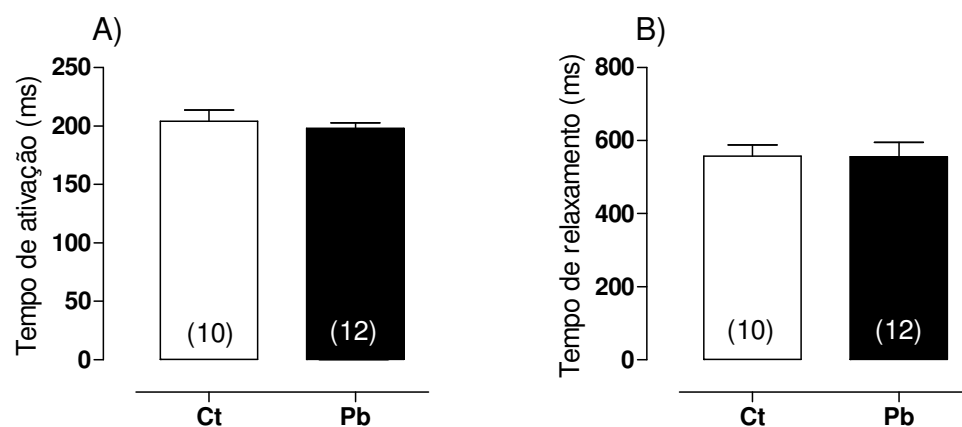


Figura 19: Avaliação, *in vitro*, de parâmetros temporais da contração de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p > 0,05$. Teste *t de Student* não-pareado

5.5.3 AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

Os resultados encontrados pela investigação dos efeitos do tratamento com chumbo no inotropismo cardíaco *in vitro* diferem dos nossos resultados *in vivo*. Esta incongruência entre os resultados sugere que os mecanismos celulares envolvidos na gênese da força e na velocidade contrátil, como os mecanismos envolvidos no ciclo de cálcio, estão atenuando o provável estímulo inotrópico positivo no

cardiomiócito, visualizado *in vivo*, evitando o aumento de força na preparação isolada.

Para investigarmos este aspecto, avaliamos os efeitos do tratamento com chumbo nos principais mecanismos celulares envolvidos na regulação do inotropismo cardíaco. A figura 20 expõe a avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático, ilustrada pelas potenciações pós-pausas. Para realização desta manobra, os papilares foram submetidos a pausas na estimulação elétrica de 15, 30 e 60 segundos (VASSALLO; MILL, 1988). Nota-se, na figura 20, que o tratamento com chumbo não resultou em alterações funcionais quanto à liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático.

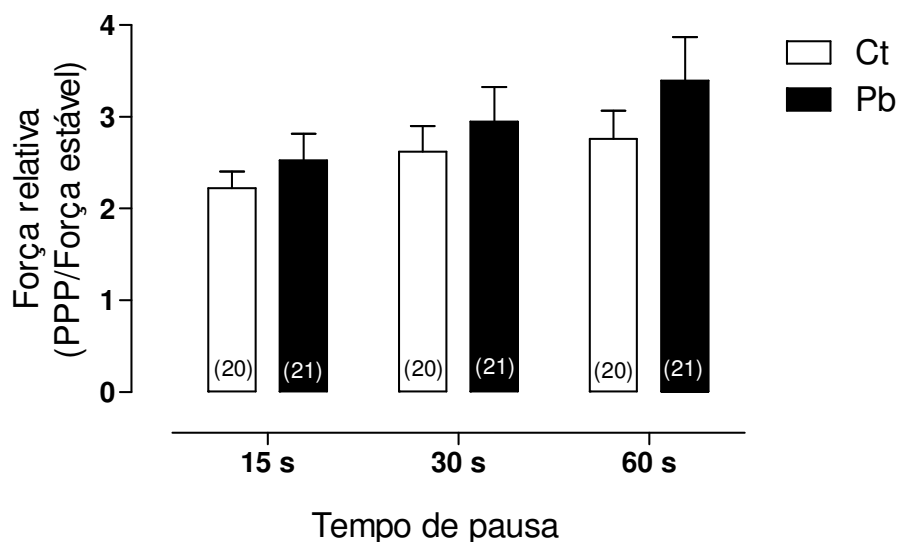


Figura 20: Avaliação, *in vitro*, das potenciações relativas após pausas de 15, 30 e 60 segundos de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p > 0,05$. Anova duas vias.

5.5.4 MEDIDA DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE A MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR

Outra intervenção realizada com o intuito de se investigar os efeitos do chumbo nos mecanismo reguladores da contratilidade miocárdica consiste em uma curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular. A figura 21 evidencia a maior resposta contrátil dos papilares dos animais do grupo tratado quando comparados aos do grupo controle. Esta resposta é sugestiva de que os

cardiomiócitos dos animais do grupo tratado são mais permeáveis ao cálcio ou suas proteínas contráteis possuem maior afinidade por este íon (LEITE et al., 1995).

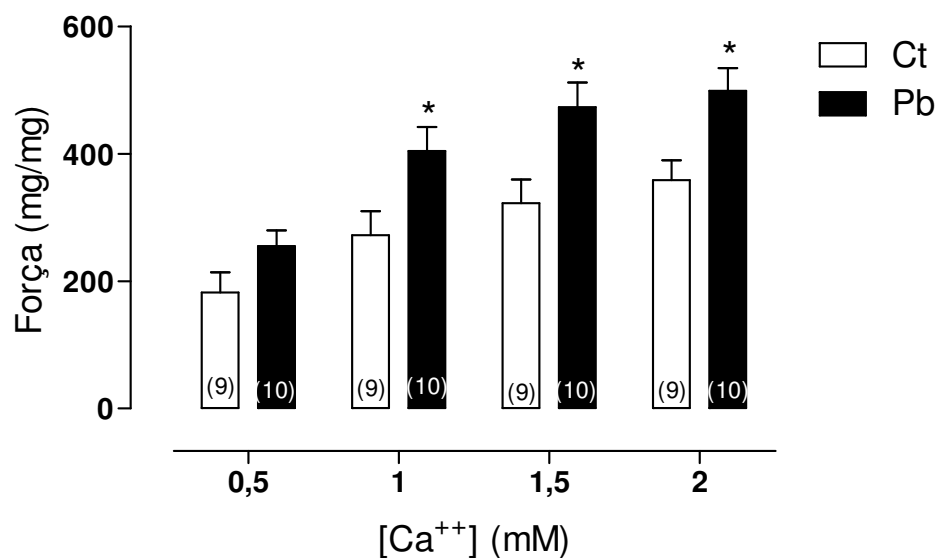


Figura 21: Avaliação, *in vitro*, da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $p < 0,05$ vs Ct para a mesma concentração de cálcio. Anova duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

5.5.5 AVALIAÇÃO INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSARCOLEMAL

As contrações obtidas após pausa de 10 minutos na estimulação elétrica (PRC) foram realizadas para investigação do ciclo de cálcio, mais efetivamente, seu influxo. Na figura 22 observa-se aumento na PRC de aproximadamente 50 % no grupo tratado (Ct: $10,4 \pm 1,01$ %; Pb: $21,4 \pm 3,72$ %). Este achado sugere um aumento no influxo de cálcio transarcolemal ocasionado pela exposição ao chumbo.

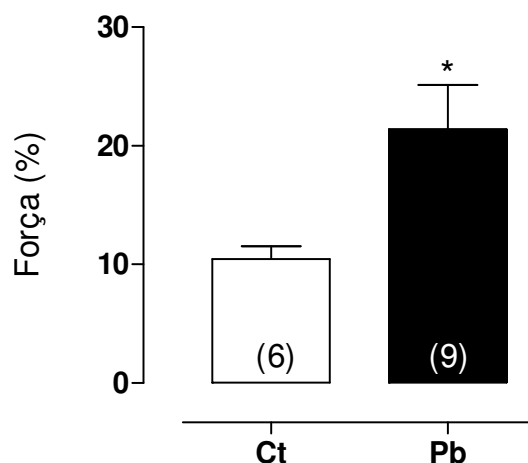


Figura 22: Avaliação indireta, *in vitro*, do influxo de cálcio transarcolema avaliada pela “*post rest contraction*” de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb. A força foi calculada como a porcentagem da força de contração após a pausa e a estabilizada anteriormente ao início da realização da intervenção. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $p < 0,05$ vs Ct. Teste t de Student não-pareado.

5.5.6 AVALIAÇÃO DAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS E DO BLOQUEIO COM VERAPAMIL

As contrações tetânicas foram realizadas no intuito de avaliar o influxo de cálcio transarcolema e a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (LEITE et al., 1995). A figura 23 evidencia o aumento no pico e no platô das contrações tetânicas, promovidos pela exposição ao chumbo. Este aumento foi abolido quando a preparação foi exposta a um bloqueador de canal de cálcio (verapamil). Este achado corrobora as respostas obtidas na curva de cálcio e na PRC, confirmando que os cardiomiócitos dos animais tratados com chumbo apresentam maior influxo de cálcio quando comparados aos dos animais do grupo controle.

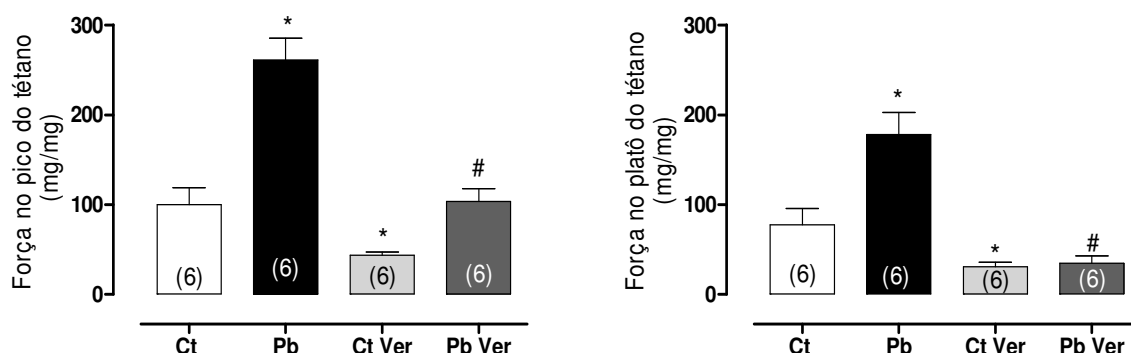


Figura 23: Avaliação, *in vitro*, da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb no pico e no platô das contrações tetânicas na ausência e na presença do verapamil (Ver). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $p < 0,05$ vs Ct; # $p < 0,05$ vs Pb. Anova uma via seguida de pós teste de Tukey.

5.5.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL FRENTE À ESTIMULAÇÃO β -ADRENÉRGICA

A exposição ao chumbo pode provocar hiperatividade simpática (CARMIGNANI et al., 2000) e este pode ser um dos mecanismo envolvidos nas respostas apresentadas pelos animais do grupo tratado previamente descritas. A figura 24 elucida a intervenção inotrópica produzida por uma curva concentração-resposta ao isoproterenol (agonista β -adrenérgico). Como esperado, esta interferência homeométrica promoveu aumento de força em ambos os grupos experimentais. No entanto, o inotropismo cardíaco positivo desencadeado por esta manobra foi menor no grupo tratado. Este achado é sugestivo de dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos cardíacos. Esta dessensibilização pode ter ocorrido frente às maiores concentrações de catecolaminas circulantes nestes animais, o que justificaria, pelo menos em parte, o aumento de PAS, PSVE e FC encontrados *in vivo*. Ainda, é importante ressaltar que a força de contração estabilizada antes desta intervenção era igual entre os grupos, como previamente demonstrado na figura 17.

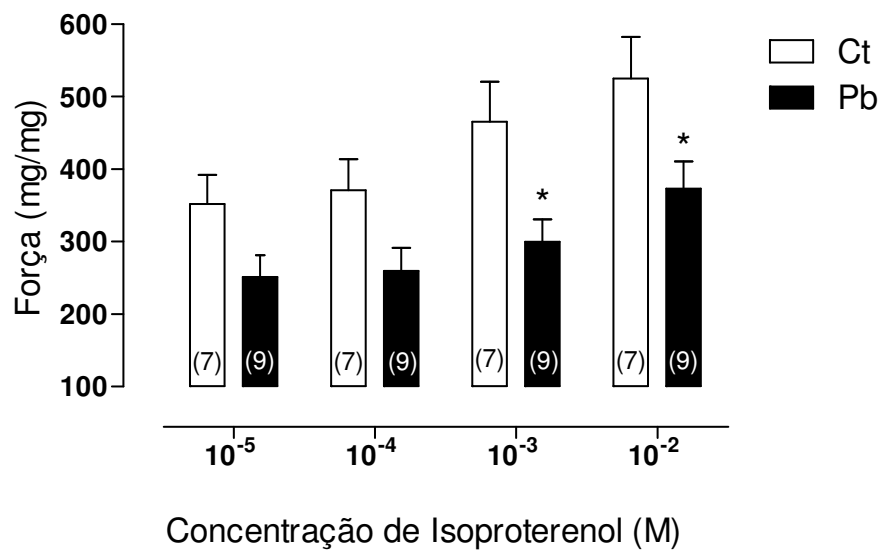


Figura 24: Avaliação, *in vitro*, da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos Ct e Pb frente a estimulação β -adrenérgica. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $p < 0,05$ vs Ct para a mesma dosagem do agonista. Anova 2 vias seguida de pós teste de Bonferroni.

5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.6.1 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Alguns trabalhos correlacionam os efeitos pressóricos do chumbo a ativação do sistema renina-angiotensina (SIMÕES et al., 2011; FIORIM et al., 2011; CARMIGNANI et al., 1999). Para investigarmos o envolvimento desta via nas respostas funcionais elucidadas previamente, foram realizadas medidas plasmáticas e teciduais da atividade da ECA. A figura 25 mostra a atividade da ECA, mensurada fluorimetricamente. O tratamento com chumbo não modificou as atividades plasmática e cardíaca desta enzima descartando o envolvimento desta via reguladora do sistema cardiovascular nas respostas inotrópica e cronotrópica promovidas pelo tratamento com chumbo.

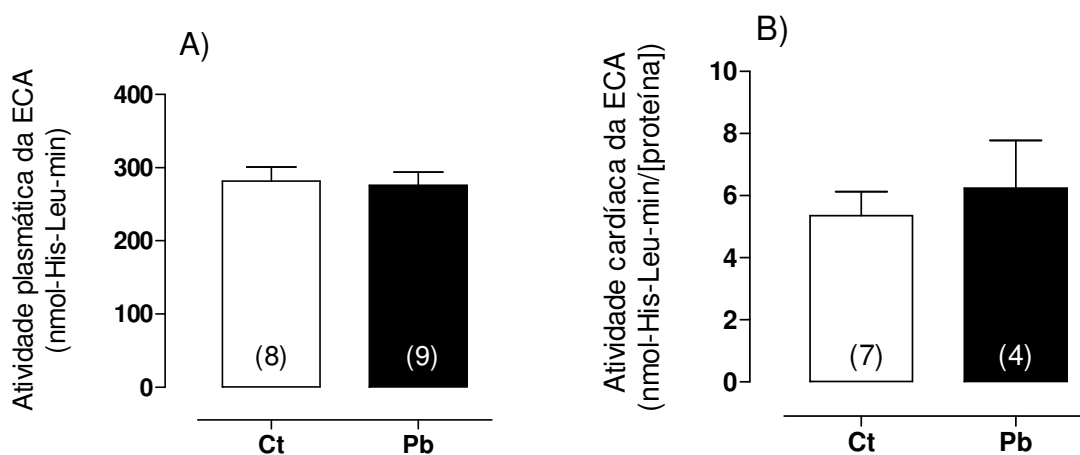


Figura 25: Atividade da enzima conversora de angiotensina no plasma (A) e no coração (B) dos ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de amostras avaliadas. $p > 0,05$. Teste t de Student não-pareado.

5.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPase

A NKA é uma importante proteína integral de membrana que regula a homeostase de íons intracelulares, controlando o transporte ativo de sódio e potássio nas células (BERRY et al., 2006). A figura 26 mostra o envolvimento desta bomba nas respostas provocadas pela exposição ao chumbo. O tratamento com chumbo promoveu

aumento na atividade da NKA (Ct: $138,2 \pm 43,45$; Pb: $433,8 \pm 15,03$ nmol Pi.min⁻¹.mg protein⁻¹) quando comparado ao grupo controle.

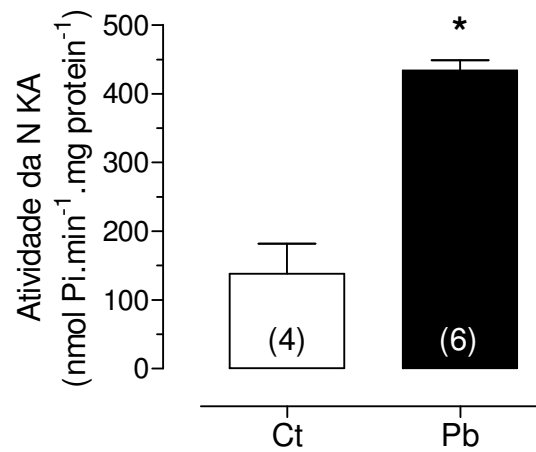


Figura 26: Atividade da bomba de sódio e potássio no coração dos ratos dos grupos Ct e Pb. Os números entre parênteses correspondem ao número de amostras avaliadas. *p < 0,05 vs Ct. Teste t de Student não-pareado.

5.7 BIOLOGIA MOLECULAR

5.7.1 AVALIAÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Além de promover alterações funcionais, a exposição por 30 dias ao chumbo pode culminar em alterações celulares estruturais. Com a finalidade de investigar estes possíveis comprometimentos foi utilizada a técnica de Western blot para quantificação de importantes proteínas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica. A avaliação das proteínas reguladoras da contratilidade muscular incluiu as medidas de: SERCA-2, NCX, PLB, fosfo-Tre¹⁷-PLB e corrigido pelo fosfolambam total (fosfo-Tre¹⁷-PLB/PLB), fosfo-Ser¹⁶-PLB e corrigido pelo fosfolambam total (fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB) e a subunidade α -1 da NKA.

A figura 27 mostra que o tratamento com chumbo reduziu a expressão ventricular da SERCA 2 entretanto, não alterou a expressão do PLB (Figura 28) e de suas subunidades fosforiláveis, assim como as razões fosfo-Tre¹⁷-PLB/PLB e fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB mantiveram-se inalteradas (Figura 29).

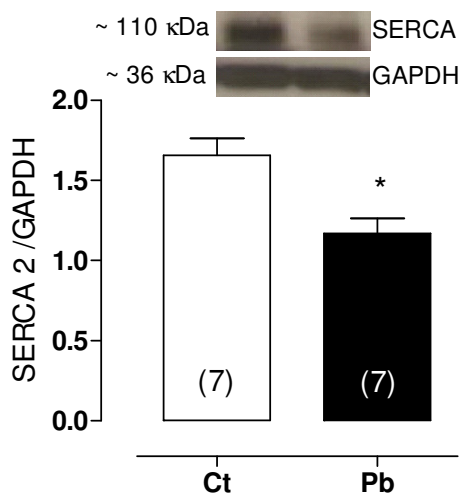


Figura 27: Expressão protéica ventricular da bomba de cálcio do RS (SERCA 2) de ratos dos grupos Ct e Pb. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão da SERCA 2 e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade da SERCA 2 e do GAPDH. * $p < 0,05$ vs Ct. Teste *t-Student* não-pareado.

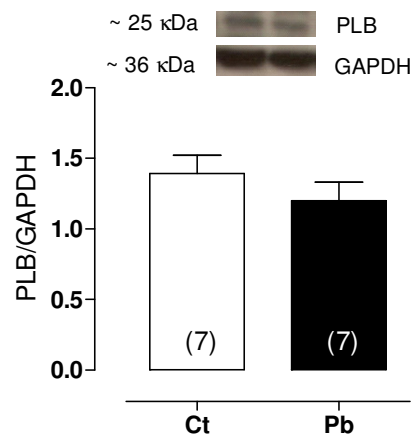


Figura 28: Expressão protéica ventricular do PLB de ratos dos grupos Ct e Pb. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão do PLB e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade do PLB e do GAPDH. $p > 0,05$. Teste *t-Student* não-pareado.

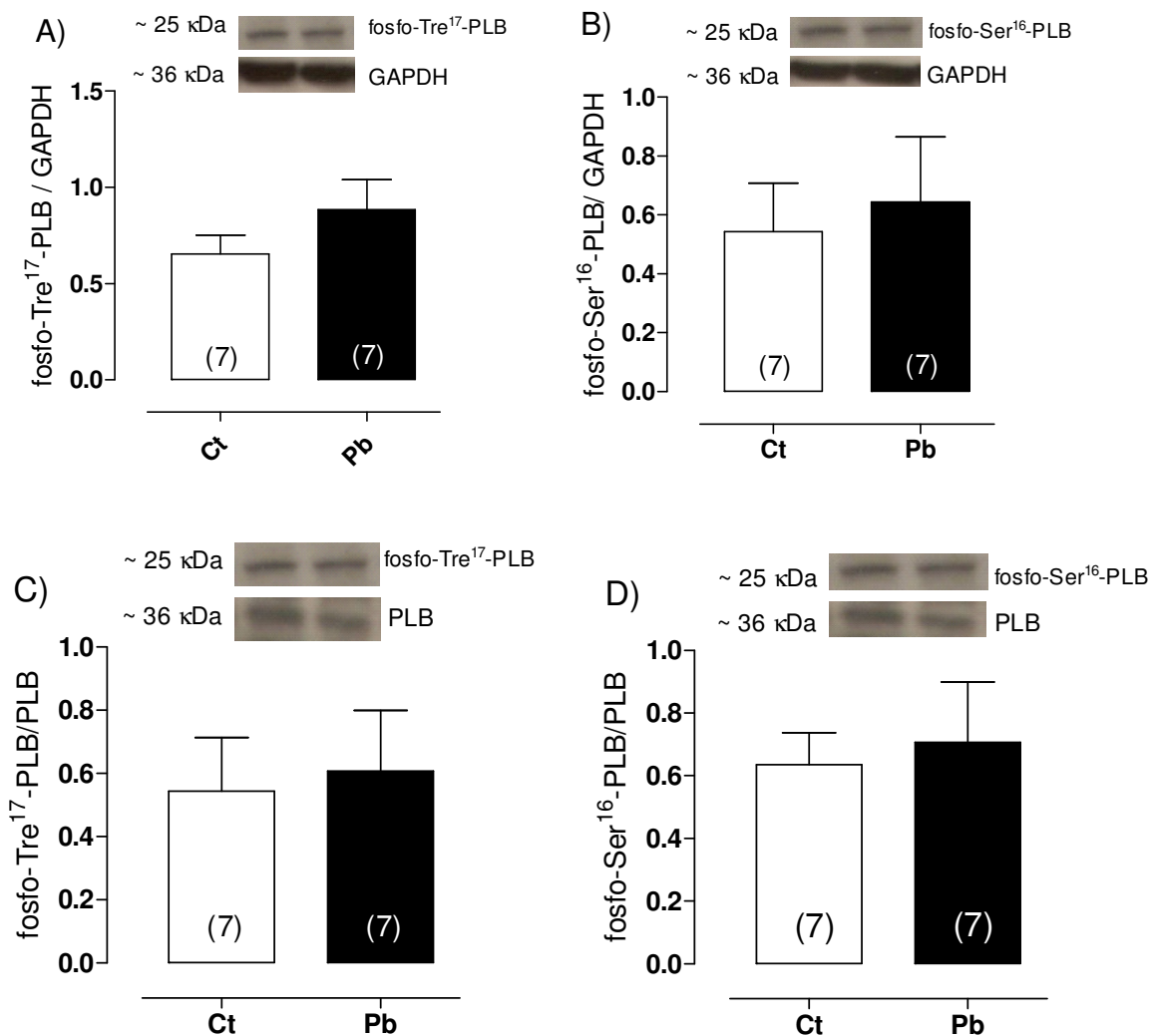


Figura 29: Expressão protéica ventricular das subunidades fosfo-Tre¹⁷-PLB (A) e fosfo-Ser¹⁶-PLB (B) e as razões fosfo-Tre¹⁷-PLB/PLB (C) e fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB (D) de ratos dos grupos Ct e Pb. Na parte

superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão das subunidades fosforiláveis do GAPDH ou PLB. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade do PLB e do GAPDH. $p > 0,05$. Teste *t-Student* não-pareado.

O trocador sódio-cálcio é um importante mecanismo regulador do ciclo de cálcio no cardiomiócito, contribuindo tanto para a contração quanto para o relaxamento do mesmo (SHIGEKAWA; IWAMOTO, 2001). A quantificação do NCX é ilustrada na figura 30, a qual evidencia que o tratamento com chumbo não alterou expressão desta importante proteína no coração dos animais estudados.

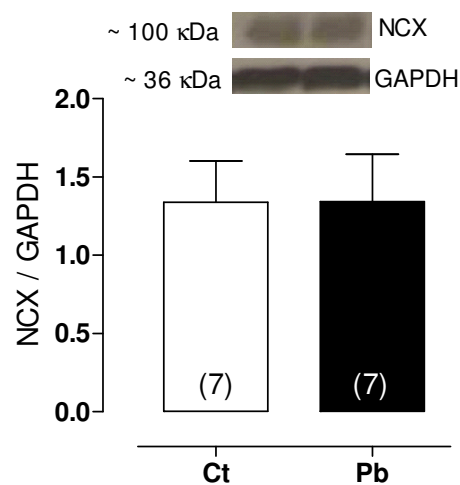


Figura 30: Expressão protéica ventricular do trocador sódio/cálcio (NCX) de ratos dos grupos Ct e Pb. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão do NCX e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade do NCX e do GAPDH. $p > 0,05$. Teste *t-Student* não-pareado.

A expressão protéica da subunidade alfa-1 da NKA foi quantificada em corações dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica da subunidade α -1 foi semelhante nos corações dos animais dos grupos controle e chumbo, como mostra a figura 31.

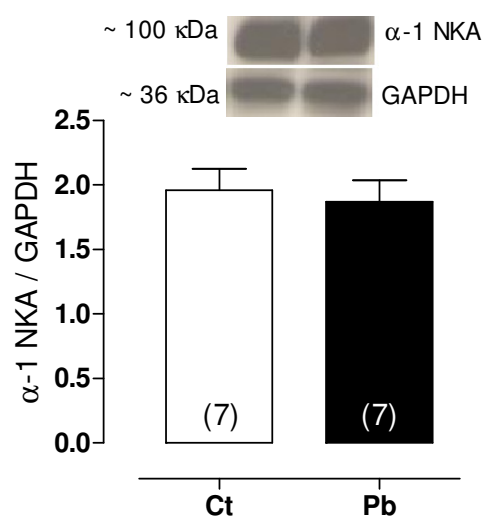


Figura 31: Expressão protéica da subunidade α -1 da NKA de ventrículos ratos dos grupos Ct e Pb. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão da subunidade α -1 da NKA e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade da subunidade α -1 da NKA e do GAPDH. $p > 0,05$. Teste *t-Student* não-pareado.

5.8 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

O chumbo pode ligar-se ao grupamento heme e interferir na formação da hemoglobina, resultando em anemia (LAWTON; DONALDSON, 1991). O hemograma foi realizado para investigar se o aumento de FC, observado na avaliação hemodinâmica, foi resultante da interferência do chumbo na formação da hemoglobina. A hemoglobina, o VCM e o RDW, índices referentes à concentração de hemoglobina, ao tamanho das hemácias e a porcentagem de variação dos volumes obtidos, respectivamente, estão descritos na tabela 4. Os valores foram similares entre ambos os grupos de animais, sugerindo que os animais tratados com chumbo não apresentaram alterações na formação das hemácias. Este achado descarta a correlação entre o aumento de FC e a anemia, portanto, outros mecanismos estão envolvidos neste efeito cronotrópico positivo visualizado nos animais tratados.

Tabela 4: Hematologia de ratos expostos ou não-expostos ao chumbo.

	Ct	n	Pb	n	p
Hemoglobina (g/dL)	17,20 ± 0,31	5	17,37 ± 0,51	6	0,795
VCM (fL)	58,14 ± 0,49	5	57,72 ± 0,28	6	0,457
RDW %	17,56 ± 0,48	5	16,83 ± 0,515	6	0,338

Avaliação de parâmetros hematológicos entre os grupos controle (Ct) e chumbo (Pb) ao final do tratamento por 30 dias com Pb⁺⁺. Teste *t* de *Student* não-pareado. $p > 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos neste estudo apontam a exposição ao chumbo como um potencial agravante no desenvolvimento da hipertensão arterial e um fator de risco para o estabelecimento de doenças cardíacas. A elevação da pressão arterial foi observada precocemente e manteve-se durante todo o tratamento com o metal e as alterações contráteis foram registradas após 30 dias do início da exposição.

Sumarizando os principais resultados deste estudo, que elucidam o envolvimento do chumbo na gênese da hipertensão arterial e nos distúrbios da contratilidade miocárdica, temos:

- O padrão de tratamento escolhido foi eficaz em promover um modelo de exposição ao chumbo, no qual os animais apresentaram-se expostos a uma concentração sanguínea inferior ao permitido pela legislação brasileira vigente.
- O estudo aponta o tecido ósseo como o principal sítio de deposição do metal.
- A exposição ao chumbo foi responsável pela elevação da pressão arterial dos animais, visualizada desde a primeira semana de tratamento.
- Os animais expostos ao chumbo apresentaram incremento no inotropismo cardíaco, avaliado *in vivo*.
- A plumbemia elevada foi responsável pelo aumento da frequência cardíaca nos animais expostos.
- A avaliação contrátil, *in vitro*, aponta para elevação do influxo de cálcio transsarcolemal e dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos cardíacos, como resultados da exposição ao chumbo.
- A atividade da NKA, enzima importante na regulação da homeostase de íons celulares, mostrou-se elevada nos animais expostos ao chumbo.
- A exposição ao chumbo foi capaz de diminuir a expressão da SERCA 2, uma proteína fundamental na regulação do ciclo de cálcio no cardiomiócito.

6.1 EFICÁCIA DO TRATAMENTO EM PROMOVER UM MODELO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

O modelo de tratamento escolhido foi baseado em outros estudos de exposição ao acetato de chumbo (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; HEYDARI et al., 2006; FARMAND et al., 2005; KARIMI et al., 2002; SHARIFI et al., 2004; VAZIRI et al., 1999; CARMIGNANI et al., 1999). Estes estudos também constam de modelos de exposição por via oral, entretanto, podem ser considerados, em sua maioria, modelos de exposição prolongados, se comparados as quatro semanas que os nossos animais receberam o chumbo. Dentre estes modelos, há alguns que se estendem por até 10 meses de administração do metal (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999).

A concentração sanguínea de chumbo encontrada nos animais do grupo tratado foi de aproximadamente 13 µg/dL, enquanto os animais do grupo controle apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do aparelho (Tabela 1). A média encontrada nos animais do grupo tratado foi inferior àquelas encontradas nos demais estudos que utilizaram a via oral como forma de exposição ao chumbo. Usualmente, estes estudos apresentaram concentrações sanguíneas próximas de 26 µg/dL (HEYDARI et al., 2006; KARIMI et al., 2002). A baixa concentração atingida em nosso modelo experimental pode ser devido ao menor tempo de exposição ao qual os nossos animais foram submetidos.

Os valores encontrados nos animais do grupo tratado são inferiores ao índice biológico máximo permitido no Brasil, que consiste em 60 µg/dL, de acordo com Norma Regulamentadora n° 7 do Ministério do Trabalho (BRASIL, 1978). Esta lei limita para 60 µg/dL o valor máximo que se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de dano à saúde, ou seja, somente a ultrapassagem deste valor significa exposição excessiva. Nosso trabalho reveste-se de relevância, pois demonstra que uma exposição por curto prazo à plumbemia inferior à regulamentada por lei, para seres humanos, consiste em fator de risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, em ratos.

6.2 DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO CHUMBO

A distribuição do chumbo, proporcional a massa obtida de cada tecido, foi avaliada após 30 dias de exposição ao metal. A figura 9 evidencia que o sítio de maior acúmulo foi o tecido ósseo, o qual apresentou valor correspondente a 73% do total de chumbo, entre os órgãos avaliados. O segundo sítio de maior concentração foi os rins, com 23 % do conteúdo de chumbo. O coração, com 3% do conteúdo de chumbo ocupou a terceira posição entre órgãos alvos de exposição e o pulmão a quarta posição, com 2%. O tecido cerebral e o vascular (avaliado na artéria aorta) apresentaram somente 1 % do conteúdo de chumbo.

O tratamento com chumbo promoveu maior acúmulo de chumbo, em comparação ao grupo Ct, em todos os tecidos estudados, com restrição do cérebro, que apresentou concentração similar a 0,2 µg/g em ambos os grupos. Ainda, a avaliação da concentração de chumbo no pâncreas, no baço e nos testículos mostrou que estes órgãos são sítios de baixa deposição do metal.

SUN e colaboradores (2009) estudaram a distribuição do chumbo no sangue e em órgãos de camundongos expostos ao nitrato de chumbo, por via endovenosa, após 15 dias de tratamento. Estes autores não investigaram a deposição óssea do chumbo, que consiste no sítio que o metal apresenta maior tropismo. No entanto, entre os órgãos estudados, mostraram que o rim foi o sítio de maior deposição do metal, seguido pelo fígado, baço, coração, pulmão e cérebro. A distribuição proposta por estes autores condiz com a encontrada em nosso trabalho, corroborando o tropismo deste metal pelo sistema renal.

Em 1976, RABNOWITZ e colaboradores submeteram humanos à dieta suplementada com chumbo por um período entre um e 124 dias e estudaram a distribuição do chumbo entre o sangue, a urina, as fezes, as secreções do trato gastrointestinal, o suor, os ossos, os cabelos e as unhas e propuseram um modelo de distribuição do chumbo no organismo humano. Eles sugeriram um modelo de três compartimentos no qual o primeiro seria o sangue, que estaria em comunicação direta com os compartimentos dois e três. O segundo reservatório seria composto dos tecidos moles e o terceiro consistiria principalmente dos ossos, que conteria elevados níveis do chumbo corpóreo. Os tempos de meia-vida do chumbo nos três compartimentos são bastante diferentes, sendo estimado em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles e 27 anos para os ossos, de acordo com este modelo.

O tecido ósseo está em constante processo de reabsorção e, por este motivo, não pode ser considerado como um depósito inerte de chumbo em nosso organismo. Portanto, por ser apontado como o principal sítio de deposição (Figura 9), pelo fato do chumbo ósseo possuir meia-vida próxima de 27 anos e ainda, por estar em constante reabsorção, o tecido ósseo, contaminado com chumbo, pode ser considerado uma fonte crônica interna de exposição ao metal, mesmo depois de cessada a fonte primária externa. Desta forma, após uma única exposição aguda, o metal pode se depositar no osso e, pelo processo de reabsorção, transforma-se em uma fonte de exposição crônica ao chumbo.

É importante destacar que, apesar dos animais estarem expostos ao chumbo, esta intoxicação crônica, abaixo dos limites de referência, não foi capaz de afetar o crescimento ponderal dos mesmos, como visualizado na figura 10 e na tabela 2, embora a pressão arterial já se mostre elevada (Tabela 3).

Ainda, como o efeito do chumbo na contratilidade miocárdica foi o foco principal deste estudo, vale ressaltar que este metal possui a capacidade de se depositar no tecido cardíaco (Figuras 8 e 9) e esta deposição pode estar correlacionada com seus efeitos deletérios no coração. Entretanto esta deposição não afetou a relação entre o peso das câmaras ventriculares e o peso corporal, como visualizado na figura 11, mas promoveu aumento do inotropismo e alterações no ciclo de cálcio, dados estes que serão abordados posteriormente nesta discussão.

6.3 EXPOSIÇÃO AO CHUMBO: FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Os animais tiveram suas pressões arteriais registradas semanalmente pela técnica de pletismografia de cauda. Esta técnica foi utilizada com o intuito de detectarmos possíveis alterações pressóricas precoces induzidas pelo tratamento com o chumbo, sem a necessidade do uso de anestesia.

A avaliação pressórica com o animal acordado ilustra, mais fidedignamente, os reais valores pressóricos induzidos pela exposição ao chumbo, uma vez que a medida pressórica direta foi realizada com os animais anestesiados e há evidências que o uso do anestésico uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*) promove efeitos depressores na pressão arterial e na FC (ZORNIAC et al., 2010).

A pressão arterial sistólica do animal acordado, no início do tratamento, era estatisticamente igual entre ambos os grupos (Figura 12). Esta equidade desapareceu já na primeira semana de exposição ao metal, uma vez que os animais do grupo tratado apresentaram incremento na pressão, fato que não foi verificado nos animais do grupo controle. A pressão arterial sistólica dos animais tratados com chumbo manteve-se elevada nas semanas subseqüentes. Ao final do tratamento os valores foram, aproximadamente, de 127 mmHg e 140 mmHg, respectivamente, para os animais do grupo controle e tratado (Figura 12).

O efeito depressor da uretana (ZORNIAC et al., 2010) pôde ser visualizado na comparação entre os resultados da avaliação pressórica pela técnica de medida direta (hemodinâmica) e indireta (pletismografia). Na avaliação hemodinâmica a magnitude da diferença persistiu, no entanto, os valores pressóricos em ambos os grupos foram menores, correspondentes a, aproximadamente, 96 e 116 mmHg nos grupos Ct e Pb, respectivamente (Tabela 3 e Figura 13).

Além do incremento na PAS, a avaliação hemodinâmica aponta que a exposição ao chumbo foi capaz de elevar a PAM, PAD e FC dos animais.

O aumento de pressão arterial encontrado em nosso trabalho já está bem documentado em trabalhos que utilizaram modelos de exposição nos quais os animais foram submetidos a maiores concentrações sanguíneas e/ou maiores períodos de contato com o metal (VAZIRI et al., 1997; FARMAND et al., 2005; SHARIFI et al., 2004; VAZIRI et al., 1999; CARMIGNANI et al., 1999; GRIZZO;

CORDELLINI, 2008). No entanto, somente recentemente, trabalhos do nosso laboratório foram capazes de demonstrar que baixa concentração sanguínea de chumbo (cerca de 10 µg/dL) (FIORIM et al., 2011) ou uma única exposição aguda (cerca de 37 µg/dL) (SIMÕES et al., 2011) foram capazes de elevar a pressão arterial sistólica de animais experimentais. Cumpramos ressaltar, aqui, que a exposição a baixas doses de chumbo aumenta precocemente a pressão arterial (FIORESI et al., 2009; SIMÕES et al., 2011; FIORIM et al., 2011)

O aumento de FC apresentado pelos animais expostos ao chumbo ainda não havia sido documentado (Tabela 3 e Figura 13). Alguns trabalhos, que diferem de nosso desenho experimental, reportam inalterabilidade da FC frente ao tratamento por 10 meses com 60 ppm de acetato de chumbo (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999, 2000). Entretanto, esta resposta não era esperada visto que, nestes trabalhos, os pesquisadores registraram hiperatividade simpática central e periférica nos animais tratados com chumbo (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999, 2000), o que, conseqüentemente, pode culminar em efeito cronotrópico positivo.

Sabe-se que o chumbo interfere na produção do grupo heme e, conseqüentemente, reduz a concentração sanguínea de hemoglobina, ocasionando anemia (PATRICK, 2006) e há um aumento das evidências de que a anemia contribui para o desenvolvimento de doenças cardíacas. Em pacientes com doença renal crônica, por exemplo, a anemia é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular e em pacientes com insuficiência cardíaca a anemia está associada com aumento da morbidade. O aumento da FC, em resposta à anemia, consiste em um dos mecanismos implicados no aumento da morbidade e da mortalidade de origem cardíaca (SILVERBERG et al., 2004).

A avaliação hematológica foi realizada para investigarmos se o aumento da FC, registrado nos animais tratados com chumbo, está correlacionado com uma possível redução na hemoglobina. Nossos resultados (Tabela 4) evidenciam que o modelo de tratamento utilizado não promoveu alterações na formação das hemácias, descartando a influência de anemia na taquicardia registrada nos animais do grupo tratado. Este incremento na FC pode estar associado ao aumento de atividade do sistema nervoso simpático, visto que estudos prévios demonstram a habilidade do

chumbo em promover hiperatividade simpática (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999, 2000).

6.3.1 POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

Acredita-se que a patogênese da toxicidade do chumbo no desenvolvimento da hipertensão arterial seja multifatorial, por: alterar a homeostasia do cálcio (VALENCIA et al., 2001); promover hiperatividade simpática (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999, 2000); induzir aumento de atividade do sistema renina-angiotensina (SHARIFI et al., 2004; SIMÕES et al., 2011); deprimir as reservas antioxidantes do organismo e/ou aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultando no aumento do estresse oxidativo (COURTOIS et al., 2003; LE-FENG et al., 2005; MARQUES et al., 2001; FARMAND et al., 2005; SILVEIRA et al., 2010); alterar a resposta vascular frente a agentes vasoativos (LE-FENG et al., 2007; SHELKOVNIKOV; GONICK, 2001; VALENCIA et al., 2001; FIORIM et al., 2011); promover danos endoteliais, reduzir a biodisponibilidade do NO e aumentar os níveis de endotelina (KHALIL-MANESH et al., 1993; VAZIRI; DING, 2001; MARQUES et al., 2001; HEYDARI et al., 2006; GRIZZO; CORDELLINI, 2006) e induzir danos renais (RONCAL et al., 2007).

6.3.1.1 Interferência na homeostasia do cálcio

Como previamente explanado, os animais expostos ao chumbo apresentaram elevação da PA e diversos são os mecanismos potencialmente implicados nesta elevação. Valencia e colaboradores (2001), em um estudo que avaliou a reatividade vascular de anéis de aorta, demonstraram que o chumbo ao entrar nas células exerce efeitos contráteis, diretamente, sobre o músculo liso. Estes autores sugerem que o chumbo possa substituir o cálcio, mimetizar os efeitos deste íon e desencadear a contração no músculo liso vascular, sendo este um dos mecanismos envolvidos no aumento da reatividade vascular e conseqüentemente, repercutindo no aumento da pressão arterial. Esta capacidade do chumbo de mimetizar o cálcio é corroborada pelo trabalho de Chao e colaboradores (1990) o qual mostra a capacidade do chumbo de mimetizar o cálcio e ativar a TnC extraída de miofibrilas

esqueléticas. Talvez esta capacidade do chumbo mimetizar o cálcio ou interferir na sua homeostase esteja relacionada às alterações pressóricas e da contratilidade encontradas em nosso trabalho, visualizadas através do aumento da PA, da PSVE e da dP/dt positiva (Tabela 3).

6.3.3.2. Alterações na regulação neuro-humoral

Além do aumento da PAS nossos animais tratados com chumbo apresentaram elevação da PAD e da FC. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento de atividade simpática, uma vez que a literatura aponta que a exposição ao chumbo resulta em hiperatividade deste sistema. Boscolo e Carmignani (1988) mostraram que a exposição crônica ao chumbo (18 meses) induz hiperatividade simpática por estimulação periférica (favorecendo a liberação de noradrenalina nas terminações pós-ganglionares) e central (por estimulação dos receptores α -2 nas junções simpáticas centrais) aumentando, portanto, a atividade dos receptores simpáticos vasculares (α -2) e cardíacos (β -1). Em outro trabalho, este mesmo grupo de pesquisadores italianos mostrou que o tratamento por 10 meses com 60 ppm de acetato de chumbo promoveu aumento da concentração plasmática de adrenalina e noradrenalina (CARMIGNANI et al., 2000).

Além do sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina (SRA) também se mostra como um alvo crítico na exposição ao chumbo. Carmignani e colaboradores (1999) mostraram que a exposição por 10 meses a 60 ppm de acetato de chumbo elevou a atividade plasmática da ECA e os níveis plasmáticos de angiotensina II reduzindo, conseqüentemente, os valores de bradicinina. Estes autores correlacionaram estas respostas ao aumento da pressão arterial, visualizada nos animais expostos ao chumbo. Entretanto, outro grupo de pesquisadores (SHARIFI, et al., 2004) estudou ratos Sprague-Dawley expostos por 2, 4, 6 e 8 semanas a 100 ppm de acetato de chumbo e mostrou aumento progressivo da PAS nestes animais, em função do tempo de exposição ao metal. A atividade plasmática e tecidual da ECA se mostrou elevada nas primeiras semanas de tratamento, contudo, a exposição prolongada suprimiu a atividade desta enzima.

Trabalhos recentes do nosso laboratório, desenvolvidos por Simões e colaboradores (2011) e Fiorim e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento com chumbo

resulta em aumento de pressão arterial e o desencadeamento desta resposta está, mesmo que em parte, relacionado ao aumento da atividade do SRA. Simões e colaboradores (2011) submeteram ratos Wistar a uma única dose aguda de acetato de chumbo que resultou em uma concentração plasmática de 37 µg/dL. Estes animais tiveram suas pressões sistólicas aumentadas, após uma hora de exposição, em decorrência do aumento da ação da angiotensina II. Da mesma forma, os animais estudados por Fiorim e colaboradores (2011) também tiveram aumento da PAS induzido pela exposição ao chumbo. Os animais deste estudo foram submetidos ao chumbo por via intra-muscular (IM) e apresentaram, após 7 dias de tratamento, concentração sanguínea próxima de 10 µg/dL. O aumento da pressão visualizado por estes pesquisadores também foi relacionado ao aumento de atividade da ECA, dentre outros fatores.

O sistema renina angiotensina parece ser importante no desenvolvimento da hipertensão arterial induzida pelo chumbo, visto que se mostrou fundamental na gênese desta hipertensão (SIMÕES et al., 2011; FIORIM et al., 2011). No entanto, a participação do sistema renina-angiotensina demonstra inconstância na manutenção desta hipertensão. Nossos resultados apóiam esta afirmação visto que, após um mês de exposição, nossos animais não apresentaram mudanças na atividade da ECA plasmática e cardíaca (Figura 25). Este achado é respaldado pelo trabalho de Sharifi e colaboradores (2004), no qual o SRA se mostrou importante apenas na fase inicial do desenvolvimento dos níveis pressóricos elevados e não na manutenção da hipertensão apresentada pelos animais expostos cronicamente ao chumbo.

Assim, nosso trabalho mostra que a exposição ao chumbo promoveu aumento da PA, da PSVE, da dP/dt positiva e da FC sendo que, estas elevações não foram acompanhadas de aumento da atividade da ECA plasmática. Por outro lado, nossos resultados apontam para aumento da atividade do sistema nervoso autonômico simpático e é importante considerar que o aumento de atividade simpática pode estimular a liberação renal de renina (SCHWEDA et al., 2007). Frente ao exposto, apesar de nossos dados não apontarem para o aumento de atividade da ECA, não podemos descartar totalmente a participação do sistema renina angiotensina no desenvolvimento da hipertensão induzida pelo chumbo, uma vez que esta exposição

pode culminar em maiores concentrações de renina circulante e, conseqüentemente, maior formação de angiotensina II.

6.3.3.3 Promoção do estresse oxidativo e alterações nas respostas vasculares

O estresse oxidativo é o mecanismo melhor descrito envolvido no desenvolvimento da hipertensão promovida pelo chumbo. Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da aterosclerose, de desordens neurodegenerativas, do câncer e de outros processos patológicos, inclusive na gênese e manutenção da hipertensão arterial (VAZIRI; KHAN, 2007). A propriedade do chumbo de catalisar reações oxidativas e gerar espécies reativas de oxigênio é relatada em trabalhos que avaliam tanto seus efeitos na exposição aguda (COURTOIS, et al., 2003; LE-FENG, et al., 2005) quanto na exposição crônica (MALVEZZI, et al., 2001; FARMAND, et al., 2005; VAZIRI, et al., 1997; VAZIRI, et al., 1999).

Patrick (2006), em uma excelente revisão sobre os danos causados pelos radicais livres nas doenças relacionadas à exposição ao chumbo, discute os efeitos deste metal na formação de radicais livres e no desequilíbrio das reservas antioxidantes. Ele revela que este desequilíbrio resulta em danos endoteliais, favorecendo os mecanismos vasoconstritores e colaborando com a gênese da hipertensão arterial. No presente estudo, os animais expostos ao chumbo apresentaram aumento de PAD (Tabela 3) e este aumento talvez esteja relacionado ao estresse oxidativo e suas repercussões vasculares.

Esta afirmação é corroborada pelos achados de Vaziri e colaboradores (1997), os quais submeteram seus animais a um modelo de tratamento similar ao utilizado em nossa pesquisa (diferindo apenas no maior tempo de exposição daqueles animais) e mostraram que a exposição ao chumbo resultou em aumento de PA e da concentração plasmática de malondialdeído (um marcador da peroxidação lipídica), refletindo aumento da geração dos radicais livres. Outro grupo de pesquisadores (FARMAND et al., 2005) investigaram a participação do estresse oxidativo, promovido por semelhante exposição ao chumbo, e concluíram que a hipertensão arterial dos animais possuía correlação direta com o aumento compensatório da atividade de importantes enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e

glutationa peroxidase) e que este aumento representava um desbalanceamento dos mecanismos antioxidantes/oxidantes ocorrido na presença do chumbo.

Várias espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são continuamente produzidas no organismo pelo metabolismo do oxigênio. As espécies reativas de oxigênio desempenham um importante papel como sinalizadores moleculares, conseqüentemente, contribuem para o funcionamento celular normal, além de participarem das defesas do organismo contra microorganismos infecciosos. Naturalmente, as ROS são contidas pelos antioxidantes, que consistem em moléculas endógenas ou exógenas, as quais inativam os radicais livres. O aumento da produção de radicais livres e/ou depleção do sistema antioxidante podem ser os mecanismos pelos quais o chumbo induz estresse oxidativo (PATRICK, 2006). As ROS não-contidas provocam dano tecidual, citotoxicidade e disfunção por atacar moléculas estruturais e funcionais (VAZIRI; KHAN, 2007). A toxicidade cardiovascular do chumbo, correlacionada aos prejuízos ocasionados pelo aumento do estresse oxidativo, ocorre em duas vias distintas, porém interligadas: a geração de espécies reativas de oxigênio e a depleção das reservas antioxidantes (MALVEZZI, et al., 2001; FARMAND, et al., 2005; VAZIRI, et al., 1997; VAZIRI, et al., 1999; PATRICK, 2006).

O chumbo, por ser um cátion divalente, possui forte afinidade pelo radical -SH das proteínas, o que pode alterar a atividade de enzimas ou proteínas estruturais. O chumbo e/ou as ROS, produzidos durante sua exposição, se ligam às enzimas que possuem o grupo -SH ativo e transformam estas enzimas em não funcionais, causando um desequilíbrio no balanço de controle dos radicais livres (LYNES et al., 2007). Uma das ações do chumbo, ao promover desequilíbrio das reservas antioxidantes, consiste em alterar o metabolismo da glutatona, uma enzima, que entre outras funções, tem a propriedade de neutralizar radicais livres. O chumbo se liga ao agrupamento -SH e inibe a ação desta molécula. Esta afirmação é corroborada pelo fato que a concentração sanguínea de glutatona encontra-se reduzida em animais experimentais e humanos expostos ao chumbo (PATRICK, 2006).

Como citado previamente, além de reduzir as reservas antioxidantes, o chumbo favorece a produção de ROS. Esta produção ocorre, principalmente, devido à alta afinidade que o chumbo possui pelas hemácias (mais de 90% do chumbo sanguíneo encontrasse ligado às hemácias) e a habilidade que tem em promover peroxidação lipídica, desestabilização das membranas e hemólise. Na membrana das hemácias o chumbo e as ROS se ligam a fosfatidilcolina e promove, conseqüentemente, redução da concentração de fosfolipídios, fato que desestabiliza a membrana e resulta em hemólise (PATRICK, 2006).

A interferência dos radicais livres, produzidos na exposição ao chumbo, com o sistema cardiovascular ocorre, principalmente, por sua interação com o NO provocando redução da biodisponibilidade deste importante fator relaxante derivado do endotélio (DING et al., 2000; VAZIRI et al., 1999). O NO é o vasodilatador mais potente, derivado do endotélio, e exerce seu papel na manutenção da pressão arterial. Muitas das ações biológicas induzidas pelo NO são mediadas por ação do segundo mensageiro GMPc, que é produzido a partir do GTP pela guanilato ciclase solúvel (GCs). A ativação da GCs pelo NO induz a produção de GMPc, o qual promove vasodilatação. Khalil-Manesh e colaboradores (1993) demonstraram redução na concentração plasmática e renal de GMPc, em ratos com hipertensão induzida pelo chumbo. Ainda, Vaziri e Sica (2004) mostraram que animais expostos ao chumbo apresentam elevada concentração plasmática de nitrotirosina (um marcador da oxidação do NO pelas ROS).

Além de reduzir a biodisponibilidade do NO, as ROS, ao interagirem com sua molécula, favorecem a geração de peroxinitrito (ONOO^-), uma espécie reativa de oxigênio com alta citotoxicidade, que também pode contribuir com os efeitos cardiovasculares adversos da exposição ao chumbo (VAZIRI, 2008). A redução da biodisponibilidade do NO, ocorrida na exposição ao chumbo, contribui para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial e das doenças cardiovasculares. Em adição, via ativação do fator nuclear κB , NF κB , e a conseqüente formação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, o estresse oxidativo pode promover inflamação, que é um importante componente para a aterogênese. A soma destes fatores contribui para os efeitos cardiovasculares induzidos pelo estresse oxidativo provocado pela exposição ao chumbo (NI et al., 2004).

Outros mecanismos que podem contribuir com o aumento da pressão arterial, visualizado no presente trabalho, são as alterações das respostas vasculares. Marques e colaboradores (2001) estudaram o relaxamento vascular em anéis de aorta de ratos tratados por 30 dias com 5 ppm de acetato de chumbo na água de beber. O chumbo causou prejuízo no relaxamento, tanto dependente como independente do endotélio, acompanhado de aumento da expressão de eNOS e *downregulation* da sGC (guanilato ciclase solúvel), resultado este também descrito por Farmand e colaboradores (2005). Estes efeitos foram prevenidos pela administração concomitante ao chumbo de vitamina C, na água de beber, sugerindo o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na regulação do sistema de relaxamento NO/cGMP na parede vascular dos ratos expostos cronicamente ao chumbo.

Outro grupo de pesquisadores (LE-FENG et al., 2007) incubaram anéis de aorta por 24 horas com 4,8 μM de acetato de chumbo e encontraram redução do relaxamento à acetilcolina. Entretanto não houve alteração do relaxamento ao nitroprussiato de sódio, o qual causa relaxamento da parede vascular independente do endotélio, por ativação da formação do GMPc no músculo liso. Outro achado relevante, deste mesmo trabalho, foi a redução da excreção de nitrito no grupo tratado, entretanto, havia aumento da oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), promovendo um paradoxo entre a redução da biodisponibilidade do NO e o aumento compensatório das isoformas responsáveis pela síntese do mesmo (eNOS/iNOS). Uma possível explicação talvez seja a capturação do NO pelas ROS, uma vez que estes radicais encontram-se elevados na exposição ao chumbo.

Os estudos que investigam a correlação da exposição ao chumbo ao estresse oxidativo estão voltados para as alterações vasculares e o objetivo do nosso trabalho está focado nas alterações cardíacas da exposição ao chumbo. Portanto, apesar da comprovada participação do estresse oxidativo no aumento da resistência vascular e da interferência do chumbo nas respostas vasculares frente a agentes vasoconstritores e vasodilatadores, nossa pesquisa não se focou na geração do estresse oxidativo, assim como não se prendeu às alterações vasculares, apesar de acreditarmos que estas sejam umas das interferências induzidas pelo chumbo que possibilitaram o aumento de PAD.

6.3.3.4 Surgimento de danos renais

Além de promover alterações diretas no sistema cardiovascular, que podem resultar no desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial, a exposição crônica ao chumbo também pode resultar em danos renais, e indiretamente sobrecarregar o sistema cardiovascular (OGATA et al., 2011). Roncal e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição ao chumbo, por 30 dias, repercutiu em aumento da pressão arterial e prejuízos renais. Estes prejuízos renais foram evidenciados por glomerulosclerose, proteinúria, perdas de capilares peritubulares, danos tubulares e migração de macrófagos, podendo contribuir para a manutenção da hipertensão arterial na contaminação por chumbo.

O aumento da pressão arterial e da FC encontrado em nosso estudo certamente não está correlacionado ao comprometimento de um único mecanismo regulador do sistema cardiovascular, uma vez que diversos estudos elucidam a multidimensional toxicidade do chumbo neste sistema. Portanto, o aumento dos valores pressóricos e da FC, encontrados neste estudo, podem ser correlacionados ao estresse oxidativo; à redução da biodisponibilidade do NO; à inflamação; às alterações de hormônios vasoativos; às mudanças na homeostase do cálcio; e às alterações de mecanismos neurais e renais reguladores do sistema cardiovascular. O estudo da interferência destas vias nos valores pressóricos encontrados diverge do objetivo central deste trabalho, que consiste em estudar a influência direta do chumbo na maquinaria contrátil.

6.4 EXPOSIÇÃO AO CHUMBO: IMPLICAÇÃO NOS FATORES REGULADORES DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Os animais tiveram suas pressões intraventriculares e os índices de contratilidade e relaxamento registrados ao final dos 30 dias de tratamento (Tabela 3 e Figuras 14 e 15). Na avaliação *in vivo*, os animais que receberam o chumbo apresentaram elevação nos parâmetros avaliados no VE, sugerindo aumento de contratilidade miocárdica. Entretanto a avaliação do VD mostra que a exposição ao metal não promoveu mudanças nos parâmetros investigados nesta câmara.

Neste protocolo, de avaliação hemodinâmica, os efeitos do chumbo na pressão ventricular e no inotropismo cardíaco, foram investigados *in vivo*, portanto, sujeitos a interferências como efeito Anrep, mecanismo Frank-Starling e regulação neuro-humoral, além dos mecanismos intrínsecos reguladores da contratilidade miocárdica. Para removermos estas interferências sistêmicas na contratilidade miocárdica, isolamos os músculos papilares do VE. Esta técnica permite avaliar os efeitos diretos do chumbo na musculatura cardíaca, sem interferências externas na gênese da força. É importante ressaltar que esta investigação é inédita, visto que não há registros de pesquisas que investigaram os efeitos diretos da exposição crônica ao chumbo na contratilidade miocárdica de VE de ratos, neste modelo de exposição ao chumbo.

A avaliação da força isométrica (Figura 17), dos tempos de ativação e relaxamento (Figura 19) e das derivadas temporais - positiva e negativa - de força (Figura 18) nos permite inferir que a exposição ao chumbo não modificou os parâmetros inotrópicos e temporais da contração. No entanto, importantes mecanismos envolvidos com a gênese e regulação da contratilidade foram modificados pelo tratamento com chumbo. As figuras 21, 22 e 23 ilustram protocolos que investigaram o influxo de cálcio transsarcolemal e a resposta das proteínas contráteis ao conteúdo citoplasmático de cálcio.

A figura 21 esboça a maior resposta contrátil dos músculos papilares dos animais do grupo tratado, frente ao incremento na concentração de cálcio extracelular, enquanto a figura 22 explana o maior influxo de cálcio transsarcolemal nos papilares dos animais tratados com chumbo. A figura 23 mostra que os papilares dos grupos tratados possuem maiores pico e platô das contrações tetânicas, corroborando o maior influxo de cálcio transsarcolemal e a maior resposta das proteínas contráteis ao

cálcio. Através da análise destes protocolos pode-se concluir que a exposição ao chumbo modificou o ciclo de cálcio no cardiomiócito e a resposta das proteínas contráteis ao cálcio ativador da contração, achados estes que serão discutidos posteriormente nesta seção.

Outro importante mecanismo envolvido na regulação da contratilidade miocárdica consiste na regulação β -adrenérgica a qual afeta tanto a disponibilidade do cálcio para a contração quanto à resposta miofibrilar a este íon. A figura 24 mostra que os papilares dos animais expostos ao chumbo apresentaram redução na resposta contrátil frente a um agonista β -adrenérgico (isoproterenol) em comparação aos animais que não sofreram a exposição ao chumbo. Esse resultado sugere que, *in vivo*, o miocárdio foi exposto à maior atividade simpática, com conseqüente dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos.

Além da avaliação da contratilidade miocárdica através dos músculos papilares isolados do VE, as atividades de importantes enzimas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica foram mensuradas: NKA cardíaca e ECA cardíaca e plasmática. A figura 25 corresponde à atividade plasmática e tecidual da ECA e mostra que o tratamento com chumbo não alterou a atividade desta enzima, enquanto que a figura 26 elucida aumento da atividade da NKA no coração dos animais que receberam o chumbo por 30 dias.

Ainda, no intuito de investigarmos os efeitos do chumbo nos mecanismos reguladores da contratilidade miocárdica, proteínas fundamentais na regulação do ciclo de cálcio no cardiomiócito tiveram suas expressões quantificadas. A avaliação destas proteínas reguladoras da contratilidade muscular incluiu as medidas de: SERCA-2, NCX, PLB, fosfo-Tre¹⁷-PLB e corrigido pelo fosfolambam total (fosfo-Tre¹⁷-PLB/PLB), fosfo-Ser¹⁶-PLB e corrigido pelo fosfolambam total (fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB) e subunidade α -1 da NKA. Destas, a exposição ao chumbo promoveu redução na expressão da SERCA-2.

Esta menor expressão da SERCA-2 culmina em redução da recapturação de cálcio pelo RS e conseqüentemente, reduz o conteúdo de cálcio do RS e a disponibilidade deste íon para a ativação das proteínas contráteis (STOKKE et al., 2010). Talvez seja este o motivo pelo qual os cardiomiócitos tratados com chumbo não apresentaram aumento do inotropismo cardíaco, apesar de apresentarem maior

influxo de cálcio transarcolemal. Os detalhes dos mecanismos envolvidos em tais alterações serão explanados posteriormente nesta discussão.

6.4.1 POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

6.4.1.1 Mecanismos envolvidos no aumento do inotropismo cardíaco encontrado na preparação *in vivo*

Carmignani e colaboradores (1999, 2000) estudaram ratos Sprague-Dawley tratados por 10 meses com 100 ppm de acetato de chumbo, na água de beber e mostraram que a exposição ao chumbo resultou em aumento da dP/dt positiva ventricular esquerda. Este incremento foi acompanhado de redução de fluxo sanguíneo na artéria carótida, apontando aumento da resistência vascular. De fato, o aumento de pressão intraventricular esquerda encontrado em nosso trabalho também foi acompanhado de aumento da pressão arterial (Tabela 3), sendo que esta sobrecarga pode ser correlacionada ao efeito Anrep ou ao mecanismo de Frank-Starling, resultando em maior contratilidade.

O efeito Anrep foi descrito em 1912 por Von Anrep como a resposta inotrópica positiva que se seguia à elevação da pressão arterial sistólica. Ainda em 1914, Patterson e colaboradores, em cujo laboratório os experimentos de Anrep foram realizados, relataram resultados semelhantes em corações de cães e admitiram que o aumento do fluxo sanguíneo para o coração, que ocorre após elevação da PA, melhoraria o desempenho cardíaco e permitiria ao miocárdio desenvolver a mesma força com menor comprimento muscular (apud OKOSHI et al., 1994). No entanto, após 100 anos da descrição do efeito Anrep, os mecanismos envolvidos na sua resposta ainda permanecem controversos, pois há indicações, também, que a interação entre a pré-carga e o comprimento diastólico da fibra influi no inotropismo miocárdico, podendo ser fator fundamental na gênese do efeito Anrep (OKOSHI et al., 1994). Entretanto, é de comum acordo que o aumento da PAS resulta em melhora da perfusão coronariana e repercute em aumento da contratilidade. Sendo assim, talvez este mecanismo esteja envolvido no aumento da PSVE e da dP/dt , positiva encontrado no presente estudo (Tabela 3 e Figura 14).

O mecanismo de Frank-Starling, atualmente, está correlacionado a fatores físicos e fatores que alteram a intensidade de ativação da contração em resposta ao aumento da pré-carga. Os fatores físicos relacionam-se a disposição espacial dos miofilamentos, ou seja, a distensão miocárdica propicia maior interação espacial entre os miofilamentos e acentua o número de ligações ativas entre a miosina e a actina, com conseqüente melhora do desempenho ventricular. Os fatores ativadores da contração estão correlacionados com a regulação da contratilidade frente ao estiramento do miocárdio, resultando em: aumento do influxo transarcolemal de cálcio, melhor liberação de cálcio pelo RS e aumento da atividade da troponina C pelo cálcio (OKOSHI et al., 1999; SHIELS; WHITE, 2008). Sendo estes, possíveis mecanismos implicados no aumento de inotropismo na exposição ao chumbo, visualizado *in vivo*. Entretanto, a PDfVE mostrou-se inalterada na exposição ao chumbo, portanto, o grau de estiramento ventricular não pode ser correlacionado ao aumento da PAS e da PSVE apresentado pelo animais tratados com chumbo (Tabela 3 e Figura 14).

Outro mecanismo sistêmico implicado na elevação da PSVE e das dP/dt (positiva e negativa) está relacionado a um suposto aumento de atividade simpática. Este aumento de atividade simpática já foi reportado no modelo de tratamento crônico por 10 meses com chumbo (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999, 2000). Estes autores encontraram aumento de PAS e aumento de PSVE e correlacionaram o incremento do inotropismo cardíaco, entre outros fatores sistêmicos, a maiores níveis circulantes de catecolaminas e a hiperestimulação de receptores β_1 . Como nestes trabalhos o inotropismo cardíaco foi verificado por medidas hemodinâmicas, acredita-se que seu incremento esteja, também, associado ao aumento da resistência periférica.

Fisiologicamente a estimulação simpática dos β -receptores resulta em aumento da força contrátil desenvolvida (efeito inotrópico positivo), aceleração do tempo de relaxamento (efeito lusitrópico positivo) e aumento da freqüência cardíaca (efeito cronotrópico positivo). Os agonistas β -adrenérgicos, aumentam a produção intracelular do segundo mensageiro, AMPc, que ativa a PKA, causando fosforilação da troponina I (TnI). Este mecanismo envolve interações alostéricas entre as proteínas do filamento fino, culminando na redução da afinidade da Troponina C (TnC) pelo cálcio (BERS, 2002). Nossos resultados apontam para aumento de

atividade simpática nos animais tratados com chumbo visto que o incremento na PSVE e na dP/dt positiva do VE (efeito inotrópico positivo) foi acompanhado de elevação da FC (efeito cronotrópico positivo) e de efeito lusitrópico positivo, visualizado no registro da dP/dt negativa do VE (Tabela 3). Sabe-se, ainda, que a estimulação β -adrenérgica, por períodos prolongados, promove dessensibilização dos receptores adrenérgicos (TAKAGI et al., 2006) e, este fenômeno foi observado no protocolo de avaliação simpática na preparação *in vitro*. Na curva concentração-resposta ao isoproterenol, os papilares dos animais do grupo Pb apresentaram menor aumento na resposta contrátil a este agonista β -adrenérgico (Figura 24), fortalecendo a hipótese de dessensibilização destes receptores.

Outro possível mecanismo envolvido no aumento do inotropismo encontrado *in vivo*, relacionado à regulação neuro-humoral da contratilidade, consiste na interferência do chumbo no SRA, visto que alguns trabalhos reportam aumento da atividade do SRA na exposição ao chumbo (SHARIFI et al., 2004; SIMÕES et al., 2011; FIORIM et al., 2011).

Há sugestões que o chumbo aumenta a atividade do SRA por aumentar a concentração plasmática de renina devido à estimulação de sua síntese e liberação no aparelho justaglomerular (BOSCOLO; CARMIGNANI, 1988; CARMIGNANI et al., 1999), favorecer o aumento da produção de angiotensina I (CAMPBELL et al., 1985) e aumentar a atividade da ECA (SHARIFI et al., 2004). O aumento da atividade da ECA resulta em aumento da disponibilidade de angiotensina II. Simões e colaboradores (2011) encontraram elevação da angiotensina II na exposição ao chumbo (SIMÕES et al., 2011). A angiotensina II promove efeito inotrópico positivo, principalmente, por aumentar a disponibilidade de cálcio no cardiomiócito (MATTIAZZI, 1997; PETROFF et al., 2000), portanto, este poderia ser um dos mecanismos envolvidos no aumento de PSVE e dP/dt positiva encontrado em nosso estudo (Tabela 3).

Entretanto, as atividades da ECA - sistêmica (plasmática) e local (cardíaca) - não se mostraram alteradas, sugerindo que o SRA não está envolvido na resposta inotrópica encontrada nos animais após 30 dias de tratamento (Tabela 3). No entanto, não se pode descartar o envolvimento deste sistema na fase inicial das alterações contráteis promovidas pelo chumbo, uma vez que SHARIFI e colaboradores (2004) mostraram divergências na participação do sistema renina

angiotensina ao longo de oito semanas de exposição ao metal. Estes autores mostraram que os animais apresentaram elevação da atividade plasmática da ECA, na segunda semana de tratamento, e esta elevação calhou com aumento da PAS. No entanto, na quarta semana, a pressão se manteve elevada enquanto a atividade da ECA retornou aos valores basais. Sendo assim, parece que o SRA estaria envolvido com a gênese, mas não com a manutenção de altos valores pressóricos. No entanto, os nossos dados nos impedem de excluir a participação do SRA nas respostas cardiovasculares induzidas pelo chumbo, uma vez que o aumento de atividade simpática estimula a produção renal de renina, o que resulta em aumento de angiotensina II, sem, necessariamente, aumentar a atividade da ECA.

Além dos protocolos realizados na câmara ventricular esquerda, o ventrículo direito também sofreu intervenções para a investigação dos efeitos da exposição ao chumbo nos parâmetros hemodinâmicos referentes a esta cavidade. A principal função do VD é receber o retorno venoso sistêmico e bombeá-lo para as artérias pulmonares. Assim como o ventrículo esquerdo, o ventrículo direito está sob regulação de diferentes mecanismos, como a frequência cardíaca, o mecanismo de Frank-Starling e a regulação neuro-humoral (HADDAD et al., 2008). Diferentemente da resposta inotrópica encontrada na avaliação ventricular esquerda, os parâmetros investigados no VD não sofreram alterações na exposição ao chumbo (Tabela 3 e Figura 15) sugerindo que este metal, no modelo de tratamento estudado, não modifica a função hemodinâmica desta cavidade.

O incremento da pressão intraventricular esquerda e da contratilidade, avaliado *in vivo*, encontrado em nosso trabalho pode ser resultado do aumento da resistência vascular sistêmica, corroborando os trabalhos que estudaram os efeitos agudos do chumbo na reatividade vascular (LE-FENG et al., 2007; FARMAND, et al., 2005; VAZIRI, et al., 1997; VAZIRI, et al., 1999; SILVEIRA, et al., 2010). Devido a esta intervenção sistêmica, o incremento da dP/dt positiva ventricular esquerda consiste em um indicador de inotropismo com aplicações limitadas, visto que, outros fatores, além daqueles intrínsecos ao coração, são capazes de interferir em seus valores. Dentre estes fatores podemos citar as mudanças na pré-carga e pós-carga e suas repercussões, como efeito Anrep e Frank-Starling, além dos fatores neuro-humorais reguladores da contratilidade. Frente ao exposto, a avaliação da contratilidade

miocárdica, através dos músculos papilares, tornou-se de fundamental importância no isolamento destes mecanismos intrínsecos de regulação contrátil.

6.4.1.2 Resposta inotrópica obtida na preparação *in vitro*

Avaliamos a contratilidade miocárdica através da técnica de músculos papilares isolados do VE de ratos. Ainda, estudamos os efeitos do chumbo na atividade da NKA cardíaca e na expressão de importantes proteínas reguladores da contratilidade miocárdica. Através destas avaliações foi possível investigarmos os efeitos diretos do chumbo nos parâmetros contráteis e nos mecanismos reguladores desta contratilidade, sem a interferência da resistência vascular ou de fatores neuro-humorais.

A exposição ao chumbo não promoveu mudanças na força, assim como não alterou os parâmetros temporais e inotrópicos da contração de músculos papilares do VE (Figuras 17, 18 e 19) mostrando que os resultados encontrados *in vitro* diferem dos nossos resultados *in vivo*. Estes achados sugerem que os mecanismos celulares envolvidos na gênese da força e na velocidade contrátil, tais como aqueles envolvidos com o ciclo de cálcio, estão regulando o provável estímulo inotrópico positivo no cardiomiócito, provavelmente promovido pela estimulação simpática, visualizado hemodinamicamente, evitando o aumento de força na preparação isolada.

Os escassos estudos que, até o momento, investigaram os efeitos diretos do chumbo na contratilidade miocárdica estão concentrados em nosso laboratório. Vassallo e colaboradores (2008) submeteram a preparação de tiras de VD às concentrações crescentes de acetato de chumbo (3 - 300 μM) e registraram redução da força isométrica nas concentrações superiores a 30 μM . No entanto, a atividade do RS não foi modificada pelo tratamento agudo com chumbo, sendo que a diminuição na força foi atribuída ao menor influxo de cálcio transsarcolemal e a redução na atividade da enzima ATPase miosínica (VASSALLO et al., 2008). Esses achados apontam o chumbo como um fator de risco capaz de alterar o funcionamento cardíaco.

Fioresi e colaboradores (2009) estudaram os efeitos agudos de baixa concentração de chumbo na contração isométrica de músculos papilares isolados do VE de ratos.

Estes autores mostraram que uma única exposição ao chumbo foi capaz de promover efeito inotrópico positivo, efeito este relacionado, principalmente, ao aumento da atividade da ATPase miosínica. Com este trabalho, foi demonstrado, pela primeira vez, que o aumento da pressão ventricular induzida pelo chumbo possui, além do envolvimento vascular, alterações diretas na contratilidade miocárdica.

A literatura dispõe de dois trabalhos que investigaram a contratilidade miocárdica através da técnica de coração isolado. Prantice e Koop (1985) estudaram a cardiotoxicidade da exposição aguda ao chumbo (0,3 – 30 μM) e concluíram que a perfusão com a solução contendo 30 μM de acetato de chumbo prolongou a condução atrioventricular e a do feixe de His, ainda, reduziu o fluxo sanguíneo coronariano e a FC. Outro grupo de pesquisadores estudou ratos expostos ao chumbo por até 12 semanas e mostrou que os animais que receberam o chumbo, por oito ou mais semanas, tiveram aumento da contratilidade miocárdica. Entretanto, neste último trabalho, a contratilidade foi avaliada através do registro da força gerada por uma haste presa ao ápice do coração e conectada a um transdutor de força (REZA et al., 2008), técnica sujeita a muitas falhas.

Frente à breve discussão sobre os efeitos do chumbo na contratilidade miocárdica e diante das limitações ou divergências dos estudos crônicos e agudos focados nos efeitos diretos deste metal no músculo cardíaco o presente estudo se torna relevante na investigação inédita da repercussão da exposição ao chumbo na contratilidade miocárdica e nos mecanismos reguladores do inotropismo cardíaco.

Como observado na figura 17, após a exposição ao chumbo, a força contrátil e os parâmetros temporais da contração se mantiveram inalterados. No entanto, será que os mecanismos celulares envolvidos na regulação inotrópica estão, de alguma forma, comprometidos neste modelo de exposição ao chumbo, uma vez que a avaliação *in vivo* dos animais aponta para aumento de contratilidade?

Para investigarmos esta hipótese, os principais mecanismos reguladores da contração foram investigados. A regulação do ciclo de cálcio celular é fundamental para a contratilidade miocárdica e a perda desta regulação está associada com disfunção e doenças cardíacas (ENDO, 2006). Portanto, investigamos os efeitos do chumbo no ciclo de cálcio do cardiomiócito e a resposta inotrópica dos músculos papilares frente a diversas manobras. Ainda, investigamos os efeitos do chumbo na

atividade da NKA e na expressão de importantes proteínas envolvidas na regulação do ciclo de cálcio no cardiomiócito.

6.4.1.3 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência no funcionamento dos canais do tipo L para cálcio

Durante o potencial de ação cardíaco o cálcio entra na célula através dos canais de cálcio ativados por despolarização e gera a corrente de cálcio, chamada I_{Ca} , que se refere a entrada através dos canais do tipo L para cálcio. A entrada de cálcio pelo sarcolema desencadeia a liberação de cálcio-cálcio induzida do retículo sarcoplasmático, através dos canais de rianodina. A combinação entre o influxo e a liberação de cálcio aumenta a concentração de cálcio intracelular ($[Ca]_i$), possibilitando a ligação do cálcio com a troponina C (TnC), e desta forma, desencadeando o processo contrátil (BERS, 2005).

O processo contrátil envolve a participação de proteínas contráteis e proteínas reguladoras da contração. A troponina é uma proteína moduladora formada por três subunidades: a subunidade I (TnI) que, em repouso, interage com a tropomiosina, provocando inibição do sítio ativo da actina; a subunidade C (TnC), que possui grande afinidade pelo íon cálcio; e a subunidade T (TnT), que se liga à tropomiosina quando o cálcio interage com a troponina. Nesta última situação a tropomiosina desloca-se liberando os sítios ativos da actina, garantindo a interação actino-miosina. Deste modo, as proteínas que realmente realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, sendo denominadas proteínas contráteis, enquanto que a tropomiosina e a troponina modulam a sua interação, daí a denominação de proteínas moduladoras da contração.

O relaxamento do cardiomiócito ocorre com o desprendimento do cálcio da TnC e a posterior redução da $[Ca]_i$. Esta redução é possibilitada por ação de quatro mecanismos, envolvendo: a bomba de cálcio do RS (SERCA), a qual recaptura ativamente este íon para seu interior; a Ca ATPase do sarcolema ou bomba de cálcio do sarcolema; o NCX; e o uniporte de cálcio mitocondrial (BERS, 2002).

Para investigarmos a interferência promovida pela exposição ao chumbo no influxo de cálcio transsarcolemal, submetemos os músculos papilares aos seguintes

protocolos que avaliam indiretamente esta propriedade: medida da PRC, curva concentração-resposta ao cálcio extracelular e contrações tetânicas.

A figura 21 ilustra a curva concentração-resposta ao aumento da concentração de cálcio extracelular e evidencia a maior resposta contrátil dos papilares dos animais do grupo tratado quando comparados aos do grupo controle, sugerindo que os cardiomiócitos dos animais do grupo tratado são mais permeáveis ao cálcio (LEITE et al., 1995).

A figura 22 mostra que o tratamento com chumbo promoveu aumento na PRC. Este achado fortalece nosso resultado descrito acima: que a exposição ao chumbo ocasionou aumento no influxo de cálcio transsarcolemal.

As contrações tetânicas também foram realizadas no intuito de avaliarmos o influxo de cálcio e a afinidade das proteínas contráteis ao cálcio, uma vez que, foram realizadas na presença de um inibidor do RS, a cafeína. A figura 23 mostra que o tratamento com chumbo resultou em aumento no pico e no platô das contrações tetânicas, e este aumento foi suprimido quando a preparação foi exposta a um bloqueador de canal de cálcio. Este achado corrobora as respostas obtidas na curva de cálcio e na PRC, confirmando que os cardiomiócitos dos animais tratados com chumbo apresentam maior influxo de cálcio quando comparados aos dos animais do grupo controle.

Até o momento, desconhecemos na literatura trabalhos que investigaram os efeitos do chumbo na homeostasia do cálcio no cardiomiócito, assim, este aumento da $[Ca]_i$ ainda não havia sido registrado. Entretanto há trabalhos que reportam este aumento em hemácias e correlacionam a toxicidade do chumbo nestas células a este fator. QUINTANAR-ESCORZA e colaboradores (2007) estudaram a toxicidade do chumbo em eritrócitos extraídos de trabalhadores expostos a este metal (concentração média de chumbo no sangue equivalente a 75 $\mu\text{g}/\text{dL}$). Estes autores mostraram que a $[Ca]_i$ era maior nas hemácias provenientes dos trabalhadores ocupacionalmente expostos. Em outro trabalho recente, este mesmo grupo de pesquisadores, estudando eritrócitos expostos agudamente a crescentes concentrações de chumbo, mostraram que aumento da $[Ca]_i$ induzido pela exposição ao chumbo depende da concentração, do tempo de exposição ao metal e do estado oxidativo do eritrócito, uma vez que a co-incubação com um análogo da vitamina E impediu o aumento da concentração intracelular de cálcio (QUINTANAR-ESCORZA et al., 2010).

O mecanismo pelo qual o chumbo age, a nível celular, favorecendo o influxo de cálcio ainda é uma incógnita. No entanto, nossos resultados sugerem que o chumbo favoreça o influxo de cálcio via canais do tipo L para cálcio, uma vez que o uso do verapamil, um bloqueador destes canais, aboliu o maior influxo de cálcio no coração dos animais expostos ao chumbo.

A exposição ao chumbo resultou em aumento da atividade de NKA, como visualizado na figura 26. LEE e colaboradores (2009) mostraram que a ativação da NKA resulta em uma cascata de sinalização intracelular, via ativação de Src e ERK $\frac{1}{2}$, que culmina em ativação da subunidade α -1 do canal de cálcio do tipo L. Esta ativação, por sua vez, resulta em aumento do influxo de cálcio por este canal, sendo este um novo mecanismo proposto para a sinalização intracelular de regulação do ciclo de cálcio no cardiomiócito. Portanto, como o aumento da atividade da NKA encontrado em nosso trabalho condiz com aumento da PRC, da curva concentração-resposta ao cálcio e com as repostas nas contrações tetânicas. Talvez seja este o mecanismo pelo qual a exposição ao chumbo resulta em aumento do influxo de cálcio.

6.4.1.4 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência no funcionamento do RS

No cardiomiócito intacto, o cálcio que penetra na célula, via canais do tipo L para cálcio, ativa a liberação do estoque de cálcio do RS, por ativação dos receptores de rianodina, através de um mecanismo conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio (BERS, 2002). O cálcio liberado do RS, associado ao cálcio proveniente do meio extracelular, aumenta a $[Ca]_i$, evento que proporciona a ligação destes íons com a TnC e a ativação do processo contrátil.

Para que o músculo relaxe, alguns processos estão envolvidos na remoção dos íons cálcio do sarcoplasma. Dentre estes mecanismos, o mais efetivo nesta ação é a recapturação de cálcio pelo RS, via SERCA 2 (BERS, 2002).

A SERCA 2 é uma proteína expressa na membrana do RS com a propriedade de recapturar cálcio e favorecer a diástole, assim como armazenar cálcio para ser utilizado na próxima contração. O fosfolambam desfosforilado é um inibidor da ação enzimática da bomba. Portanto, alterações na expressão ou na atividade do PLB podem causar impacto na recapturação de cálcio e, conseqüentemente, no

acoplamento excitação-contração. O PLB, quando fosforilado, perde a propriedade de inibição da SERCA, permitindo que esta recapture ativamente o cálcio para o interior do RS (PERIASAMY, 2008). O PLB possui duas subunidades fosforiláveis: serina 16 (Ser¹⁶), por ação da PKA, e treonina 17 (Thr¹⁷), por ação da CaMKII (MATTIAZZI et al., 2006).

O tratamento com chumbo resultou na redução da expressão protéica da SERCA 2 (Figura 27). Esta menor expressão culmina em redução do conteúdo de cálcio do RS e, conseqüentemente, reduz a disponibilidade deste íon na ativação das proteínas contráteis (STOKKE et al., 2010). Este é o motivo pelo qual os cardiomiócitos tratados com chumbo não apresentaram aumento do inotropismo cardíaco, apesar de apresentarem maior influxo de cálcio transarcolemal. Esta afirmação é legitimada pela igualdade de resposta nas potenciações pós-pausas, apresentada entre ambos os grupos (Figura 20). A manobra de PPP foi utilizada para avaliarmos, de maneira indireta, a liberação de cálcio do RS (VASSALLO; MILL, 1988) e nos permite concluir que, apesar do estímulo para liberação de cálcio induzida ser maior no grupo Pb, a redução na expressão da SERCA 2 contrabalança esta resposta e culmina em similar liberação de cálcio (Figura 20) e inotropismo (Figura 17 e 18) entre ambos os grupos.

A exposição ao chumbo promove redução na expressão da SERCA 2, no entanto, a expressão do PLB e de suas subunidades fosforiláveis (fosfo-Tre¹⁷-PLB e fosfo-Ser¹⁶-PLB) não se mostraram alteradas (Figura 28). As razões entre as subunidades fosforiláveis, corrigidas pelo fosfolambam total (fosfo-Tre¹⁷-PLB/PLB e fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB) também não sofreram mudanças induzidas pelo tratamento com chumbo (Figura 29). Estas razões foram obtidas no intuito de estudarmos a atividade do fosfolambam e nos permite concluir que a exposição ao chumbo não modificou esta atividade. Portanto, nos corações dos animais tratados, a SERCA 2 está quantitativamente reduzida e o PLB não promoveu nenhuma resposta compensatória a esta dessensibilização. O resultado final desta combinação entre redução da expressão da SERCA 2 e a ausência de resposta compensatória pelo fosfolambam culmina em recaptção similar de cálcio pelo RS entre ambos os grupos, mesmo estando a SERCA 2 do grupo Pb exposta a maior disponibilidade de cálcio.

A redução da expressão da SERCA 2 pode ter ocorrido frente a possível estimulação simpática crônica (PRASAD et al., 2007; RYALL et al., 2008) ou devido ou aumento da concentração da $[Ca]_i$ promovida pelo maior influxo de cálcio (RAEYMAEKERSL, et al., 2011). Ainda, vale ressaltar que a redução da expressão da SERCA 2 é considerada um marcador molecular do prejuízo da performance cardíaca durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda, no estabelecimento da insuficiência cardíaca (QI et al., 1997).

6.4.1.5 Ciclo de cálcio do cardiomiócito: interferência nos mecanismos sarcolemais envolvidos na extrusão do cálcio citoplasmático

No entanto, se os cardiomiócitos dos animais tratados apresentam maior influxo de cálcio transsarcolemal e a magnitude de recaptação deste cálcio pelo RS não se apresentou maior, qual via está implicada na remoção deste cálcio do meio intracelular?

De acordo com CHASE e ORCHARD (2011) três mecanismos estão envolvidos na remoção do cálcio citoplasmático de cardiomiócitos de ratos. Quantitativamente, o principal mecanismo efetivo na remoção dos íons cálcio ocorre por ação da SERCA 2, o qual contribui com 86 % da remoção de cálcio do citoplasma, transportando este íon ativamente para o interior do RS. Os outros dois mecanismos ocorrem via sarcolema: o NCX contribui com 8 % da extrusão enquanto a Ca ATPase sarcolemal participa com 6%.

Como a participação do RS não diferiu entre os grupos (Figura 20) é provável que os mecanismos envolvidos na remoção de cálcio, via sarcolema, estejam compensando o maior influxo deste íon no coração dos animais do grupo tratado e, assim, evitando o aumento de força contrátil.

O NCX é um importante regulador da homeostase do cálcio no cardiomiócito e possui ação moduladora na contratilidade miocárdica. A expressão protéica do NCX está ilustrada na figura 30, a qual evidencia que o tratamento com chumbo não modificou sua expressão protéica. O fato da expressão protéica de determinada enzima manter-se inalterada, não necessariamente reflete o verdadeiro estado de sua atividade. Esta afirmação é confirmada pela comparação entre as figuras 31 e 26, as quais ilustram esta divergência entre a expressão e a atividade da NKA. A

expressão da subunidade α -1 da NKA, responsável por 88 % da atividade desta enzima, (BERRY et al., 2007) manteve-se inalterada na presença do chumbo enquanto a atividade enzimática desta enzima mostrou-se acentuadamente elevada.

O NCX do sarcolema é reversível e, desta forma, além de participar do processo de relaxamento, também auxilia no processo de contração. Este trocador possui uma estequiometria de três íons sódio para cada íon cálcio, e gera a corrente $I_{Na/Ca}$, a qual pode resultar da extrusão ou do influxo de cálcio. Na repolarização ou no repouso celular o trocador trabalha em seu modo normal, ou seja, favorecendo a extrusão de cálcio e o influxo de sódio. Durante a despolarização, o potencial de membrana torna-se positivo e atinge valores maiores que o do potencial de equilíbrio do trocador. Esta alteração elétrica causa inversão do NCX, portanto, o mesmo trabalha retirando sódio e favorecendo o influxo de cálcio no miócito (BLAUSTEIN; LEDERER, 1999).

Além de mudanças no potencial de membrana, outra forma de controlar a atividade do NCX, consiste nas alterações na disponibilidade destes íons para o transporte. A elevação da $[Na^+]_i$ dificulta, rápida e intensamente, a troca Na/Ca no estado de repouso, basicamente porque o aumento da $[Na^+]_i$ diminui o gradiente difusional do sódio através da membrana. Além disso, o trocador possui dois sítios intracelulares onde se ligam Na^+ e Ca^{++} . A ligação do Na^+ provoca redução da atividade da troca, enquanto a ligação com o cálcio a estimula. Desta forma, condições que promovem elevação dos níveis intracelulares de sódio, tais como os digitálicos, dificultam a extrusão do cálcio via troca Na/Ca, aumentando a força de contração (BLAUSTEIN; LEDERER, 1999).

Nossa hipótese de aumento de atividade de NCX, mesmo com sua expressão inalterada, é baseada no fato que este trocador possui estes sítios internos de ligação para os íons sódio e cálcio. Logo, o aumento do influxo de cálcio transarcolema e a não recapturação deste excesso pelo RS favorece a ligação do cálcio no sítio interno do trocador e ativa a extrusão destes íons via NCX. Este aumento da atividade do NCX resulta em elevação da $[Na]_i$ que, por sua vez, funciona como estímulo para o aumento de atividade da NKA (BERS; DESPA, 2009), como visualizado em nosso trabalho (Figura 26).

6.4.1.6 Mecanismo proposto para os efeitos do chumbo no ciclo de cálcio do cardiomiócito

Sumarizando os eventos que ocorrem nos cardiomiócitos de ratos expostos por 30 dias ao acetato de chumbo, temos:

- O influxo de cálcio transsarcolemal é maior nos miócitos dos animais do grupo Pb. Esta resposta foi visualizada pelo aumento na PRC, pelo maior inotropismo desenvolvido na curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular e pelo aumento no pico e no platô das contrações tetânicas, aumento este abolido pelo bloqueio do canal de cálcio.
- O maior influxo transsarcolemal de cálcio não resultou em maior inotropismo cardíaco, *in vitro*, pois, apesar do cálcio entrar com maior facilidade na célula, ele não promove, efetivamente, maior liberação de cálcio-cálcio induzida do RS. Isto ocorre, pois o RS apresenta menor quantidade de SERCA 2 portanto, não recaptura o excesso de cálcio que entra via sarcolema, logo a quantidade de cálcio liberada do RS para ativar a contração é mesma em ambos os grupos, fato este visualizado na similaridade na manobra PPP .
- Esta dessensibilização da SERCA 2 ocorreu, provavelmente, devido a exposição prolongada a alta concentração de cálcio intracelular ou devido ao estímulo simpático crônico, ativado durante os 30 dias de tratamento. Esta última afirmação é corroborada pelo aumento de FC e pela divergência entre o aumento do inotropismo ventricular registrado *in vivo* e a inalterabilidade da força contrátil, visualizada *in vitro*, assim como pela redução na resposta ao agonista β -adrenérgico, na preparação de músculo isolado.
- O maior influxo de cálcio observado, indiretamente, no cardiomiócito não resulta em maior recaptção de cálcio pelo RS, mas sim é extruído via NCX. Apesar da expressão protéica deste trocador não estar alterada, acreditamos que sua atividade esteja. Esta hipótese é justificada pelo aumento de atividade da NKA. O maior influxo de cálcio resulta em maior concentração deste íon no citoplasma, que ativa o NCX a remover este excesso, uma vez que a SERCA 2 não o recaptura. A saída do cálcio via NCX resulta em aumento do influxo de sódio, que conseqüentemente, tem sua concentração aumentada no sarcoplasma. O aumento de sódio intracelular é o estímulo para que a NKA aumente sua atividade, removendo o excesso de sódio do

meio intracelular. De fato, a exposição ao chumbo elevou a atividade desta bomba.

A figura 32 esquematiza os mecanismos pelos quais o chumbo, no modelo de tratamento utilizado, altera o ciclo de cálcio no cardiomiócito: há maior influxo de cálcio transarcolemal, entretanto este maior influxo não resulta em inotropismo positivo, uma vez que a SERCA 2 encontra-se dessensibilizada e o NCX promove a extrusão destes íons da célula.

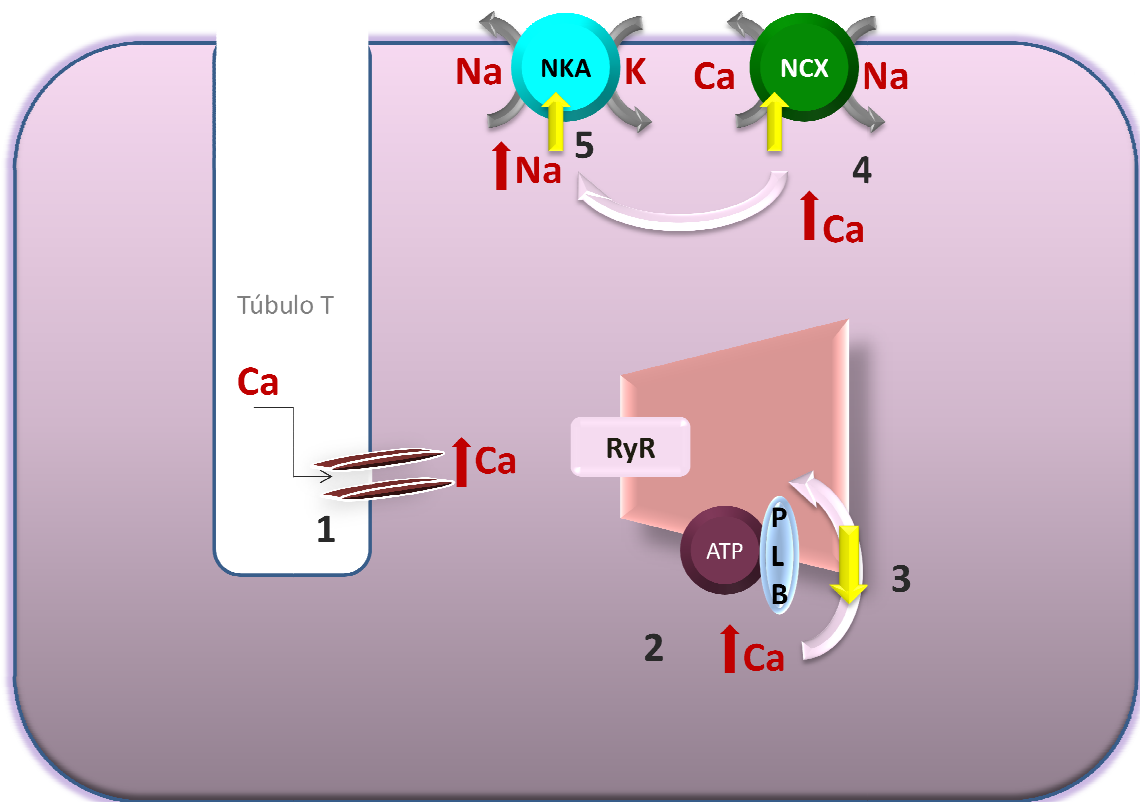


Figura 32: Mecanismo proposto pelo qual a exposição ao chumbo altera o ciclo de cálcio no cardiomiócito. 1: O chumbo promove maior influxo de cálcio transarcolemal; 2: Há aumento da $[Ca]_i$; 3: Há dessensibilização da SERCA 2 e menor recaptção de cálcio; 4: Conseqüentemente, o aumento da $[Ca]_i$ ativa o NCX a remover o cálcio citosólico; 5: O aumento da atividade do NCX resulta em aumento da $[Na]_i$, que por sua vez, ativa a NKA.

7 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que a exposição, por 30 dias, a uma concentração sanguínea de chumbo inferior ao limite recomendado pela legislação brasileira resulta em aumento da pressão arterial, da FC e do inotropismo ventricular esquerdo. Ainda, demonstrou, pela primeira vez, que a exposição ao chumbo promove alterações no ciclo de cálcio do cardiomiócito que podem contribuir com os efeitos deletérios deste metal no sistema cardiovascular.

8 REFERÊNCIAS

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

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Lead**. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta: 2007.

[ILZSG]. International Lead and Zinc Study Group. **Press Release**, 2011. Disponível em:

<http://www.ilzsg.org/generic/pages/list.aspx?table=document&ff_aa_document_type=R&from=3>. Acesso em 14/mar/2011.

[WHO] World Health Organization. **Cardiovascular diseases**, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acesso em 06/Mai/2011.

BERGDAHL, I. A. et al. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health**. v. 23, p. 359-363, 1997.

BERRY, R. G. et al. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na⁺/K⁺-ATPase α 1 and α 2 subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. **Cardiovascular Research**. v. 73, p. 92–100, 2007.

BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. Insight review articles. **Nature**. v. 415, p. 198-205, 2002.

BERS, D.M.; DESPA, S. Na⁺ transport in cardiac myocytes; Implications for excitation-contraction coupling. **IUBMB Life**. v. 61, p. 215–221, 2009.

BERS, D.M.; GUO, T. Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1047, p. 86–98, 2005.

BLAUSTEIN, M. P.; LEDERER, W.J. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. **Physiological Reviews**. v. 79, p. 764-830, 1999.

BOSCOLO, P.; CARMIGNANI, M. Neurohumoral Blood Pressure Regulation in Lead Exposure. **Environmental Health Perspectives**. v. 78, p. 101-106, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 218-254, 1976.

BRASIL, Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 7. Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Portaria GM nº 3.214, de 08 de junho de 1978.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral, **Sumário Mineral 2009**. Disponível em: <https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=4544>. Acesso em 14/mar/2011.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 04 Ago. 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 01 jun. 2011.

BRASIL. Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008. Fixa o limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 04 Ago. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11762.htm>. Acesso em: 15 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. **Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico. Saúde do trabalhador**. Protocolos de complexidade diferenciada. Normas e manuais técnicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) / **Publicações: Chumbo**. Disponível em:

<https://sistemas.dnrm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=3981>. Acesso em 15/mar/2011.

CAMPBELL, B.C.; MEREDITH, P.A.; SCOTT, J.J. Lead exposure and changes in the renin-angiotensin-aldosterone system in man. **Toxicology Letters**. v. 25, p. 25-32, 1985.

CAPITANI, E.M.; PAOLIELLO, M.M.B.; ALMEIDA, G.R.C. **Simpósio: Chumbo e Saúde Humana. Fontes de Exposição humana ao chumbo no Brasil**. Medicina (Ribeirão Preto). v. 42, p. 311-318, 2009.

CARMIGNANI, M. et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. **Life Sciences**. v. 68, p. 401–415, 2000.

CARMIGNANI, M. et al. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. **Immunopharmacology**. v. 44, p. 105–110, 1999.

CARVALHO, F.M. et al. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 13, p. 19-24, 2003.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} activity. **Annual Biochemistry**. v. 157, p. 375-380, 1986.

CHAN, R. Parents demand answers in China lead poisoning. **Reuters**, 2011. Disponível em: <http://www.reuters.com/article/2011/01/07/us-china-lead-idUSTRE7061F520110107>. Acesso em 29 mar. 2011.

CHAO, S.; BU, C.H.; CHEUNG, W.Y. **Activation of troponin C by Cd^{2+} and Pb^{2+}** . **Archives of Toxicology**. v. 64, p. 490–496, 1990.

CHASE, A.; ORCHARD, C.H. Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 50, p. 187–193, 2011.

CORDEIRO, R.; LIMA FILHO, E.C.; SALGADO, P.E.T. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue I: Neuropatia periférica. **Revista de Saúde Pública**. v. 30, p. 248-255, 1996.

COURTOIS, E. et al. Lead-Induced Downregulation of Soluble Guanylate Cyclase in Isolated Rat Aortic Segments Mediated by Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 14, p. 1464–1470, 2003.

DEN, H.E.; NAWROT, T.; STAESSEN, J.A. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. **Journal of Human Hypertension**. v. 16, p. 563–568, 2002.

ENDO, M. Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 100, p. 525–537, 2006.

FARMAND, F. et al. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. **Environmental Research**. v. 98, p. 33–39, 2005.

FIORESI, M. et al., Acute lead exposition increases myocardial contractility in rats. **Biological Research**. v. 42 (supplement A0: R-104), 2009.

FIORIM, J. et al. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. **PLoS One**. v. 6, 2011.

GRIZZO, L. T.; CORDELLINI, S. Perinatal Lead Exposure Affects Nitric Oxide and Cyclooxygenase Pathways in Aorta of Weaned Rats. **Toxicological Sciences**. v. 103, p. 207–214, 2008.

HADDAD, F. et al. Right Ventricular Function in Cardiovascular Disease, Part I: Anatomy, Physiology, Aging, and Functional Assessment of the Right Ventricle. **Circulation**. v. 117, p. 1436-1448, 2008.

HEYDARI, A. et al. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. **Toxicology Letters**. v. 166, p. 88–94, 2006.

HUO, X. et al. Elevated blood lead levels of children in Guiyu, an electronic waste recycling town in China. **Environmental Health Perspectives** . v. 115, p. 1113-1117, 2007.

KARIMI, G. et al. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. **Pharmacological Research**. v. 46, p. 31-37, 2002.

KHALIL-MANESH, F. et al. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. **American Journal of Hypertension**. v. 6, p. 723-729, 1993.

KORECKOVÁ-SYSALOVÁ, J. Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GFAAS. **Biological Trace Element Research**. v. 53, p. 321-329, 1997.

KOSNETT, M.J. et al. Recommendations for medical management of adult lead exposure. **Environmental Health Perspective**. v. 115, p. 463-471, 2007.

KREUSCH, M.A. **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, Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2005.

LAWTON, L.J.; DONALDSON, W.E. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. **Biological Trace Element Research**. v. 28, p. 83-97, 1991.

LEE, D. I. et al. Activation of (Na⁺K⁺)-ATPase Modulates Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel Function. **Molecular Pharmacology**. v. 75, p. 774-781, 2009.

LE-FENG, Z. et al. Direct effects of lead (Pb²⁺) on the relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. **Toxicology Letters**. v. 170, p. 104–110, 2007.

LE-FENG, Z.; SHUANG-QING , P.; SHENG, W. Influence of lead (Pb²⁺) on the reactions of in vitro cultured rat aorta to 5-hydroxytryptamine. **Toxicology Letters**. v. 159, p. 71–82, 2005.

LEITE, C.M.; VASSALLO, D.V.; MILL, J.G. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 73, p. 638-643, 1995.

LEITE, C.M.; VASSALLO, D.V.; MILL, J.G. The effect of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 21, p. 859-62, 1988.

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**. p. 1391-1410, 2007.

MALVEZZI, C.K. , et al. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p.1341-1346, 2001.

MARQUES, M. et al. Alteration of the Soluble Guanylate Cyclase System in the Vascular Wall of Lead-Induced Hypertension in Rats. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 12, p. 2594–2600, 2001.

MATTIAZZI, A. et al. The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 563-572, 2006.

MATTIAZZI, A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness? **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 37, p. 205-214, 1997.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 9, p.167-181, 2004.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. Effects of lead exposure on the human body and health implications. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 15, p. 119-129, 2004.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, p. 472-482, 2007.

Ni Z, et. al. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Kidney International**. v. 66, p. 2329-2336, 2004.

OGATA, A.; SUETA, S.; TAGAWA, M. A case of lead nephropathy due to chronic occupational lead exposure]. **Nippon Jinzo Gakkai Shi. Japanese Journal of Nephrology**. v. 53, p. 207-211, 2011.

OKOSHI, M. P. et al., Influência da elevação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo sobre os valores da primeira derivada temporal da pressão ventricular (dP/dt). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 73, p. 37-41, 1999.

OKOSHI, M.P.; TUCCI, P.J.F.; CICOGNA, A.C. O efeito Anrep. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 63, p. 501-505, 1994.

OLIVEIRA, E.M.; SANTOS, R.A.S.; KRIEGER, J.E. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. **Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 755-764, 2000.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**. Centro de Recursos Ambientais. v. 3. Salvador: 2001.

PATRICK, L. Lead Toxicity Part I: A Review of the Literature. Exposure, Evaluation, and Treatment. Part 1. **Alternative Medicine Review**. v. 11, p. 02-22, 2006.

PATRICK, L. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. **Alternative Medicine Review**. v. 11, p. 114-127, 2006.

PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G.J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovascular Research**. v. 77, p. 265–273, 2008.

PETERS, J.L. Stress as a Potential Modifier of the Impact of Lead Levels on Blood Pressure: The Normative Aging Study. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, p. 1154–1159, 2007.

PETROFF, M.G.V. et al. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. **The Journal of Physiology**. v. 529, p. 189-203, 2000.

PIRKLE, J. R. et al. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. **American Journal of Epidemiology**. v. 121, p. 246-258, 1985.

PRASAD, A.M. et al. Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. **American Journal of Physiology Cellular Physiology**. v. 292, p. 2269-2275, 2007.

PRENTICE, R.C.; KOPP, S.J. Cardiotoxicity of lead at various perfusate calcium concentrations: functional and metabolic responses of the perfused rat heart. **Toxicological and Applied Pharmacology**. v. 81, p. 491–501, 1985.

QI, M. et al. Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. **American Journal of Physiology**. v. 272, p. 2416-2424, 1997.

QUINTANAR-ESCORZA, M.A. et al. Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. **Toxicological and Applied Pharmacology**. v.1, p. 1-8, 2007.

QUINTANAR-ESCORZA, M.A. et al. Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺]_i concentration in human erythrocytes incubated with lead. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p.1338-1346, 2010.

RABINOWITZ, M.B.; WETHERILL, G.W.; KOPPLE, J.D. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 58, p.260-270, 1976.

- RAEYMAEKERS, L. et al. Modeling Ca^{2+} dynamics of mouse cardiac cells points to a critical role of SERCA's affinity for Ca^{2+} . **Biophysical Journal**. v. 100, p. 1216-1225, 2011.
- REZA, B. et al. Effects of low-level lead exposure on blood pressure and function of the rat isolated heart. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 40, p. 69-72, 2008.
- RINGER, S.A. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. **Journal of Physiology**. v. 4, p. 29-47, 1883.
- RONCAL, C. et al. Lead, at low levels, accelerates arteriopathy and tubulointerstitial injury in chronic kidney disease. **American Journal Physiology. Renal Physiology**. v. 293, p. 1391-1396, 2007.
- RYALL, J.G. et al. Chronic β_2 -adrenoceptor stimulation impairs cardiac relaxation via reduced SR Ca^{2+} -ATPase protein and activity. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**. v. 294, p.2587-2595, 2008.
- SCHWEDA, F. et al. Renin release. *Physiology*. v. 22, p. 310-319, 2007.
- SHARIFI, A.M. et. al. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. **Toxicology Letters** v. 153, p.233–238, 2004.
- SHELKOVNIKOV, S.A.; GONICK. H.C. Influence of Lead on Rat Thoracic Aorta Contraction and Relaxation. **American Journal of Hypertension**. v. 14, p. 873–878, 2001.
- SHIELS, H.A.; WHITE, E.D. Commentary:The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. **The Journal of Experimental Biology**. v. 211, p. 2005-2013, 2008.
- SHIGEYAMA, M., IWAMOTO, T. Cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchange: molecular and pharmacological aspects. **Circulation Research**. v. 88, p. 864-76, 2001.

SILVEIRA, E. A. et al. Acute lead-induced vasoconstriction in the vascular beds of isolated perfused rat tails is endothelium-dependent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, p. 492-499, 2010.

SILVERBERG, D.S.; WEXLER, D.; IAINA, A. The role of anemia in the progression of congestive heart failure. Is there a place for erythropoietin and intravenous iron? **Journal of Nephrology**. v. 17, p. 749-761, 2004.

SIMÕES, M.R. et al. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the Renin-Angiotensin system. **PloS One**. v. 11, 2011.

STEFANON, I. et al. Ventricular performance and Na⁺-K⁺ ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. **Journal of Medical and Biological Research**. v. 42, p. 902-911, 2009.

STOKKE, M.K. et al. Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca wave development in ventricular myocytes. **Cardiovascular Research**. v. 86, p. 63–71, 2010.

SUN, H.V. et al. Lead distribution in blood and organs of mice exposed to lead by vein injection. **Environmental Technology**. v. 30, p. 1051-1057, 2009.

TAKAGI, I. et al. Chronic direct stimulation of adenylyl cyclase induces cardiac desensitization to catecholamine and beta-adrenergic receptor downregulation in rabbits. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 48, p. 223-230, 2006.

TATTERSALL, N.; BROCK, J. Lead poisoning kills 400 more Nigerian children. **Reuters**, 2011. Disponível em: <http://www.reuters.com/article/2011/03/07/us-nigeria-poisoning-idUSTRE7264IC20110307>. Acesso em: 29 mar.2011.

TSAIH, S.W. et al. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. **Environmental Health Perspectives**. v. 107, p. 391-396, 1999.

TSAO, D.A. et al. The change of β -adrenergic system in lead-induced HTN. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 164, p. 127–133, 2000.

VALENCIA, I. et al. Lead induces endothelium- and Ca²⁺-independent contraction in rat aortic rings. **Pharmacology & Toxicology**. v. 89, p. 177–182, 2001.

VASSALLO D.V. et al. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. **Pharmacology Research**. v. 29, p. 251-260, 1994.

VASSALLO, D.V. et al. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 41,p. 789-795, 2008.

VASSALLO, D.V.; de CARVALHO, A.P. Influence of temperature on isometric contractions of rabbit atria during inotropic interventions. **Acta Physiologica Latinoamericana**. v.29, p. 131-135, 1979.

VASSALLO, D.V.; MILL, J.G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. **Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana**. v. 38, p. 87-97, 1988.

VAZIRI, N.D. ,2008. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. **American Journal of Physiology / Heart and Circulatory Physiology**. v. 295, p. 454-465, 2008.

VAZIRI, N.D. et al. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: Effect of lazaroid therapy. **Kidney International**. v. 52, p. 1042—1046, 1997.

VAZIRI, N.D. et al. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. **Kidney International**. v. 56, p. 1492-1498, 1999.

VAZIRI, N.D.; KHAN, M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 34, p. 920–925, 2007.

VAZIRI, N.D.; SICA, D. Lead-induced HTN: role of oxidative stress. **Current Hypertension Reports**. v. 6, p. 314–320, 2004.

VAZIRI, N.D; DING, Y. Effect of Lead on Nitric Oxide Synthase Expression in Coronary Endothelial Cells: Role of Superoxide. **Hypertension**. v. 37, p.223-226, 2001.

VUPPUTURI, S.H.J. et al. Blood Lead Level Is Associated With Elevated Blood Pressure in Blacks. **Hypertension**. v. 41, p. 463-468, 2003.

WIER, W.G.; BALKE, C.W. Ca^{2+} release mechanisms, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. **Circulation Research**. v. 85, p. 770-776,1999.

WILLS,K.; BLANCHARD,B. China battery plant manager held in lead poisoning case. **Reuters**, 2011. Disponível em: <http://www.reuters.com/article/2011/03/27/us-china-lead-idUSTRE72Q0IS20110327>. Acesso em 29 mar. 2011.

ZORNIK, M. et al. Comparison of thiopental, urethane, and pentobarbital in the study of experimental cardiology in rats in vivo. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 56, p. 38-44, 2010.