

**Exposição à baixa concentração de chumbo reduz
a força cardíaca em músculos papilares isolados
de ratos**

Marito Afonso Sousa Costa Silva

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória 2014

Silva, Marito Afonso Sousa Costa 1988

Efeitos da exposição por 15 dias ao acetato de chumbo sobre a pressão arterial e na contratilidade miocárdica em ratos [Vitória] 2014

81 pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

Palavras chaves: Chumbo, hipertensão, contratilidade cardíaca.

Dedico as pessoas mais importantes da minha vida. Meus pais (Maria da luz e Antônio silva), aos meus irmãos (Leila, Reginaldo, Stella e Wagner) e aos meus sobrinhos (Delci e Diego).

“Um mar calmo nunca formou um marinheiro habilidoso. ”

Provérbio inglês

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela força, saúde e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pela dedicação pelo sacrifício e acima de tudo pelo apoio incondicional.

A Profa. Dra. Alessandra por me aceitar como seu aluno. Ale muito obrigado, ter me aceitado proporcionou muitas coisas boas além do tão sonhado mestrado.

Ao Prof. Dr. Dalton, à Profa. Dra Ivanita e ao Prof Dr. Leonardo pela disponibilidade e dedicação e pelas sugestões e observações científicas.

À Edna pela orientação, pela ajuda, pelo apoio disponibilidade e, principalmente por ter-me dado este projeto.

Ao Leandro Ceotto, muito obrigado pela amizade, por acreditar e por ter me acompanhado na hora de procurar um orientador.

Ao David por ter me ensino a técnica de papilar, pela amizade e por estar disponível sempre que eu precisei.

À Dieli, aquela que mais me apoio dentro do laboratório. Muito obrigado pela ajuda, pelas conversas e por preocupar sempre!

Ao Gilson e Camila, pela ajuda, amizade e muitas vezes pela orientação.

Ao Bernah, Olavo e Gustavo, pela amizade, pelo apoio, pelos momentos de descontração para cada experimente errado, pela disponibilidade em me ajudar em tudo o que eu preciso. Vcs são mais do que amigos.

Ao Jair, por acreditar em mim, pelos bons conselhos, pela boa influência e acima de tudo, pelo apoio.

À Simone, por sua generosidade. Obrigado por ter acreditado em mim e ao apoio sempre.

Ao colega de república Carlos (kuiu), obrigado pelos conselhos, pelo apoio e pela ajuda.

Aos meus amigos conterrâneos: Denilson, Arickson, Samora, Djidja, Zeca, Eric, Ivan e Helder. Obrigado por bons momentos.

A grande família LEMC: Aliny, Bruna Marchezini, Carolina, Cindy, Daniele, Emilia, Emilly, Fabiana Simões, Fabiana Siman, Fernanda Calazans, Gérsica, João Vitor, Lorena, Mirian, Paula, Rodrigo, Samya, Tatiani, Teresa, Thiago, Vinícius, Keli, Renata, Sabrina, Jonaina, Thaís, Priscila, Bruna e karolini. Um muito abrigado a todos, por bons momentos, por se importar em horas difíceis e principalmente pelo presente de aniversário.

À Maylla, pelo incentivo, apoio e principalmente, graças a sua ideia pude ir visitar a minha família.

Aos meus amigos da Farmaufes 2007/1, pela amizade e pelos momentos de descontração e por compartilhar comigo tantos momentos de desespero quando de felicidade.

Aos funcionários e professores do Programa, pela prontidão e ensinamentos compartilhados.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas.

À família Mathias por me acolher como membro da família. Obrigado pelas festas, pelo apoio e pela ajuda quando sempre precisei.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. CHUMBO.....	21
1.1.1. Aspectos gerais	21
1.1.2. Contaminação Ambiental e Exposição.....	22
1.1.3. Cinética no organismo humano.....	25
1.1.4. Efeitos biológicos do chumbo.....	28
1.1.5. Efeitos do chumbo no sistema cardiovascular.....	30
1.2. CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	32
1.2.1. Proteínas Contráteis.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. OBJETIVOS GERAL.....	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	35
3.1.1. Modelo Experimental.....	35
3.1.2. Concentração sanguínea do chumbo.....	36
3.2. AVALIAÇÃO PONDERAL.....	36
3.3. METODOLOGIA EMPREGADA PARA AVALIAÇÃO DOS VALORES PRESSÓRICOS	36
3.3.1. Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica	36
3.3.2. Medida hemodinâmicas.....	37
3.4. METODOLOGIA EMPREGADA PARA AVALIAR A CONTRATILIDADE CARDÍACA PELA TÉCNICA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS	39
3.4.1. Montagem da preparação.....	39
3.4.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	40
3.4.2.1. Efeitos da exposição por 15 dias com chumbo na força de contração isométrica e parâmetros temporais.....	40
3.4.2.2. Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático	41
3.4.2.3. Efeitos da exposição por 15 dias com chumbo na resposta contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular	42

3.4.2.4.	Medida indireta do influxo de cálcio transsarcolemal “ <i>post rest contraction-prc</i> ”.....	43
3.4.2.5.	Efeitos da exposição por 15 dias com chumbo na força desenvolvida durante contrações tetânicas e o bloqueio com verapamil.....	44
3.4.2.6.	Efeitos da exposição por 15 dias com chumbo na resposta β -adrenérgica.....	45
3.5.	BIOLOGIA MOLECULAR.....	46
3.5.1.	Avaliação da expressão das proteínas envolvidas na cinética do cálcio pelo método de Western Blot.....	46
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
3.7.	FÁRMACOS E REAGENTES.....	50
4.	RESULTADOS	52
4.1.	CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DO CHUMBO.....	52
4.2.	VALORES DA AVALIAÇÃO PONDERAL.....	52
4.2.1.	AVALIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	52
4.2.2.	AVALIAÇÃO PONDERAL DAS CÂMARAS CARDÍACAS.....	53
4.3.	AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)	54
4.4.	MEDIDAS HEMODINÂMICAS	54
4.5.	AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS	57
4.5.1.	AVALIAÇÃO PONDERAL DOS PAPILARES.....	57
4.5.2.	AVALIAÇÃO FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA, DERIVADAS E PARÂMETROS TEMPORAIS (TA E TR90%).....	58
4.5.3.	AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.....	60
4.5.4.	ANÁLISE DA RESPOSTA INOTRÓPICA DE MÚSCULOS PAPILARES DE RATOS EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO.....	61
4.5.5.	MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSsarcolemal “ <i>POST REST CONTRACTION-PRC</i> ”.....	63
4.5.6.	FORÇA DESENVOLVIDA DURANTE CONTRAÇÕES TETÂNICAS E O BLOQUEIO COM VERAPAMIL	64
4.5.7.	BIOLOGIA MOLECULAR.....	65

4.5.7.1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CINÉTICA DO CÁLCIO PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT.....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos expostos e não-expostos ao chumbo.....	55
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty.....28

Figura 2: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. A) Registo da pressão arterial, da pressão ventricular esquerda, derivada temporal do ventrículo esquerdo. B) registro da pressão ventricular direita, derivada temporal do ventrículo direito e da frequência cardíaca.....39

Figura 3: Registro típico de contrações isométricas desenvolvidas por músculos evidenciando os parâmetros temporais da contração isométrica de papilares de ventrículo esquerdo de ratos nutridos com solução Krebs.....41

Figura 4: Registros típicos de contrações isométricas após estabilização e potenciações pós-pausas (PPP) obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s em músculos papilares de VE de ratos.....42

Figura 5: Registro típico da curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos.....43

Figura 6: Registro típico de um PRC obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos.....44

Figura 7: Registro típico de uma contração tetânica, indicando o pico e platô dessas contrações características.....45

Figura 8: Curva de concentração-resposta ao isoproterenol. Concentrações crescentes e cumulativas de isoproterenol (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M) foram adicionadas a uma solução de Krebs contendo uma concentração de Ca^{2+} 0,62 mM.....46

Figura 9: Avaliação do peso corporal entre os grupos CT e Pb^{2+} , antes e no final do tratamento. Os números entre parênteses correspondem ao número de ratos estudados e os dados estão expressos como média \pm EPM. $p < 0,05$, teste t de Student não pareado.....53

Figura 10: Comparação entre o peso dos ventrículos esquerdo (A) e direito (B) após 15 dias de tratamento dos respectivos grupos experimentais controle (CT) e chumbo (Pb^{2+}). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos em Média \pm EPM. $p < 0,05$, teste t de Student não pareado.....53

Figura 11: Os efeitos da exposição ao chumbo sobre a pressão arterial sistólica pressão (PAS) em cauda de ratos acordados. Os resultados são expressos como média \pm EPM. ANOVA 2 vias seguida de pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,05$54

Figura 12: Avaliação, in vivo, de parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares esquerdo dos ratos dos grupos CT e Pb^{2+} . Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. $P < 0,05$. Teste t de Student não-pareado.....56

Figura 13: Avaliação, in vivo, de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito dos ratos dos grupos CT e Pb^{2+} . Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. $P < 0,05$. Teste t de Student não-pareado.....57

Figura 14: Peso úmido dos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos grupos Controle (n=15) e chumbo (n=16). Dados expressos em Média \pm EPM. $P < 0,05$, Teste t de Student não pareado.....58

Figura 15: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos CT (n= 17) e Pb²⁺ (n= 18). Dados expressos em Média \pm EPM. $p < 0,05$, teste t de Student não pareado.....59

Figura 16: Avaliação, in vitro, das derivadas temporais da contração de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (CT, n= 23) e chumbo (Pb²⁺, n= 24). $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado.....59

Figura 17: Parâmetros temporais (TA e TR90%) em músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $p < 0,05$ vs C, teste t de Student não-pareado.....60

Figura 18: Potenciação pós-pausa (PPP) em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Para análise estatística ANOVA duas vias e teste post hoc de Bonferroni.....61

Figura 19: Resposta inotrópica (g/mg) a concentrações crescentes de CaCl₂ (0,62; 1,25; 2,5 e 3,75 mM) em músculos de papilares do ventrículo esquerdo de ratos controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise

estatística foi utilizado ANOVA duas vias e post hoc de Bonferroni. *
p<0,05.....62

Figura 20: Desenvolvimento de força frente a estimulação β -adrenérgica em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos CT e Pb^{2+} . Força corrigida pelo peso do papilar. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas vias e post hoc de Bonferroni.63

Figura 21: Avaliação indireta do influxo transsarcolemal de cálcio, antes após o bloqueio com verapamil, em musculo papilares de ratos controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA uma vias e post hoc de Turkey.....64

Figura 22: contrações tetânicas em músculos papilares de ventrículos esquerdo de ratos controle e chumbo antes e após adição de verapamil. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA uma vias e post hoc de Turkey. *p < 0,05.....65

Figura 23: Expressão proteica da SERCA-2^a (A), trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) (B) e fosfolambam (C) em ventrículos esquerdo de ratos controle e ratos tratados com chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. P < 0,05, teste t de Student não-pareado.....66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ATP= 5'-trifosfato de adenosina

Ca⁺⁺: cálcio

dP/dt: derivada de força / derivada de tempo

dL: Decilitro

EPM: erro padrão da média

EUA: Estados Unidos da América

FE: Fenilefrina

F: Força

FC: frequência cardíaca

Hz: hertz

iNOS: sintetase induzível do NO

kDa: kilodalton

Lmax: comprimento no qual a tensão é máxima

MG: Minas Gerais

M: Molar

mmHg: milímetro de Mercúrio

mM: milimolar

ms: milissegundos

NCX: trocador sódio/cálcio

PbS: galena

Pb²⁺: chumbo

PE: Pernambuco

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PR: Paraná

p.p.m: partículas por milhão

PAD: pressão arterial diastólica

PSVD: pressão sistólica do ventrículo direito

PDfVD: pressão diastólica final do ventrículo direito

PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PDfVE: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PPP: potenciação pós-pausa

PRC: contrações após repouso de 10 minutos

PKA: quinase A

RS: Rio grande do Sul

RJ: Rio de Janeiro

RS: retículo sarcoplasmático

SP: São Paulo

TA: tempo de ativação

TR90%: tempo de relaxamento de 90%

UI: unidade internacional

µg: Micrograma

µM: micromolar

%: Porcentagem

°C: graus Celsius

RESUMO

A exposição crônica ao chumbo produz hipertensão, mas seus efeitos, em baixas concentrações, sobre a função cardíaca ainda são pouco conhecidos. Objetivamos investigar se baixa concentração plasmática de chumbo pode modificar a contratilidade cardíaca em músculos papilares isolados de ratos. Ratos Wistar foram divididos em dois grupos: controle (CT) e tratados com chumbo (Pb^{2+}) (100 ppm na água de beber, por 15 dias). A pressão arterial foi medida no momento zero e no final dos 15 dias. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados e eutanaziados, e os parâmetros de contratilidade dos músculos papilares isolados foram registrados. Os ratos Pb^{2+} apresentaram concentração sanguínea de chumbo de 12,3 $\mu\text{g/dL}$. A pressão arterial dos animais Pb^{2+} elevou-se no final do tratamento. *In vitro*, o tratamento com chumbo não alterou a força e suas derivadas temporais, porém reduziu o tempo de ativação e de relaxamento. Além disso, a resposta inotrópica induzida por aumento de cálcio (Ca^{2+}) extracelular foi reduzida no grupo Pb^{2+} . Esses resultados sugerem alterações na cinética do cálcio nos cardiomiócitos dos ratos expostos ao chumbo. Contudo, a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e a expressão proteica da SERCA e do fosfolambam não foram modificadas. Ao avaliar, *in vitro*, a participação dos canais de Ca^{2+} do tipo L usando o bloqueador verapamil foi observada redução na força em ambos os grupos experimentais. Esses achados sugerem que a redução da resposta inotrópica ao Ca^{2+} não parece estar relacionada a mudanças no fluxo transarcolema desse íon, mas sugere uma possível alteração das proteínas contráteis. Nossos resultados evidenciam que mesmo em concentração abaixo dos valores preconizados como seguros, o chumbo causa efeitos deletérios na maquinaria contrátil do coração e deve ser considerado como um fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Palavras chave: Chumbo, hipertensão, contratilidade cardíaca

ABSTRACT

Chronic lead exposure produces hypertension, but its effects at low concentrations on cardiac function are still poorly understood. We aimed to investigate whether low plasma concentrations of lead can modify cardiac contractility in isolated papillary muscles of rats. Wistar rats were divided into two groups: control (TC) and treated with lead (Pb^{2+}) (100 ppm in drinking water for 15 days). Blood pressure was measured at time zero and at the end of 15 days. At the end of treatment, animals were anesthetized and euthanized, and the parameters of contractility of isolated papillary muscles was recorded. The Pb^{2+} rats had blood lead concentration of 12,3 $\mu\text{g}/\text{dL}$. The animals' blood pressure Pb^{2+} raised at the end of treatment. In vitro, treatment with lead did not alter the force and its time derivatives, but decreased the activation time and relaxation. Furthermore, the inotropic response induced increase of calcium extracellular (Ca^{2+}) was reduced in the group Pb^{2+} . These results suggest changes in calcium kinetics in cardiomyocytes of rats exposed to lead. However, the uptake of Ca^{2+} by the sarcoplasmic reticulum and protein expression of SERCA and fosfolamabam were not modified. To evaluate, in vitro, the involvement of L-type Ca^{2+} using blocker verapamil reduction in the strength was observed in both experimental groups. These findings suggest that the reduction of the inotropic response to Ca^{2+} does not appear be related to changes in flow transarcolemal this ion, but suggests a possible change in contractile proteins. Our results show that even at concentrations below the levels recommended as safe, lead cause deleterious effects on the contractile machinery of the heart and should be considered as a risk factor for development of cardiovascular disease.

Keywords: Lead, hypertension, cardiac contractility

1. INTRODUÇÃO

1.1. CHUMBO

1.1.1. Aspectos gerais

O chumbo foi um dos primeiros metais utilizados pelo Homem tendo sido encontrado em escavações arqueológicas, no Egito, que datam de 3500 a.C. Este metal raramente é encontrado no seu estado natural. Normalmente, está associado a outros elementos, sendo os mais importantes: minério a galena, cerussita, anglesita, piromorfita, vanadinita, concroíta e a wulfenita. A galena (PbS), um sulfeto de chumbo (Pb = 86,6% e S = 13,4%), é o seu minério mais importante e geralmente ocorre associada com a prata. Além deste último, alguns metais também aparecem associados ao chumbo, como o zinco, o cobre, o ouro e o antimônio (BRASIL., 2008).

O chumbo é um metal pesado (densidade relativa de 11,4 a 16°C), de coloração branca-azulada, tornando-se acinzentado quando exposto ao ar. Muito macio, altamente maleável, possui razoável condutividade elétrica e é altamente resistente à corrosão. É capaz de se dissolver a quente nos ácidos nítrico, acético, sulfúrico e clorídrico em ebulição, porém outros ácidos não exercem ação sobre ele, o que o torna um dos elementos preferidos para o revestimento interno de recipientes para ácidos (BRASIL, 2011). E ainda, tem a propriedade singular de absorver radiações de ondas curtas, como as emanções do rádio ou produzidas pelos raios-X, e se funde com facilidade (327,4°C), com temperatura de vaporização a 1725°C (BRASIL., 2008).

Todas as características apresentadas e a capacidade de se combinar com outros elementos fazem do chumbo o sexto metal de maior emprego na indústria moderna, tanto puro, como sob a forma de composto, usado principalmente na construção de baterias para automóveis e estacionarias, que consomem em torno de 90% do metal em torno do mundo. (Brasil., 2008).

1.1.2. Contaminação Ambiental e Exposição

Chumbo (Pb^{2+}) ocorre naturalmente no ambiente. É encontrado em níveis baixos na crosta terrestre, principalmente como sulfeto de chumbo. No entanto, a maior parte dos níveis elevados encontrados em todo o meio ambiente vêm de atividades humanas tais como mineração, fundição, refino e reciclagem informal de chumbo; produção de baterias de chumbo-ácido e tintas. Outras fontes de chumbo no ambiente incluem as atividades naturais, como a atividade vulcânica, intemperismo geoquímico, e as emissões de água do mar e remobilização de fontes históricas, tais como o chumbo no solo, sedimentos e água de áreas de mineração (WHO., 1995).

Como o chumbo é um elemento, uma vez liberado no meio ambiente, ele persiste. Por causa dessa persistência e o potencial para o transporte atmosférico global, as emissões atmosféricas afetam até mesmo as regiões mais remotas do mundo (WHO., 1995). Essas partículas, quando lançadas no ar, podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Ao ser depositado na água, sofre influência do pH, sais dissolvidos e agentes complexantes orgânicos, que definem sua permanência na fase aquosa ou como precipitado. (WHO., 1995).

A presença de Pb^{2+} em águas também é limitada pela presença de sulfatos e carbonatos, uma vez que formam compostos poucos solúveis (Paoliello et al., 2001).

O teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias fontes. Tanto a deposição seca (na forma de partículas ácidas ou gases) quanto a úmida (chuva ácida, neve, granizo ou neblina) são importantes fontes de contaminação (WHO., 1995).

A China é considerada o maior produtor mundial de chumbo sendo responsável por uma produção de 1,5 milhão de toneladas, seguida pela Austrália, com 570 mil toneladas e pelo EUA, com 444 mil toneladas. Enquanto

que, o Brasil ocupa o décimo sexto produtor de chumbo do mundo, com aproximadamente 25.000 toneladas em 2008 (Brasil., 2008).

A produção do metal secundário, no Brasil, alcançou 142.450 toneladas em 2008, representando 3,2% da produção mundial. O metal secundário é obtido a partir de reciclagem de material usado, especialmente de baterias automotivas, industriais e das telecomunicações em usinas refinadoras nas regiões Nordeste (PE), Sul (RS e PR) e Sudeste (SP, RJ, e MG) (BRASIL, 2009). O consumo aparente do metal tende a crescer continuamente devido ao desenvolvimento do país e às previsões das montadoras de automóveis de investir R\$ 20 bilhões para elevar a produção nacional para 5 milhões de veículos até 2012 (Brasil., 2008).

A exposição da população ao chumbo, geralmente, ocorre de duas maneiras: a exposição ocupacional e não-ocupacional (ATSDR, 2007); (Brasil, 2006b). Pessoas expostas ocupacionalmente, incluem trabalhadores de indústrias de fundição e refino de chumbo; fundições de latão/bronze, na produção de borracha e plásticos; em operações de soldagem e de corte de aço; na fabricação de baterias, cerâmica e olaria; construção civil e demolição; incineradores de resíduos urbanos, reparadores de radiador, e pintores. Esses indivíduos são contaminados, principalmente, por inalar partículas de chumbo no ar ambiente ([ATSDR], 2007; BRASIL, 2006b).

Sabe-se que o chumbo particulado pode ser transportado a longas distâncias, sendo observada exposição fora do local de trabalho. As fontes não industriais de exposição ao chumbo, as quais são denominadas de não-ocupacionais, têm contribuído de maneira significativa na contaminação de um grande número de pessoas. Segundo Jacobs et al., (2002), a fonte primária de exposição e de toxicidade ao chumbo em crianças nos Estados Unidos, advém da presença desse metal nas tintas que revestem o interior das casas. Enquanto que nos adultos da população em geral, o principal meio de exposição não ocupacional a esse metal é proveniente dos alimentos e das bebidas (WHO., 1995). A exposição a esse metal pode acontecer também, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados; uso de tinturas de cabelo; manuseio de brinquedos pintados com tintas à base de chumbo e contato com solo contaminado com pesticidas contendo chumbo (ATSDR, 2007; Brasil, 2006a; Capitani et al., 2009).

As principais vias de exposição do chumbo são a oral, inalatória e a cutânea. Destas, a inalatória representa a principal via de exposição ocupacional, a cutânea é importante apenas na exposição ao chumbo orgânico e a via oral é a principal forma de exposição, a esse metal, na população em geral (Alves; Terra, 1983; Tsalev, DL & Zaprianov, 1985). No entanto, a toxicidade deste metal dependerá do modo de entrada e da sua forma química e física, o que determinará também o modo de transferência entre as fases aquosa, orgânica (membrana celular) e sólida (ossos) do corpo. Outros fatores determinantes na toxicidade do chumbo ao indivíduo são a idade, sexo e condição nutricional, tais como ingestão de cálcio, ferro, fósforo e proteínas (Moreira; Moreira, 2004). Sabe-se que um baixo teor de Cálcio ou ferro na dieta aumenta a absorção de chumbo. O mesmo é verdadeiro para uma alimentação deficiente em fosforo e proteínas (Moreira; Moreira, 2004)

No Brasil, a NR-7(Norma regulamentadora número 7 -Portaria nº 24, de 29/12/94), determina a realização de exames médicos anuais para monitorar os efeitos tóxicos do chumbo inorgânico no organismo de trabalhadores expostos. Para tanto, a NR-7, estabelece os Valores de Referência (VR), isto é, os níveis máximos de chumbo em pessoas não ocupacionalmente expostas e os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP) em trabalhadores expostos; para o metal no sangue estes são respectivamente 40 µg/dl e 60 µg/dl (Cordeiro, et al.,1996; Jacob et al., 2002). Entretanto, pesquisas demonstram que concentrações sanguíneas de chumbo abaixo no VR comprometem o organismo humano. Neste sentido, concentrações 30-50 µg/dL de Pb podem provocar problemas relacionados com a coordenação motora e há evidências que níveis abaixo de 10 µg/dL no sangue, está associado com problemas renais(CDC, 2003).

1.1.3. Cinética no organismo humano

Atualmente, o chumbo, é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição. Assim sendo, todos os seres humanos têm chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas (Saryan, LA & Zenz, 1994). Entretanto este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo, e seus efeitos tóxicos sobre os homens e animais já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano (Xie, et al., 1998)

No entanto, a sua cinética sofre influência de vários fatores, endógenos e exógenos. Os fatores endógenos compreendem-se, a genética e estado de saúde enquanto que os exógenos são, exposição simultânea á várias substâncias, drogas, álcool e fumo. Além disso, após a exposição o chumbo não é metabolizado e sim, complexado por macromoléculas (principalmente à hemoglobina, e outras proteínas de baixo peso molecular), sendo diretamente absorvido, distribuído e excretado pelos rins (Moreira; Moreira, 2004)

A maior parte do chumbo entra no organismo humano pelas vias respiratórias e gastrointestinal. Somente o chumbo orgânico pode ser absorvido através da pele (Tsalev, DL & Zaprianov, 1985). Uma vez absorvido, o chumbo se distribui entre o sangue, os tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos mineralizados (ossos e dentes). ([ATSDR], 2007).

A absorção do chumbo é influenciada pela via de exposição, espécie químicas formada, tamanho da partícula, solubilidade em água, e variações individuais fisiológicas e patológicas (Moreira; Moreira, 2004).

A absorção do chumbo da atmosfera para o sangue envolve dois processos: a deposição das partículas de chumbo do ar no trato respiratório e a remoção e absorção do trato respiratório para a circulação. As partículas são depositadas principalmente nos sacos alveolares do pulmão. Fumos e vapores gerados em operações, nas quais os metais são cortados ou aquecidos geram partículas de tamanho muito pequeno e, portanto, podem ser absorvidos. A absorção depois da exposição varia conforme a solubilidade dos compostos

chumbo e da toxicidade inerentes para os macrófagos e cílios do pulmão (WHO., 1995). A absorção do chumbo no sangue pode ser superior a 50% da dose inalada/ingerida para gases de exaustão e sais altamente solúveis assim como para fumantes e pessoas com doenças das vias respiratórias superiores, que têm a atividade ciliar prejudicada, favorecendo assim uma maior deposição das partículas de chumbo no trato respiratório (Saryan, LA & Zenz, 1994).

Já no trato gastrointestinal, a absorção do chumbo varia de 2% a 16% se ingerido com refeição, mas pode chegar a 60-80%, quando administrado em jejum. Essa absorção ocorre originalmente no duodeno por mecanismos ainda indefinidos, mas, sugere-se que esse processo envolve os meios de transporte ativo e/ou difusão trans ou paracelular (ATSDR, 2007).

Vários modelos cinéticos têm sido propostos para explicar a distribuição do chumbo no organismo. Rabinowitz et al., (1976) 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 Pb 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 (Moreira; Moreira, 2004). O chumbo presente no sangue é distribuído entre os órgãos, dependendo do gradiente de concentração e da afinidade pelo tecido específico. Níveis mais elevados têm sido encontrados na aorta, fígado e rins. A retenção do chumbo nos tecidos moles se estabiliza na vida adulta e pode decrescer em alguns órgãos com a idade, contudo continua a se acumular nos ossos e na aorta durante toda a vida (Tsalev, DL & Zaprianov, 1985; Saryan, LA & Zenz, 1994). O chumbo atravessa a barreira hematoencefálica, mas sua concentração no cérebro é baixa. Também penetra na placenta, que pode determinar 57,4% do nível de Pb transferido para o feto, e o sangue fetal contém quase que os mesmos níveis do metal que o sangue materno (Nashashibi, et al., 1999)

Durante a sua distribuição, o chumbo segue a via metabólica do cálcio e se acumula nos ossos e dentes. Esse grande depósito contribui significativamente para manter os níveis de chumbo no sangue após o término da exposição e

também como fonte deste metal para o feto, no período de formação do esqueleto fetal (Gulson et al., 1999)

O chumbo é excretado por várias vias, como o suor, a descamação cutânea, o cabelo, as unhas (Tsalev, DL & Zaprianov, 1985), porém só a excreção renal e a gastrointestinal são de importância prática. A quantidade excretada, independente da via, é afetada pela idade, características da exposição e dependente da espécie (Moreira; Moreira, 2004). Num estudo sobre a relação entre o nível de exposição e a taxa de excreção do chumbo foi encontrado que a eliminação renal, para valores de chumbo no sangue entre 25 e 80 $\mu\text{g.dL}$, aumenta numa taxa semelhante àquela de aumento do chumbo no plasma (IPCS, 1995).

A excreção gastrointestinal acontece por secreção de várias glândulas, entre elas a pancreática, e por excreção biliar, possivelmente na forma de um complexo chumbo-glutationa (Moreira; Moreira, 2004). O chumbo da dieta ou, até mesmo, aquele deglutido nas partículas de ar e não absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado nas fezes, que contêm elevado teor do metal, em torno de 90% do total excretado (Saryan, LA & Zenz, 1994).

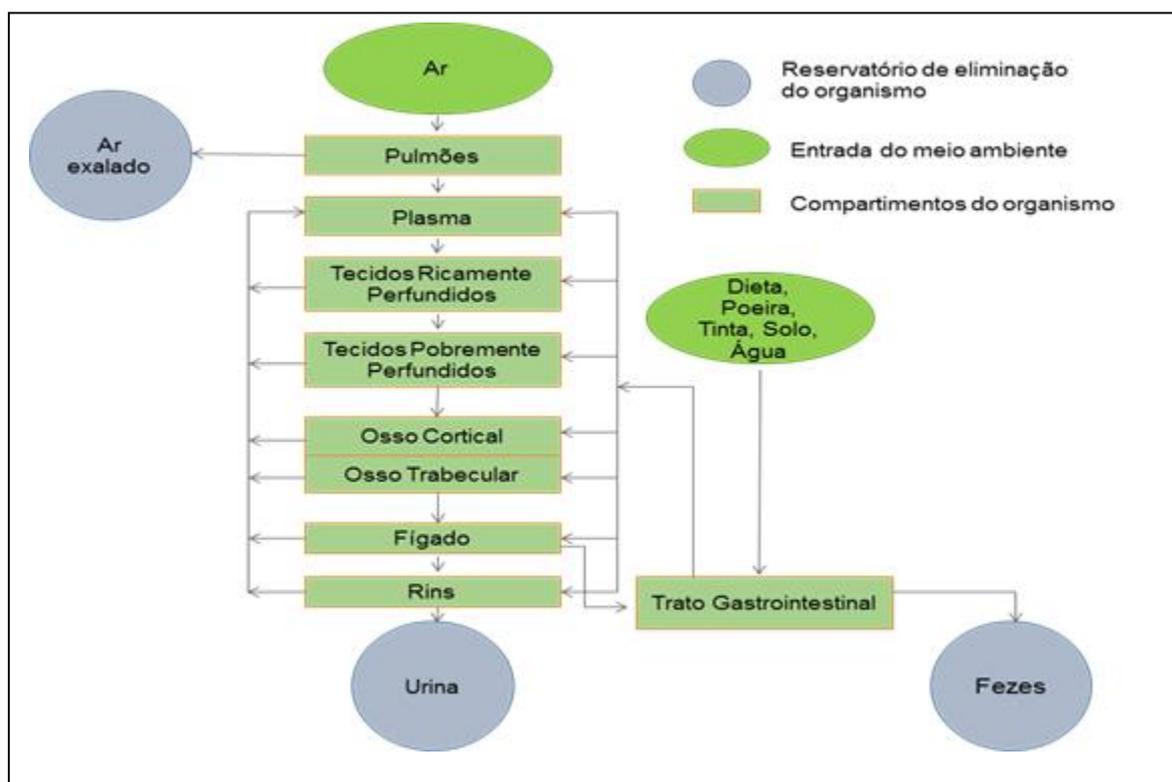


Figura 1: Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty.

Fonte: Modificado de (Moreira; Moreira, 2004).

1.1.4. Efeitos biológicos do chumbo

Os metais pesados podem danificar toda e qualquer atividade biológica porém existem consideráveis diferenças de sensibilidade entre diferentes órgãos e tecidos gerando desde efeitos claros, ou clínicos, até efeitos sutis, ou bioquímicos (Moreira, F.R.; Moreira, 2004). A exposição ao chumbo pode ter início já na fase intra-uterina do feto e continuar aumentando depois do nascimento (ATSDR, 1995).

O sistema nervoso, a medula óssea e os rins são os mais afetados na exposição ao chumbo (Elinder et al., 1994). De todas as alterações tóxicas produzidas pela intoxicação pelo chumbo, a encefalopatia é a mais importante e grave, tanto em adultos, quanto em crianças (Moreira; Moreira, 2004). A encefalopatia causada pelo chumbo ocorre nas formas aguda e crônica com a uma evolução clínica dependente da idade da condição geral do paciente, da quantidade absorvida, do tempo de exposição e de certos fatores como o alcoolismo crônico (Moreira; Moreira, 2004). Os sintomas incluem apatia, irritabilidade, dificuldade de concentração, cefaléia, tremor muscular, perda de memórias, alucinações (Paoliello et al., 2001)

Em adultos, alguns estudos indicam que os efeitos claros da neurotoxicidade aparecem com níveis Pb no Sangue de 40 a 60 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, concentração na qual também se fazem presentes outros sinais e sintomas claros de intoxicação por chumbo, tais como as gastrointestinais (cólica abdominal, constipação, diarreia e gastrite). (Moreira; Moreira, 2004).

O chumbo também causa paralisia do sistema nervoso periférico que é caracterizada pelo envolvimento seletivo dos nervos motores (Rubens et al., 2001). Este metal, também, tem se mostrado um potente agente nefrotóxico em seres humanos (Witzmann et al., 1999). A toxicidade renal pode manifestar-se

por distúrbio reversível dos túbulos renais e nefropatia intersticial irreversível, observada em níveis relativamente altos de chumbo no sangue. Clinicamente a toxicidade renal é verificada pela presença de uma síndrome caracterizada por proteinúria, hematúria e presença de cilindros na urina, glicosúria e fosfatúria, aumento da excreção renal de sódio e redução da excreção de ácido úrico. (Craswell, 1987; Bernard e Becker, 1988; Kosnett, 2003). Esses efeitos parecem ser reversíveis (Paoliello et al., 2001). Já, a nefropatia irreversível, um efeito direto da exposição crônica sobre os rins, é caracterizada 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, 2007).

Como já foi visto, a nefropatia por chumbo é caracterizada por uma redução gradual da função renal e essa é frequentemente acompanhada por hipertensão (Saryan, LA & Zenz, 1994); WHO., 1995). Vários são os mecanismos que interrelacionam a exposição ao chumbo, seus efeitos renais e a hipertensão. Entre eles temos: aumento da densidade de receptores beta adrenérgicos (Tsao, 2000) levando a uma atividade simpática aumentada e aumento da produção de renina; acréscimo da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que localmente causa produção de angiotensina II e aldosterona, culminando na redução da excreção urinária de água e sódio (Sharifi, et al., 2004). Além de efeitos deletérios nos rins, o chumbo pode reduzir a produção de hemoglobina, levando uma à anemia que pode ser de leve a moderada em adultos (Moreira; Moreira, 2004). Os desvios hematológicos que levam à anemia pelo chumbo são considerados como resultado de sua ação tóxica sobre as células vermelhas e eritropoiéticas na medula óssea. (Moreira; Moreira, 2004).

Outro fator também que pode estar envolvida no desenvolvimento da anemia satúrnica, é o aumento da taxa de destruição das células vermelhas, que está relacionado com a diminuição nas concentrações de eritropoietina sérica, atribuído ao efeito tóxico do chumbo no túbulo renal que é o sítio de produção da eritropoietina (Romeo et al., 1996).

Os limiares do chumbo em sangue para um decréscimo dos níveis de hemoglobina em adultos e crianças estão estimados em, respectivamente, 50 e 40 µg / dL (Paoliello et al., 2001).

1.1.5. Efeitos do chumbo no sistema cardiovascular

Pesquisas populacionais sobre os efeitos cardiovasculares do chumbo tem se concentrado em grande parte, a associação com a pressão arterial e hipertensão (Navas-Acien et al., 2007). Isso torna-se importante quando se sabe que as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo (Lopez, et al., 2006). Ademais os toxicantes ambientais como o chumbo e outros metais, contribuem para o surgimento ou agravamento dos sintomas dessas doenças. Neste sentido, vários estudos foram realizados com o intuito de investigar evidências que correlacionam concentração sanguínea de chumbo com a hipertensão arterial (Hertz-Picciotto & Croft, 1993; Nawrot, et al., 2002; Schwartz, 1991; Sharp, et al., 1987; Staessen et al., 1994).

Os efeitos hipertensor do chumbo tem sido demonstrado em animais experimentais e trabalhadores expostos cronicamente a altas concentrações desse metal. Pode-se inferir que tanto a exposição ocupacional quanto a exposição podem promover aumento na pressão sanguínea (Kopp, et al., 1988; Harlan, 1988; Schwartz, 1988; Lal, et al., 1991; Sharp, et al., 1987; Pocock, et al., 1984; Pirkle, et al., 1985; Vaziri, et al., 1997; Farmand, et al., 2005; Sharifi, et al., 2004; Vaziri, et al., 1999; Carmignani, et al., 1999; Grizzo & Cordellini, 2008; Silveira et al., 2014). Além disso, foram realizados estudos com baixas concentrações de chumbo, por curto período de tempo, e o aumento da pressão arterial em animais também foi observado (Fiorim et al., 2011; Simões et al., 2011, Fioresi et al., 2013). Todavia, os efeitos desse metal no sistema cardiovascular são diretamente influenciados pela dose, tempo e via de exposição, idade, temperatura e ingestão de cálcio (Khera, et al., 1980; Harlan, et al., 1985; Pirkle et al., 1985; Fell, 1984).

De acordo com os dados obtidos através do NHANES II, participantes com concentração sanguínea entre 20-29 $\mu\text{g/dL}$ de chumbo apresentam 39% de risco de mortalidade cardiovascular, quando comparados aos sujeitos que apresentavam uma concentração sanguínea de chumbo menor que 10 $\mu\text{g/dL}$ (Lustberg & Silbergeld, 2002).

Em populações humanas, o aumento da pressão arterial tem sido observado também em crianças (Roy et al., 2009), gestantes expostas ao metal

(Yazbeck et al., 2009) e indivíduos de raça negra expostos ao chumbo (Vupputuri et al., 2003).

Os efeitos cardiovasculares do chumbo, no entanto não estão limitado somente ao aumento da pressão arterial. Neste sentido, a exposição ao chumbo também tem sido associada com uma maior incidência de outras doenças cardiovasculares como: como doença coronariana, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (Lustberg & Silbergeld, 2002; Menke et al., 2006; Navas-Acien et al., 2004; Schober et al., 2006) e com outras alterações da função cardiovascular, como a hipertrofia ventricular esquerda e alterações no ritmo cardíaco (Cheng et al., 1998; Schwartz, 1991).

Além disso, outros estudos, realizados no nosso laboratório evidenciaram que o chumbo promove alterações diretas na contratilidade cardíaca. Sendo assim, Vassallo et al., (2008) demonstraram, em tiras isoladas de ventrículo direito (VD) submetidas à exposição aguda ao chumbo, efeito inotrópico negativo e diminuição na atividade ATPase miosina. Contrapondo esses achados, Fioresi et al., (2013) investigaram os efeitos agudos do chumbo, em músculos papilares isolados e verificaram efeito inotrópico positivo e aumento da atividade da ATPase miosina. Esse mesmo grupo investigou os efeitos do tratamento crônico por 30 dias ao chumbo papilares de ventrículo esquerdo de rato e registrou um aumento inotropismo ventricular esquerdo e alterações no ciclo de cálcio do cardiomiócito que podem contribuir com os efeitos deletérios deste metal no sistema cardiovascular.

1.2. CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Para uma melhor compreensão do nosso estudo, faremos uma breve revisão sobre a contratilidade miocárdica, destacando as principais vias de regulação da maquinaria contrátil.

1.2.1. Proteínas Contráteis

As proteínas que realmente realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, (Vassallo et al. 2008b) sendo as outras proteínas moduladoras da contração.

A miosina é uma proteína com PM = 450 kDa, composta de duas cadeias entrelaçadas que terminam em uma região globular. Compõe os filamentos grossos, que são formados pela associação de moléculas de miosina que se divide em duas partes quando hidrolisada enzimaticamente com a tripsina. Uma parte leve, formada por grande parte de sua cauda, denominada meromiosina leve e uma parte pesada, a meromiosina pesada que contém a região globular. Ainda com a hidrólise, a meromiosina pesada subdivide-se em duas subunidades S1 e S2. A subunidade S1 corresponde à região globular propriamente dita, possuindo atividade ATPásica, sendo portadora da ATPase miosínica. Esta subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica pesada e duas cadeias polipeptídicas leves. A cadeia pesada constitui o corpo da enzima (ATPase miosínica) e as cadeias leves parecem modular a atividade ATPásica da miosina, visto que sua remoção leva a perda da atividade de hidrólise de ATP (Vassallo et al., 2008b).

As cadeias pesadas existem sob duas isoformas, α e β . Como cada filamento de miosina possui duas cadeias pesadas, as associações podem ser $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$. A isoforma $\alpha\alpha$ é típica de músculos de contração rápida com grande velocidade de hidrólise de ATP. A isoforma $\beta\beta$ é típica de músculos lentos e com baixa velocidade de hidrólise de ATP, a isoforma $\alpha\beta$ é intermediária às duas anteriores. Estas isoformas são encontradas no miocárdio de rato e foram

denominadas de V1, V2 e V3, de acordo com a velocidade de hidrólise de ATP (Vassallo et al., 2008b).

Já os filamentos finos são compostos, basicamente, por 3 proteínas: actina, tropomiosina e troponina. A actina apresenta sítios ativos capazes de interagir com a miosina, e durante esta interação a ATPase miosínica é ativada, hidrolisando a ATP com consequente liberação da energia necessária à contração. Em repouso, este sítio de interação é bloqueado pela tropomiosina (Vassallo et al., 2008b).

A tropomiosina é uma proteína alongada, dímera com duas isoformas, α e β que se liga à troponina.

A troponina é formada por três subunidades: a subunidade I (TnI) que quando interage com a tropomiosina, provoca a inibição do sítio da actina, a subunidade C (TnC) que tem grande afinidade pelo íon cálcio e 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 da actina, garantindo a interação actino-miosina. Essas proteínas são denominadas proteínas moduladoras da contração uma vez que modulam a interação das proteínas contrateis (Vassallo et al., 2008b).

Além dessas proteínas existem outras, componentes do citoesqueleto da célula, que sustentam a estrutura espacial do sarcômero. Estas proteínas além de interligar as miofibrilas na linha Z, prendem as miofibrilas a receptores de integrina, na membrana celular.

Considerando uma predominância de estudos que relacionam o chumbo com a hipertensão e uma escassez de estudos que demonstram efeito direto do chumbo na atividade do miocárdio o presente estudo tem como o objetivo determinar se baixa concentração plasmática de chumbo, abaixo daquela preconizada como segura pelas associações e agências de saúde, podem modificar a contratilidade cardíaca, associada às mudanças na cinética do cálcio, em ratos expostos a esse metal por 15 dias.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar se baixa concentração plasmática de chumbo, abaixo daquela preconizada como segura pelas associações e agências de saúde, pode modificar a contratilidade cardíaca em ratos expostos a esse metal por 15 dias.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, a concentração sanguínea de chumbo dos animais, após 15 dias de exposição ao chumbo;
- Avaliar os efeitos do chumbo, durante 15 dias de exposição, sobre a pressão arterial sistólica de ratos acordados;
- 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;
- Averiguar, *in vitro*, os efeitos da exposição ao chumbo na contratilidade miocárdica, avaliando: o inotropismo cardíaco, os parâmetros temporais da contração, a atividade do retículo sarcoplasmático, a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio, a resposta das proteínas contráteis ao cálcio e a participação da ativação β -adrenérgica nos músculos papilares do ventrículo esquerdo;
- Investigar, se a exposição ao chumbo altera a expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de cálcio no miócito cardíaco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para realização do presente estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente três meses de idade, pesando 280-350 gramas, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA 015/2012)

3.1.1. Modelo experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: chumbo (Pb²⁺) e controle (CT). Os animais do grupo Pb²⁺ receberam, por um período de 15 dias, água de beber destilada acrescida de 100 ppm de acetato de chumbo Já os animais CT receberam, pelo mesmo período supracitado, água de beber destilada sem o acréscimo do acetato de chumbo (Karimi et al., 2002; Fioresi et al., 2014).

É importante destacar que os animais de ambos os grupos experimentais foram alojados em gaiolas independentes, de forma que os animais do grupo controle não eram expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado.

3.1.1.1. Concentração sanguínea do chumbo

No intuito de mensurar a concentração de chumbo no sangue, 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). A concentração sanguínea de chumbo foi determinada conforme protocolo desenvolvido por Korecková-Sysalová, 1997. Foram realizadas medidas em duplicata através da espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite no laboratório Hermes Pardini.

3.2. AVALIAÇÃO PONDERAL

Antes do início e ao final do tratamento os ratos do grupo tratado com chumbo e do grupo controle foram pesados com o objetivo de avaliar se a exposição a esse metal interfere no ganho de peso dos animais.

Além disso, os ventrículos esquerdos foram separados dos ventrículos direitos e os mesmos foram também pesados. Os pesos dos ventrículos de ambos os grupos eram corrigidos pelo peso dos respectivos ratos.

3.3. METODOLOGIA EMPREGADA PARA AVALIAÇÃO DOS VALORES PRESSÓRICOS

3.3.1. Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais dos dois grupos foi verificada no início e no final da exposição ao chumbo, de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Os animais foram climatizados, três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento (Fiorim et al., 2011 e Silveira et al., 2014). 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. A média de três medidas, que não variassem mais que 5 mmHg, foi utilizada.

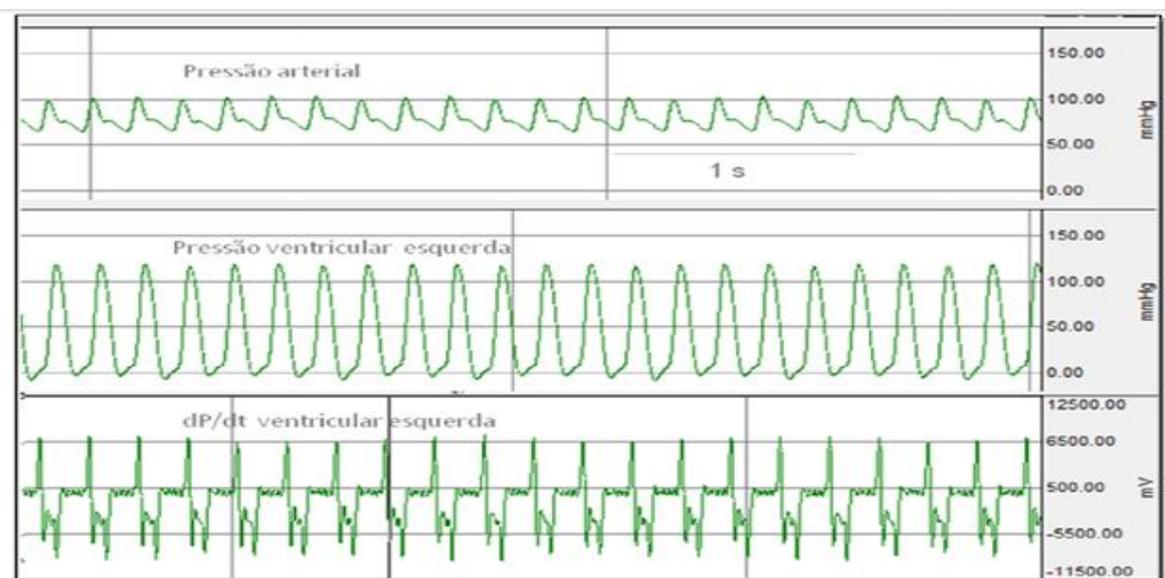
3.3.2. Medidas hemodinâmicas

Após 15 dias de exposição ao chumbo, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1,2 g/ Kg) e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direitas para mensuração dos parâmetros cardiovasculares in vivo. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. As canulações foram realizadas com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100 UI/ml). Os cateteres 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 frequências 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.

Após período de estabilização de 20 minutos os cateteres foram introduzidos até os ventrículos esquerdo e direito via a artéria carótida direita e jugular direita, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD); frequência cardíaca (FC); pressão sistólica e diastólica final intraventricular 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 liotrópicas.

A figura 2 (A e B) ilustra os registros típicos destes parâmetros hemodinâmicos avaliados.

A)



B)

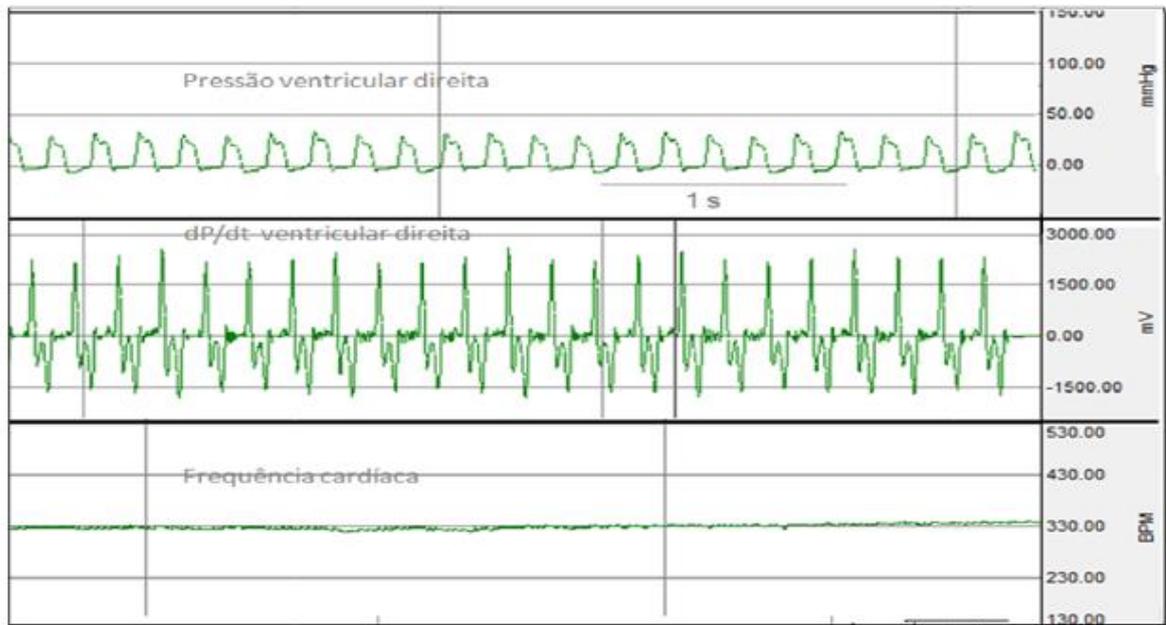


Figura 2: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. A) Registro da pressão arterial, da pressão ventricular esquerda, derivada temporal do ventrículo esquerdo. B) registro da pressão ventricular direita, derivada temporal do ventrículo direito e da frequência cardíaca

3.4. METODOLOGIA EMPREGADA PARA AVALIAR A CONTRATILIDADE CARDÍACA PELA TÉCNICA DE MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

3.4.1. Montagem da preparação

Após a mensuração dos parâmetros hemodinâmicos, os ratos foram sacrificados, submetidos à toracotomia. Em seguida, os corações foram rapidamente 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 em seguida, 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 evitar a possibilidade de hipóxia, os experimentos eram realizados sob baixa temperatura (26° C) como previamente descrito por Vassallo e Paes de Carvalho, 1979.

Os músculos papilares são estimulados eletricamente 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) com uma frequência de estimulação padrão era de 0,5 Hz. Após montagem dos músculos no aparato experimental, os mesmos foram estirados até o comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima (L_{max}). Após 60 minutos de estabilização das preparações, iniciaram-se os protocolos experimentais.

A força desenvolvida foi medida através de transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Byopac Systems, Inc; CA) e registrados em sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA) com taxa de amostragem de 500 amostras/segundo.

Ao final do experimento, os papilares foram pesados e a força de contração isométrica desenvolvida foi corrigida pelo peso dos músculos.

3.4.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.2.1. Força de contração isométrica e parâmetros temporais de força

Após o período de estabilização foram mensuradas: a força desenvolvida (F) os tempos de ativação e relaxamento e as derivadas temporais de força

(dF/dt) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares (figura 3). Estes parâmetros foram avaliados em ambos os grupos experimentais.

Os resultados de força isométrica estão expressos em gramas por miligramas de peso do músculo. Os tempos de ativação e relaxamento são os tempos despendidos, respectivamente, do início da contração até o pico máximo de força e do pico máximo até 90% do relaxamento isométrico (Vassallo et al., 2008).

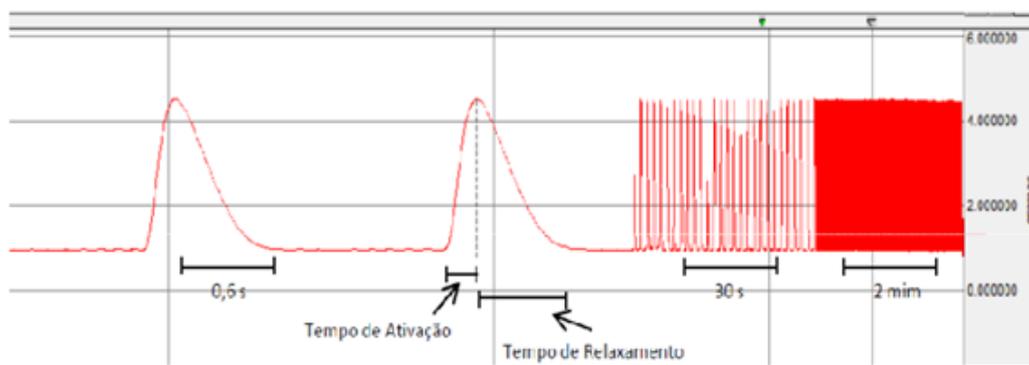


Figura 3: Registro típico de contrações isométricas desenvolvidas por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos nutridos com solução Krebs.

3.4.2.2. Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático

O protocolo das potenciações relativas pós-pausa (PPP) foi realizado a fim de obter, indiretamente, inferências quanto aos efeitos do chumbo na atividade funcional do RS. Estas potenciações foram obtidas por meio da re-estimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 (segundos) no estímulo elétrico aplicado no músculo (Vassallo & Mill, 1988).

A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração antes da pausa, objetivando avaliar a atividade do retículo sarcoplasmático (RS) (Vassallo & Mill, 1988);

(Leite, et al., 1991); (Mill, et al., 1992) em músculos papilares dos grupos Controle e Pb²⁺.

No músculo cardíaco, as contrações que ocorrem após pausas curtas são potencializadas, e as contrações pós-pausas são dependentes da duração da pausa e da quantidade de cálcio estocada nos sítios intracelulares. Para que a próxima pausa fosse realizada, a preparação passava novamente por um período de estabilização até que a força desenvolvida retornasse ao valor basal. A figura 4 ilustra um registro típico de PPP.

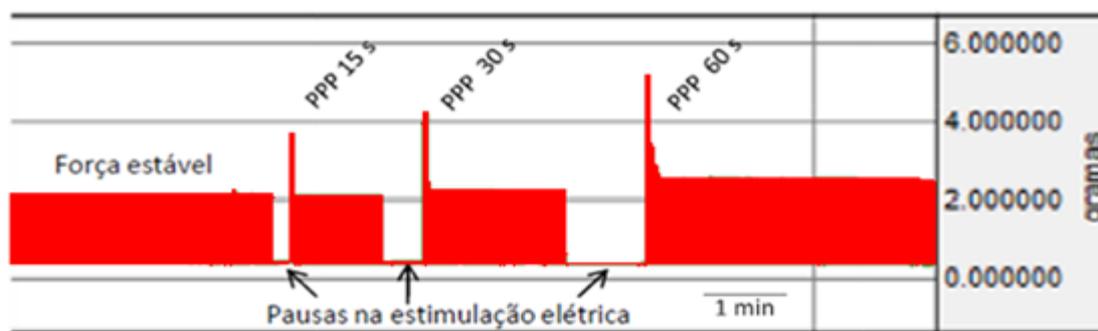


Figura 4: Registros típicos de contrações isométricas após estabilização e potenciações pós-pausas (PPP) obtidas após pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de VE de ratos.

3.4.2.3. Avaliação da resposta contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular

Para avaliar por 15 dias de exposição com chumbo seria capaz de alterar a resposta inotrópica ao cálcio, foi realizada uma curva concentração-resposta ao cálcio. Esta curva foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada, após o acréscimo na concentração extracelular de cálcio (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM) na perfusão dos músculos papilares isolados dos ratos de ambos os grupos experimentais (figura 5). A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

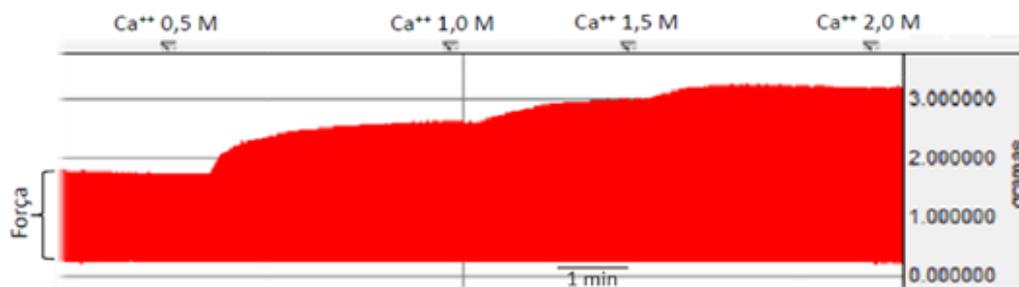


Figura 5: Registro típico da curva concentração-resposta a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos.

3.4.2.4. Medida indireta do influxo de cálcio transsarcolemal “*post rest contraction-prc*”

A “post rest contraction” (PRC) foi realizada para avaliar a interferência da exposição ao chumbo no influxo de cálcio transsarcolemal. Para isso, foi utilizada a solução “Krebs” previamente descrita, porém livre de cálcio (cálcio *Free*) e acrescida de 10 mM de cafeína. Este procedimento permite depletar o conteúdo de cálcio intracelular e do RS.

A cafeína depleta os estoques intracelulares de Cálcio por se ligar aos receptores de rianodina (Bassani, Bassani, & Bers, 1994; Leite, et al., 1995). Por outro lado, a ausência de cálcio na sua composição facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (Vassallo et al., 2008).

Os músculos foram lavados, por duas vezes, com a solução Ca^{++} free até as contrações serem abolidas (Ringer, 1883), em seguida o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Segundos antes de a estimulação ser reiniciada, as preparações eram reperfundidas com solução Krebs-Henseleit normal. Desta forma, pode-se inferir que a contração após a pausa de 10 minutos é dependente do cálcio proveniente do meio extracelular, visto que os estoques intracelulares foram depletados.

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

PRC foi obtido antes e após o bloqueio do influxo de cálcio transsarcolemal. Para este bloqueio, o verapamil (10 μM) foi acrescentado por 20 minutos no banho, antes da realização do próximo PRC (Leite et al., 1988).

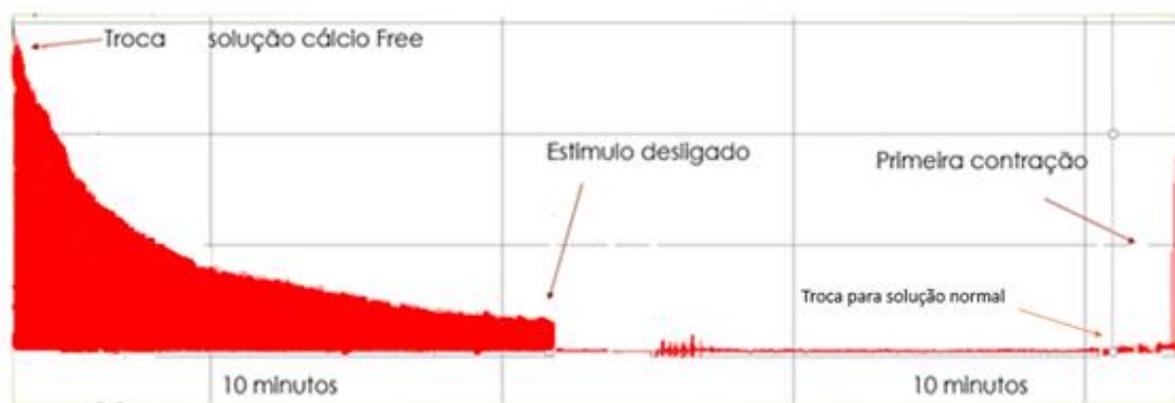


Figura 6: Registro típico de um PRC obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos.

3.4.2.5. Avaliação da resposta contrátil nas contrações tetânicas e o bloqueio com verapamil

As contrações tetânicas permitem investigar a resposta contrátil miocárdio intacto com o retículo sarcoplasmático não-funcional (Leite et al., 1995). Deste modo, através dessas contrações podem-se inferir informações sobre o influxo de cálcio transsarcolemal, bem como, a responsividade das proteínas contráteis ao cálcio.

Para realização dessa manobra, os músculos papilares foram perfundidos por 30 minutos com solução de Krebs acrescida de 10 mM de cafeína, a uma frequência de estimulação de 10 Hz e duração de 15 segundos (Leite et al.,

1995). Para fins experimentais utiliza-se a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações características corrigidas pelo peso dos músculos papilares.

As contrações tetânicas foram obtidas antes e após o bloqueio do influxo de cálcio transsarcolemal. Para este bloqueio, o verapamil (10 μM) foi adicionado no banho por 20 minutos, antes da realização da próxima contração tetânica (Leite et al., 1988) (Figura 7).

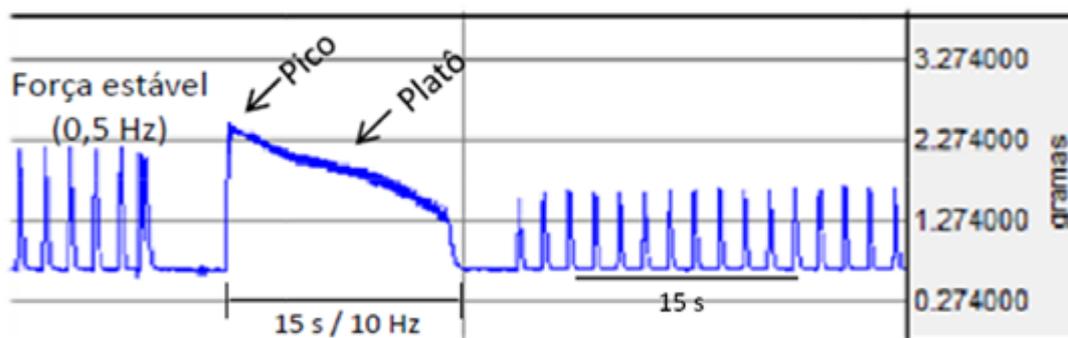


Figura 7: Registro típico de uma contração tetânica, indicando o pico e platô dessas contrações características.

3.4.2.6. Avaliação da resposta contrátil frente à estimulação beta-adrenérgica

Para avaliar se a exposição ao chumbo foi capaz de alterar a resposta simpática cardíaca foi realizada uma curva concentração-resposta ao isoproterenol (10 μM a 10 mM), um agonista (não seletivo) beta-adrenérgico.

Segundo Vassallo et al., 1994 as preparações isoladas de ratos exibem melhores respostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de Ca^{++} . Por isso, os músculos papilares dos animais experimentais foram perfundidos com solução de Krebs contendo concentração de cálcio 0,62 mM.

Após estabilização funcional da preparação, foram adicionadas ao banho, concentrações crescentes de isoproterenol (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M), (Figura 8).

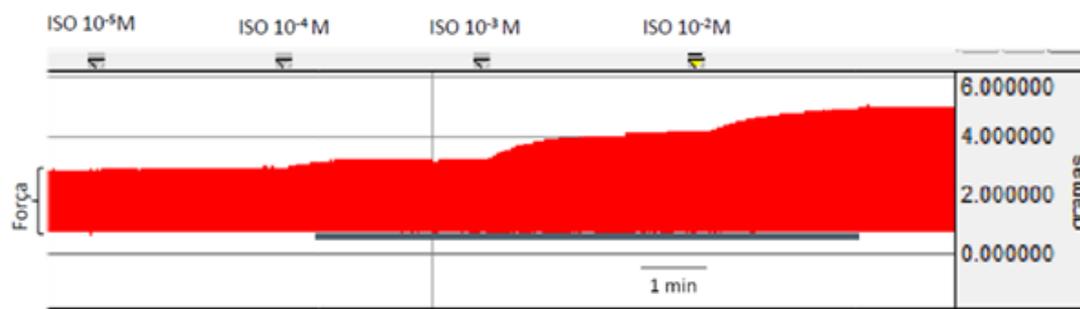


Figura 8: Curva de concentração-resposta ao isoproterenol. Concentrações crescentes e cumulativas de isoproterenol (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} M) foram adicionadas a uma solução de Krebs contendo uma concentração de Ca^{2+} 0,62 mM.

3.5. BIOLOGIA MOLECULAR

3.5.1. Avaliação da expressão das proteínas envolvidas na cinética do cálcio pelo método de western blot

Para investigar se a exposição ao chumbo altera a expressão de proteínas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica, utilizou-se a técnica de Western blot, para mensuração das seguintes proteínas: SERCA-2a, fosfolambam (PLB); e trocador sódio/cálcio (NCX).

Para realização dessa técnica foram utilizadas amostras de ventrículo esquerdo, dos animais CT e Pb²⁺. Estas amostras foram congeladas à -80°C até o momento da extração proteica.

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos corações, na temperatura de 4°C, em tampão de homogeneização contendo: Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, SDS 1% p/v, NaF 10 mM, PMSF 1 mM, NaVO₃ 1mM, DTT 0.5 mM, coquetel inibidor de protease contendo AEBSF, Aproptin, Bestatin, E-64, Leupeptin na proporção de 1:100.

Após a homogeneização do tecido, esta mistura foi acondicionada em tubos eppendorfs e centrifugada a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e o “pellet” desprezado. Foi realizada uma diluição da amostra (1:200) para quantificação total da proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), em seguida foram aliqüotadas 80µg de proteína e estas foram mantidas à -80°C até o momento da realização do ensaio.

Quando realizado o Western Blot as amostras foram adicionadas de um tampão de carregamento (Laemmli 2X buffer) contendo Uréia 0,5 mM, SDS 0,17 mM, DTT 39 nM, Tris-HCl 0.01 M com pH 8.0. As amostras foram então adicionadas deste tampão em uma proporção de 1:1 (Laemmli 2X buffer) e aquecidas à 95°C por 4 minutos. Em seguida foram carregados os géis de SDS-poliacrilamida 7,5% (SERCA-2a e Trocador Na⁺/Ca²⁺) ou 15 % (Fosfolamban) imersos em um tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) e submetidos a uma amperagem de 80 V por 2 horas.

Após o término da eletroforese foi realizada a transferência elétrica das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, UK) em um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% e SDS 0.1 %) à temperatura ambiente usando 25 V em um Semi-dry (Bio-Rad).

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por duas horas em uma solução bloqueadora de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5). Os anticorpos primários utilizados foram anti-mouse monoclonal para SERCA-2a (1:500; Affinity Bioreagents), anti-mouse monoclonal para PLB (2ng/ml; Affinity Bioreagents), anti-mouse monoclonal para NCX (1:200; Abcam Cambridge, MA, USA) e anti-mouse monoclonal para GAPDH (1:5000; Abcam Cambridge MA, USA) diluídos em uma solução de BSA que por sua vez, foi diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5). As membranas foram incubadas overnight a 4°C.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas eram lavadas por 30 minutos com uma solução TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5) para remoção dos anticorpos primários.

Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anti-mouse ou anti-rabbit (1:2500 ou 1:5000; StressGen, Victoria, Canadá)

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20.

As bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (ECL plus, Amersham, UK) e expostas a um filme de raio-X (Hyper film, Amersham UK) o qual era revelado. As proteínas pesquisadas foram corrigidas pela quantidade de GAPDH detectado.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. (EPM). Os valores de “n” representam o número de animais ou amostras utilizadas 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. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas e plotagem de todos os gráficos foi empregado o GraphPad Prisma 4.0 (San Diego, CA, USA).

3.7. FÁRMACOS E REAGENTES

2-Hidroxi-etilmercaptano (-mercaptoetanol) (Sigma)

Acetato de Chumbo II (Sigma)

Ácido clorídrico – HCl (Merck)

Ácido tricloroacético (Merck)

Albumina, Soro Bovina (Sigma)

Álcool polivinílico (Merck)

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 rato para GAPDH (Abcam)

Bicarbonato de sódio - NaHCO₃ (Merck)

Cafeína (B.HERZOG)

Cloreto de cálcio dihidratado - CaCl₂. 2H₂O (Merck)

Cloreto de magnésio Hexahidratado - MgCl₂. 6H₂O (Merck)

Cloreto de potássio - KCl (Merck)

Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)

Cloridrato de verapamil (Teuto)

Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)

Etanol absoluto (Sigma)

EDTA (Sigma)

EGTA (Sigma)

Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Merck)

Glicerol (Reagen)

Glicose (Vetec)

Heparina sódica (Roche)

HEPES (Sigma)

Hidrato de cloral (Reagen)

Hidróxido de Sódio (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

L-Isoproterenol (Sigma)

Molibdato de amônio (Nuclear)

Metanol (Sigma)

N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)

N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)

NaVO₃

Ouabaína, octahidrato (Sigma)

Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)

Sulfato de sódio - Na₂SO₄ (Merck)

Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)

Persulfato de amônio (APS) (Sigma)

Tris-HCl (Sigma)

Triton X-100 (VETEC)

Uretana sódica (Sigma)

4. RESULTADOS

4.1. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DO CHUMBO

A medida da concentração sanguínea de chumbo foi realizada após 15 dias de exposição ao metal. Os animais do grupo Pb^{2+} apresentaram concentração sanguíneas de $12,3 \mu\text{g/dL} \pm 2 \mu\text{g/dL}$ ($n=6$) enquanto os animais do grupo Controle ($n= 6$) apresentaram concentrações menores que o limite de detecção do aparelho.

4.2. VALORES DA AVALIAÇÃO PONDERAL

4.2.1. AVALIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A figura 9, mostra o ganho de peso dos ratos de ambos os grupos experimentais, antes e depois dos 15 dias de exposição ao chumbo (100 ppm). Como pode-se observar o peso dos ratos foi igual tanto no início como no final do tratamento, demonstrando que o chumbo não interfere no ganho de peso corporal.

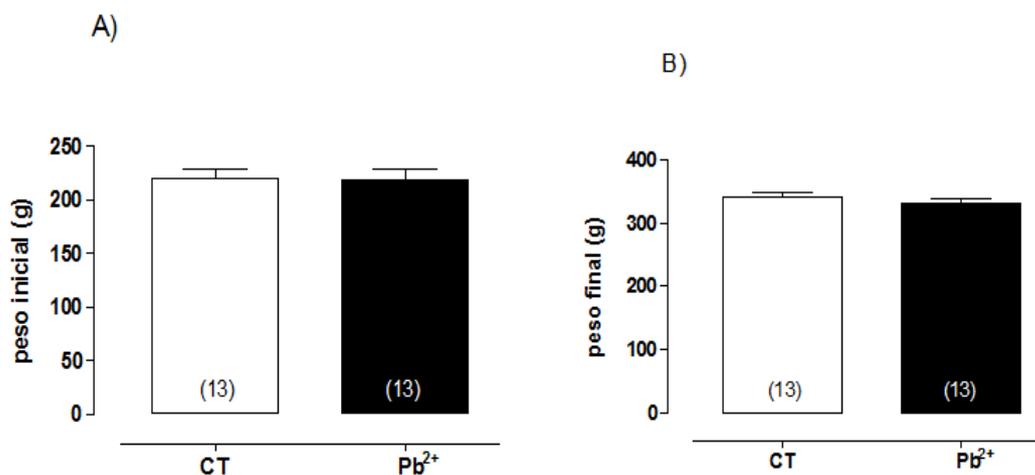


Figura 9: Avaliação do peso corporal entre os grupos CT e Pb²⁺, antes e no final do tratamento. Os números entre parênteses correspondem ao número de ratos estudados e os dados estão expressos como média \pm EPM. $P < 0,05$, teste t de Student não pareado.

4.2.2. AVALIAÇÃO PONDERAL DAS CÂMARAS CARDÍACAS

Os parâmetros ponderais das câmaras cardíacas foram obtidos ao final dos 15 dias de tratamento. Para evitar possíveis “falsos resultados” em detrimento do tamanho dos ventrículos, o peso úmido das câmaras foi corrigido pelo peso corporal de cada animal correspondente. O peso úmido foi usado com o intuito de avaliar hipertrofia ventricular. O peso relativo do ventrículo direito (VD/PC) e o peso relativo do ventrículo esquerdo (VE/PC) foram similares nos animais CT (VD/PC: $2,13 \pm 0,07$ e VE/PC: $0,58 \pm 0,03$) e nos animais expostos ao Pb²⁺ (VD/PC: $2,32 \pm 0,12$ e VE/PC: $0,59 \pm 0,03$) (Figura 10).

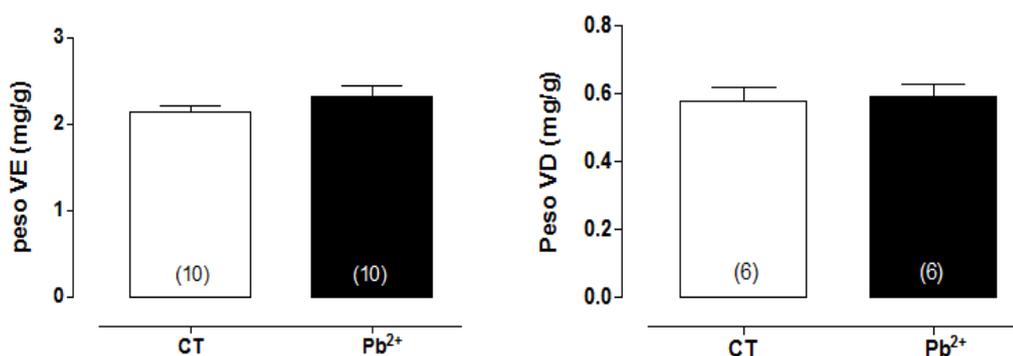


Figura 10: Comparação entre o peso dos ventrículos esquerdo (A) e direito (B) após 15 dias de tratamento dos respectivos grupos experimentais controle (CT) e chumbo (Pb²⁺). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos em Média \pm EPM. $P < 0,05$, teste t de Student não pareado.

4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

A PAS foi avaliada por meio da pletismografia de cauda, no tempo 0 (momento antes do início do tratamento) e no final dos 15 dias de tratamento. Como demonstrado na figura 11, no início os valores pressóricos são semelhantes, ao passo que no final do tratamento foi observado um aumento significativo na PAS nos animais exposto ao chumbo (CT: 112 ± 2 mmHg, $n = 6$ vs Pb^{2+} : 125 ± 2 mmHg, $n = 6$; $P < 0.05$, ANOVA duas vias).

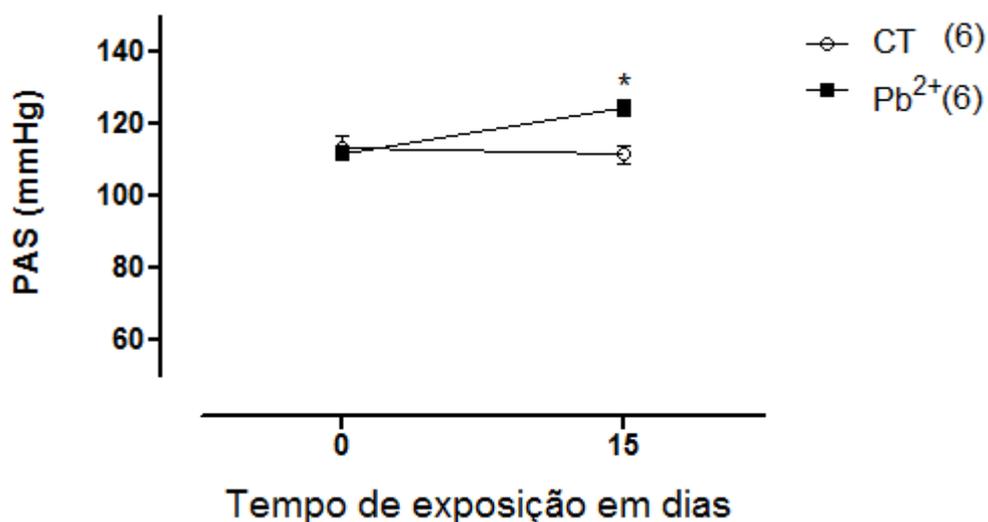


Figura 11: Os efeitos da exposição ao chumbo sobre a pressão arterial sistólica pressão (PAS) em cauda de ratos acordados. Os resultados são expressos como média \pm EPM. ANOVA 2 vias seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

4.4. MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Ao final dos 15 dias de exposição ao chumbo, os ratos foram anestesiados e as medidas diretas dos parâmetros hemodinâmicos foram obtidas. Estes parâmetros estão apresentados na tabela 1 e Figura 12 e 13. Como pode-se

observar, em ambos os grupos experimentais esses parâmetros não foram alterados nos grupos CT e Pb²⁺.

Tabela 1: Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares de ratos expostos e não-expostos ao chumbo

	CT (n = 9)	Pb²⁺(n=9)
SAP (mmHg)	106 ± 4,7	110 ± 2,4
DAP (mmHg)	60 ± 3,9	62 ± 1,9
FC (bpm)	298 ± 9,3	279 ± 11,2
PSVE (mm Hg)	119 ± 8,3	117 ± 4,7
PDfVE (mm Hg)	5,06 ± 0,78	4,6 ± 0,52
dP/dt+ VE (mm Hg/sec)	7719 ± 1294	6261 ± 887,8
dP/dt - VE (mm Hg/sec)	-4451 ± 1777	-4276 ± 1698
PSVD (mm Hg)	37,3 ± 2,58	34,9 ± 2,97
PDfVD (mmHg)	2,06 ± 0,64	1,86 ± 0,47
dP/dt+ VD (mm Hg/sec)	1822 ± 366,8	1977,4 ± 371,8
dP/dt—VD (mm Hg/sec)	-1366 ± 206,8	-1605,078 ± 354,4

Efeitos de 100 ppm de acetato de chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial Sistólica (PAS); Pressão Arterial Diastólica (PAD); 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 este *t* não pareado: $P < 0,05$ CT vs Pb^{2+} .

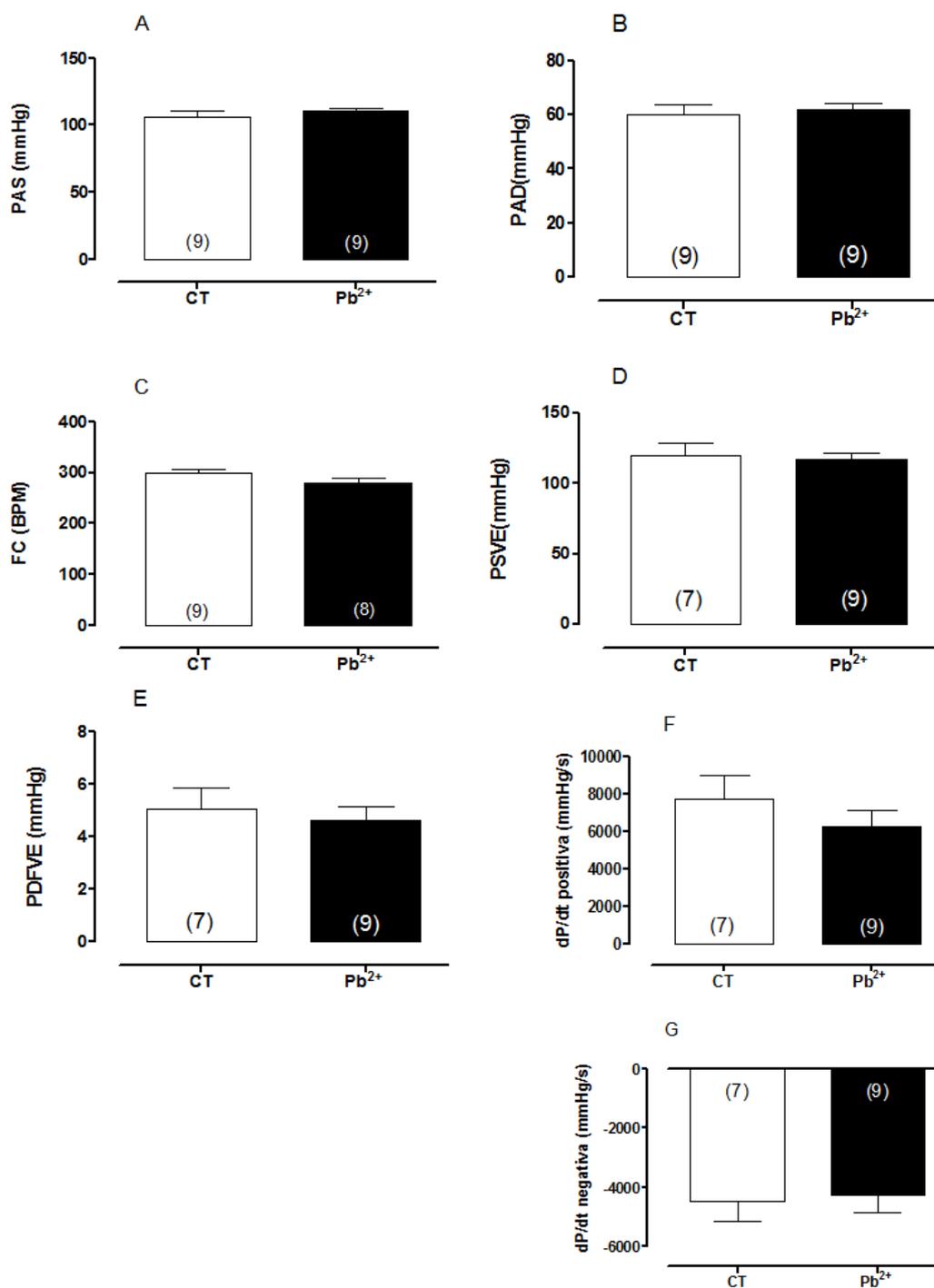


Figura 12: Avaliação, in vivo, de parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares esquerdo dos ratos dos grupos CT e Pb^{2+} . Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. $P < 0,05$. Teste *t* de Student não-pareado.

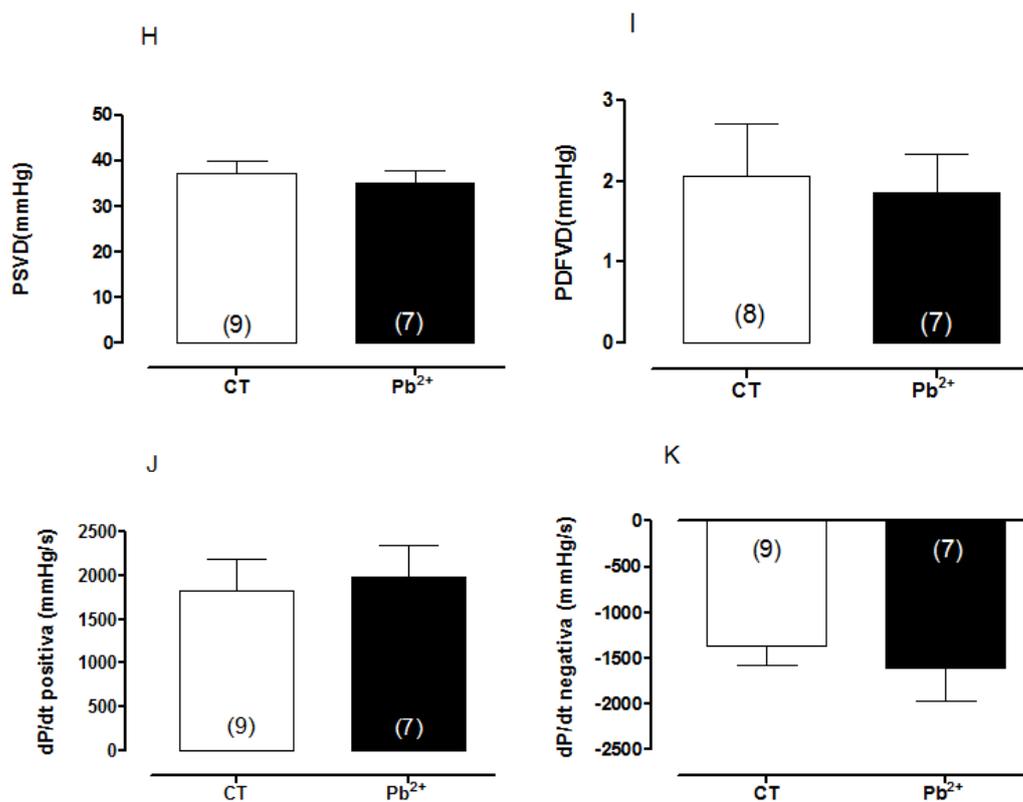


Figura 13: Avaliação, in vivo, de parâmetros hemodinâmicos ventriculares direito dos ratos dos grupos CT e Pb²⁺. Os números entre parênteses correspondem ao número de animais estudados. P <0,05. Teste t de Student não-pareado.

4.5. AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

4.5.1. AVALIAÇÃO PONDERAL DOS PAPILARES

Os dados ponderais estão representados na figura 14. Ao final de cada experimento os papilares úmidos de ambos os grupos foram pesados. Como

demuestra a figura, os pesos dos papilares do grupo controle e do chumbo não mudaram (Controle: $5,74 \pm 0,35$ g; chumbo: $5,54 \pm 0,43$ g).

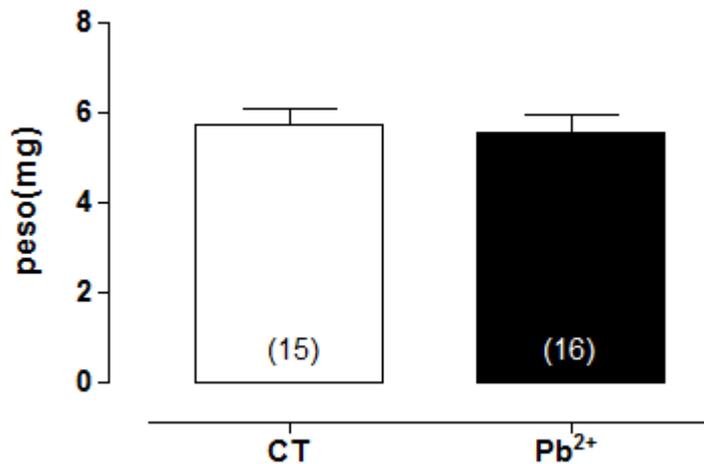


Figura 14: Peso úmido dos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos grupos Controle (n=15) e chumbo (n=16). Dados expressos em Média \pm EPM. $P < 0,05$, Teste t de Student não pareado.

4.5.2. FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA, DERIVADAS E PARÂMETROS TEMPORAIS

A força desenvolvida (F), os tempos de ativação (TA) e de relaxamento (TR 90%) e as derivadas temporais de força (dF/dt) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares foram obtidas após 60 minutos de estabilização. As figuras 15 – 16 ilustram a análise desses parâmetros. Na figura 15, percebe-se que a exposição ao acetado de chumbo por 15 dias não alterou a força desenvolvida nos animais de ambos os grupos experimentais (CT: $0,64 \pm 0,052$; Pb²⁺: $0,56 \pm 0,033$ g/mg). Da mesma forma, também não foi observada alterações nas as derivadas temporais (dF/dt) positiva e negativa dos grupos CT e Pb²⁺ (Figura 16A e B). Por outro lado, os tempos de ativação (TA) e de relaxamento (TR 90%) foram reduzidos nos animais expostos ao chumbo (Figura 17).

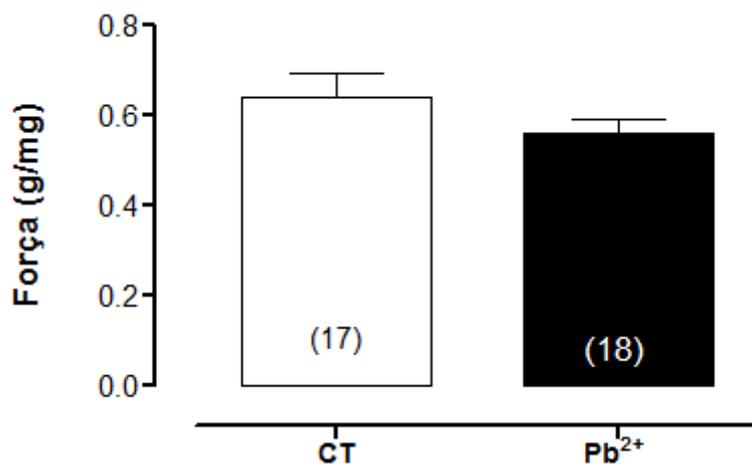


Figura 15: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos CT (n= 17) e Pb²⁺ (n= 18). Dados expressos em Média ± EPM. $p < 0,05$, teste t de Student não pareado.

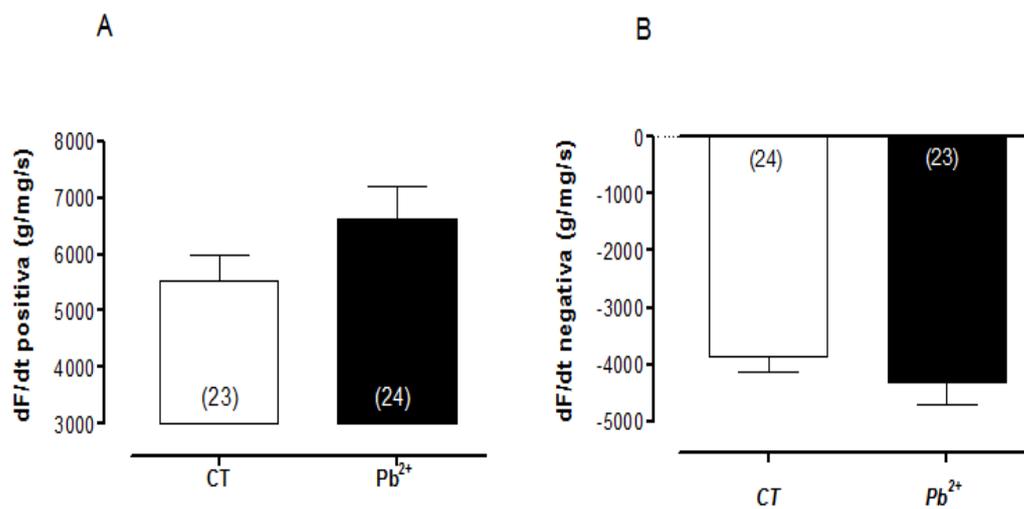


Figura 16: Avaliação, in vitro, das derivadas temporais da contração de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (CT, n= 23) e chumbo (Pb²⁺, n= 24). $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado.

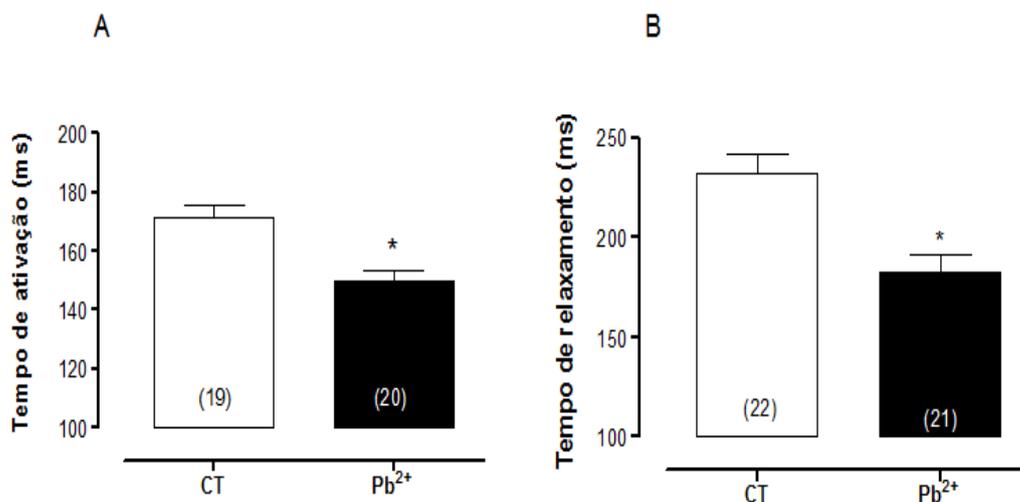


Figura 17: Parâmetros temporais (TA e TR90%) em músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados.*p < 0,05 vs C, teste t de Student não-pareado.

4.5.3 AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

Após estabilização das preparações, os músculos papilares foram submetidos a alguns protocolos experimentais. O primeiro protocolo utilizado para avaliar a força contrátil foi a potenciação pós-pausa (PPP). Este protocolo, permite avaliar de forma indireta, o funcionamento do retículo sarcoplasmático (RS).

A figura 18 apresenta a PPP obtida nos papilares dos ratos de ambos os grupos, após pausas na estimulação elétrica de 15, 30 e 60 segundos (VASSALLO; MILL, 1988). Nota-se que a exposição por 15 dias ao chumbo não alterou o funcionamento do RS, já que a potenciação no grupo controle e no grupo chumbo foi estatisticamente iguais.

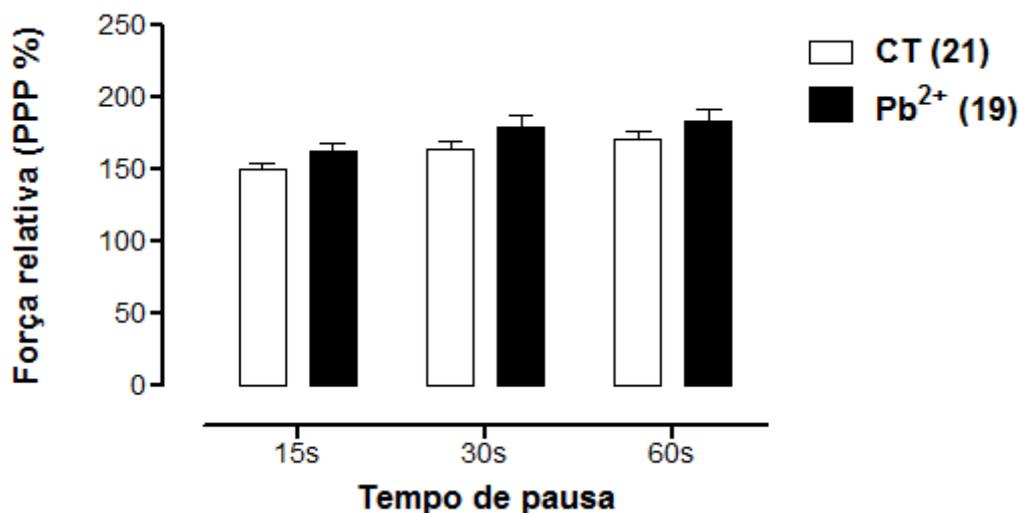


Figura 18: Potenciação pós-pausa (PPP) em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Para análise estatística ANOVA duas vias e teste post hoc de Bonferroni.

4.5.4. ANÁLISE DA RESPOSTA INOTRÓPICA DE MÚSCULOS PAPILARES DE RATOS EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO

Para investigar se a exposição ao chumbo poderia alterar os mecanismos celulares envolvidos na resposta inotrópica do coração, foram realizados dois protocolos, por meio de curvas concentração-resposta ao cálcio e ao isoproterenol.

A curva concentração-resposta ao cálcio foi realizada utilizando concentrações extracelulares crescentes de cálcio (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM). A figura 19 demonstra um aumento progressivo na força nos músculos papilares isolados em ambos os grupos experimentais. No entanto, a resposta inotrópica ao cálcio foi menor no grupo Pb²⁺ em relação ao CT.

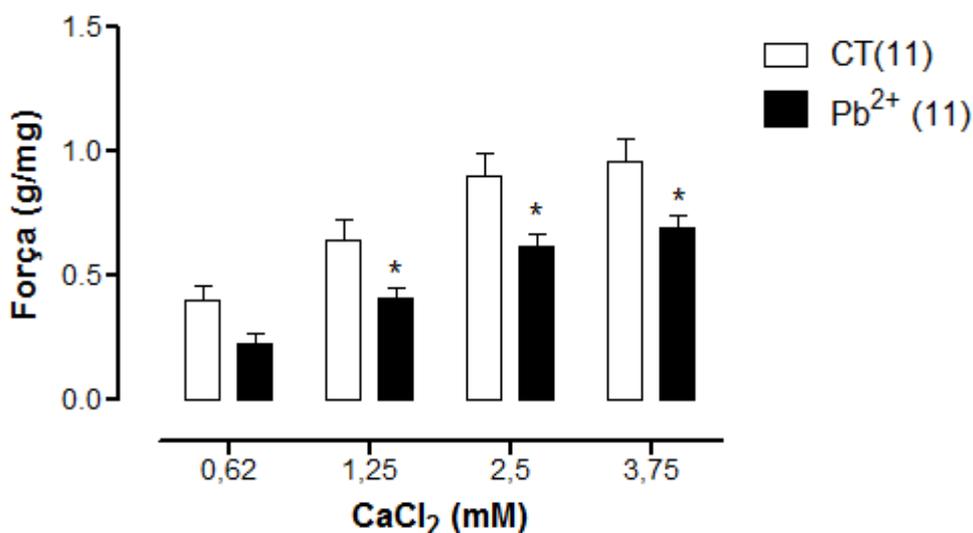


Figura 19: Resposta inotrópica (g/mg) a concentrações crescentes de CaCl₂ (0,62; 1,25; 2,5 e 3,75 mM) em músculos de papilares do ventrículo esquerdo de ratos controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas vias e post hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Outra intervenção inotrópica que permite avaliar os efeitos do chumbo nos mecanismos reguladores da contratilidade cardíaca, é a curva concentração resposta ao agonista β -adrenérgico, o isoproterenol. Por meio deste protocolo, percebe-se que a força desenvolvida frente a concentrações crescentes ao isoproterenol (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M) não foi modificada no grupo Pb²⁺ quando comparado ao grupo CT (Figura 20).

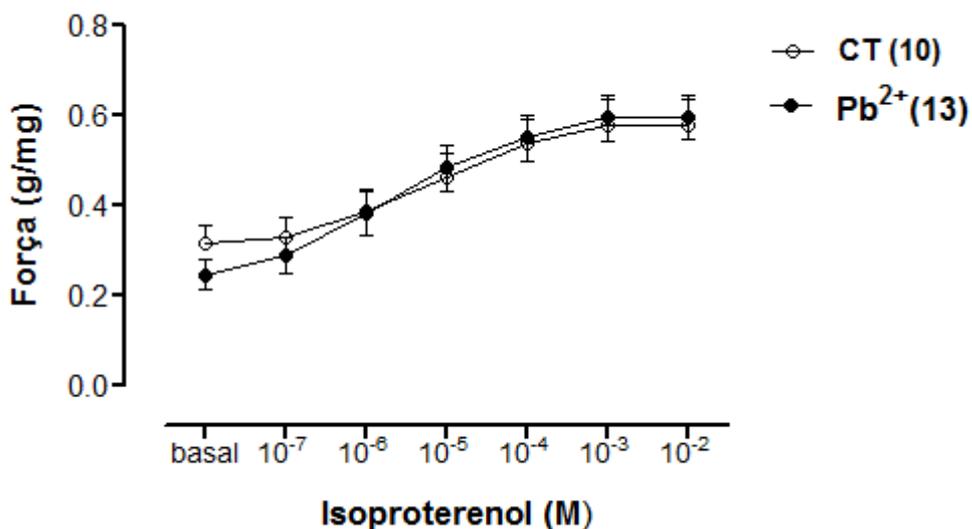


Figura 20: Desenvolvimento de força frente a estimulação β -adrenérgica em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos CT e Pb^{2+} . Força corrigida pelo peso do papilar. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas vias e post hoc de Bonferroni.

4.5.5. MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSSARCOLEMAL "POST REST CONTRACTION-PRC".

As contrações obtidas após pausa de 10 minutos na estimulação elétrica (PRC) foram realizadas para investigar o efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio. Para isso, os músculos papilares de ambos os grupos foram lavados e perfundidos com uma solução de Krebs livre de cálcio (Ca^{2+} free) e contendo cafeína. Em seguida, o perfusato foi substituído por solução Krebs normal e o estímulo foi religado, e a primeira contração gerada foi mensurada.

O mesmo protocolo foi repetido, após um período de estabilização, diferenciando apenas pela adição, na solução de Krebs, do verapamil, um bloqueador de canais de cálcio de tipo L. Os resultados obtidos nesse protocolo

demonstram respostas semelhantes em ambos os grupos experimentais, tanto na ausência como na presença de verapamil (Figura 21: A e B, respectivamente).

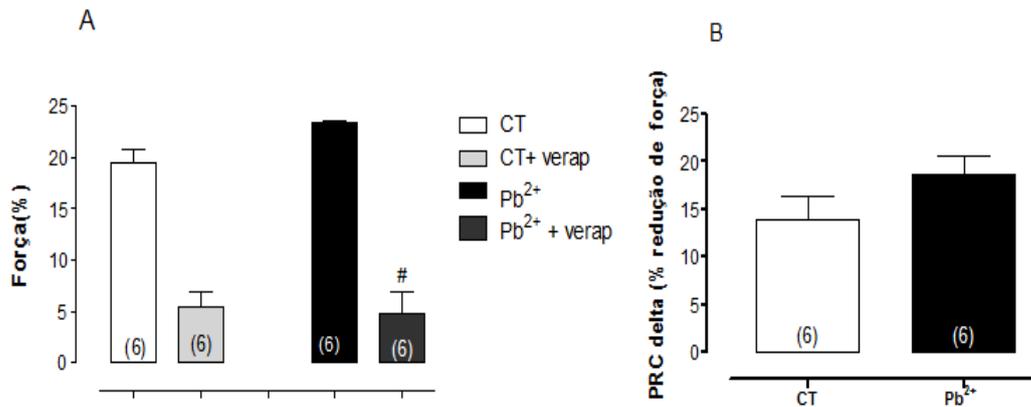


Figura 21: Avaliação indireta do influxo transsarcolemal de cálcio, antes após o bloqueio com verapamil, em musculo papilares de ratos controle e chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA uma vias e post hoc de Turkey.

4.5.6. FORÇA DESENVOLVIDA DURANTE CONTRAÇÕES TETÂNICAS E O BLOQUEIO COM VERAPAMIL

As contrações tetânicas foram realizadas com objetivo de avaliar a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio (LEITE et al.,1995). Neste protocolo ocorre desenvolvimento de uma rápida elevação na força (pico da contração tetânica), seguida por uma pequena queda e conseqüente formação de um platô.

A figura 22 mostra que o desenvolvimento de força tanto no pico da contração como no platô foi reduzida, sugerindo uma menor sensibilidade ao

cálcio pelas proteínas contráteis do grupo exposto ao chumbo.

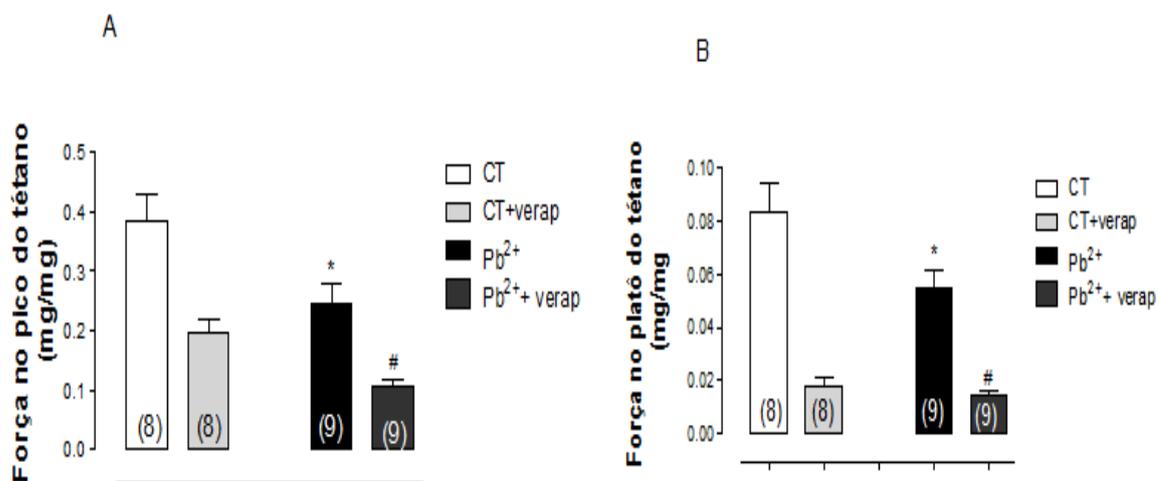


Figura 22: contrações tetânicas em músculos papilares de ventrículos esquerdo de ratos controle e chumbo antes e após adição de verapamil. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA uma via e post hoc de Turkey. * $p < 0,05$.

4.5.7. BIOLOGIA MOLECULAR

4.5.7.1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CINÉTICA DO CÁLCIO PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT

A figura 23 apresenta os níveis proteicos SERCA-2a, fosfolambam e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no grupo controle e no grupo tratado com chumbo durante 15 dias de tratamento. Mediante a figura, pode observar que os níveis se mantiveram iguais em ambos os grupos.

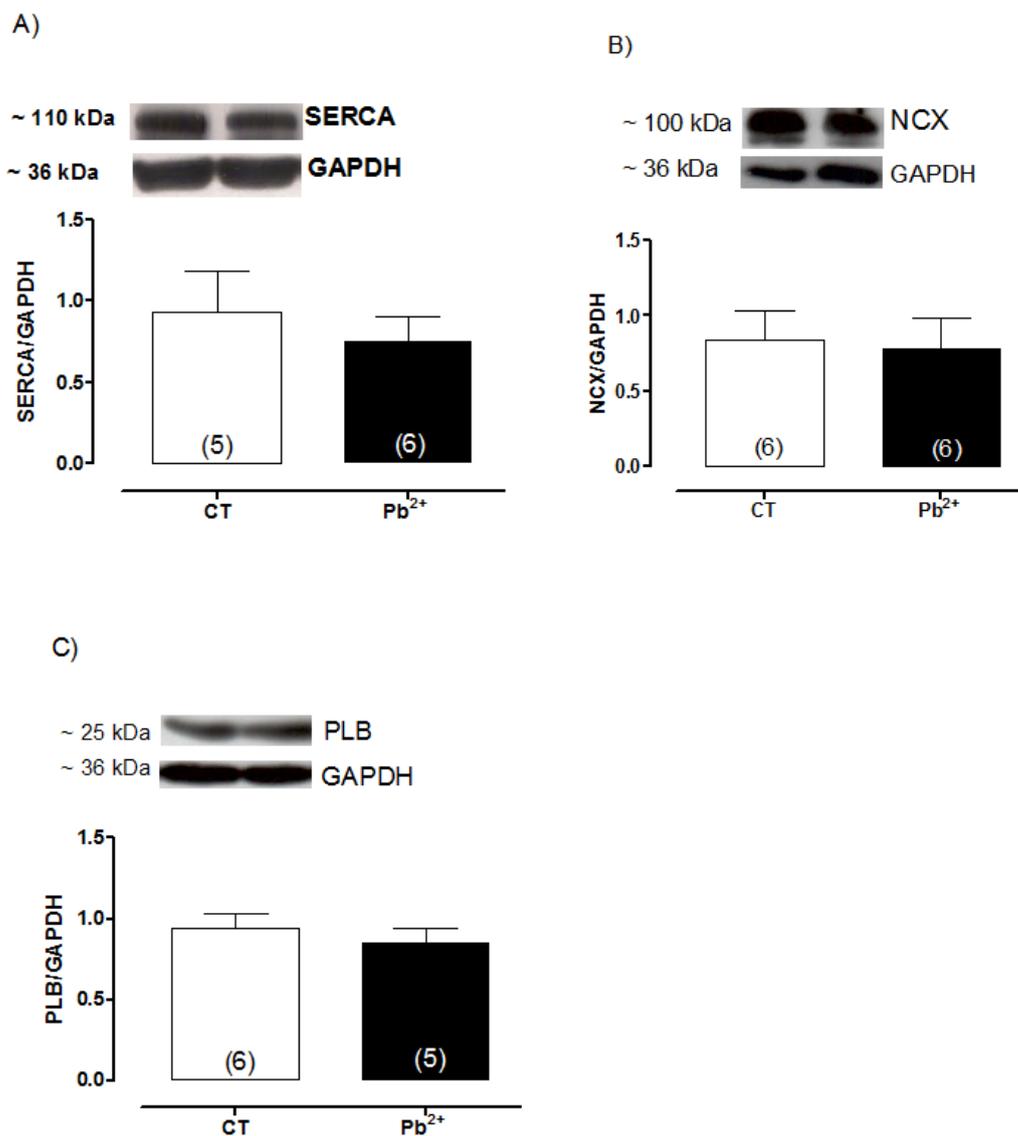


Figura 23: Expressão proteica da SERCA-2^a (A), trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) (B) e fosfolambam (C) em ventrículos esquerdo de ratos controle e ratos tratados com chumbo. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a exposição aguda à baixa concentração plasmática de chumbo (12.3 µg/dL), abaixo daquela preconizada como segura pelas agências de saúde (BRASIL, 2006b; [ATSDR], 2007; (WHO), 2011), além de elevar a pressão arterial, prejudica a maquinaria contrátil do coração. Esse efeito deletério sobre o coração parece estar relacionado à redução de sensibilidade ao cálcio pelas proteínas contráteis. Nossos dados sustentam a hipótese de que a exposição ao chumbo, mesmo em baixas concentrações, constitui-se um fator de risco para doenças cardiovasculares.

Nesse estudo após 15 dias de exposição à baixa concentração de chumbo, os ratos apresentaram aumento de pressão arterial sistólica, medida indiretamente através da pletismografia de cauda (figura 11). No entanto, ao se avaliar a pressão arterial de forma direta, essa diferença não foi observada (figura 12 e 13). 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 (Zorniak et al., 2010).

Vários trabalhos já demonstraram que uma baixa concentração deste metal, é capaz de induzir aumento da pressão arterial, tanto em humanos quanto em animais. Cronicamente, Carmignani et al., (1999), demonstraram que a exposição a 60 ppm de chumbo em água de beber por 10 meses, foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica no grupo de ratos que foi exposto ao referido metal. Em outro trabalho, Sharifi et al., (2004), encontrou aumento de pressão arterial sistólica a partir da segunda semana de tratamento com 100 ppm de acetato de chumbo em água de beber. Este aumento de pressão arterial se manteve até a oitava semana, na qual atingiu valor aproximado de 180 mmHg.

Roncal et al., (2007), demonstram também que ratos expostos a 150 ppm de chumbo por 4 meses obtiveram aumento da pressão arterial sistólica. Na mesma linha, com uma dose mais alta, Malvezzi, et al., (2001), com uma exposição de 750 ppm em água de beber por 10 semanas, demonstraram um

aumento de pressão a partir da quinta semana comparados os respectivos controles. Corroborando com estes achados, Grizzo et al., (2008), com ratas grávidas e em período de lactação expostas a 100 ppm de chumbo em água de beber, demonstraram também que os filhotes com 22 dias de vida apresentaram um aumento de pressão arterial comparados com grupo controle.

Ainda, estudos concentrados em nosso laboratório também demonstraram esse aumento de pressão arterial durante o tratamento com o chumbo. Silveira et al., (2014) e Fioresi et al., (2014), demonstraram que ratos expostos ao chumbo por 30 dias apresentaram aumento de PAS logo na primeira semana e esta se manteve elevada até o final do tratamento. Fiorim et al., (2011), demonstrou também, que o tratamento por 7 dias com chumbo, aumentou a PAS no final do tratamento.

Além disso, agudamente Simões et al., (2011), demonstraram que uma única dose aguda de chumbo (320 µg/kg) após 120 minutos foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica (PAS).

Já em humanos, Glenn et al., (2003, 2006), demonstraram que trabalhadores expostos ocupacionalmente em média por 18 anos apresentaram um aumento na pressão arterial. Esse aumento na pressão arterial se manteve 18 anos após a última exposição ocupacional.

Diversos mecanismos pelos quais o chumbo promove aumento de pressão arterial já foram descritos. Dentre eles incluem a inibição da bomba de sódio (Lustberg & Silbergeld, 2002), prejuízo da função do endotélio vascular com redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (Silveira et al., 2014; Khalil-Manesh et al., 1993; Carmignani et al., 2000) e aumento do estresse oxidativo (Vaziri, et al., 2001; Silveira et al., 2014; Simões et al., 2011). Além disso, um aumento do tônus simpático com prejuízo da sensibilidade do barorreflexo (Navas-Acien et al., 2007) e aumento da atividade do sistema renina-angiotensina (Carmignani et al., 1999;2000) também estão relacionados à hipertensão induzida pelo chumbo.

Embora os efeitos hipertensores induzidos pelo chumbo já tenham sido descritos, sua ação sobre a função cardíaca ainda é pouco conhecida. Os efeitos do chumbo sobre a função cardíaca parecem depender do tempo de exposição

e da concentração desse metal. Agudamente, altas concentrações de chumbo produzem redução da contratilidade miocárdica por redução do influxo sarcolemal de cálcio e redução da atividade da ATPase miosínica em ventrículo direito (Vassallo et al., 2008). No entanto, já em baixas concentrações, o chumbo promove efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos, associado ao aumento da atividade da bomba de sódio e da ATPase miosínica em ventrículo esquerdo (Fioresi et al., 2013).

Nossos resultados demonstram que a exposição por 15 dias à baixa concentração de chumbo (12.3 µg/dL) não produz mudanças na força isométrica de músculos papilares isolados. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Fioresi et al., 2014, que não verificaram alterações na força isométrica em músculos papilares isolados de ratos expostos ao chumbo por 30 dias (100 ppm na água de beber). No entanto, diferente dos resultados obtidos por Fioresi et al., (2014), nossos resultados demonstraram que a exposição por 15 dias ao chumbo, embora não modifique a força desenvolvida pelos músculos papilares isolados, reduz o tempo de ativação da contração (TP) e de relaxamento (TR 90%). Provavelmente, as diferenças encontradas entre os nossos resultados e àqueles obtidos por Fioresi et al., (2014), possam ser explicadas pela diferença no tempo de exposição ao metal.

A redução do TP e TR 90% poderia ser devido ao aumento no influxo de cálcio pela membrana sarcolemal e aumento na recaptção deste íon pelo retículo sarcoplasmático. Entretanto, a função do retículo sarcoplasmático, avaliada por meio da PRP após pausas de 15, 30 e 60 s não foi modificada em músculos papilares isolados de ratos do grupo Pb²⁺ quando comparados aos ratos do grupo CT. Ao mesmo tempo, a expressão protéica da SERCA 2a foi similar em coração de ratos de ambos os grupos experimentais. Fioresi et al., 2014, evidenciaram redução da expressão protéica da SERCA 2a. Contudo, isso não foi acompanhado por modificações na expressão protéica do PLB e nem em suas subunidades fosforiladas, sugerindo que a captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático não foi alterada nos animais expostos a 100 ppm de acetato de chumbo por 30 dias. Trabalhos que investigaram as ações agudas do chumbo sobre a função cardíaca *in vitro*, também verificaram que este metal não altera a atividade do retículo sarcoplasmático (Vassallo et al., 2008; Fioresi et al., 2013).

Outra análise importante do nosso estudo foi investigar se a exposição por 15 dias ao chumbo poderia modificar a resposta inotrópica dos músculos papilares isolados. Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta ao isoproterenol e ao cálcio. Os resultados obtidos destes protocolos demonstraram que a intervenção inotrópica produzida pelo isoproterenol não modificou o incremento de força entre os grupos Pb^{2+} e CT.

No entanto, trabalhos anteriores evidenciaram um aumento de responsividade dos receptores β -adrenérgicos em ratos tratados agudamente com chumbo (Vassallo et al., 2008, Fioresi et al., 2013). Por outro lado, Tsao et al., 2000, verificaram que o tratamento por 2 meses com chumbo promove aumento dos níveis plasmáticos de norepinefrina e redução da densidade do receptor β -adrenérgico e do conteúdo de AMPc no coração, o que poderia resultar em diminuição da contratilidade cardíaca. O aumento dos níveis plasmáticos de norepinefrina é sugestivo de aumento na atividade simpática que foi evidenciado em ratos expostos cronicamente (18 meses) ao chumbo ((Boscolo & Carmignani, 1988). Portanto, sugerimos que a divergência dos resultados apresentados no presente estudo com aqueles observados em ratos submetidos a tratamentos agudo (Vassallo et al., 2008; Fioresi et al., 2013) e crônico (Tsao et al., 2000) possa ser devido ao tempo de exposição a esse metal.

Em contrapartida, a resposta inotrópica produzida pelo aumento das concentrações extracelulares de cálcio foi menor em papilares isolados de ratos tratados com chumbo quando comparados ao controle. Esses resultados sugerem que os cardiomiócitos de ratos do grupo Pb^{2+} podem apresentar menor permeabilidade ao cálcio ou uma menor afinidade das proteínas contráteis a este íon (Leite et al, 1995).

Contraditoriamente, a exposição por 30 dias ao chumbo aumenta a resposta inotrópica induzida pelo cálcio em músculos papilares isolados (Fioresi et al., 2014). Já em estudos realizados após exposição aguda, o chumbo parece promover redução do ganho de força cardíaca em resposta a concentrações crescentes de cálcio quando comparado aos animais controles (Vassallo et al., 2008; Prentice & Kopp, 1985). Esse efeito de redução do fluxo transsarcolemal de

cálcio pode ser atribuído à capacidade deste metal em bloquear canais de cálcio, como já demonstrado em miócitos de ratos e *Xenopus laevis* oocytes (Bernal, et al., 1997). Dessa forma, fica evidente que os efeitos agudos e crônicos induzidos pelo chumbo sobre a resposta inotrópica se divergem.

Com intuito de avaliar se a menor resposta inotrópica ao aumento de cálcio extracelular observado em músculos papilares isolados de ratos tratados poderia estar relacionada às alterações no influxo de cálcio pelos canais do tipo L, foi realizado a PRC na presença e na ausência de verapamil, um bloqueador desses canais de cálcio (Leite et al., 1995). De acordo com nossos resultados, a PRC foi similar em papilares isolados de ratos CT e Pb^{2+} .

Juntos, esses resultados sugerem que a redução da resposta inotrópica em resposta a concentrações crescentes de cálcio extracelular não parece ser ocasionada por alteração no fluxo transsarcolemal de cálcio.

No entanto, outro fator que poderia explicar o efeito do chumbo sobre a redução da resposta inotrópica ao cálcio seria uma possível alteração das proteínas contráteis. Já foi demonstrado que o chumbo pode se ligar a grupos sulfidríla (SH) (Dabrowska-Bouta, et al., 1996) e dessa forma, afetar a proteínas contráteis. A atividade da miosina, que possui grupos SH, por exemplo, é reduzida pelo chumbo (Vassallo et al., 2008).

Assim, para avaliar indiretamente, tanto as proteínas contráteis como o influxo de cálcio, os músculos papilares isolados foram submetidos a contrações tetânicas conforme protocolo estabelecido por Leite et al., 1995. As contrações tetânicas obtidas após inibição do retículo sarcoplasmático com cafeína ou rianodina têm sido usadas para produzir ativação máxima da maquinaria contrátil no miocárdio intacto (Yue, et al., 1986;Moreira et al., 2003). A cafeína age depletando o estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático e a exposição sustentada à cafeína previne o acúmulo de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Leite et al., 1995). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram redução na força tetânica tanto na presença quanto na ausência de verapamil. No entanto, a análise da diferença do platô e do pico das contrações tetânicas, na presença e na ausência de verapamil, foi similar entre os grupos Pb^{2+} e CT sugerindo novamente que a exposição por 15 dias ao chumbo não modifica o

influxo de cálcio. Uma vez que a atividade do retículo sarcoplasmático está bloqueada, as contrações tetânicas dependem somente do influxo de cálcio e da atividade da ATPase miosínica. Assim, nossos resultados sugerem que a exposição ao chumbo por 15 dias, embora não altere o influxo de cálcio, pode modificar a função das proteínas contráteis.

Ademais, a menor afinidade das proteínas contráteis ao cálcio pode explicar a redução observada nos parâmetros temporais da contração (TA e TR90%). A dessensibilização das proteínas contráteis (troponina) aumenta a quantidade de cálcio disponível para a recaptação pelo RS. Esse aumento de disponibilidade de cálcio reduz o tempo de relaxamento do músculo cardíaco. O TA, por sua vez, também pode reduzir, uma vez que, quanto mais cálcio recaptado mais cálcio vai ser liberado para a contração, entretanto, sem que esse pudesse causar um aumento de força de contração. (Vassallo et al., 2008b).

No entanto, algumas manobras experimentais não realizados nesse estudo devido à falta de tempo e aparato necessário para a sua realização poderiam ser usados para confirmar os nossos resultados. Entre eles podemos citar: atividade da ATPase miosínica pela técnica de western blot e uma curva de estiramento (Frank-Starling). Com a afinidade ao cálcio reduzida no grupo exposto ao Pb^{2+} , esperaria-se que a atividade da ATPase miosínica estivesse reduzida. Igualmente, o ganho de força observado no estiramento do músculo mediante o mecanismo do Frank-Starling seria menor no grupo Pb^{2+} . O aumento de força observada após estiramento do músculo papilar além de proporcionar uma interação adequada das proteínas contráteis no Sarcômero e o aumento do cálcio intracelular está relacionada com mudanças na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio.

O principal achado do presente estudo revela que exposição a baixa concentração de chumbo por 15 dias, apesar de não comprometer a atividade do retículo sarcoplasmático, reduz a resposta inotrópica ao cálcio. Esse efeito não parece estar relacionado a mudanças no fluxo transsarcolemal de cálcio, mas sugere uma possível alteração das proteínas contráteis. Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais

conhecido o efeito da exposição ao chumbo em concentrações abaixo dos valores preconizados como seguros. Além disso, Nossos dados reforçam que o chumbo, deve ser considerado como um fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, mesmo em baixas concentrações. É importante ressaltar que essas doenças constituem um sério problema de saúde pública em diversos países, devido à alta taxa de morbi-mortalidade.

6. REFERÊNCIAS

(ATSDR). (1995). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for lead. 1993. Annual report-1995. *US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1993. Annual Report-1995. Disponível Em: <<http://www.atsdr.cdc.gov>>*, 307.

(CDC). (2003). Centers for Disease Control and Prevention. Childhood lead poisoning from commercially manufactured French ceramic dinnerware—New York City. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.

(IPCS). (1995). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead. *World Health Organization, Geneva, Suíça*.

(WHO), W. H. O. (2011). Prüss-Ustün, A; Vickers, C; Haefliger, P; Bertollini, R. Knowns and unknowns on burden of disease due to chemicals: a systematic review. Department of Public Health and Environment, World Health Organization. Geneva, Switzerland. *Environmental Health*, 10, 2–15.

(WHO), W. H. O. (1995). Environmental health criteria 165: inorganic lead. Em: IPCS (International Program on Chemical Safety). *Geneva, WHO*.

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

Alves, M. A. B.; Terra, N. N. (1983). Determinação do chumbo no sangue por espectrofotometria de absorção atômica, em indivíduos que operam na distribuição de gasolina, em Santa Maria – RS. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, Rio Grande Do Sul*, 42, 53–57.

Bassani, J. W., Bassani, R. A., & Bers, D. M. (1994). Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of Physiology*, 476, 279–93.

Bernal, J., Lee, J. H., Cribbs, L. L., & Perez-Reyes, E. (1997). Full reversal of Pb⁺⁺ block of L-type Ca⁺⁺ channels requires treatment with heavy metal antidotes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282, 172–80.

Bernard, B. P.; Becker, C. E. (1988). Environmental lead exposure and the kidney. *Journal of Clinical Toxicology*, 26, 1–34.

Boscolo, P., & Carmignani, M. (1988). Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 78, 101–6.

BRASIL. (2006a). Ministério do Trabalho. Expostos ao Chumbo Metálico. *Atenção À Saúde Dos Trabalhadores. Série A. Normas E Manuais Técnicos.*

BRASIL, M. da saúde. (2006b). 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.*

BRASIL. (2008). Ministério de Minas e Energia/Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Anuário Mineral Brasileiro (1995 a 2008). Acesso de Maio a julho de 2014.

Capitani, E.M. Paoliello, M.M.B.; Almeida, G. R. C. (2009). Fontes de Exposição humana ao chumbo no Brasil. *Simpósio: Chumbo E Saúde Humana.*, 42, 311–318.

Carmignani, M., Boscolo, P., Poma, A., & Volpe, A. R. (1999). Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology*, 44, 105–110.

Carmignani, M., Volpe, A. R., Boscolo, P., Qiao, N., Di Gioacchino, M., Grilli, A., & Felaco, M. (2000). Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences*, 68, 401–415.

Cheng, Y., Schwartz, J., Vokonas, P. S., Weiss, S. T., Aro, A., & Hu, H. (1998). Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (the Normative Aging Study). *The American Journal of Cardiology*, 82, 594–9.

Cordeiro, R., Lima Filho EC, & Salgado, P. (1996). [Readjustment of the biological exposure limit applied to blood lead levels in Brazil]. *Cadernos de Saude Publica*, 12, 455–463. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904348>

Craswell. P. W. (1987). Chronic lead nephropathy. *Annual Review of Medicine*, 38, 169–173.

Dabrowska-Bouta, B., Struzyńska, L., & Rafałowska, U. (1996). Effect of acute and chronic lead exposure on the level of sulfhydryl groups in rat brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56, 233–6.

Elinder CG, Friberg L, Kjellström T, N., & G, O. G. (1994). Biological monitoring of metals. *The Global Environmental Epidemiology Network. Geneva: World Health Organization;*

Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C. K., & Sindhu, R. K. (2005). Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research*, 98, 33–9.

Fell, G. S. (1984). Lead toxicity: problems of definition and laboratory evaluation. *Annals of Clinical Biochemistry*, 21 (Pt 6), 453–60.

Fioresi, M., Furieri, L. B., Simões, M. R., Ribeiro, R. F., Meira, E. F., Fernandes, A. A., ... Vassallo, D. V. (2013). Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 46, 178–85.

Fioresi, M., Simões, M. R., Furieri, L. B., Broseghini-Filho, G. B., Vescovi, M. V. A., Stefanon, I., & Vassallo, D. V. (2014). Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One*, 9, e96900.

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R. F., Silveira, E. A., Padilha, A. S., Vescovi, M. V. A., de Jesus, H. C., ... Vassallo, D. V. (2011). Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One*, 6, e17117.

Grizzo, L. T., & Cordellini, S. (2008). Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 103, 207–14.

Gulson, BL; Mahaffey, KR; Jameson, CW; Patison, N; Law, AJ, Mizon, KJ; Korsch, MJ; Pederson, D. (1999). Impact of Diet on Lead in Blood and Urine in Female Adults and Relevance to Mobilization of Lead from Bone Stores. *Environmental Health Perspectives*, 107, 257 – 263.

Harlan, W. R. (1988). The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environmental Health Perspectives*, 78, 9–13.

Harlan, W. R., Landis, J. R., Schmouder, R. L., Goldstein, N. G., & Harlan, L. C. (1985). Blood lead and blood pressure. Relationship in the adolescent and adult US population. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 253, 530–4.

Hertz-Picciotto, I., & Croft, J. (1993). Review of the relation between blood lead and blood pressure. *Epidemiologic Reviews*, 15, 352–73.

Jacobs, DE; Clickner, RP; Zhou, J. (2002). The prevalence of lead-based paint hazards in US housing. *Environ Health Perspect*, A599 – A606.

Karimi, G., Khoshbaten, A., Abdollahi, M., Sharifzadeh, M., Namiranian, K., & Dehpour, A. R. (2002). Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 46, 31–7.

Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Weiler, E. W., Prins, B., Weber, M. A., & Purdy, R. E. (1993). Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension*, 6, 723–9.

Khera, AK; Wibberley, DG; Edwards, KW; Waldron, H. (1980). Cadmium and lead in blood and urine in a series of cardiovascular and normotensive patients. *International Journal of Environmental Studies*, 14, 309 – 312.

Kopp, JS; Barron, JT; Tow, J. (1988). Cardiovascular Actions of Lead and Relationship to Hypertension: *Environmental Health Perspectives*, 78, 91 – 99.

Korecková-Sysalová, J. (1997). Determination of cadmium and lead levels in human blood of a general Czech population by GFAAS. *Biological Trace Element Research*, 56, 321–9.

Kosnett, M. J. (2003). Intoxicação por Metais Pesados & Quelantes. In: KATZUNG, Bertram G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,, 867–870.

Lal, B; Murthy, RC; Anand, M; Chandra, SV; Kumar, R; Tripathi, O; Srimal, R. (1991). Cardiotoxicity and hypertension in rats after oral lead exposure. *Drug and Chemical Toxicology*, 14, 305 – 318.

Leite, C. M., Vassallo, D. V, & Mill, J. G. (1988). The effect of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 21, 859–62.

Leite, C. M., Vassallo, D. V, & Mill, J. G. (1991). Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 24, 843–6.

Leite, C. M., Vassallo, D. V, & Mill, J. G. (1995). Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73, 638–43.

Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., & Murray, C. J. L. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 367, 1747–57.

Lustberg, M., & Silbergeld, E. (2002). Blood lead levels and mortality. *Archives of Internal Medicine*, 162, 2443–9.

Menke, A., Muntner, P., Batuman, V., Silbergeld, E. K., & Guallar, E. (2006). Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. *Circulation*, 114, 1388–94.

Mill, J. G., Vassallo, D. V, & Leite, C. M. (1992). Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 25, 399–408.

Moreira, F.R.; Moreira, J. C. (2004). A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 9, 167–181.

Nashashibi, N; Cardamakis, E; Bolbos, G; Tzingounis, V. (1999). Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation. *Gynecologic and Obstetric Investigation.*, 48, 158 – 162.

Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E. K., & Rothenberg, S. J. (2007). Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 472–82.

Navas-Acien, A., Selvin, E., Sharrett, A. R., Calderon-Aranda, E., Silbergeld, E., & Guallar, E. (2004). Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation*, 109, 3196–201.

Nawrot, T. S., Thijs, L., Den Hond, E. M., Roels, H. A., & Staessen, J. A. (2002). An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: a meta-analysis. *Journal of Human Hypertension*, 16, 123–31.

Paoliello, M. M., Gutierrez, P. R., Turini, C. A., Matsuo, T., Mezzaroba, L., Barbosa, D. S., ... Cascales, R. A. (2001). [Reference values for lead in blood in urban population in southern Brazil]. *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health*, 9, 315–9.

Pirkle, J. L., Schwartz, J., Landis, J. R., & Harlan, W. R. (1985). The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *American Journal of Epidemiology*, 121, 246–58.

Pocock, S. J., Shaper, A. G., Ashby, D., Delves, T., & Whitehead, T. P. (1984). Blood lead concentration, blood pressure, and renal function. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 289, 872–4.

Prentice, R. C., & Kopp, S. J. (1985). Cardiotoxicity of lead at various perfusate calcium concentrations: functional and metabolic responses of the perfused rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 81, 491–501.

Rabinowitz, MB; Wetherill, GW; Kopple, J. (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation.*, 58, 260 – 270.

Ringer, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of Physiology*, 4, 29–42.3.

Romeo, R., Aprea, C., Boccalon, P., Orsi, D., Porcelli, B., & Sartorelli, P. (1996). Serum erythropoietin and blood lead concentrations. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 69(1), 73–5.

Roncal, C. et al. (2007). Lead, at low levels, accelerates arteriolopathy and tubulointerstitial injury in chronic kidney disease. *American Journal Physiology. Renal Physiology.*, 293, 1391–1396.

Roy A, Bellinger D, Hu H, Schwartz J, Ettinder AS, Wright RO, B. M., & Palaniappan K, B. K. (2009). Lead exposure and behavior among young children in Chennai, India. *Environmental Health Perspectives*, 117, 1607– 1611.

Rubens O, Logina I, Kravale I, Eglite M, D., & M. (2001). Peripheral neuropathy in chronic occupational inorganic lead exposure: a clinical and electrophysiological study. *Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 71, 200–204.

Saryan, LA & Zenz, C. (1994). Lead and its compounds. In: Zenz, C; Dickerson, OB; Horvath, EP. *Occupational Medicine. Ed. Mosby-Year Book, EUA*, 506 – 541.

Schober, S. E., Mirel, L. B., Graubard, B. I., Brody, D. J., & Flegal, K. M. (2006). Blood lead levels and death from all causes, cardiovascular disease, and cancer: results from the NHANES III mortality study. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1538–41.

Schwartz, J. (1988). The relationship between blood lead and blood pressure in the NHANES II Survey. *Environmental Health Perspectives*, 78, 15 – 22.

Schwartz, J. (1991). Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environmental Health Perspectives*, 91, 71–5.

Sharifi, MA; Darabi, R; Akbarloo, N; Larijani, B; Khoshbaten, A. (2004). Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicology Letters*, 153, 233 – 238.

Sharp, DS; Becker, CE; Smith, A. (1987). Chronic low-level lead exposure. Its role in the pathogenesis of hypertension. *Medical Toxicology*, 2, 210 – 232.

Silveira, E. A., Siman, F. D. M., de Oliveira Faria, T., Vescovi, M. V. A., Furieri, L. B., Lizardo, J. H. F., ... Vassallo, D. V. (2014). Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radical Biology & Medicine*, 67, 366–76.

Simões, M. R., Ribeiro Júnior, R. F., Vescovi, M. V. A., de Jesus, H. C., Padilha, A. S., Stefanon, I., ... Fioresi, M. (2011). Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PloS One*, 6, e18730.

Staessen, J. A., Bulpitt, C. J., Fagard, R., Lauwerys, R. R., Roels, H., Thijs, L., & Amery, A. (1994). Hypertension caused by low-level lead exposure: myth or fact? *Journal of Cardiovascular Risk*, 1, 87–97.

Tsalev, DL & Zaprianov, Z. (1985). Lead. In Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. *CRC Press. Florida*, 137–150.

Tsao, D. A. . et al. (2000). The change of -adrenergic system in lead-induced HTN. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164, 127–133.

Vassallo DV, Oliveira EM, S. I. (2008). Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 435–469.

Vassallo, D. V, Lebarch, E. C., Moreira, C. M., Wiggers, G. A., & Stefanon, I. (2008). Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 789–795.

Vassallo, D. V, Lima, E. Q., Campagnaro, P., Stefanon, I., Leite, C. M., & Mill, J. G. (1994). Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 29, 251–60.

Vassallo, D. V, & Mill, J. G. (1988). Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana : Organo de La Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas Y de La Asociación Latinoamericana de Farmacología*, 38, 87–97.

Vaziri, N. D., & Ding, Y. (2001). Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension*, 37, 223–6.

Vaziri, N. D., Ding, Y., & Ni, Z. (1999). Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension*, 34, 558–62.

Vaziri, N. D., Ding, Y., Ni, Z., & Gonick, H. C. (1997). Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney International*, 52, 1042–6.

Vupputuri, S., He, J., Muntner, P., Bazzano, L. A., Whelton, P. K., & Batuman, V. (2003). Blood lead level is associated with elevated blood pressure in blacks. *Hypertension*, 41, 463–8.

Witzmann, F. A., Fultz, C. D., Grant, R. A., Wright, L. S., Kornguth, S. E., & Siegel, F. L. (1999). Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure. *Electrophoresis*, 20(4-5), 943–51.

Xie, Y; Chiba, M; Shinohara, A; Watanabe, H & Inaba, Y. (1998). Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *National Institute of Occupational Safety and Health, Japan.*, 36, 234 – 239.

Yazbeck C, Thiebaugeorges O, Moureau T, Goua V, Debotte G, S. J., & Forhan A, Foliguet B, Magnin G, Slama R, Charles MA, H. G. . (2009). Maternal blood lead levels and the risk of pregnancy-induced hypertension:he EDEN cohort Study. *Environmental Health Perspectives*, 117, 1527–1530.

Yue, D. T., Marban, E., & Wier, W. G. (1986). Relationship between force and intracellular $[Ca^{2+}]$ in tetanized mammalian heart muscle. *The Journal of General Physiology*, 87, 223–42.

Zorniak, M., Mitrega, K., Bialka, S., Porc, M., & Krzeminski, T. F. (2010). Comparison of thiopental, urethane, and pentobarbital in the study of experimental cardiology in rats in vivo. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 56, 38–44.