

**A Exposição Crônica ao Chumbo Diminui a
Reatividade Vascular em Aorta de Ratos: Papel do
Peróxido de Hidrogênio**

Karolini Zuqui Nunes

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória, dezembro de 2014

A Exposição Crônica ao Chumbo Diminui a Reatividade Vascular em Aorta de Ratos: Papel do Peróxido de Hidrogênio

Karolini Zuqui Nunes

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

Comissão examinadora representada por:

Drº. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

Drª. Mirian Fioresi – Coorientadora, UFES

Drª. Margareth Ribeiro Moyses - UFES

Drª. Sônia Alves Golvea - UFES

Drª. Giulia Wiggers Peçanha - UNIPAMPA

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, dezembro de 2014

Nunes, Karolini Zuqui 1990

**A Exposição Crônica ao Chumbo Diminui a Reatividade Vascular em Aorta de Ratos:
Papel do Peróxido de Hidrogênio [Vitória] 2014**

120 p (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.

Orientador: Prof^o Dr^o. Dalton Valentim Vassallo

1 Acetato de chumbo; 2 Aorta; 3 Peróxido de hidrogênio; 4 Estresse oxidativo; 5 Hipertensão.

Àqueles que eu mais amo e que me apoiam sempre:
meus pais, minha irmã e Demerson.

“Somos do tamanho dos nossos sonhos.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo a Deus, por tudo que tens feito em minha vida, pela alegria de viver, pela possibilidade de crescer a cada dia e por ter permitido que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos meus pais, pessoas das quais me orgulho e tenho como exemplo de vida. Agradeço o apoio incondicional de sempre, e por terem me ensinado os melhores caminhos. Obrigada pelo amor de vocês e por fazerem de nossa família um exemplo de união.

À minha irmã, por sua amizade e companheirismo. Obrigada pelas alegrias que vivemos juntas e por fazer de nossa casa um lugar prazeroso.

Ao Demerson, meu amor, obrigada pela paz que você representa em minha vida. Agradeço pelo cuidado indescritível que você tem comigo, por sua paciência e compreensão.

À minha coorientadora Mirian, agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida. Saiba que tenho imensa confiança, admiração pessoal e profissional por você. Obrigada por todas as oportunidades, pela sua amizade e pelo cuidado que tens comigo. Agradeço pela co-orientação, pelos conhecimentos e por proporcionar este momento feliz.

Ao Chefe, obrigada pela oportunidade e por ter me acolhido no laboratório. Agradeço a orientação, e os conhecimentos compartilhados. Sua inteligência me inspira e tenho grande orgulho de ser sua aluna.

À minha amiga Dieli, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Obrigada pela sua fiel parceria, pelo esclarecimento de dúvidas, pelas opiniões e pela paciência em me ensinar a técnica, a estatística, a análises de dados... Agradeço por sua amizade e pelos momentos alegres.

À Edna, obrigada por sua amizade e companheirismo. Agradeço todo apoio para a realização deste trabalho e cuidado que tens para fazer do nosso laboratório um lugar agradável e organizado para se trabalhar. Obrigada ainda pela ajuda nos dias de experimentos, e por fazer desses momentos um dos mais alegres.

Ao Thiago, obrigada pela amizade, pela imensa ajuda no tratamento dos animais e na realização da pletismografia quando precisei. Agradeço pelo cuidado e responsabilidade com o meu trabalho.

À Emilly e Cindy, obrigada pelo cuidado com os animais quando estava ausente. Agradeço pelo convívio e amizade, pelo companheirismo em sala de aula e por compartilharem os “momentos de desespero” fazendo deles momentos de diversão.

À Camila e o Gilson, por toda a atenção e disponibilidade para a realização dos experimentos na bioquímica.

À Maylla, pelos dias de convívio, conversas e conhecimentos compartilhados. May, sua amizade é muito especial para mim.

Aos professores, em especial aos do nosso laboratório: Prof^a. Dr^aIvanita, Prof^a. Dr^a. Alessandra e Prof^o. Dr^o. Leonardo, obrigada pelos momentos de aprendizado e opiniões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À todos os outros amigos do LEMC: Bruna, Carolina, David, Emilia, Fabiana Simões, Fabiana Siman, Jo, Keli, Marito, Paula, Priscila, Renata, Rogério, Samya, Tati, Thaís, Teresa, Vinícius, obrigada pelas conversas e dias de alegria.

Aos amigos dos outros laboratórios, em especial ao Andrews, Eweline e Girlândia, pela amizade e compreensão nos meus momentos de ausência em relação aos afazeres da comissão enquanto estava envolvida com a construção deste trabalho.

Ao Rodolfo por sempre tentar facilitar a disponibilização dos animais

Aos funcionários do Programa, pela prontidão e atenção.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 CHUMBO	27
1.1.1 História.....	27
1.1.2 Características	28
1.1.3 Fontes Naturais.....	28
1.1.4 Produção e Consumo	29
1.1.5 Fontes de Exposição	30
1.1.6 Cinética no Organismo Humano	33
1.1.6.1 Absorção	33
1.1.6.2 Distribuição	34
1.1.6.3 Excreção	35
1.1.7 Efeitos Tóxicos	35
1.1.7.1 Efeitos Cardiovasculares	38
1.2 ENDOTÉLIO VASCULAR	39
1.2.1 Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio	40
1.2.1.1 Óxido Nítrico	40
1.2.1.2 Prostaciclina.....	41
1.2.1.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio	42
1.2.2 Fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio.....	43
1.2.2.1 Prostaglandinas e Tromboxanos	43
1.2.2.2 Endotelina I.....	43
1.2.2.3 Angiotensina II	44
1.2.2.4 Espécies Reativas do Oxigênio	44
1.3 MÚSCULO LISO VASCULAR	47
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVO	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	52
4.2 MODELO EXPERIMENTAL	52
4.3 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DO CHUMBO	52
4.4 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	53
4.5 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA	53
4.5.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)	55
4.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	55
4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	56
4.6.1 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.	56
4.6.2 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	56
4.6.3 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio	56
4.6.4 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio	57
4.6.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina na aorta	57
4.6.5.1 Influência da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a via do óxido nítrico	58
4.6.5.2 Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo	58
4.6.5.3 Envolvimentos dos canais para potássio sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo	58
4.6.5.4 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo	58
4.6.5.5 Participação do sistema renina-angiotensina no efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta	59
4.7 TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO	59
4.8 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA	59
4.9 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA	60

4.9.1 Western Blot para detecção da isoforma da catalase e SOD Cu/Zn....	60
4.9.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas	60
4.9.3 Eletroforese e transferência das amostras.....	60
4.9.4 Incubação com Anticorpos	61
4.9.5 Detecção das Proteínas.....	61
4.10 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4.11 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	63
5 RESULTADOS.....	66
5.1 CONSUMO DE ÁGUA, RAÇÃO E VALORES DE MASSA CORPORAL	66
5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO SANGUÍNEA.....	66
5.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO	66
5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM O ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.....	67
5.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM O ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS	68
5.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO O ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS	69
5.7 MODULAÇÃO ENDOTELIAL NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS	70
5.7.1 Participação da via do óxido nítrico na exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina em aorta torácica	72
5.7.2 Participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas antioxidantes na exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina em aorta torácica	73
5.7.2.1 Peróxido de Hidrogênio.....	73
5.7.2.2 Expressão Proteica da Catalase em Aorta de Ratos	74
5.7.2.3 Ânions Superóxido e Superóxido Dismutase	75
5.7.2.4 Expressão Proteica e Atividade Funcional da Superóxido Dismutase	77
5.7.2.5 Participação da NAD(P)H oxidase	78
5.8 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA	

EM AORTA TORÁCICA	79
5.9 PARTICIPAÇÃO DA XANTINA OXIDASE NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA	82
5. 10 PARTICIPAÇÃO DA VIA DA CICLOXIGENASE NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA	82
5. 11 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA	83
5. 12 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO	84
5.13 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICOS	85
6 DISCUSSÃO	87
6.1 MODELO DE TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO	87
6.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOB A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E MODULAÇÃO ENDOTELIAL.....	89
6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	90
6.4 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA	91
6.4.1 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico	91
6.4.2 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via do estresse oxidativo.....	92
6.4.3 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo nos canais para potássio.....	96
6.4.4 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via da xantina oxidase, cicloxigenase e sistema renina angiotensina.....	96
6.4.4.1 Xantina Oxidase	96
6.4.4.2 Cicloxigenase	97
6.4.4.3 Sistema renina angiotensina	98
6.5 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO	99
6.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO	100
6.7 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	101

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores do consumo médio de ração (g), água (ml) e valores médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição crônica ao acetato de chumbo.....	66
Tabela 2: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Chumbo.....	68
Tabela 3: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo.....	69
Tabela 4: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pelo nitroprussiato de sódio em aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo.....	70
Tabela 5: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) dos grupos Controle e Chumbo.....	71
Tabela 6: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	73
Tabela 7: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Catalase em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	74
Tabela 8: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da SOD em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	76
Tabela 9: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do DETCA em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	78

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Apocinina em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	79
Tabela 11: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do TEA em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo.....	81
Tabela 12: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina no grupo Controle e na presença do TEA + Catalase em anéis aórticos obtidos do grupo Chumbo.....	82
Tabela 13: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do Alopurinol, Indometacina, Losartan e PD123319 em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo....	83

LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1: Na esquerda – uma amostra de galena, principal minério de chumbo, encontrada em uma mina na região de Westfália, Alemanha. Na direita – chumbo em pó, geralmente usado em baterias. Fonte: educadores.diaadia.pr.gov.br.....29

Figura 2: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (Modificado de Rattmann, 2009).....41

Figura 3: Esquema representativo da produção das principais espécies reativas do oxigênio e atuação das principais enzimas antioxidantes. A NADP(H) produz O_2^- que pode ser convertido em $ONOO^-$ por meio da interação com NO, HO^- via reação de Fenton e em H_2O_2 através da dismutação pela SOD. O H_2O_2 pode ser convertido em GSH e GSSG pela GPx, e em O_2 e H_2O através da ação da catalase.....46

Figura 4: Fatores vasoativos endoteliais e atividade em BKCa no músculo liso. 20-HETE, o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico; BKCa, canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância; AMPc, monofosfato cíclico-adenosina; cGMP, o monofosfato cíclico de guanosina; COX, ciclooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores contratantes derivados do endotélio; EDRFs, fatores relaxantes derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; eNOS, sintase endotelial de óxido nítrico; GS, proteína-G S; GSa, uma subunidade de proteína G-S; H_2O_2 , o peróxido de hidrogênio; IP, receptor prostaciclina; NO, óxido nítrico; NOX, NADPH-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI₂, prostaciclina; R ?, receptor; ROS, espécies reativas de oxigênio; sGC, guanilato ciclase solúvel; SOD, superóxido-dismutase; TP, receptor de tromboxano; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase. Fonte: Féléuto, 2009.....49

Figura 5: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli,

2009).....53

Figura 6: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro.....54

Figura 7: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré- contração com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2007).....55

Figura 8: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).....57

Figura 9: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t* não-pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂. **p*< 0,05 para R_{máx}: Controle vs Chumbo.....67

Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo, após trinta dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂. *p*>0,05.....68

Figura 11: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo, após trinta dias de

tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 . $p > 0,05$69

Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos: (A) Controle e após a retirada do endotélio (E-); (B) Chumbo e após a retirada do endotélio (E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 . * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle. # $p < 0,05$ vs pD_2 de Chumbo.....71

Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos grupos Ct/Ct-L-NAME e Pb/Pb- L-NAME. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Chumbo.....72

Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Catalase em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo(B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos grupos Ct/Ct-Catalase e Pb/Pb- Catalase. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Chumbo.....74

Figura 15: Resultados da expressão proteica da Catalase, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle (n= 7) e Chumbo (n= 7). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da Catalase e a α -actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da Catalase e da α -actina. Teste *t*-Student não pareado, * $p < 0,05$75

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da SOD

em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de SOD (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-SOD e Pb/Pb- SOD. **p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, #*p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.....76

Figura 17: Resultados da expressão proteica da SOD, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle (n= 7) e Chumbo (n= 7). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da SOD e a α -actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da SOD e da α -actina. Teste *t*-Student não pareado, **p*<0,05.....77

Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do DETCA em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo(B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-DETCA e Pb/Pb- DETCA. **p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, #*p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.....78

Figura 19: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Apocinina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo(B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-Apocinina e Pb/Pb- Apocinina. **p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, #*p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.....79

Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do TEA em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não do TEA (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-TEA e Pb/Pb- TEA. **p*<0,05 vs

R_{máx} e pD₂ de Controle, #p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.....80

Figura 21: Curvas concentração-resposta à fenilefrina no grupo Controle e na presença de TEA + Catalase em anéis isolados de aorta de ratos do grupo Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste *t*-Student não pareado. p>0,05.....81

Figura 22: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos do grupo Chumbo, controle e chumbo (Pb) + ácido ascórbico (AA). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste *t*-Student não pareado. *p<0,05 R_{máx} de Chumbo vs Controle.....85

Figura 23: Medida da produção de MDA plasmática de ratos do grupo Controle e Chumbo. Dados estão expressos em média ± EPM; Teste *t*-Student não pareado. p>0,05.....86

Figura 24: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento com o chumbo foi capaz de aumentar a produção de superóxido pela NADPH oxidase e desencadear um aumento compensatório da atividade da SOD. O aumento da atividade dessa enzima elevou a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que foi o responsável pela diminuição da reatividade vascular.....101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

1,4,5 – inositol trifosfato (IP3)

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Acetilcolina (ACh)

Ácido Dietilditiocarbâmico (DETCA)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Adenosina difosfato (ADP)

Adenosina trifosfato (ATP)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)

Água (H₂O)

Ânion superóxido (O₂⁻)

Áreas abaixo da curva (AUC)

Apocinina (Apo)

Canais para K⁺ de larga condutância, ativados por alterações de Ca⁺² intracelular (BKCa)

Canais para K⁺ dependentes de Ca⁺² (KCa⁺²)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac)

Concentração intracelular de Ca^{+2} [Ca^{+2}]

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Debito cardíaco (DC)

Diacilglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM)

Endotelina (ET)

Endotelina-1 (ET-1)

Endotelina-2 (ET-2)

Endotelina-3 (ET-3)

Endotélio íntegro (E+)

Endotélio removido mecanicamente (E-)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima conversora da angiotensina II (ECA II)

Enzima fosfolipase A2 (PLA2)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fenilefrina (FE)

Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES)

Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia (FUNCITEC)

Glutathione peroxidase (GPx)

Grupo Controle (CT)

Grupo Chumbo (Pb)

Graus Celsius (°C)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Indometacina (Indo)

Inibidor não-seletivo da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Intraperitoneal (i.p)

Ion chumbo (Pb^{+2})

Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 (COX-1)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Kilotoneladas (Kt)

Malondialdeído (MDA)

Megatoneladas (Mt)

Ministério da Saúde (MS)

Minuto (min)

Mitogen-activated protein (MAPKs)

Molar (M)

Músculo liso vascular (MLV)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho (NR7)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Partículas por milhão (ppm)

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂),

Peróxido de nitrito (ONOO⁻)

Porcentagem (%)

Prostaciclina (PGI₂)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase dependente de AMPc (AMPK)

Radical sulfidril (-SH)

Receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT1)

Receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT2)

Resposta máxima (R_{máx})

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pD₂)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Superóxido dismutase extracelular (EC SOD; SOD3)

Tetraetilamônio (TEA)

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)

Trifosfato de guanosina (GTP).

Tromboxano (TXA2)

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

RESUMO

Foi investigado os efeitos da exposição a baixas concentrações de chumbo na reatividade vascular. Ratos Wistars foram aleatoriamente classificados em dois grupos: controle (CT) e exposto à 100 ppm de acetato de chumbo (Pb) adicionado à água de beber durante 30 dias. A pressão arterial sistólica (PA) foi medida semanalmente. Após o tratamento, a reatividade vascular em anéis de aorta foi avaliada. As amostras de tecido foram devidamente armazenadas para posteriores investigações bioquímicas. Ao final do tratamento a concentração de chumbo no sangue foi de aproximadamente 8 µg/dL. A exposição ao chumbo aumentou a pressão arterial e diminuiu a resposta contrátil dos anéis de aorta à fenilefrina. Após a administração de NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), as respostas contráteis aumentaram em ambos os grupos, mas não diferiram significativamente entre si. Os efeitos do chumbo sobre $R_{\text{máx}}$ foram diminuídos em comparação com grupo controle após a administração da superóxido dismutase, catalase e ácido dietilditiocarbâmico (DETCA). A apocinina aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em aortas do grupo Pb, mas não aumentou a resposta vasoconstritora em aortas de ratos não do grupo CT. O tetraetilamônio (TEA) potencializou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta em ambos os grupos, mas estes efeitos foram maiores nos ratos do grupo Pb. A coincubação do TEA e catalase aboliu o efeito vasodilatador observado no grupo Pb. O cotratamento com ácido ascórbico reverteu a reatividade do grupo chumbo para situação controle. O presente estudo demonstrou que a concentração de chumbo no sangue abaixo dos valores estabelecidos pela legislação internacional foi capaz de aumentar a pressão arterial e diminuir a reatividade vascular induzida pela fenilefrina. Esse efeito foi relacionado com o estresse oxidativo induzido especificamente através do aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio e os seus efeitos sobre os canais para potássio.

Palavras-chave: acetato de chumbo, aorta, peróxido de hidrogênio, estresse oxidativo, hipertensão.

ABSTRACT

We investigated whether exposure to small concentrations of lead alters blood pressure and vascular reactivity. Wistar rats were sorted randomly into the following two groups: control (Ct) and treatment with 100 ppm of lead (Pb), which was added to drinking water, for 30 days. Systolic blood pressure (BP) was measured weekly. Following treatment, aortic ring vascular reactivity was assessed. Tissue samples were properly stored for further biochemical investigation. The lead concentration in the blood reached approximately 8 µg/dL. Treatment increased blood pressure and decreased the contractile responses of the aortic rings to phenylephrine. Following L-NAME administration, contractile responses increased in both groups but did not differ significantly between them. Lead effects on Rmax were decreased compared to control subjects following superoxide dismutase administration, Catalase, DETCA, and apocynin increased the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in the aortas of lead-treated rats but did not increase the vasoconstrictor response in the aortas of untreated rats. TEA potentiated the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortic segments in both groups, but these effects were greater in lead-treated rats. The co-incubation of TEA and catalase abolished the vasodilatory effect noted in the lead group. The present study is the first to demonstrate that blood lead concentrations well below the values established by international legislation increased blood pressure and decreased phenylephrine-induced vascular reactivity. The latter effect was associated with oxidative stress, specifically oxidative stress induced via increases in hydrogen peroxide levels and the subsequent effects of hydrogen peroxide on potassium channels.

Key words: lead acetate, aorta, hydrogen peroxide, oxidative stress, hypertension.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

1.1.1 História

O chumbo foi um dos primeiros metais a ser utilizado pelo homem. De acordo com descobertas arqueológicas, os egípcios já usavam este metal há mais de oito mil anos e seu emprego nas atividades humanas vem sendo preservado através dos séculos. Na antiguidade foi usado na fabricação de armas, utensílios domésticos, como copos e taças e reservatórios para o acondicionamento de bebidas alcoólicas (Capitani et al., 2009).

No século III a.C. os romanos introduziram o uso do chumbo na fabricação de canos, que até hoje continuam presentes em algumas casas e edificações erguidas antes de 1978, além disso usavam este metal na fabricação de lápis feitos de misturas com outros elementos, como a prata, o estanho, o enxofre e antimônio (Capitani et al., 2009; Brito, 2010). Durante o império romano foi utilizado como conservante de vinhos e até décadas atrás este hábito foi mantido por pequenas vinícolas europeias (Capitani et al., 2009).

No Brasil, a produção de chumbo metálico foi marcante até a década de 90 devido à existência de duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e no Paraná. Desde então sua produção tem sofrido declínio e em 2012 a produção brasileira representou 0,2% da produção mundial desse metal (Capitani et al., 2009; Brasil, 2013). Por outro lado, o consumo do chumbo metálico em 2012 foi de 246,3 Mt, um crescimento de 3,06% em relação a 2011 (Brasil, 2013).

Como o chumbo é utilizado por tão longo tempo, a história da intoxicação por este metal também é extensa. Hipócrates, no século V a.C., foi o primeiro a ligar os sintomas da intoxicação ao seu fator causal, porém a primeira descrição moderna da intoxicação por chumbo foi feita em 1839 baseado em casos clínicos. Este estudo foi tão completo que desde então, pouco foi acrescentado aos sinais e sintomas clínicos da intoxicação (Moraes, 2014).

1.1.2 Características

O chumbo pertence ao grupo IV B da tabela periódica e é representado pelo símbolo Pb, possui número atômico 82 e massa atômica 207 u. Encontra-se em estado sólido a temperatura ambiente, e se funde com facilidade a 327,4 °C e possui temperatura de vaporização de 1725 °C (IUPAC, 2003). É um metal cinza-azulado, inodoro e maleável e sua ampla utilização industrial pode ser explicada por possuir algumas características como: baixo ponto de fusão, alta ductibilidade, facilidade de formar ligas, não elástico, trabalhável a frio, razoável condutor de calor e eletricidade e condutibilidade térmica (Brasil, 2006).

Sua elevada ductibilidade, maleabilidade e flexibilidade favorecem o uso na produção de chapas e de tubos, principalmente utilizados na construção civil. Além disso, tem demonstrado ser um excelente metal para proteger da corrosão atmosférica devido a sua rápida oxidação superficial e um dos elementos preferidos para o revestimento interno de recipientes para ácidos. E por último, o chumbo tem a propriedade singular de absorver radiações de ondas curtas, o que o torna o isolante mais utilizado no emprego de raios-x (Brasil, 2009).

1.1.3 Fontes Naturais

O chumbo é o quinto metal mais abundante do planeta (Matos, 2007). É encontrado na crosta terrestre na forma livre ou principalmente em associação a outros elementos formando o sulfato de chumbo, arsenato de chumbo, dióxido de chumbo, chumbo, tetrametila entre outros. Suas fontes naturais incluem as emissões vulcânicas, evaporação dos oceanos e a degradação de rochas (Brasil, 2006). Estima-se que a taxa de emissão de chumbo na atmosfera seja de aproximadamente 19.000 toneladas por ano, e que os níveis naturalmente presentes no solo seja de 10 a 70 mg/Kg (WHO, 1995).

Nas plantas, a ocorrência do chumbo se dá por processos de captação e incorporação (WHO, 1995). Já na atmosfera, o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas, quando lançadas no ar, podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Entretanto, o teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades humanas e pelo transporte do metal através do ar (Paoliello, 2001).

A Figura 1 ilustra uma amostra de galena, o principal minério de chumbo e o chumbo em pó, forma no qual geralmente é utilizada pelas indústrias.



Figura 1: Na esquerda – uma amostra de galena, principal minério de chumbo, encontrada em uma mina na região de Westfália, Alemanha. Na direita – chumbo em pó, geralmente usado em baterias. Fonte: educadores.diaadia.pr.gov.br.

1.1.4 Produção e Consumo

Em 2012, as reservas mundiais de chumbo atingiram 89 Mt. A produção mundial do minério concentrado alcançou um crescimento de 10,64% em relação a 2011. Os principais produtores de chumbo primário são os países detentores das maiores reservas do mundo: China, Austrália e Estados Unidos da América. A produção brasileira de chumbo metálico refinado foi de 165,40 Kt, correspondendo a 1,56% da produção global, colocando o Brasil na décima sexta posição entre os maiores produtores mundiais (Brasil, 2013).

A maior parte da produção brasileira de concentrado de chumbo é oriunda de Minas Gerais. Em 2012 essa produção alcançou um crescimento de 4,41%, em relação ao ano anterior, o que rendeu ao país aproximadamente 7,4 milhões de dólares provenientes principalmente da exportação do produto para China. O Brasil não possui produção primária de chumbo metálico refinado, a produção deste metal é obtida a partir de reciclagem de material usado, especialmente de baterias automotivas e indústrias de telecomunicações (Brasil, 2013). Estima-se que das 20 milhões de novas baterias automotivas fabricadas anualmente no Brasil, 95% delas sejam provenientes do processo de reciclagem do chumbo (Brasil, 2009).

O chumbo é o mais utilizado dos metais não ferrosos (Moraes, 2014). A evolução do consumo do metal ocorrido no Brasil ao longo das últimas três décadas indica que o consumo que era da ordem de 100.000 toneladas/ano passou para o patamar de 220.000 toneladas/ano, crescimento favorecido principalmente pelo desenvolvimento da indústria automobilística (Brasil, 2009). No ano de 2012, 81,9% do chumbo metálico foi destinado aos fabricantes de baterias automotivas (Brasil, 2013). Além destas, as indústrias de condutores elétricos continuam destacando-se pela utilização de ligas de chumbo para a cobertura de cabos. E em menor proporção, o consumo é efetuado pelas fábricas de tanques de armazenamento de substâncias corrosivas, de produção de munições, indústrias tipográficas e mais uma vez na indústria automotiva, na soldagem de latas e na fabricação de radiadores (Moraes, 2014).

O chumbo refinado é consumido com intensidade em todos os países em estágio avançado de industrialização. Há alguns anos o maior consumidor era os Estados Unidos que foram superados nos últimos anos pela China, atualmente o maior produtor e consumidor mundial (Brasil, 2009). O consumo do chumbo no Brasil e no mundo ascende paralelo à taxa de crescimento das economias de alguns países em desenvolvimento, como a China, Coréia do Sul e Índia que tem incorporado um importante aumento na industrialização de veículos automotores, computadores, telefones celulares e eletroeletrônicos, refletindo no aumento progressivo da demanda do metal (Brasil, 2009).

O aspecto mais relevante relacionado a esse aumento da utilização do chumbo diz respeito às emissões de componentes desse metal provocadas principalmente pelo processo de reciclagem. A emissão de chumbo ocorre em cada unidade do processo de fundição do chumbo secundário, permitindo a emissão desse elemento tóxico no ambiente (Brasil, 2009).

1.1.5 Fontes de Exposição

O chumbo é utilizado em mais de 200 processos industriais diferentes, com importante destaque para as indústrias de acumuladores elétricos. Em virtude da ampla utilização do metal, o homem se faz o principal alvo de exposição devido o contato com o chumbo em suas atividades. Este metal é o poluente de maior

ameaça em escala global: estima-se que 10 milhões de pessoas vivam em regiões contaminadas (Brasil, 2006).

De forma geral, as fontes de exposição ao chumbo podem ser divididas em ocupacionais e não ocupacionais. Como principais fontes ocupacionais, destacam-se as indústrias de refino do chumbo, de fabricação e reciclagem de baterias, cabos elétricos, processos de soldagens, entre outros. Dentre as principais fontes de exposição não ocupacionais, o chumbo pode estar presente em utensílios de PVC, algumas bebidas alcoólicas, tintas de brinquedos e imobiliários e na gasolina (Capitani, 2009). As indústrias de reciclagem de chumbo são potencialmente poluidoras, devido à emissão de gases e particulados decorrentes do próprio processo de produção e reciclagem. Entretanto a reciclagem ainda é para o meio ambiente e economicamente mais viável que a extração (Matos, 2007).

As baterias são as principais fontes de chumbo secundário. Para o processo de recuperação do chumbo desses materiais, são utilizados alguns métodos que acabam liberando gases e particulados do metal para a atmosfera, gerando também resíduos em uma quantidade considerada altamente perigosa e que deveria ser disposta em aterro industrial adequado (Matos, 2007). As fábricas de produção e reciclagem de baterias são as fontes mais significativas de emissões industriais desse metal (Paoliello & Chasin, 2001).

Na indústria eletrônica, o chumbo torna-se particularmente apropriado para a fabricação de forro para cabos de telefone e de televisão. A ductilidade única deste metal permite que possa ser estirado para formar um revestimento contínuo em torno dos condutores internos (Brasil, 2009). Além disso, o chumbo também é muito importante nos processos de soldagens, juntamente com outros metais, ele serve como elementos de adesão de superfícies e se faz propício para ligação de circuitos eletroeletrônicos (Kreusch, 2005).

Os óxidos de chumbo podem ser encontrados como componentes na manufatura de borrachas e tintas (Paoliello & Chasin, 2001). A presença de chumbo em tintas foi e ainda é usada na decoração de interiores e exteriores de casas, bem como em brinquedos e móveis. A exposição ao chumbo através da tinta pode ocorrer durante a fabricação e continuar por muitos anos com a deterioração ou remoção da pintura

(WHO, 2011). No Brasil, em agosto de 2008 foi publicada a Lei nº 11.762, que regulariza o uso de pigmentos e secantes à base de chumbo em tintas imobiliárias. A lei estabelece que tintas imobiliárias não possa conter chumbo em concentração igual ou superior a 0,06%, em peso (Brasil, 2008).

Com relação ao teor de chumbo em bebidas alcoólicas, um estudo realizado no Brasil em 2011 objetivou identificar a quantidade de chumbo presente em 19 marcas diferentes de bebidas destiladas. Dentre estas, 16 apresentaram valores maiores ao limite máximo estabelecido na Instrução Normativa utilizada como referência no estudo. Não se conseguiu detectar a causa possível da contaminação dessas bebidas por chumbo, porém sugeriu-se que o metal poderia advir do processo produtivo, ou também, do material utilizado na embalagem (Schoeninger & Campos, 2011).

Com o objetivo de melhorar a potencia dos motores de carros e obter maior economia de combustível, em 1922 o chumbo começou a ser introduzido como constituinte da gasolina (Landrigan, 2002). A emissão de gases pelos automóveis é uma das principais maneiras em que a população fica exposta ao chumbo. A ampla utilização do chumbo proporciona a contaminação direta de pessoas ocupacionalmente expostas, e indiretamente à população em geral (Moraes, 2014). Estudos mostraram que foram encontrados níveis mais altos de chumbo próximo às rodovias do que em locais mais distantes (WHO, 1995). No Brasil, a presença do chumbo na gasolina foi proibida desde 1978, no entanto alguns países ainda utilizam o metal na composição do combustível (Paoliello & Chasin, 2001).

O chumbo pode ainda ser amplamente encontrado em lâmpadas fluorescentes e monitores de tubos de raio catódicos (CRT). O descarte incorreto desses materiais é uma das formas de maior propagação do metal no ambiente. De acordo com os dados do Centro de Descarte e reuso de resíduos de Informática (Cedir) da Universidade de São Paulo (USP), um monitor CRT tem quase 58% de seu peso gasto exclusivamente com o tubo de raios catódicos, o único material que tem reciclagem difícil, por conter cerca de dois a três quilos exclusivamente de chumbo. A lei de resíduos sólidos brasileira, sancionada em 2010, prevê que o lixo eletrônico não poderá ser descartado em aterros e lixões a partir deste ano de 2014. Os

fabricantes serão os responsáveis por dar o destino correto aos materiais que eles mesmos produzirem (Ecycle, 2014).

A presença de metais pesados acima do permitido pela legislação do Mercosul em erva-mate foi detectada em uma análise realizada pelo Sindicato da Indústria do Mate do Estado (Sindmate) do Rio Grande do Sul. Segundo a entidade, de 27 amostras pesquisadas, 5,66% apresentaram contaminação por metais pesados, dentre eles o chumbo (G1, 2014).

1.1.6 Cinética no Organismo Humano

1.1.6.1 Absorção

As principais vias de absorção do chumbo são o trato gastrointestinal e o sistema respiratório. A absorção de chumbo no trato gastrointestinal varia principalmente com a idade e as condições nutricionais. Se for ingerido, as crianças podem absorver até 40% do metal, enquanto adultos absorvem 10%. Do mesmo modo, indivíduos com baixa ingestão de ferro, cálcio e fósforo têm a absorção de chumbo aumentada, devido a um mecanismo de competição desses metais no trato intestinal. No caso da via respiratória, a absorção varia principalmente conforme o tempo de exposição e a concentração de chumbo, de modo que quando o indivíduo é submetido a concentrações altas e por tempo prolongado pode absorver até 90% das partículas inaladas do metal (Moraes, 2014).

As condições fisiológicas também podem ter grande influência na absorção do chumbo, de modo que fumantes e pessoas com doenças das vias respiratórias superiores, que têm atividade ciliar prejudicada, possuem maior predisposição à deposição das partículas do metal no trato respiratório e conseqüentemente uma maior absorção (Saryan & Zenz, 1994). De um modo geral, quando não há exposição ocupacional ao chumbo, a absorção ocorre principalmente por via oral com contribuição da via respiratória, enquanto que, na exposição ocupacional, a principal via de contaminação é a inalatória (Paoliello & Chasin, 2001).

Outro fator que influencia a absorção do chumbo é a espécie química formada. Somente os compostos orgânicos de chumbo são capazes de penetrar através da pele íntegra. Os compostos de chumbo tetra alquila por exemplo (que são utilizados

como aditivos na gasolina) são absorvidos rapidamente pelos pulmões, trato gastrointestinal e também pela pele (Tsalev & Zaprianov, 1985). Para gases de exaustão e sais solúveis, a absorção do chumbo no sangue pode ser superior a 50% da dose inalada ou ingerida (Saryan & Zenz, 1994).

Em gestantes, a absorção intestinal pode aumentar devido a maior mobilização do chumbo dos ossos e contribuir para a elevação da concentração do metal no sangue observada no último trimestre da gestação (ATSDR, 1992).

1.1.6.2 Distribuição

Após a absorção, o chumbo é distribuído no organismo e é depositado nos tecidos moles, principalmente nos rins e no fígado, parte dele penetra na circulação na forma de fosfato de chumbo, onde com o tempo é redistribuído e se armazena principalmente nos ossos (95%) (Moraes, 2014). Pode atravessar livremente a barreira placentária e sua distribuição no feto se faz similar a do adulto. Praticamente todo metal circulante está ligado aos eritrócitos e apenas em altas concentrações aparece no plasma (Moraes, 2014).

Algumas hipóteses de distribuição cinética do chumbo têm sido apresentadas. Uma das principais idéias propostas há algumas décadas se baseia no modelo de três compartimentos, no qual o primeiro seria o sangue que manteria contato com os demais, o segundo os tecidos moles e o terceiro os ossos, em que o tempo de meia vida poderia ser nesse último de aproximadamente 27 anos, fazendo-se dessa forma o principal reservatório do metal a longo tempo (Rabinowitz et. al., 1976). O chumbo armazenado nos ossos pode ser mobilizado para circulação como consequência dos mais diversos processos fisiológicos ou patológicos de reabsorção óssea, constituindo assim um dos principais mecanismos para a intoxicação tardia (Pires et al., 2001).

O chumbo segue a mesma via metabólica do cálcio. Dessa forma, sua entrada e liberação do esqueleto são, em parte, controladas por muitos dos mecanismos que regulam a homeostase do mineral, os quais incluem os processos de deposição e reabsorção óssea (Smith et al., 1996).

Em geral, a concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo (Goyer, 1991). O metal presente no sangue é distribuído entre os órgãos, dependendo principalmente da afinidade pelo tecido específico. Níveis 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 (Saryan & Zenz, 1994).

1.1.6.3 Excreção

A excreção se dá principalmente pela via renal através da filtração glomerular e gastrointestinal, tanto por secreção ativa pela excreção biliar ou passiva pelas glândulas salivares, pancreáticas e parietais intestinais. Pode ainda ser excretado em menores quantidades pelo suor, leite, descamação de dentes, unhas e cabelos (Moraes, 2014). Em níveis proporcionais, cerca de 75% a 80% do chumbo é eliminado pela urina, 15% pelas fezes, através da bile e secreção do trato gastrointestinal e 8% pelas outras possíveis vias de eliminação (Tsalev & Zaprianov, 1985). O chumbo que não é absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado nas fezes, outra parte é derivado da diferença entre a excreção gastrointestinal total e a reabsorção. A excreção do chumbo absorvido nas fezes é cerca de metade da urinária em situações de baixas exposições e, provavelmente, menor nos níveis de exposições mais elevadas (Saryan & Zenz, 1994).

A eliminação do chumbo no organismo humano é extremamente lenta. A meia vida é de aproximadamente 10 anos (Moraes, 2014). Dessa forma o chumbo é acumulado por toda a vida e liberado lentamente para a circulação. Uma única exposição ao metal pode demonstrar concentrações sanguíneas de chumbo normais após um tempo da exposição, porém o conteúdo corpóreo total pode ser ainda elevado. Assim, exposições agudas ao chumbo por um pequeno tempo podem levar ao desenvolvimento de uma intoxicação (ATSDR, 1992).

1.1.7 Efeitos Tóxicos

O chumbo caracteriza-se por ser um metal tóxico cumulativo que afeta vários sistemas do corpo, incluindo principalmente neurológico, hematológico, gastrointestinal, renal e cardiovascular (WHO, 2010), não havendo evidências de

funções fisiológicas no organismo (Moreira & Moreira, 2004). Estima-se que em 2004 a exposição ao chumbo foi responsável por 143 mil mortes e 0,6% da carga global de doenças destacando-se o retardo mental leve e alterações cardiovasculares (WHO, 2010).

Os mecanismos de toxicidade propostos envolvem vários processos bioquímicos, principalmente os que estão relacionados ao funcionamento de membranas celulares e enzimas. As alterações no funcionamento de enzimas estão principalmente relacionadas às interações desse metal com os grupamentos sulfidril (-SH) de proteínas que estão intimamente relacionadas a ativação de proteínas quinases C, fazendo desse um dos principais mecanismos de toxicidade. Outro importante mecanismo de toxicidade do chumbo se dá pela sua capacidade de mimetizar o íon cálcio e interagir com diversas proteínas, como sua interação com a calmodulina através da interação com os grupamentos carboxilas (Moreira & Moreira, 2004).

Os efeitos da intoxicação com o chumbo no sistema nervoso são considerados um dos mais críticos. As encefalopatias destacam-se como um dos mais sérios problemas em adultos e crianças, podendo ocorrer de forma aguda ou crônica, tendo o curso clínico variável dependendo das condições gerais da exposição e do indivíduo (Moreira & Moreira, 2004). Acredita-se que as manifestações neurológicas da intoxicação pelo chumbo sejam irreversíveis (WHO, 2013).

Atenção especial tem sido dada aos sintomas neurotóxicos da exposição ao chumbo em crianças. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), cerca de 600 mil casos de crianças com deficiência intelectual desenvolvem-se por ano em decorrência da exposição ao chumbo. Em casos de exposição elevada, a intoxicação com o chumbo pode se manifestar com convulsões, coma e morte. De forma geral, o chumbo altera o desenvolvimento do intelecto de crianças, resultando em redução do quociente de inteligência e alterações comportamentais, tais como diminuição da atenção (WHO, 2013). A neurotoxicidade ao chumbo ocorre principalmente por um aumento na liberação de neurotransmissores, desencadeada pela sua competição ou mimetização da ação do íon cálcio. Por este mecanismo, o chumbo promove alterações na entrada do cálcio na célula modificando a sinalização neuronal (Patrick, 2006).

Alguns autores descrevem que as alterações no sistema nervoso ocorrem em concentrações sanguíneas menores que 10 µg/dL, em crianças, e aparece nos adultos em concentrações em torno de 40 µg/dL (Cordeiro et al.,1996; Patrick, 2006). Segundo a WHO (2013), mesmo as concentrações de 5µg/dL de chumbo no sangue, que se pensava ser um nível seguro, podem resultar em dificuldades de comportamento e problemas de aprendizagem em crianças (WHO, 2013). Ressalta-se ainda que estes valores descritos encontram-se abaixo dos limites de referência para intoxicação no Brasil (BRASIL, 1978).

Além dos efeitos neurológicos, a intoxicação com o chumbo pode manifestar alterações hematológicas importantes, na qual se destaca a anemia resultante da ação tóxica do chumbo nas células vermelhas e eritropoiéticas na medula óssea (Moreira & Moreira, 2004). O chumbo possui alta afinidade pelo grupamento sulfidrílico de proteínas e o efeito mais conhecido desta propriedade de ligação do chumbo com o grupo-SH é a interferência na síntese do grupo heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que o chumbo possui alta afinidade pelos eritrócitos (Lawton & Donaldson, 1991). Em situações de contato prolongado e de exposição a altas concentrações de chumbo, esse metal é capaz de diminuir a síntese da hemoglobina e estimular a eritropoese levando assim ao quadro de anemia (Moreira & Moreira, 2004).

Geralmente na intoxicação aguda ao chumbo, as cólicas abdominais são os sintomas iniciais (Moreira & Moreira, 2004). Também chamada de cólica saturnina, essa manifestação se caracteriza por espasmos intestinais que provocam dores abdominais intensas. Os músculos abdominais tornam-se rígidos, ocorrendo hipersensibilidade na região umbilical, febre e palidez (Klassen, 1991; Paoliello & Chasin, 2001; Kosnett, 2003). Este quadro é observado em plumbemia entre 40 e 200 µg/dL (Paoliello & Chasin, 2001). Nas intoxicações mais leves, as manifestações gastrointestinais mais evidentes são diarreia, constipação intestinal, desconforto epigástrico pós-prandial e anorexia (Moraes, 2014).

A exposição prolongada e excessiva ao chumbo pode ocasionar lesão renal progressiva e irreversível. A lesão renal é uma lesão intersticial com degeneração tubular e alterações vasculares nas pequenas artérias e arteríolas. A nefropatia plúmbica é caracterizada por um declínio progressivo da função renal geralmente

acompanhada de hipertensão arterial. As alterações funcionais são semelhantes às encontradas em casos de lesões nos túbulos proximais, sendo caracterizada por diminuição da absorção de aminoácidos, glicose, ácido cítrico e fosfato (Moraes, 2014). Clinicamente a toxicidade é verificada por proteinúria, hematúria e presença de cilindros na urina (Kosnett, 2003). Uma das consequências da diminuição da função tubular é a gota saturnínica, ocasionada devido a elevada deposição de uratos nas articulações, decorrentes da diminuição da excreção desses cristais provocadas pelo chumbo (Moraes, 2014).

1.1.7.1 Efeitos Cardiovasculares

Desde o ano de 2000, as doenças cardiovasculares, como a cardiopatia isquêmica e o infarto do miocárdio, lideram o ranking das principais causas de morte no mundo. Em 2011, aproximadamente 17 milhões de pessoas morreram em decorrência das doenças cardiovasculares no mundo, e em 2030 estima-se que mais de 23 milhões de indivíduos irão morrer por esse problema (WHO, 2013). Nesse contexto, a exposição ao chumbo e a outros metais podem contribuir para o surgimento e agravamento desses processos patológicos. Vários estudos em populações gerais identificaram uma associação positiva entre a exposição ao chumbo e a prevalência de doenças cardiovasculares (Navas-Acien et al., 2007).

Diversos estudos populacionais sobre os efeitos cardiovasculares do chumbo, tem se concentrado em grande parte nas alterações da pressão arterial, principalmente a hipertensão. Mais de trinta estudos populacionais envolvendo no total aproximadamente 60 mil participantes, demonstraram forte correlação entre os níveis sanguíneos de chumbo e hipertensão (Navas-Acien et al., 2007). No entanto, a exposição ao chumbo não se limita apenas às alterações na pressão arterial. A exposição ao metal também tem sido relacionada ao desfecho de outras doenças cardiovasculares, como a doença coronariana, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (Lustbergand & Silbergeld, 2002; Menke et al., 2006; Navas-Acien et al., 2004; Schober et al., 2006) e com alterações na função cardíaca, como hipertrofia ventricular esquerda e alterações no ritmo cardíaco (Cheng et al. 1998; Schwartz, 1991).

Além das pesquisas clínicas e epidemiológicas, estudos em animais experimentais, tecidos isolados, e cultivo de células, fornecem evidências convincentes de que a exposição ao chumbo, mesmo a baixas doses, pode desencadear importantes alterações no funcionamento cardiovascular. Essas alterações têm sido associadas a alguns fatores, como o aumento do estresse oxidativo, a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, o aumento da atividade adrenérgica e da produção de endotelina, o desequilíbrio no sistema renina-angiotensina e na produção de prostaglandinas, as alterações na sinalização de cálcio no músculo liso vascular, diminuição do relaxamento dependente do endotélio e a modificação na resposta vascular aos agonistas vasoativos. Além disso, tem sido mostrado que o chumbo é capaz de causar lesão endotelial, inibir a angiogênese, reduzir o crescimento de células endoteliais, suprimir a produção de proteoglicanos, estimular a proliferação de células de músculo liso vascular e reduzir o ativador tecidual do plasminogênio. Devido a estas e outras ações, a exposição ao chumbo causa hipertensão, promove arteriosclerose, aterosclerose, trombose, e outras doenças cardiovasculares (Vaziri, 2008).

1.2 ENDOTÉLIO VASCULAR

Por muito tempo o endotélio vascular foi considerado apenas uma barreira passiva sem funções fisiológicas vasculares específicas. Até que em 1980 Furchgot e Zawadski demonstraram sua participação na dilatação vascular através da ação da acetilcolina (Felizzola, 1996). Desde então vários estudos vem demonstrando as inúmeras funções do endotélio na manutenção do tônus vascular, na inibição da agregação plaquetária, na adesão leucocitária e na proliferação das células musculares lisas.

O controle do tônus vascular realizado pelo endotélio é mediado por fatores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição, que em condições fisiológicas permanecem em equilíbrio. Os principais fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio são: o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina. Dentre os principais fatores contráteis estão: as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (Carvalho et al., 2001).

Já é bem esclarecido que a exposição ao chumbo leva à disfunção endotelial e que essas alterações podem ser fortemente associadas à hipertensão e com um concomitante aumento de morbidades e mortalidade (Triggle et al., 2003). Vários estudos experimentais tem demonstrado que a exposição ao chumbo pode desencadear um desequilíbrio na síntese, na liberação e/ou no efeito de algum dos mediadores endoteliais capazes de relaxar ou contrair o músculo liso (Fiorim et al., 2011; Silveira et al., 2010, 2014).

1.2.1 Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio

1.2.1.1 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. Sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina que é convertido em L-citrulina, reação que é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). Como já descrito, o NO tem um papel fundamental no relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas o relaxamento ocorre pela estimulação de receptores (da acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) na membrana das células endoteliais ou quando há um aumento do atrito das células circulantes na camada endotelial levando a ativação da NOS e consequente produção de NO (*shear stress*) (Figura 2) (Dusse et al., 2003; Carvalho et al., 2001).

O NO produzido pela célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula e lúmen vascular. No interior da célula ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração na conformação desta enzima, ativando-a. Esta enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc resulta no relaxamento desta célula. O mecanismo envolve a diminuição da entrada de cálcio para o interior da célula, a inibição da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de cálcio para o retículo endoplasmático (Dusse et al., 2003).

O chumbo é capaz de alterar a biodisponibilidade de óxido nítrico, resultando em achados ambíguos em relação à liberação de NO (Carmingnani et al., 2000; Patrick., 2006; Silveira et al., 2010). Alguns estudos demonstram que exposição crônica ao

chumbo está relacionada com a diminuição na concentração urinária de NO (Vaziri et al., 2003; Ding et al., 1998; Heydari et al., 2006), outros achados, como de Vaziri et al., (2001) relatam aumento na concentração urinária de NO.

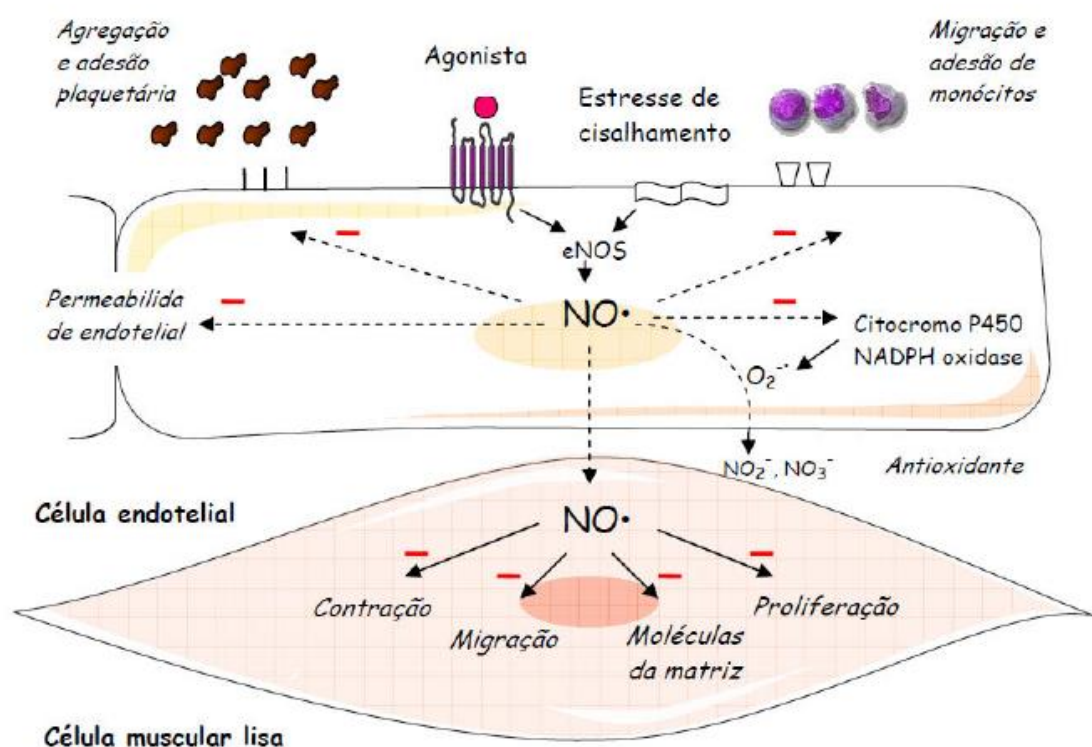


Figura 2: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (Modificado de Rattmann, 2009).

1.2.1.2 Prostaciclina

As prostaciclina (PGI₂) são eicosanóides derivadas do ácido araquidônico que são liberadas dos fosfolípidios da membrana pela ação de fosfolipases ativas. A contribuição da prostaciclina para a vasodilatação dependente do endotélio é usualmente pequena. A atividade da PGI₂ depende dos receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. Assim, o acoplamento da PGI₂ com seu receptor preferencial, o receptor de prostaciclina (IR), ativará a adenilato ciclase, e conseqüentemente, o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009). Esta interação também pode estimular a proteína quinase

dependente de AMPc (AMPK), no músculo liso vascular. A proteína quinase pode atuar abrindo canais para K^+ sensíveis ao ATP, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e estimulando a saída de Ca^{+2} do citosol, diminuindo a oferta deste íon a maquinaria contrátil. Estes fatos contribuem para relaxamento vascular. Além dos efeitos na regulação do tônus vascular, as prostaciclina têm ação antiplaquetária e antiproliferativa (Batlouni, 2001). Em modelos experimentais a diminuição da síntese de prostaciclina induziu hipertensão e esclerose arterial (Félétou & Vanhoutte, 2009).

1.2.1.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)

Apesar de serem potentes vasodilatadores derivados do endotélio, nem todo vasorelaxamento pode ser explicado pelo óxido nítrico ou pelas prostaciclina, vários autores sugerem a existência de um mecanismo endotelial adicional, conhecido como EDHF (Beny & Brunet, 1988; Cowan & Cohen, 1991; Hasunuma *et al.*, 1991). Fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRFs), incluindo o NO, PGI₂, e o EDHF, têm um papel central na regulação do tônus vascular. A redução de EDHF causam prejuízos ao relaxamento dependente do endotélio, ou disfunção endotelial. Alterações no relaxamento dependente do endotélio em resposta à acetilcolina são freqüentemente observadas em vasos de pacientes humanos e em modelos animais de hipertensão (Kang, 2014).

A identidade química do EDHF permanece desconhecida, e a possibilidade da existência de vários EDHFs já foi levantada (Carvalho *et al.*, 2001). O EDHF produz hiperpolarização do músculo liso vascular sem aumentos celulares de GMPc nas células musculares lisas. A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nos vasos de condutância (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais para potássio presentes nas células do músculo lisovascular. Em geral, as respostas mediadas pelos EDHFs envolvem o aumento de Ca^{+2} intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativados por Ca^{+2} (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

1.2.2 Fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio

1.2.2.1 Prostaglandinas e Tromboxanos

As prostaglandinas e tromboxanos são derivados da via da ciclooxigenase e em condições fisiológicas, a ação vasoconstrictora dessas substâncias é inibida pela ação dos vasodilatadores produzidos pelo endotélio (Batlouni, 2001).

A produção destes eicosanóides é regulada pela disponibilidade do ácido araquidônico e pela atividade das sintases da prostaglandina H (PGHS). O ácido araquidônico é formado por fosfolípidios da membrana através da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) e, posteriormente, convertido em PGH2 pelas sintases das prostaglandinas H (PGHS). A PGH2 é a precursora das demais prostaglandinas, incluindo o tromboxano, e possui atividade direta sobre o músculo liso vascular, promovendo vasoconstrição. O tromboxano é o maior produto vasoconstritor derivado da ciclooxigenase. As prostaglandinas e os tromboxanos estimulam a atividade contrátil do músculo liso vascular através do acoplamento com receptores específicos. Esta interação leva ao aumento de cálcio intracelular e a maior sensibilidade às proteínas contráteis (Davidge, 2001).

O chumbo pode interferir no metabolismo do ácido araquidônico e contribuir com o aumento da pressão arterial (Grizzo et al., 2008; Courtois et al., 2003; Karimi et al., 2002). Estudos laboratoriais demonstraram um maior envolvimento de prostanoídes vasoconstrictores derivados da COX no leito arterial caudal de ratos perfundidos com acetato de chumbo (Silveira et al., 2010, 2014).

1.2.2.2 Endotelina I

Endotelina é um peptídeo com 21 aminoácidos, existente no homem em três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). O endotélio vascular produz somente a ET-1. Cada isoforma de ET exerce seu efeito após unir-se ao seu receptor específico. Foram denominados três tipos de receptores: ETA, ETB, ETC. O receptor ETA tem maior afinidade com a ET-1 e são expressos principalmente em células musculares lisas, provendo vasoconstrição através da ativação da fosfolipase C, da proteína quinase (PKC) e do aumento do Ca^{+2} intracelular, pelos canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem. Normalmente, os

níveis circulantes de endotelina, são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas pouca endotelina seja produzida (Batlouni, 2001).

1.2.2.3 Angiotensina II

A formação da angiotensina II se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por uma redução da pressão arterial ou desequilíbrio hidroeletrólítico. Assim, a pré pró-renina, um peptídeo não ativo se transforma em pró-renina. Posteriormente, a pró-renina, através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, ao ser liberada, irá atuar sobre o angiotensinogênio, que será clivado, gerando a angiotensina I. Esta, por sua vez, sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no pulmão, originando a angiotensina II. A transformação da angiotensina I em angiotensina II ocorre no plasma e em vários outros tecidos, assim como nas células endoteliais. São conhecidos dois tipos de receptores para a angiotensina II: AT1 e AT2. A maioria dos efeitos biológicos é atribuída à ativação de AT1 (Crackower, 2002; Batlouni, 2001). A angiotensina II exerce efeitos locais, como nos vasos sanguíneos, rins, coração e sistema endócrino, realizando importante papel na regulação da pressão sanguínea. Ela exerce efeito predominante no tônus vascular via interação com o receptor AT1, levando a efeitos vasoconstritores. Os receptores AT2 são expressos durante o desenvolvimento fetal, entretanto, esta expressão é amplamente diminuída após o nascimento. O mecanismo de ação deste receptor está relacionado à liberação de NO promovendo relaxamento do músculo liso vascular (Crackower, 2002; Batlouni, 2001).

A exposição ao chumbo ativa a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Sharifi et al., 2004), além de aumentar a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese e liberação da mesma pelo aparelho justaglomerular (Boscolo & Carmingnani, 1988; Carmingnani et al., 1999).

1.2.2.4 Espécies reativas do oxigênio

As Espécies Reativas do Oxigênio são metabólitos derivados da redução do oxigênio, e incluem as espécies radicais livres e outras que embora não possuam elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e reativos.

A principal fonte geradora de EROs são as mitocôndrias, assim, a formação destes metabólitos pelo organismo em condições fisiológicas é inevitável, visto que o processo de respiração celular ocorre nesta organela. A formação das EROs também é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, isoenzimas da citocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase. A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NAD(P)H oxidase (Cai & Harrison, 2000).

Muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas pelas EROs. No endotélio vascular os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento da adesão de monócitos e angiogênese. Enquanto no MLV, os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama & Griendling, 2003). A produção endógena de ROS é controlada por mecanismos anti-oxidantes, compostos por enzimas e doadores de elétrons de baixo peso molecular (como o ácido ascórbico, os α -tocoferóis, a catalase, superóxido dismutase e a glutatona) que limitam a ação das ROS por eliminá-las ou reparam modificações oxidativas potencialmente danosas à célula.

Dentre as principais EROs destacam-se: o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH\cdot$), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Um dos mais importantes radicais para a biologia vascular é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (Taniyama & Griendling, 2003). Apesar do $O_2^{\cdot-}$ poder diretamente promover alterações na função vascular, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas. Radicais superóxido são rapidamente dismutados pelas enzimas: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citoplasmática (Cu, Zn-SOD) e superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (Ferreira & Matsubara, 1997). A glutatona peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 . Já a glutatona peroxidase transforma o H_2O_2 glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) (Griendling & Ushio-Fukai, 2000). A Figura 3 a seguir representa a produção das principais espécies reativas do oxigênio e a atuação das principais enzimas antioxidantes. A NAD(P)H aparece em destaque por ser uma das principais

enzimas produtoras de ânions superóxido no endotélio do sistema vascular (Figura 3) (Cai & Harrison, 2000).

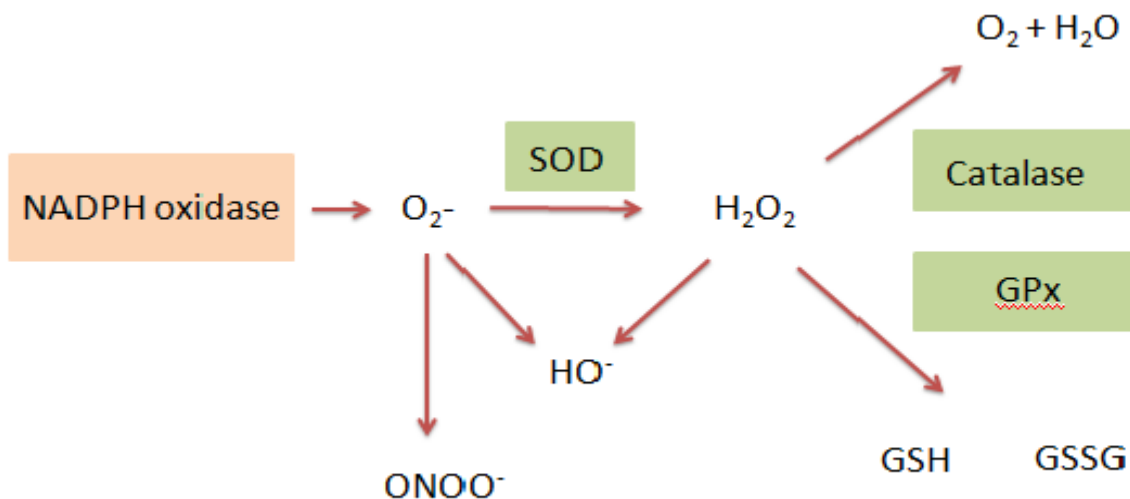


Figura 3: Esquema representativo da produção das principais espécies reativas do oxigênio e atuação das principais enzimas antioxidantes. A NADP(H) produz O_2^- que pode ser convertido em $ONOO^-$ por meio da interação com NO, HO^- via reação de Fenton e em H_2O_2 através da dismutação pela SOD. O H_2O_2 pode ser convertido em GSH e GSSG pela GPx, e em O_2 e H_2O através da ação da catalase.

O termo estresse oxidativo descreve a condição que envolve um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio, onde há uma incapacidade das enzimas antioxidantes controlarem essa produção, ocasionando também um desequilíbrio na biodisponibilidade do sistema enzimático (Paravicini, 2008).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a exposição a baixas doses de chumbo, tem sido associada a doenças como hipertensão, doença arterial periférica, doenças renais e doenças neurodegenerativas e todas elas incluem componentes do estresse oxidativo. O estresse oxidativo produzido pela exposição ao chumbo modifica o papel dos fatores neuro-humorais envolvidos na regulação da pressão arterial (Vaziri, 2002, 2004). As EROs produzidas durante a exposição ao chumbo se ligam às enzimas que possuem o grupo - SH desativando-as e causando um desequilíbrio no balanço do controle dos radicais livres (Lynes et al., 2007). A ação das EROs produzidas pela exposição ao chumbo também é associada a sua

interação com o NO, alterando assim a biodisponibilidade deste importante fator de relaxamento (Vaziri, 1999).

Dentre as EROs destacamos o papel do peróxido de hidrogênio, que é capaz de desempenhar função vasodilatadora ou vasoconstritora dependendo do leito vascular, da presença do endotélio, das condições experimentais ou das concentrações estudadas. A produção de H_2O_2 pode ser envolvida no relaxamento dependente do endotélio em resposta a agonistas e fluxo ou compensada pela diminuição na produção de NO. O relaxamento envolvendo o H_2O_2 envolve múltiplas vias, incluindo a hiperpolarização das células do músculo liso vascular pela ativação dos canais de potássio (Félétou, 2009).

Em suma, o desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. E a exposição ao chumbo tem se mostrado um importante fator desencadeador da disfunção endotelial.

1.3 MÚSCULO LISO VASCULAR

O músculo liso vascular (MLV) é responsável pelo controle da resistência periférica total, pelo tônus arterial e venoso e pela distribuição do fluxo sanguíneo. A atividade contrátil das células do MLV é estimulada por fatores neurais e humorais. A contração das células do músculo liso também se dá pela interação entre actina e miosina, assim como no músculo esquelético. Porém o mecanismo pelo qual o cálcio regula a contração do músculo liso difere do esquelético. A concentração de cálcio que desencadeia a contração pode ser obtida através de canais de cálcio dependentes de voltagem e através de canais de cálcio mediados por receptores no sarcolema e através da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. As células se relaxam quando o cálcio intracelular livre é bombeado de volta para dentro do retículo sarcoplasmático, para fora da célula pela bomba de cálcio intracelular e removido da célula pelo trocador Na-Ca. O acoplamento farmacomecânico é o mecanismo predominante para promover a contração do MLV (Aires, 2008).

A atividade dos canais para potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares. A abertura

de um canal para potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular o que leva a um fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e conseqüente diminuição da entrada de Ca^{2+} para o interior da célula, causando o relaxamento vascular. De forma inversa, o fechamento de um canal para potássio causa um estado de despolarização, levando a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e conseqüente, aumento da concentração de cálcio intracelular e vasoconstrição.

Vários fatores vasoativos endoteliais regulam o tônus vascular através da ação nos canais para potássio. O relaxamento produzido pelas prostaciclina, peróxido de hidrogênio e pelo NO são associados a hiperpolarização das células do MLV e envolve a abertura de canais para potássio. A ativação de canais para potássio também é o mecanismo preponderante do relaxamento produzido por ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), gerados pelo citocromo P450 endotelial (Félétou, 2009).

Os fatores contráteis derivados do endotélio também desempenham sua ação nos canais para potássio. A endotelina I dependendo dos vasos sanguíneos inibe vários grupos de canais para potássio (Park et al., 2005). Similarmente a ativação de receptores de tromboxanos inibem canais para potássio e despolarizam as células do MLV (Cogolludo et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio podem contribuir diretamente para a contração do músculo liso vascular. Elas aumentam a sensibilidade das proteínas contráteis ao íon cálcio e despolarizam as células do MLV inibindo a ativação dos canais para potássio (Félétou, 2009).

A Figura 4 elucida os principais fatores vasoativos endoteliais que agem nos canais para potássio dependentes de cálcio de alta condutância (BKca).

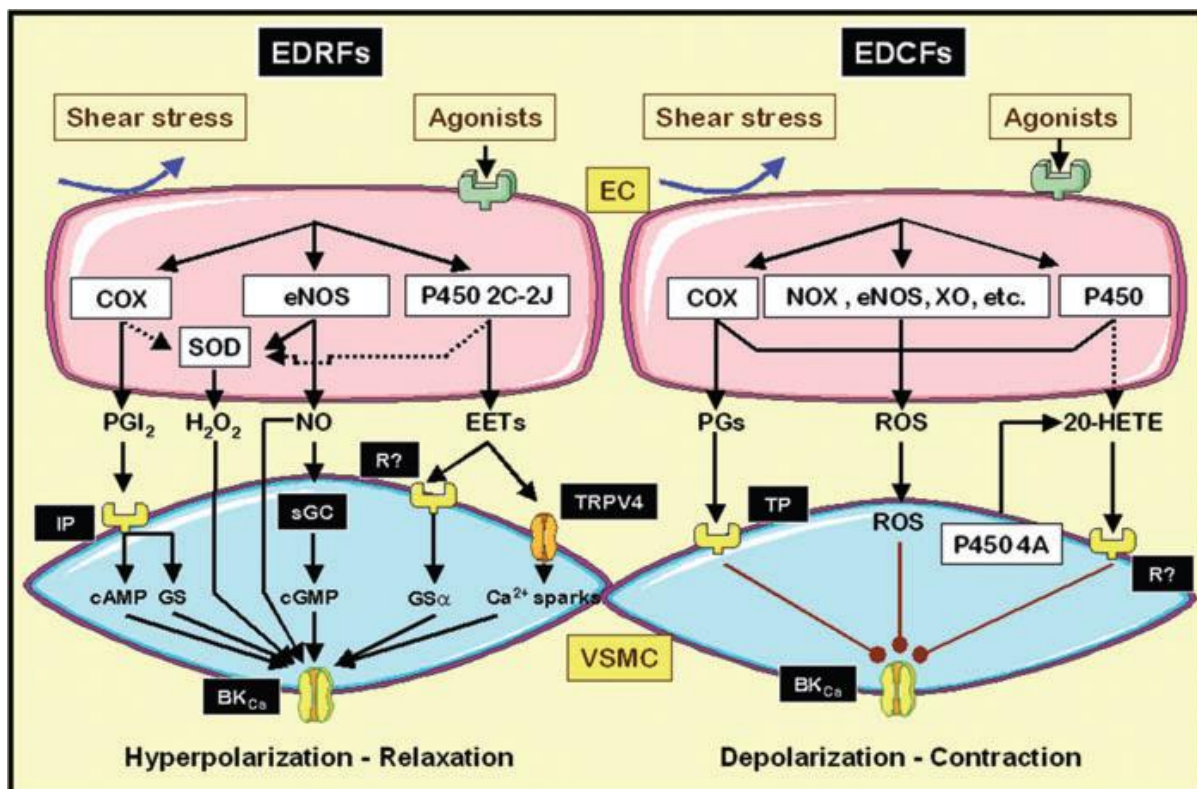


Figura 4: Fatores vasoativos endoteliais e atividade em BKCa no músculo liso. 20-HETE, o ácido 20-hidroieicosatetraenóico; BKCa, canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância; AMPc, monofosfato cíclico-adenosina; cGMP, o monofosfato cíclico de guanosina; COX, ciclooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores contratantes derivados do endotélio; EDRFs, fatores relaxantes derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; eNOS, sintase endotelial de óxido nítrico; GS, proteína-G S; GSα, uma subunidade de proteína G-S; H₂O₂, o peróxido de hidrogênio; IP, receptor prostaciclina; NO, óxido nítrico; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI₂, prostaciclina; R ?, receptor; ROS, espécies reativas de oxigênio; sGC, guanilato ciclase solúvel; SOD, superóxido-dismutase; TP, receptor de tromboxano; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase. Fonte: Félétou, 2009.

2. JUSTIFICATIVA

A exposição ao chumbo é amplamente reconhecida como um problema comum de saúde ocupacional e ambiental. Assim, os estudos da exposição à baixas concentrações, mesmo que conduzidos em animais, podem despertar a atenção dos órgãos públicos responsáveis pelo controle da emissão deste metal e da população em geral para este tema. Um trabalho, realizado recentemente em nosso laboratório, com o mesmo modelo experimental, elucidou os efeitos cardíacos do chumbo, em plumbemia inferior ao limite estabelecido pelas legislações internacionais (Fioresi et al., 2014). Como o chumbo mostra-se cardiotoxíco, surgiu-se o questionamento quanto aos efeitos vasculares, concomitantes aos cardíacos, desencadeados neste mesmo modelo experimental. Ainda, como exposto previamente, a literatura mostra-se controversa quanto à ação do chumbo no âmbito vascular. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos vasculares resultantes da exposição a baixas concentrações de chumbo por 30 dias e investigar os mecanismos que podem estar envolvidos nas alterações vasculares provocadas pelo metal.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com baixa concentração de Pb por 30 dias sobre a reatividade vascular em segmentos isolados de aorta torácica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar semanalmente o efeito da exposição ao chumbo sobre a medida indireta da pressão arterial sistólica de ratos acordados;

Verificar se a exposição ao chumbo promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina;

Avaliar se o chumbo altera a participação endotelial na regulação vascular;

Estudar a participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, da via da ciclooxigenase, sistema renina angiotensina, xantina oxidase e dos canais para potássio na regulação vascular na exposição ao chumbo;

Investigar se a exposição ao chumbo modifica a expressão protéica da isoforma endotelial da catalase e SOD Cu/Zn;

Mensurar os níveis de malondialdeído plasmático.

Avaliar os efeitos de um tratamento antioxidante sobre a reatividade vascular à fenilefrina de ratos expostos ao chumbo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), cedidos pelo Biotério do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Estes animais foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controle de temperatura, com livre acesso à ração e água. 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 Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA 002/2013).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os ratos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 280 e 350 g, foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Chumbo. Os animais destinados ao grupo chumbo recebiam, por um período de 30 dias, água de beber destilada acrescida de 100 ppm de acetato de chumbo (Karimi et al., 2002). Os animais do grupo controle recebiam, pelo mesmo período descrito acima, água de beber destilada sem o acréscimo do acetato de chumbo. Cada grupo era alojado em gaiolas independentes, de forma que os animais do grupo controle não eram expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado.

4.3 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DO CHUMBO

Ao final do tratamento, amostras sanguíneas (5ml) dos grupos Chumbo e Controle, foram coletadas em tubos heparinizados para a realização das medidas das concentrações sanguíneas de chumbo através de um espectrofotômetro de absorção atômica. Para o transporte, as amostras eram acondicionadas em caixas térmicas de modo que a temperatura dentro da caixa fosse de aproximadamente 20 °C. O laboratório Bioclínico, localizado na Avenida Rio Branco, 310, Santa Lúcia, Vitória- ES intermediou o envio das amostras de sangue para um segundo laboratório. O laboratório responsável pelas quantificações dos metais no sangue foi o Instituto de Patologia e Análises Clínicas Hermes Pardini, localizado na Rua dos

Aimorés, 66, Funcionários, Belo Horizonte - MG - CEP: 30.140-070, o qual apresenta resultados satisfatórios na análise das amostras e certificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Resolução - RE nº 2.379, de 12 de junho de 2009.

4.4 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada pelo método de pletismografia de calda de acordo com Buñang (1973) e modificada segundo Grizzo et al. (2008). As medidas foram realizadas nos animais dos grupos Controle e Chumbo semanalmente, através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. A média de três medidas foi utilizada.

4.5 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Ao final do tratamento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e, em seguida, eutanasiados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 5).

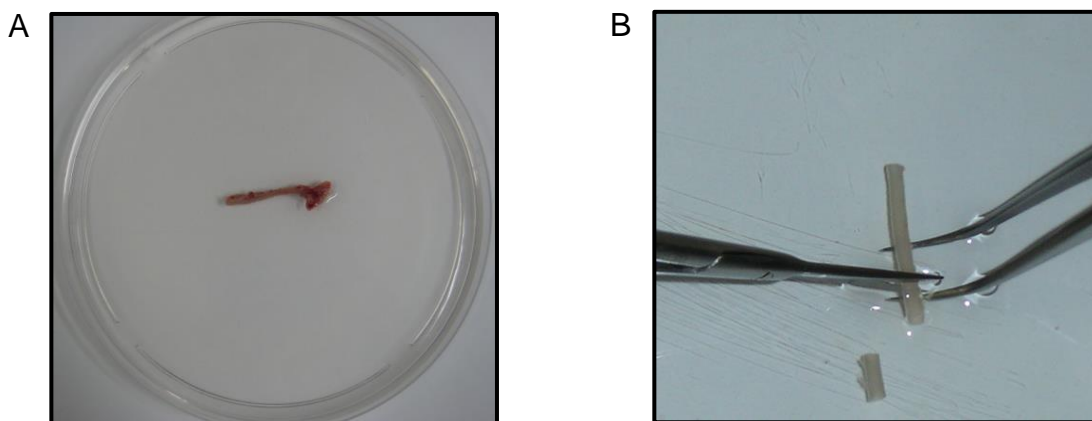


Figura 5: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA) e este a um computador (Figura 6).

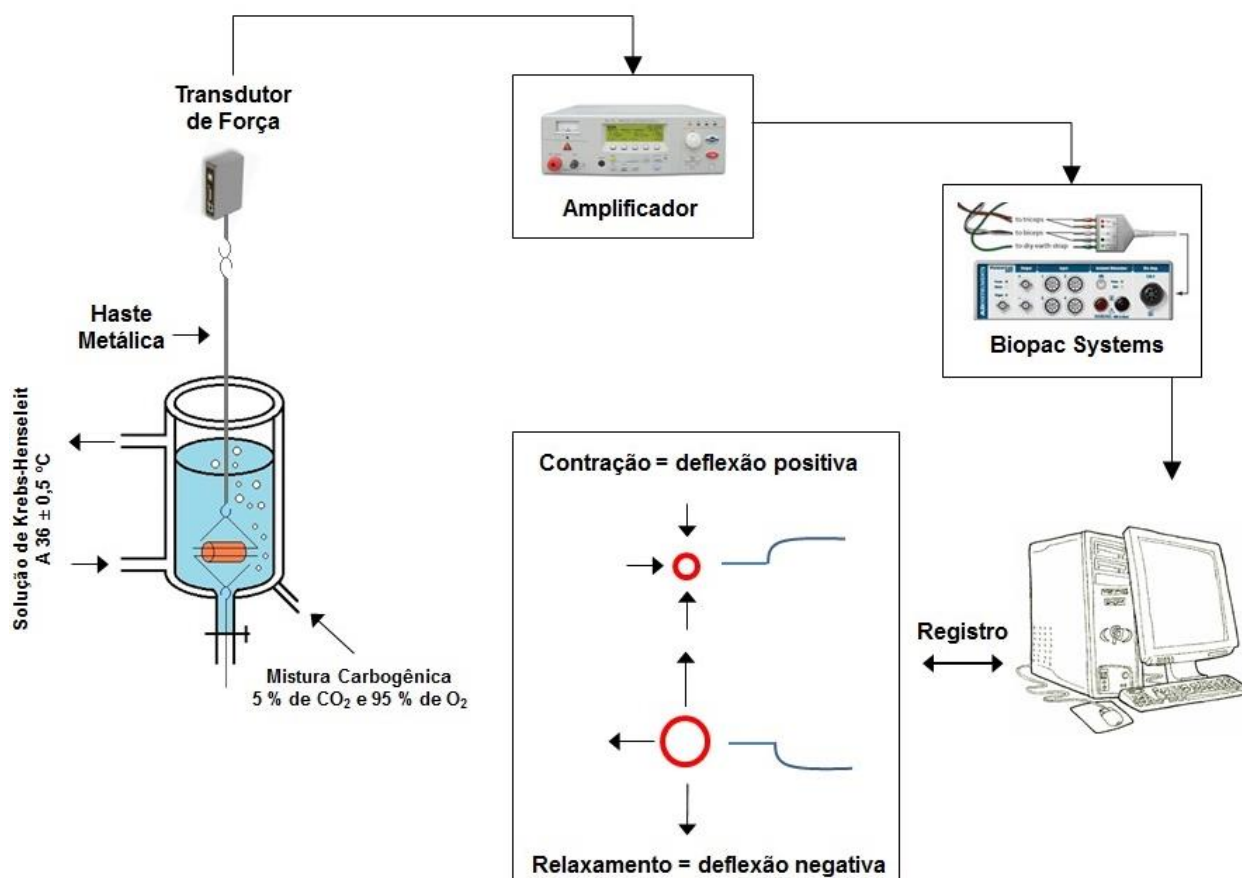


Figura 6:Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro (Nunes, 2014).

4.5.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho 125 µl de KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 7 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 7 D), uma nova dose de 125 µl de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 7 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes com a solução de Krebs-Henseleit para atingir o valor basal (1.0 grama) e, após 30 minutos (Figura 7

G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

4.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M foi aplicada (Figura 7 I, J, L). A integridade endotelial era determinada por um relaxamento maior ou igual a 80%.

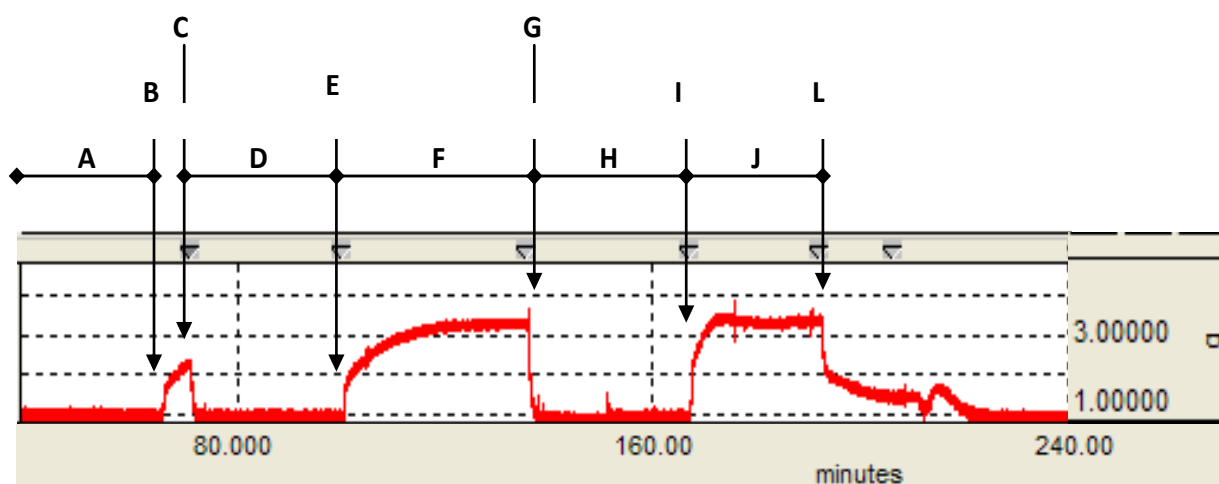


Figura 7: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2007).

4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.6.1 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse estabelecida. Após 30 minutos de estabilização, foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

4.6.2 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10^{-5} M) de induzir o relaxamento, após a pré-contração com fenilefrina (10^{-7} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

4.6.3 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a 3×10^{-5} M).

4.6.4 Efeito da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao NPS em concentrações de 10^{-11} a $3 \cdot 10^{-5}$ M.

4.6.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina na aorta

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos (L-NAME, Catalase, SOD, DETCA, TEA, Alopurinol, Indometacina, Apocinina, Losartan, PD123319) e, logo após, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 8).

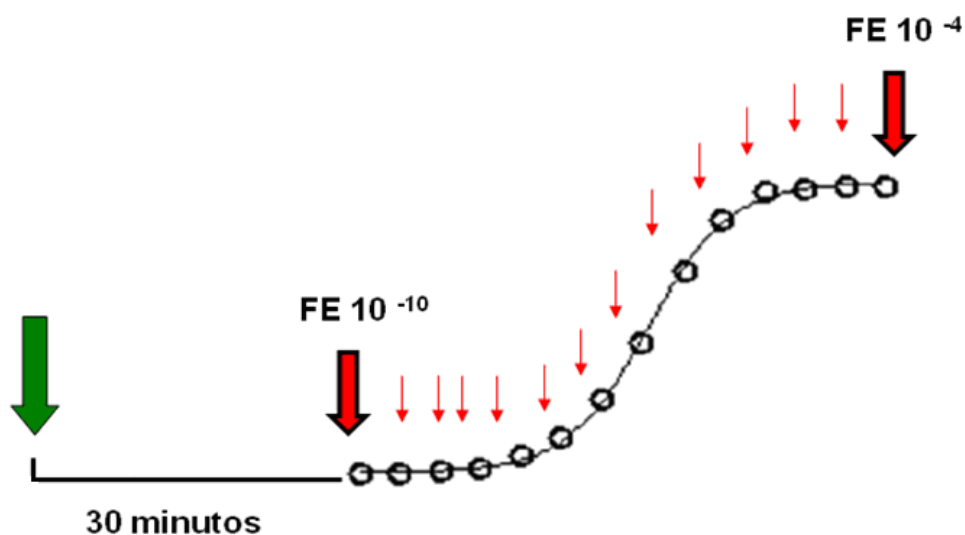


Figura 8: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

4.6.5.1 Influência da exposição por trinta dias com acetato de chumbo sobre a via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) nos efeitos vasculares promovidos pela exposição ao chumbo, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, $100 \mu\text{M}$).

4.6.5.2 Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo

A fim de investigar a participação das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença de apocinina (10 μM), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase; a catalase (1000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), um “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); superóxido dismutase (SOD, 150 U ml^{-1}), importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ácido dietilditiocarbâmico (DETCA, 0.5mM), um bloqueador da superóxido dismutase; e Alopurinol (400 μM), um inibidor da xantina oxidase.

4.6.5.3 Envolvimentos dos canais para potássio sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo

Para verificar o envolvimento dos canais para potássio, os anéis foram incubados com tetraetilamônio (TEA, 2mM), um inibidor não específico dos canais para potássio.

4.6.5.4 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição por trinta dias com acetato de chumbo

Para verificar o envolvimento dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μM), inibidor não específico da ciclooxigenase.

4.6.5.5 Participação do sistema renina-angiotensina no efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta

Buscando averiguar uma possível participação da angiotensina II local no efeito no efeito provocado pela exposição ao acetato de chumbo na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, foi utilizadoo losartan, um inibidor específico dos receptores AT1; e o PD123319 um antagonista dos receptores AT2.

4.7 TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO

Durante o mesmo período em que foram tratados os animais dos grupos controle e chumbo, dois grupos de ratos Wistar de três meses de idade, pesando entre 280 e 350 g, foram tratados a fim de avaliar o efeito de um tratamento com antioxidante sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ratos expostos ao chumbo. Os animais de um dos grupos recebiam, durante trinta dias, ácido ascórbico (200mg/Kg/dia) (Zhang et al., 2011), por via intraperitoneal e água de beber destilada, o outro grupo recebia ácido ascórbico (200mg/Kg/dia), por via intraperitoneal acrescido de 100 ppm de acetato de chumbo na água de beber.

4.8 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA

As amostras de plasma dos animais foram coletadas e armazenadas a -80°C até o dia da análise. As concentrações plasmáticas de MDA foram mensuradas por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Wiggers et al., 2008). Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica.

Após centrifugação do sangue, o plasma foi coletado e misturado ao ácido tricloroacético a 20% em 0.6 M HCl (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97°C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando Absorbance Microplate Reader (ELx808TM).

4.9 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA

4.9.1 Western Blot para detecção da isoforma da catalase e SOD Cu/Zn

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição por trinta dias do acetato de chumbo sobre a expressão proteica das isoformas da catalase e SOD Cu/Zn em segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle e

Chumbo. Para tal, os segmentos aórticos foram dissecados em solução nutritiva de Krebs-Henseleit e armazenados a -80°C até a homogeneização das amostras.

4.9.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos segmentos aórticos por trituração em solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH: 7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- HinzGmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação proteica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 μg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 μM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

4.9.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed, previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (Power PacTM HC, BioRad, Singapura) a 4°C . Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados à uma cuba (Trans-Blot SD CellBio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8°C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

4.9.4 Incubação com Anticorpos

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4° C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para catalase (1:100, Sigma, Aldrich, Germany) SOD Cu/Zn (1:500, Sigma, Aldrich, Germany) e α -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA).

Ao final da incubação dos anticorpos primários, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 15 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:5000, Stress Gen, Victoria, Canada).

4.9.5 Detecção das Proteínas

As proteínas correspondentes a Catalase, SOD Cu/Zn e α -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC Plus, Amersham TM GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham TM, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas proteicas impregnadas foram escaneadas e analisados pelo software ImageJ.

4.10 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina (10^{-6} M).

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{máx}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se GraphPrism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (% dAUC) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão proteica da Catalase e SOD Cu/Zn estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação à α -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t de Student não-pareado. Para análise dos resultados de pressão arterial foi utilizado ANOVA uma e duas vias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4.11 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetato de chumbo (Sigma)
- Acetato de Sódio (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido Ascórbico (Sigma)
- Ácido Dietilditiocarbâmico (DETCA) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Alopurinol (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para α -actina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para Catalase (Sigma, Aldrich, Germany)
- Anticorpo produzido em camundongo para SOD Cu/Zn (Sigma, Aldrich, Germany)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)

- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- PD123319 (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Sacarose (Merck)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tetraetilamonio (TEA) (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções usadas para a avaliação da reatividade vascular foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. Exceto Indometacina (preparada em solução TRIS/bicarbonato de sódio).

5. RESULTADOS

5.1 CONSUMO DE ÁGUA, RAÇÃO E VALORES DE MASSA CORPORAL

O consumo de água e ração foi semelhante em ambos os grupos. Os animais dos grupos Controle e Chumbo apresentaram peso semelhante no início e ao fim do tratamento, sugerindo que a exposição crônica ao chumbo não influencia o consumo de ração e água e o ganho de peso corpóreo (Tabela 1).

Tabela 1: Valores do consumo médio de ração, água e valores médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição crônica ao acetato de chumbo

Grupo	Peso Corporal Inicial (g)	Peso Corporal Final (g)	Consumo de Ração (g/dia)	Consumo de Água (ml/dia)
Controle (n=30)	259 ± 1,30	309 ± 2,56	27 ± 2,21	43 ± 2,62
Chumbo (n=30)	258 ± 0,99	310 ± 2,59	26 ± 1,72	42 ± 2,83

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste t: $p > 0,05$.

5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO SANGUÍNEA

Ao final dos 30 dias de exposição, amostras de sangue foram colhidas para dosagem espectrofotométrica da concentração de chumbo. Em ratos expostos ao chumbo por trinta dias, a concentração de chumbo no sangue foi de $8,4 \mu\text{g/dL} \pm 1,1 \mu\text{g/dL}$ ($n = 5$). Enquanto os animais do grupo controle apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do aparelho, que consiste em $0,2 \mu\text{g/dL}$ ($n=5$).

5.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO

A avaliação semanal da pressão arterial sistólica foi realizada por pletismografia de cauda. Um aumento na pressão arterial sistólica foi observado sete dias após a exposição ao chumbo (primeiro dia: $108 \pm 2,21 \text{ mmHg}$, sétimo dia: $127 \pm 1,22 \text{ mmHg}$, $n = 8$; $P < 0,05$) e foi mantido até o 28^o dia de exposição ($126 \pm 1,42 \text{ mmHg}$,

n = 8, P <0,05). Nos animais do grupo controle, a pressão manteve-se inalterada durante os trinta dias (107 ± 5.0 mmHg, n= 6; P<0.05).

5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM O ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

A exposição ao chumbo não afetou a resposta ao KCl (Controle: $2,19 \pm 0,21$ g, n = 30; Chumbo: $2,22 \pm 0,92$ g, n = 30; P> 0,05). A retirada mecânica do endotélio também não modificou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl (Controle, n = 35; $2,24 \pm 0,16$ g vs Chumbo, n = 36; $2,28 \pm 0,19$ g), e assim como nos segmentos com endotélio íntegro a resposta ao KCl nos anéis sem endotélio foi semelhante nos dois grupos experimentais.

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos Controle e Chumbo (Figura 9), no entanto, a resposta máxima foi menor nos segmentos arteriais dos animais do grupo Chumbo (Tabela 2). A resposta a fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Chumbo na sensibilidade (pD₂).

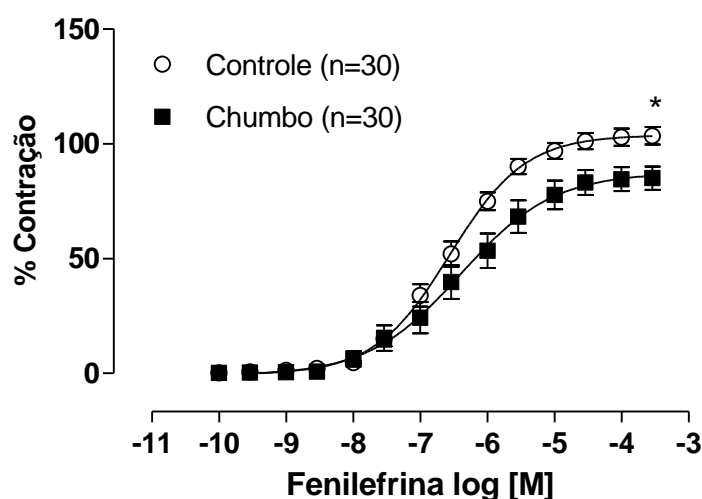


Figura 9: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não-pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂. *p< 0,05 para R_{máx}: Controle vs Chumbo.

Tabela 2: Resposta máxima (R_{máx}) e Sensibilidade (pD₂) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 2,05	6,5 ± 0,05
Chumbo	87 ± 4,12*	6,3 ± 0,12

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, **p*<0.05 Chumbo vs Controle.

5.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM O ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta a ACh. Como esperado, houve relaxamento concentração resposta em todos os anéis isolados de aorta (Figura 10). Nenhuma diferença foi observada nos valores de R_{máx} e pD₂ entre os grupos estudados (Tabela 3).

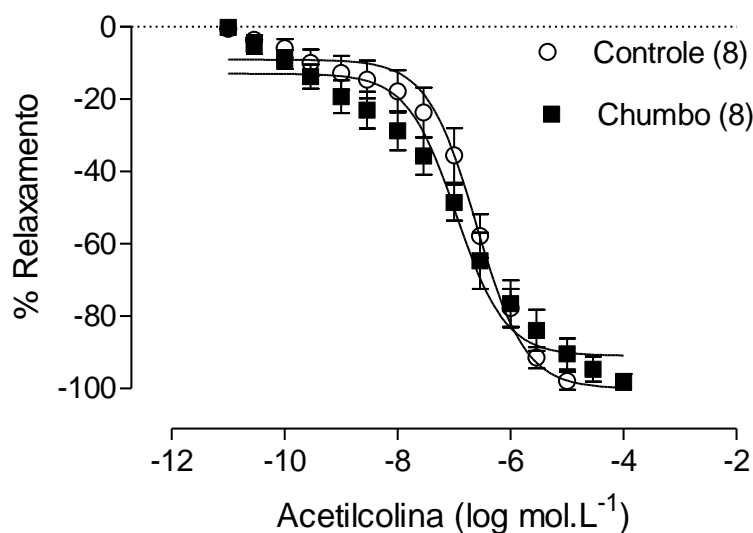


Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo, após trinta dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM. Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂, *p*>0,05.

Tabela 3: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$99,9 \pm 1,66$	$6,60 \pm 2,36$
Chumbo	$90,9 \pm 1,96$	$6,95 \pm 2,42$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, $p > 0,05$.

5.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO O ACETATO DE CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), que de maneira concentração dependente inibiu a contração induzida pela fenilefrina. A resposta ao relaxamento induzida pelo nitroprussiato de sódio não foi diferente nos grupos estudados (Figura 11; Tabela 4).

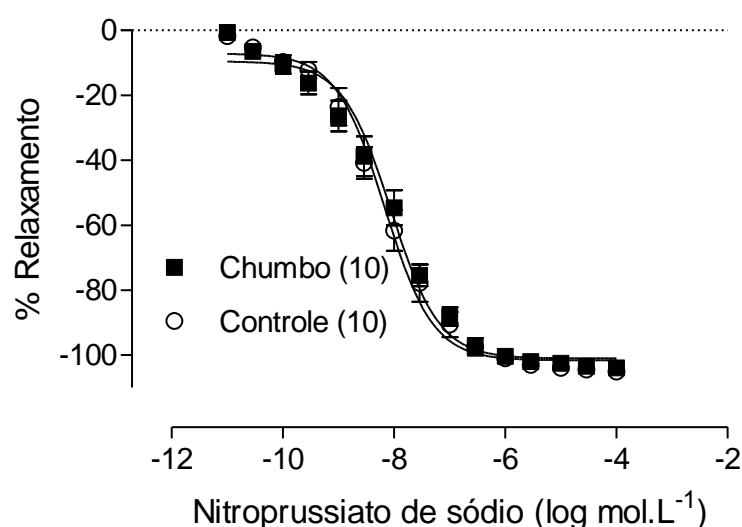


Figura 11: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo, após trinta dias de exposição ao acetato de chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 , $p > 0,05$.

Tabela 4: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pelo nitroprussiato de sódio em aorta de ratos dos grupos Controle e Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	101,6 ± 1,35	8,16 ± 0,05
Chumbo	101 ± 1,28	8,05 ± 0,05

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, $p > 0,05$.

5.7 MODULAÇÃO ENDOTELIAL NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

Para avaliar a influência de fatores endoteliais envolvidos na resposta vascular, o endotélio foi removido mecanicamente. Após a remoção endotelial a reatividade à fenilefrina foi aumentada em ambos os grupos experimentais (Figura 12A,B), mas este aumento foi superior no grupo exposto ao chumbo, como demonstrado pelos valores dAUC (Figura 12 C; Tabela 5). Estes dados associados com a diminuição da reatividade vascular à fenilefrina sugerem que a exposição por 30 dias com acetato de chumbo provoca a liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio.

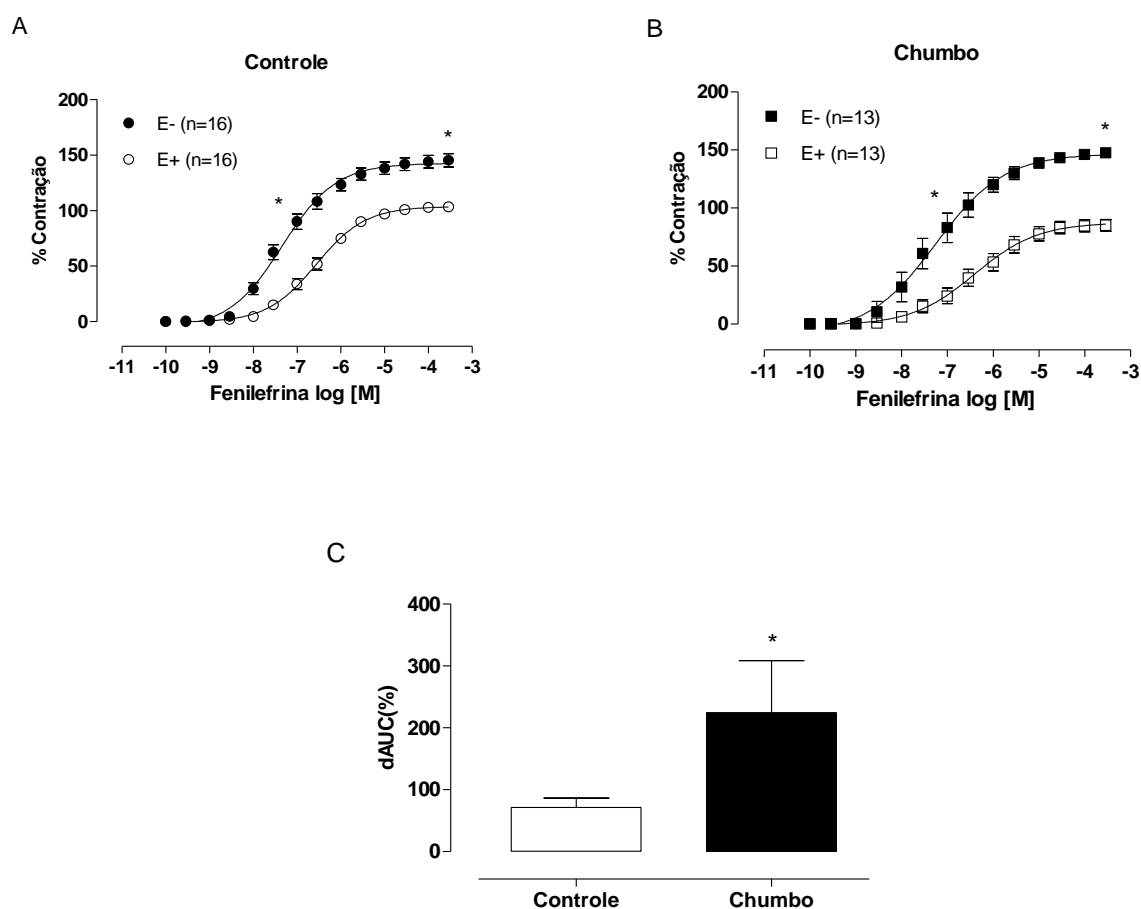


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos: (A) Controle e após a retirada do endotélio (E-); (B) Chumbo e após a retirada do endotélio (E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos grupos Ct /Ct E- e Pb/Pb E- . * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, * $p < 0,05$ vs pD_2 de Chumbo.

Tabela 5: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) dos grupos Controle e Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 2,05$	$6,56 \pm 0,05$
Controle E-	$142 \pm 2,74$ *	$7,33 \pm 0,06$ *
Chumbo	$87 \pm 4,12$	$6,39 \pm 0,12$
Chumbo E-	$146 \pm 4,82$ #	$7,25 \pm 0,12$ #

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Chumbo.

5.7.1 Participação da via do óxido nítrico na exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina em aorta torácica

Para avaliar se a exposição ao acetato de chumbo altera a modulação induzida por NO nas respostas contráteis induzidas por fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com o inibidor da eNOS, L-NAME (100 mM). L-NAME provocou aumentos semelhantes na resposta máxima à fenilefrina em artérias de ambos os grupos experimentais (Figura 13 A,B). No entanto, os valores da dAUC demonstraram que o papel desempenhado pelo óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina não diferiu entre os grupos (Figura 13 C; Tabela 6).

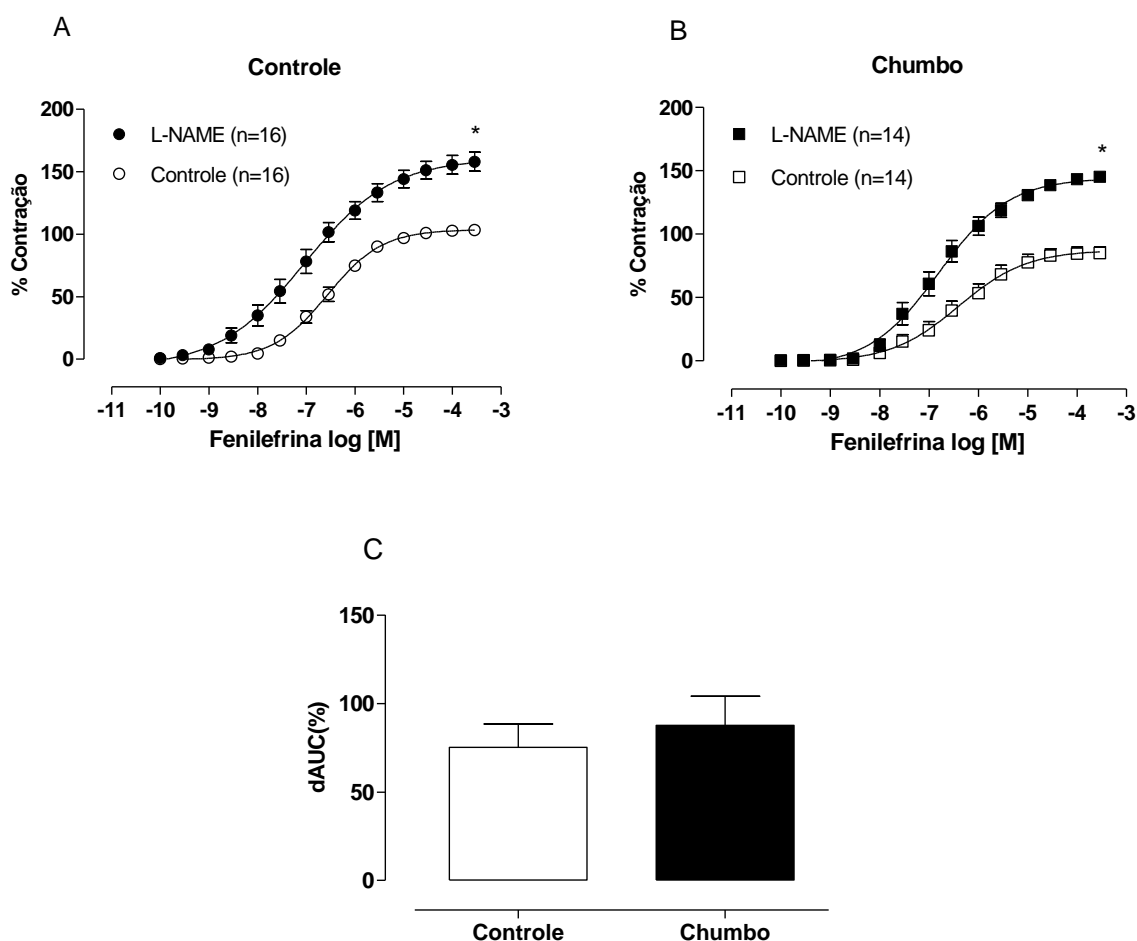


Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado

para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-L-NAME e Pb/Pb-L-NAME. *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.

Tabela 6: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle L-NAME	160 ± 5,84*	7,02 ± 0,12
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo L-NAME	144 ± 3,84 [#]	6,79 ± 0,08

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} de Controle, [#]p<0,05 vs R_{máx} de Chumbo.

5.7.2 Participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas antioxidantes na exposição por trinta dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina em aorta torácica

5.7.2.1 Peróxido de Hidrogênio

Vários estudos têm demonstrado que a exposição ao chumbo induz a geração de espécies reativas de oxigênio, que posteriormente resulta em dano oxidativo a vários sistemas orgânicos e alterações de sistemas de defesa antioxidante (Ding et al., 1998, Farmand et al., 2005, Ni et al. de 2004, Vaziri et al., 1999). Entre as EROs, o peróxido de hidrogênio pode agir como um agente hiperpolarizante derivado do endotélio (Park et al., 2014).

Partindo da hipótese de que o peróxido de hidrogênio age sobre os anéis de aorta e induz uma resposta vasodilatadora no grupo exposto ao chumbo, incubamos os anéis de aorta com catalase (1000 U / mL), um varredor de peróxido de hidrogênio. A incubação com esta droga aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em aorta de ratos expostos ao chumbo, mas não afetou as respostas de aortas de ratos não expostos (Figura 14 A, B; Tabela 7).

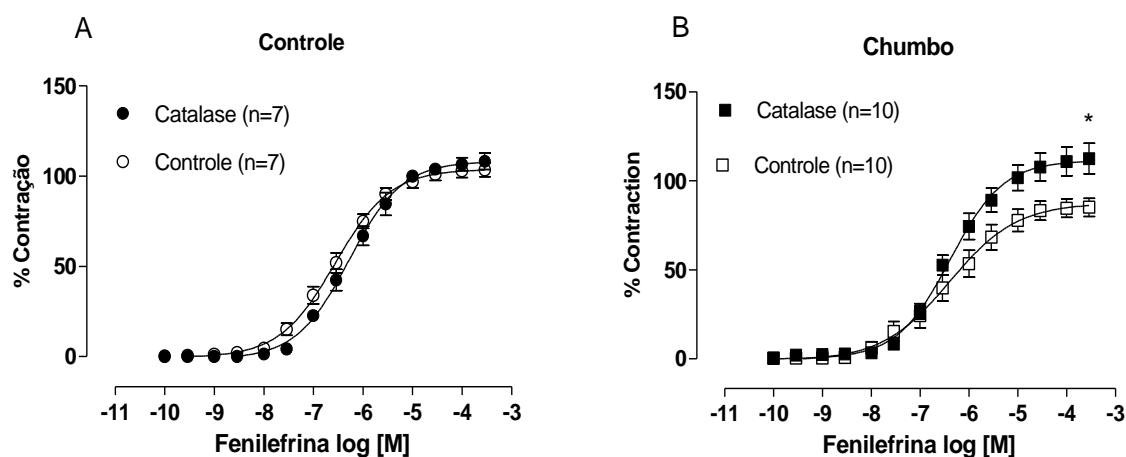


Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Catalase em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos grupos Ct/Ct-Catalase e Pb/Pb- Catalase. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Chumbo.

Tabela 7: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Catalase em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 2,05$	$6,56 \pm 0,05$
Controle Catalase	$108 \pm 2,19$	$6,28 \pm 0,05$
Chumbo	$87 \pm 4,12$	$6,39 \pm 0,12$
Chumbo Catalase	$111 \pm 3,50^{\#}$	$6,38 \pm 0,08$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, $^{\#}p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ de Chumbo.

5.7.2.2 Expressão Proteica da Catalase em Aorta de Ratos

A análise por Western blot da catalase foi realizada para determinar se o aumento do peróxido de hidrogénio era resultante da diminuição da expressão dessa enzima. No entanto, os nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos (Figura 15).

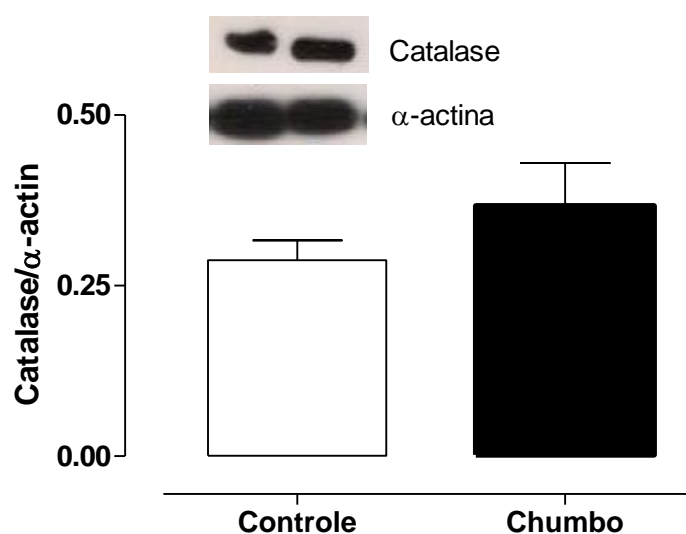


Figura 15: Resultados da expressão proteica da Catalase, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle (n= 7) e Chumbo (n= 7). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da Catalase e a α -actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da Catalase e da α -actina. Teste *t*-Student não pareado, * $p < 0,05$.

5.7.2.3 Ânions Superóxido e Superóxido Dismutase

O aumento da produção de peróxido de hidrogênio poderia ainda ser explicado por duas hipóteses: um aumento de substrato, ou um aumento de atividade enzimática. Para isso realizamos a incubação com a enzima superóxido dismutase (150 U / mL). A SOD causou redução na resposta máxima à fenilefrina nas artérias de ambos os grupos (Figura 16A, B; Tabela 8). No entanto, os valores de dAUC demonstraram que estes efeitos foram maiores em preparações de aortas de ratos expostos ao chumbo (Figura 16 C). Este resultado sugere as duas hipóteses seguintes: ou expressão de SOD é aumentada em animais expostos ao chumbo, ou os níveis de superóxido envolvidos na resposta contrátil à fenilefrina são maiores em preparações a partir de ratos expostos ao chumbo, que em preparações de ratos não expostos.

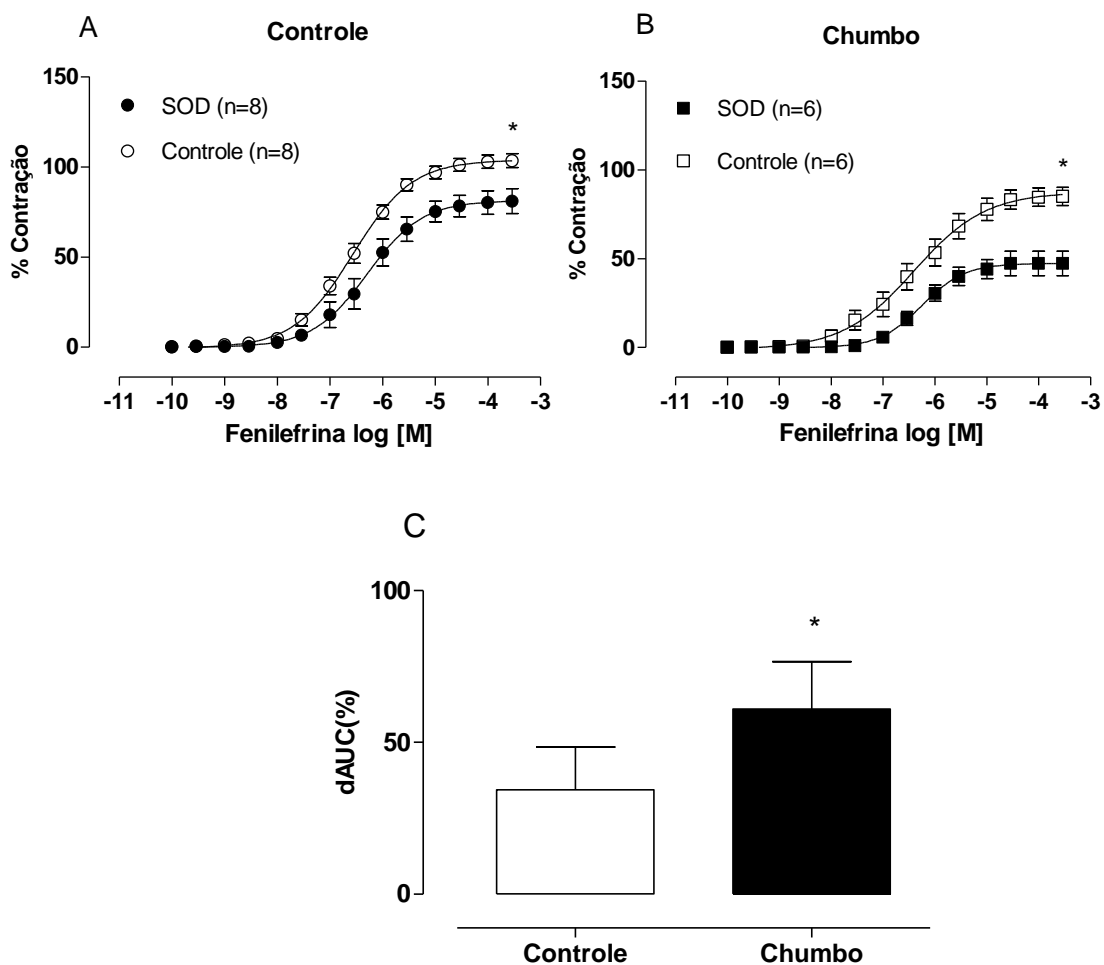


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da SOD em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de SOD (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-SOD e Pb/Pb-SOD. *p < 0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, *p < 0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.

Tabela 8: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da SOD em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle SOD	81 ± 3,36*	6,29 ± 0,10
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo SOD	47 ± 2,24 [#]	6,25 ± 0,11

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, **p*<0,05 vs R_{máx} de Controle, [#]*p*<0,05 vs R_{máx} de Chumbo.

5.7.2.4 Expressão Proteica e Atividade Funcional da Superóxido Dismutase

A fim de investigar se a expressão da SOD foi alterada em ratos expostos ao chumbo, realizamos análises de Western blot para quantificação desta enzima. As análises demonstraram um aumento da expressão proteica da SOD Cu / Zn (Figura 17).

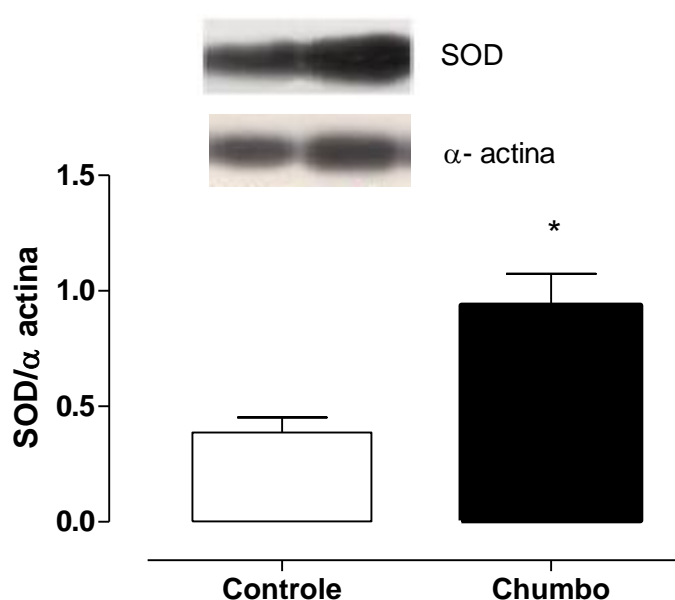


Figura 17: Resultados da expressão proteica da SOD, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle (n= 7) e Chumbo (n= 7). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da SOD e a α-actina. Os

resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da SOD e da α -actina. Teste *t*-Student não pareado, * $p < 0,05$.

Realizamos ainda a incubação com DETCA (0,5 mM), um inibidor da superóxido dismutase Cu / Zn. A incubação com o fármaco foi capaz de aumentar as respostas vasoconstritoras e a sensibilidade à fenilefrina em anéis de aorta de animais expostos ao chumbo, mas não no grupo controle (Figura 18; Tabela 9). Estes resultados sugerem que os níveis de ânion superóxido e a atividade SOD Cu / Zn endógena estão aumentados em animais expostos ao chumbo, o que pode estar contribuindo para o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio.

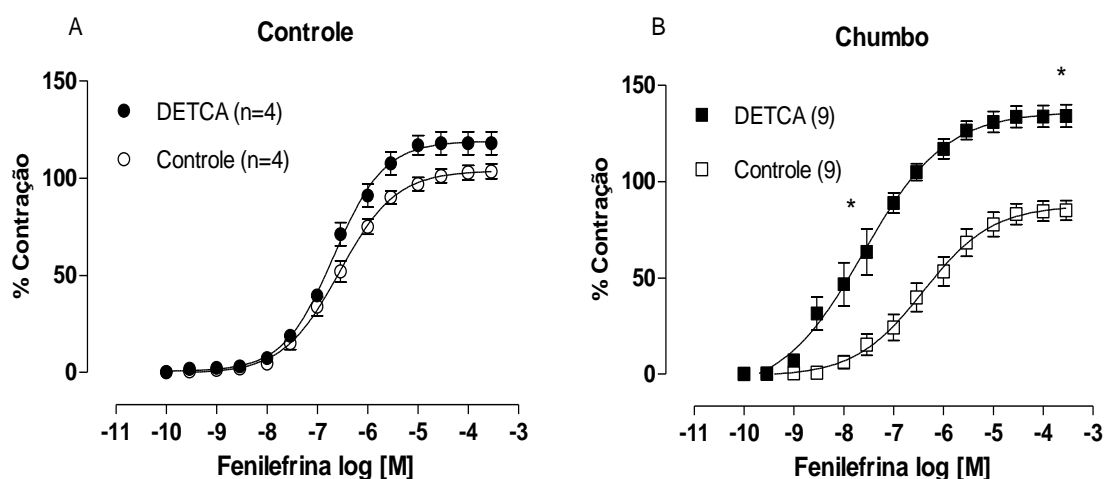


Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do DETCA em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-DETCA e Pb/Pb-DETCA. * $p < 0,05$ vs R_{máx} e pD₂ de Controle, * $p < 0,05$ vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.

Tabela 9: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do DETCA em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle DETCA	118 ± 1,97	6,67 ± 0,04
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo DETCA	136 ± 4,04 [#]	7,61 ± 0,13 [#]

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, [#]p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.

5.7.2.5 Participação da NAD(P)H oxidase

A fim de investigar se a NAD(P)H-oxidase está associada com o aumento dos níveis de superóxido nos animais expostos ao chumbo, utilizamos a apocinina (0,3 mM), um inibidor da NAD(P)H-oxidase. A apocinina reduziu a capacidade da resposta vasoconstrictora à fenilefrina no grupo controle, enquanto a resposta oposta foi observada nos animais expostos ao chumbo, o que sugere que esta via pode estar envolvida na produção de superóxido e a subsequente produção de peróxido de hidrogénio (Figura 19; Tabela 10).

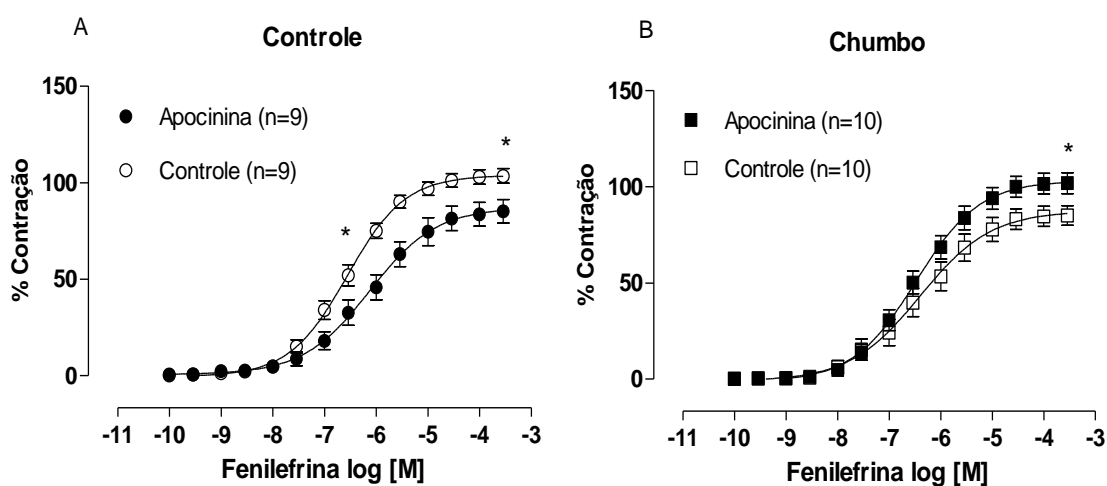


Figura 19: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Apocinina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo(B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste *t*-Student não pareado para análise da comparação entre R_{máx} e pD₂ dos grupos Ct/Ct-Apocinina e Pb/Pb-Apocinina. *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Chumbo.

Tabela 10: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da Apocinina em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle Apocinina	87 ± 4,13*	6,12 ± 0,11*
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo Apocinina	103 ± 3,07 [#]	6,47 ± 0,08

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, **p*<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, [#]*p*<0,05 vs R_{máx} de Chumbo.

5.8 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA

O relaxamento induzido pelo peróxido de hidrogênio envolve múltiplas vias, incluindo a hiperpolarização das células do músculo liso vascular através da ativação dos canais para potássio (Félétou, 2009). A fim de investigar o envolvimento de canais para potássio na resposta vasodilatadora à fenilefrina, utilizou-se TEA (2mM), um bloqueador não seletivo de canais para K⁺. O TEA potencializou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta de ambos os grupos (Figura 20 A, B), mas estes efeitos foram maiores em preparações a partir de ratos expostos ao chumbo, que em preparações de ratos não expostos, tal como é ilustrado pelos valores dAUC (Figura 20 C; Tabela 11).

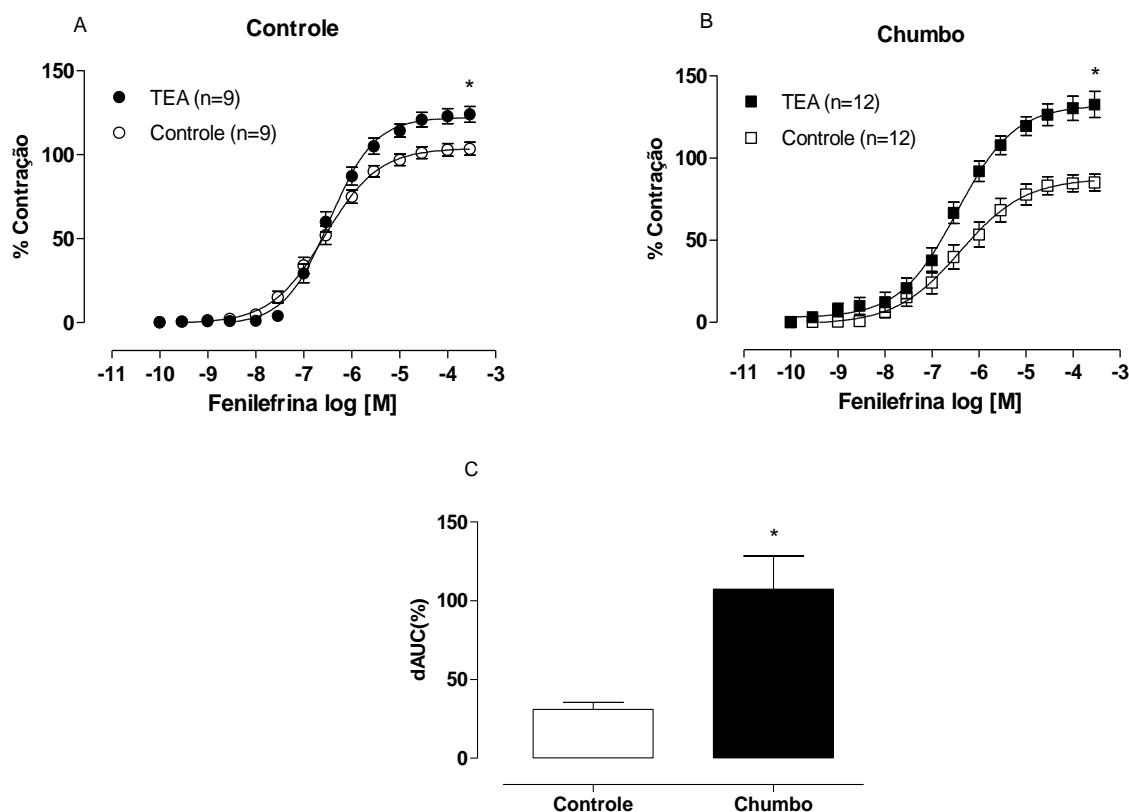


Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do TEA em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Chumbo (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não do TEA (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado para análise da comparação entre $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 dos grupos Ct/Ct-TEA e Pb/Pb-TEA. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Chumbo.

Tabela 11: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do TEA em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 2,05$	$6,56 \pm 0,05$
Controle TEA	$122 \pm 2,17^*$	$6,46 \pm 0,04$
Chumbo	$87 \pm 4,12$	$6,39 \pm 0,12$
Chumbo TEA	$132 \pm 4,08^\#$	$6,46 \pm 0,08$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ de Controle, $^\#p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ de Chumbo.

Para confirmar a nossa hipótese de que o peróxido de hidrogênio age sobre os canais para potássio e induz uma resposta vasodilatadora em animais expostos ao chumbo, incubamos catalase (1000 U / mL) com TEA (2mM). A co-incubação aboliu o efeito vasodilatador observado no grupo exposto ao chumbo fortalecendo a hipótese de ação do peróxido de hidrogênio via canais para potássio, neste modelo de exposição ao chumbo (Figura 21; Tabela 12).

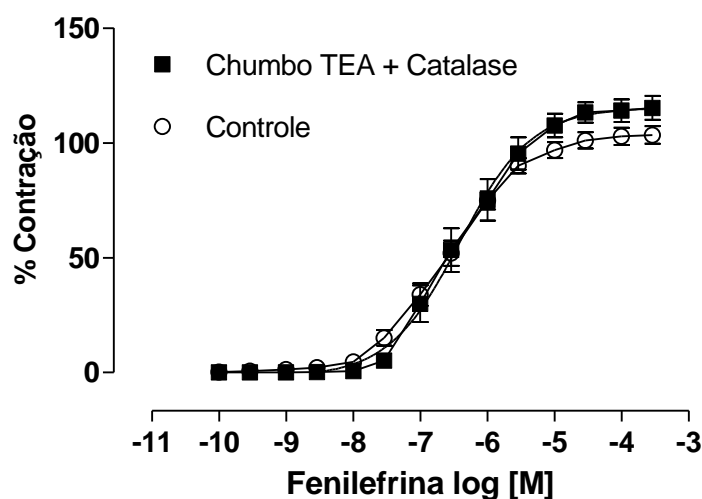


Figura 21: Curvas concentração-resposta à fenilefrina no grupo Controle e na presença de TEA + Catalase em anéis isolados de aorta de ratos do grupo Chumbo. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado, $p > 0,05$.

Tabela 12: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina no grupo Controle e na presença do TEA + Catalase em anéis aórticos obtidos do grupo Chumbo

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 2,05$	$6,56 \pm 0,05$
Chumbo TEA + Catalase	$115 \pm 3,23^*$	$6,41 \pm 0,07$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, $p > 0,05$.

Outras possíveis vias envolvidas com a resposta vasodilatadora observada no grupo chumbo e na produção das EROs foram investigadas e estão descritas a seguir:

5.9 PARTICIPAÇÃO DA XANTINA OXIDASE NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA

Além da NAD(P)H oxidase, outras vias podem estar envolvidas na produção de EROs, como o desacoplamento da cadeia de transporte mitocondrial e oxidação da xantina, pela xantina oxidase (Fridovich, 1970). Neste estudo, investigamos a participação da xantina oxidase na produção de EROs através da incubação com o bloqueador desta enzima, o alopurinol. O alopurinol provocou aumento semelhante na resposta máxima à fenilefrina em artérias de ambos os grupos experimentais, não apresentando diferenças nessas respostas (Tabela 13). Esse resultado indica que a xantina oxidase não está envolvida no aumento da produção de EROs provocado pela exposição a chumbo.

5.10 PARTICIPAÇÃO DA VIA DA CICLOXIGENASE NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA

A cicloxigenase desempenha um papel importante na produção de EROs em vários tipos celulares (Fruehauf et al., 2007; Ostuni et al., 2010). Em alguns estudos, tem sido descrita como um importante estímulo para NAD(P)H oxidase e consequente produção de EROs (Inoguchi et al., 2003). Para investigar a participação dos prostanóides derivados da COX na resposta vasodilatadora à fenilefrina nos animais expostos ao chumbo, realizamos a incubação com indometacina, um inibidor da cicloxigenase.

A indometacina reduziu a capacidade da resposta vasoconstrictora à fenilefrina no grupo controle, enquanto a resposta oposta foi observada nos animais expostos ao chumbo, o que sugere que esta via pode estar envolvida na ativação da NAD(P)H oxidase e consequente produção de peróxido de hidrogênio (Tabela 13).

5.11 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DA ANGIOTENSINA NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA

A angiotensina II é considerada como importante mediador do estresse oxidativo vascular, sendo esta uma potente ativadora da NAD(P)H oxidase, liberando radicais livres através de sua ação em receptores AT1 (Rajagopalan et al., 1996; Doughan et al., 2007; Qin et al., 2008; Garrido & Griendling, 2009). Neste protocolo investigamos a participação da Angiotensina II na produção de EROs decorrente da exposição de trinta dias ao acetato de chumbo. O losartan, um inibidor específico do receptor para Angiotensina II do subtipo AT1 foi usado em ratos controle e expostos ao chumbo.

O Losartan reduziu a capacidade da resposta vasoconstrictora à fenilefrina no grupo controle, enquanto a resposta oposta foi observada nos animais expostos ao chumbo, o que sugere que esta via também pode estar envolvida na ativação da NAD(P)H oxidase e consequente produção de peróxido de hidrogênio (Tabela 13).

Ao contrário dos receptores AT1 de angiotensina, os receptores AT2 induzem vasodilatação no leito arterial (Sanjuliani et al., 2011). Considerando que no grupo exposto ao chumbo houve uma diminuição da reatividade vascular, realizamos a incubação com o PD123319, um antagonista de receptores AT2 da angiotensina II. A incubação com o PD23319 provocou aumentos semelhantes na resposta máxima à fenilefrina em artérias de ambos os grupos experimentais, não apresentando diferenças nessas respostas. Isso indica que estes receptores não estão envolvidos na resposta vasodilatadora nos animais expostos ao chumbo (Tabela 13).

Tabela 13: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não do Alopurinol, Indometacina, Losartan e PD123319 em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Chumbo

	R _{máx} (%)	pD ₂
Alopurinol		
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle Alopurinol	98 ± 5,36	6,58 ± 0,08
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo Alopurinol	85 ± 4,86	6,47 ± 0,16
Indometacina		
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle Indometacina	83 ± 2,79*	6,89 ± 0,10
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo Indometacina	102 ± 4,25 [#]	6,61 ± 0,11
Losartan		
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle Losartan	89 ± 5,38*	6,57 ± 0,16
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo Losartan	101 ± 2,56 [#]	6,47 ± 0,06
PD 123319		
Controle	103 ± 2,05	6,56 ± 0,05
Controle PD 123319	104 ± 2,21	6,77 ± 0,06
Chumbo	87 ± 4,12	6,39 ± 0,12
Chumbo PD 123319	85 ± 1,45	6,75 ± 0,05

Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste *t*-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} de Controle, [#]p<0,05 vs R_{máx} de Chumbo.

5. 12 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram o envolvimento das EROs, mais especificamente do peróxido de hidrogênio, na resposta vasodilatadora induzida pela fenilefrina em animais expostos ao chumbo. Baseados nesses resultados, verificamos se o cotratamento com um antioxidante natural poderia reverter ou atenuar os efeitos produzidos pelo chumbo na reatividade vascular. Para realização

deste protocolo experimental tratamos um grupo de animais com chumbo (água de beber) e ácido ascórbico (intraperitoneal, 200mg/Kg/dia) durante trinta dias.

Nossos resultados demonstraram que o cotratamento com chumbo e ácido ascórbico foi capaz de reverter a reatividade vascular dos anéis de aorta para a situação controle (Figura 22). Corroborando com nossos achados de que as EROs estão envolvidas nas alterações vasculares provocadas pela exposição ao chumbo.

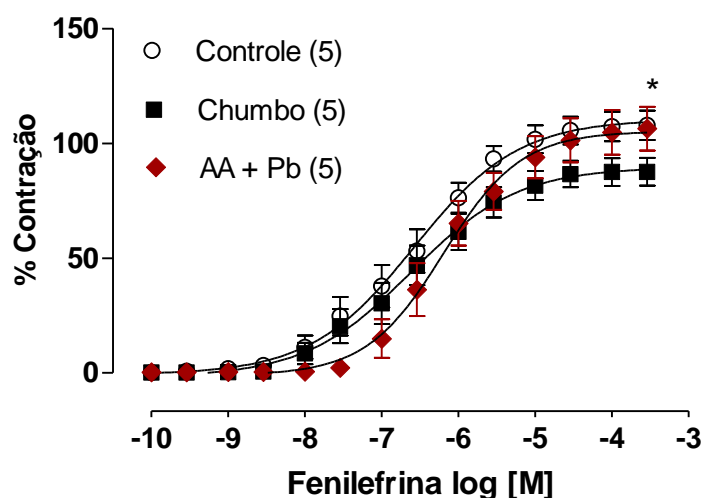


Figura 22: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos do grupo Chumbo, controle e chumbo (Pb) + ácido ascórbico (AA). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado, * $p < 0,05$ Rmáx de Chumbo vs Controle.

5.13 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICOS

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) foi alterado pela exposição ao chumbo, foi realizada a medida da produção de malondialdeído no plasma.

Como observado na Figura 23 os níveis de malondialdeído plasmáticos (Controle = $0,41 \pm 0,04$, $n = 7$; Chumbo = $0,36 \pm 0,03$, $n = 7$; $p > 0,05$) não foram alterados após a exposição ao chumbo (Figura 23).

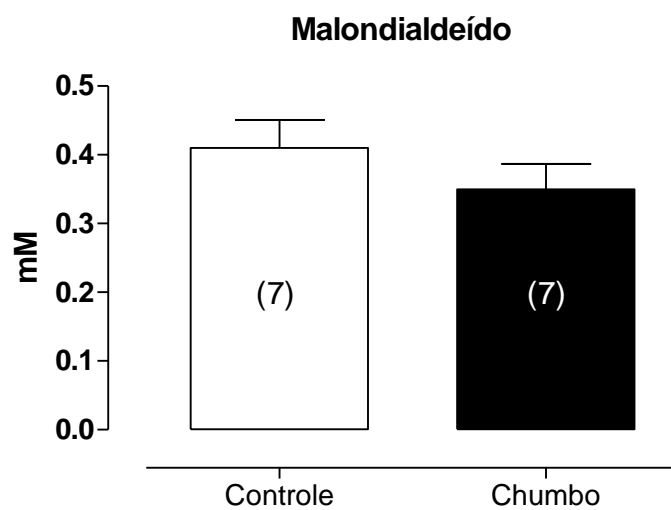


Figura 23: Medida da produção de MDA plasmática de ratos do grupo Controle e Chumbo. Dados estão expressos em média \pm EPM; Teste *t*-Student não pareado. $n = 7$ para grupo CT e Pb. $p > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo indica que o tratamento crônico com baixas concentrações de chumbo diminui a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta de ratos. Esta resposta é dependente do endotélio e é resultante do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e sua ação sobre os canais para potássio. Este resultado pode ser explicado pelo aumento da regulação compensatória da enzima superóxido dismutase (SOD), visualizado pelo aumento da expressão desta enzima, que catalisa a dismutação de superóxido aumentando assim a disponibilidade de peróxido de hidrogênio.

Embora tenha sido observado um aumento das espécies reativas do oxigênio provenientes da NAD(P)H oxidase, a exposição ao chumbo não alterou a produção de óxido nítrico, e não foram observadas alterações na peroxidação lipídica avaliada através das concentrações plasmáticas de malondialdeído. Porém o tratamento com o ácido ascórbico foi capaz de retornar a reatividade vascular à situação controle.

Ainda, o presente estudo demonstrou que apesar de ter sido encontrada uma diminuição na reatividade vascular, a exposição ao chumbo foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica. Esse resultado pode estar relacionado a um aumento da atividade simpática no animal in vivo. Estudos anteriores demonstraram que a exposição ao chumbo induz hiperatividade simpática, agindo sobre junções simpáticas centrais e periféricas, o que aumenta a capacidade de resposta do receptor alfa 2-adrenérgico, beta-adrenérgicos cardíacos e vasculares e receptores dopaminérgicos. Além disso, o tratamento com chumbo é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de noradrenalina e de adrenalina circulantes (Carmignani et al. 2000, e Boscolo & Carmignani, 1988).

6.1 MODELO DE TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO

O modelo de tratamento escolhido foi baseado em outras pesquisas de exposição ao acetato de chumbo (Boscolo; Carmignani, 1988; Heydari et al., 2006; Farmand et al., 2005; Karimi et al., 2002; Sharifi et al., 2004; Vaziri et al., 1999; Carmignani et al., 1999). Em nosso laboratório, foi desenvolvido estudo utilizando o mesmo modelo de tratamento de exposição ao chumbo que objetivou avaliar os efeitos diretos deste metal sob a contratilidade miocárdica. Esta pesquisa demonstrou alterações na

atividade contrátil dos animais expostos ao metal, assim como elevação da pressão arterial desde o sétimo dia de exposição (Fioresi et al., 2013).

A concentração sanguínea de chumbo no grupo tratado foi de aproximadamente 8 µg/dL, enquanto que os valores do grupo controle ficaram abaixo do limite de detecção do aparelho. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda como valor de referência uma concentração limite de chumbo no sangue de 60 µg/dL em ambientes com exposição ocupacional (Patrick, 2006, Kosnett et al., 2007).

No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora nº 7 (NR7) do Ministério do Trabalho (1988), atualizada em 2013, os valores de referência de normalidade, o qual apresenta valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo Permitido são respectivamente 40 µg/dL e 60 µg/dL.

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) considera as concentrações de chumbo no sangue superiores ou iguais a 30 µg/dL elevada em adultos, enquanto em crianças e lactentes são consideradas elevadas concentrações sanguíneas de chumbo superiores ou iguais a 10 µg/dL (Den Hond et al., 2002). No entanto, nosso estudo demonstrou que a exposição crônica a baixas concentrações de chumbo, resultou em concentração sanguínea inferior às consideradas seguras e que o chumbo nessas concentrações já é capaz de promover alterações cardiovasculares.

Pesquisas populacionais tem descrito concentrações sanguíneas de chumbo superiores à essas mencionadas e várias delas tem relacionado os níveis de chumbo à hipertensão arterial (Harlan, 1988; Glenn et al., 2003; Navas-Acien et al., 2007). Em estudo realizado no Alto Vale do Ribeira (SP-PR), um local que já foi cenário de intensa atividade de mineração e refino de metais, foi encontrada concentração sanguínea de chumbo próxima de 40µg/dL em crianças moradoras dessa região (Figueiredo, 2005). Em estudos com pessoas ocupacionalmente expostas foram encontradas concentrações sanguíneas de chumbo variando de 30 µg/dL a 60 µg/dL (Ehrlich et al., 1998; Bene et al., 2001).

6.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOB A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E MODULAÇÃO ENDOTELIAL

No presente estudo observamos uma redução na reatividade dos anéis de aorta à fenilefrina após 30 dias de exposição ao chumbo. A redução na reatividade vascular foi acompanhada por um aumento concomitante na modulação endotelial de tais respostas, ou seja, o endotélio estaria liberando um fator de relaxamento. O endotélio funciona como regulador do tônus vascular por liberar substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras. No entanto, em diversas condições patológicas, o equilíbrio na liberação dessas substâncias encontra-se alterado (Luscher et al., 1992; Triggle et al., 2003).

Vale ressaltar que a resposta ao cloreto de potássio (KCl) nesse estudo foi semelhante em ambos os grupos estudados. Concentrações aumentadas de K^+ no meio extracelular promovem despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Berridge et al., 2003). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase da cadeia leve da miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada, a miosina interage com os filamentos de actina, produzindo a contração (Somlyo & Somlyo, 2000). Esse achado reforça a afirmação de que a exposição por trinta dias a este metal promoveu alterações na participação do endotélio vascular sem alterar o músculo liso. Resultado semelhante ao nosso, foi encontrado em estudo no qual animais experimentais foram submetidos à sete dias de exposição ao chumbo por via intramuscular. O tratamento foi capaz de promover diminuição da reatividade vascular, no entanto este resultado foi associado ao aumento da biodisponibilidade de NO e sua ação nos canais para potássio (Fiorim et al., 2011).

Em contrapartida, outros estudos que avaliaram a reatividade vascular de aortas na exposição ao chumbo, demonstraram que esse metal é capaz de aumentar a resposta vasoconstrictora à fenilefrina. Esses autores têm associado esses resultados ao aumento da participação do sistema renina angiotensina, dos prostanoídes da via da cicloxigenase e ao estresse oxidativo, seguido da diminuição da biodisponibilidade de NO (Heydari et al., 2006; Silveira et al., 2014; Skoczynska et al., 1986).

Provavelmente a divergência entre esses resultados está associada a diferença nos modelos de exposição, vias de administração do chumbo, concentração sanguínea do metal e tempo de exposição.

6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

A partir do resultado descrito acima, no qual há diminuição da reatividade à FE por um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado como o chumbo alterava o relaxamento vascular dependente do endotélio. Para isto, foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina. A acetilcolina liga-se ao receptor muscarínico (M2) levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, o qual ativa a formação e liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO se difunde para o músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) promovendo o aumento da concentração intracelular de GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, culminando com o relaxamento do vaso por hiperpolarização do músculo liso vascular (Rattmman, 2009). Neste estudo nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Chumbo foi observada. Isto sugere que a vasodilatação dependente do endotélio está preservada, ou seja, não alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Resultado semelhante foi encontrado por Fiorim e colaboradores (2011), em cujo trabalho a exposição ao chumbo por sete dias não alterou o relaxamento dependente do endotélio, apesar de ter alterado a reatividade vascular. Em contrapartida Silveira e colaboradores (2010) encontraram prejuízos na resposta vasodilatadora à acetilcolina após a perfusão do leito caudal de ratos, com 100µM de acetato de chumbo.

Zhang e colaboradores (2007) também não encontraram alterações significantes no relaxamento induzido pela ACh em anéis de aorta que foram incubados in vitro com 1ppm de acetato de chumbo por 0,5, 6 e 12 horas. Entretanto, depois da incubação por 24 horas com chumbo, o relaxamento induzido pela ACh foi alterado.

O nitroprussiato de sódio foi utilizado para avaliar se o tratamento com chumbo prejudica o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela doação direta de NO. O NPS promoveu resposta vasodilatadora, concentração dependente, semelhante em ambos os grupos experimentais sugerindo que a exposição por trinta dias ao acetato de chumbo não modificou a capacidade de relaxamento do músculo

liso vascular. Vários estudos encontraram resultados semelhantes ao nosso (Silveira et al., 2010; Grizzo et al., 2008; Fiorim et al., 2011; Zhang et al., 2007). Entretanto Marques e colaboradores (2001) observaram prejuízo na resposta vasodilatadora induzida pelo NPS na exposição de trinta dias ao chumbo, que poderia estar associada a uma diminuição da expressão da guanilato ciclase encontrada nesse estudo.

Esses resultados nos sugerem que o relaxamento induzido pela ACh e pelo NPS parecem ser dependentes do tempo de exposição e das concentrações do metal em que os animais são expostos. Embora a exposição ao chumbo não tenha promovido alterações nas respostas vasodilatadoras induzidas pela ACh e pelo NPS, como mencionado anteriormente, foi observado uma diminuição da reatividade vascular à fenilefrina. Os mecanismos pelo qual o chumbo altera a reatividade vascular à fenilefrina ainda não foram elucidados. Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que poderiam esclarecer a ação vascular desse metal em anéis de aorta de ratos.

6.4 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CHUMBO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

6.4.1 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico

Partindo do resultado em que obtivemos um aumento na resposta vasodilatadora à fenilefrina, iniciamos nossas investigações pela via do NO, principal fator vasorelaxante produzido pelo endotélio. Observamos que o L-NAME, um inibidor da NOS, aumentou a reatividade vascular à fenilefrina em ambos os grupos experimentais. No entanto, os valores obtidos pela dAUC demonstraram que o papel desempenhado pelo óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina não diferiu entre os grupos.

Corroborando com os nossos resultados, Karimi et al., (2002), não evidenciaram diferenças na sensibilidade e na resposta máxima a FE nos anéis de aorta de ratos expostos por 28 dias com 100 ppm de chumbo e incubados com L-NAME, quando comparados ao seu respectivo grupo controle.

Vários estudos têm sugerido que a exposição ao chumbo aumenta a biodisponibilidade de NO (Fiorim et al., 2011, Silveira et al., 2010), o que contribuiu para a redução na reatividade à fenilefrina em anéis de aorta. Estes resultados foram associados com um aumento da expressão proteica da iNOS e aumento da fosforilação da eNOS no resíduo de Ser1177, o principal regulador da produção de NO (Dimmeler et al. De 1999, McCabe et al. De 2000, Fiorim et al., 2011). O aumento do NO pode abrir os canais para K^+ e contribuir para o aumento da modulação negativa da contração induzida pela fenilefrina (Félétou, 2009). O NO também ativa indiretamente canais BKCa, impedindo a formação de um inibidor endógeno destes canais (Alonso-Galicia et al. 1997, Sun et al., 1998).

Por outro lado, outros estudos demonstraram uma diminuição na biodisponibilidade de NO (Silveira et al., 2014; Vaziriel al., 1997, 1999, 2003), e associaram este resultado a um aumento da produção de radicais livres (Silveira et al., 2014).

Baseado na diminuição da reatividade vascular à fenilefrina sem alteração da biodisponibilidade de NO apresentado neste estudo após a exposição por trinta dias ao acetato de chumbo, investigamos se as alterações vasculares encontradas estão associadas a outros fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio. Continuamos nossa investigação analisando a via do estresse oxidativo, mais especificamente a participação do peróxido de hidrogênio.

6.4.2 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via do estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio contribuem para a patogênese de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e diabetes mellitus. O estresse oxidativo é resultado da produção excessiva de ROS que ultrapassa o sistema antioxidante. Vários agonistas, condições patológicas e intervenções terapêuticas conduzem a expressão e função de modulação de enzimas oxidantes e antioxidantes, incluindo a NADPH oxidase, óxido nítrico sintetase endotelial, xantina oxidase, mieloperoxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Yung et al., 2006).

As EROs contribuem para a disfunção vascular e a remodelação através do dano oxidativo por (1) redução da biodisponibilidade do NO, (2) alterações na

vasodilatação e no crescimento de células endoteliais, (3) apoptose (4) estímulo a migração de células endoteliais (5) ativação de moléculas de adesão e reação inflamatória, levando à disfunção endotelial (Yung et al., 2006).

Numerosos estudos associaram as alterações cardiovasculares do chumbo com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (Piccini et al., 1977). Nesse contexto, o peróxido de hidrogênio é capaz de promover hiperpolarizações das células do músculo liso por ativação direta dos canais para potássio ou por estimulação da guanilato ciclase solúvel (Félétou, 2009). O peróxido de hidrogênio é produzido em células endoteliais e do músculo liso a partir do ânion superóxido, principalmente pela superóxido dismutase (Ellis e Despoletou, 2003) e é convertido em água e oxigênio molecular pela catalase (Vaziriet al., 2003). Dependendo do vaso sanguíneo, da presença de endotélio, das condições experimentais e das concentrações estudadas, o H_2O_2 exerce efeito dilatador ou constritor (Félétou, 2009).

Desse modo, verificamos se a exposição ao chumbo teria aumentado a produção de peróxido de hidrogênio, através da incubação com a catalase. A incubação com este fármaco aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em aortas de ratos expostos ao chumbo, mas não aumentou a resposta em aortas de ratos não expostos, o que sugere aumento da concentração de peróxido de hidrogênio em animais expostos ao metal. Ademais, alterações na expressão proteica da catalase poderiam explicar o aumento do peróxido de hidrogênio encontrado neste estudo. No entanto, nenhuma diferença na expressão desta enzima foi encontrada.

Fisiologicamente, dentre as EROs, o peróxido de hidrogênio é a molécula mais apropriada para a função de sinalização celular, devido ao maior tempo de meia vida, à maior estabilidade e maior capacidade de difundir-se livremente através das membranas celulares (Andrade, 2013). Dois radicais superóxido formam o peróxido de hidrogênio por conversão espontânea ou enzimática. No compartimento celular, é no peroxissomo onde há grande produção de peróxido de hidrogênio (Ribeiro et al., 2005).

Vários estudos têm demonstrado que a toxicidade cardiovascular mediada pela exposição ao chumbo está fortemente associado ao estresse oxidativo induzido pelo

aumento da produção de EROs (Silveira et al. 2014, Khalil-Manesh et al, 1993, Vaziri et al., 1997), indicando que este estado oxidante desempenha um importante papel na disfunção endotelial, que está intimamente associado ao surgimento de doenças cardiovasculares (Vaziri et al., 2003). O estresse oxidativo pode ocorrer como resultado do aumento da produção de radicais livres e/ou por diminuição dos mecanismos antioxidantes (Weseler e Bast, 2010).

Visto que não encontramos alterações na expressão proteica da catalase, o aumento da produção de peróxido de hidrogênio poderia ainda ser explicado por uma elevação da expressão ou atividade da superóxido dismutase. Realizamos então a incubação com a SOD e observamos uma redução significativa na reatividade vascular de anéis de aorta de animais tratados com chumbo na presença deste fármaco, o que nos levou a pensar em duas hipóteses: poderia haver um aumento de substrato (aumento da produção de superóxido) ou maior atividade dessa enzima.

Uma das hipóteses foi confirmada pelo aumento na expressão proteica da SOD Cu/Zn e um aumento da atividade da SOD, o qual foi detectado por meio da incubação com DETCA, um inibidor desta enzima.

O aumento da produção de radicais livres (Vaziri et al., 2001), bem como a depleção (Patrick, 2006) e/ou aumento da regulação das enzimas antioxidantes (Farmand et al., 2005), também foram relatados em outros estudos. Farmand e colaboradores (2005) demonstraram que os animais expostos ao chumbo exibiram um aumento da atividade de várias enzimas antioxidantes como uma resposta compensatória à exposição ao chumbo. No entanto, outras enzimas não tiveram a mesma resposta frente ao estresse oxidativo, sugerindo um desequilíbrio oxidativo (Farmand et al., 2005).

O chumbo é descrito como um indutor da produção de radicais livres (Patrick, 2006). Vários estudos epidemiológicos envolvendo trabalhadores expostos ao chumbo relataram uma relação entre a exposição ao metal e aumento de marcadores do estresse oxidativo (Costa et al., 1997, Gurer-Orhan et al., 2004).

Estudo recente de nosso laboratório observou maior produção de ânion superóxido em anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo (Silveira et al., 2014). Além disso, o

bloqueio da produção do ânion superóxido pela apocinina é capaz de provocar redução na reatividade à fenilefrina. Estes resultados sugerem que NAD(P)H oxidase é também um local de ação do chumbo levando a um aumento da geração de radicais livres (Vassallo et al., 2011).

Ao contrário da resposta comumente esperada, neste estudo foi observado um aumento na resposta vasoconstritora em anéis incubados com apocinina no grupo exposto ao chumbo, o que sugere que a NAD(P)H-oxidase possivelmente está envolvida na produção de superóxido e a subsequente produção de peróxido de hidrogênio. De modo que ao bloquearmos esta enzima, bloquearíamos a produção de um vasodilatador. Esse resultado nos sugere também que há um aumento na produção de superóxido, o que confirma nossa hipótese de que haveria um aumento de substrato no grupo de animais expostos ao chumbo.

Outros estudos relataram aumentos transitórios na produção de superóxido, seguido por aumentos na produção de peróxido de hidrogênio em cultura de células endoteliais coronárias humanas e células do músculo liso vascular após 60 h de exposição ao acetato de chumbo (1 ppm). Esta resposta foi acompanhada por um aumento compensatório na expressão da proteína SOD Cu/Zn nas mesmas células. A exposição ao chumbo a um período curto de tempo resultou em elevações significativas de superóxido e peróxido de hidrogênio, enquanto que a exposição crônica ao chumbo resultou na elevação de peróxido de hidrogênio, mas não de superóxido (Ni et al., 2004).

Até então, demonstramos no presente estudo uma diminuição da reatividade vascular provocada pela exposição ao chumbo, caracterizada por um estado de estresse oxidativo, onde há um aumento da produção de peróxido de hidrogênio resultante de uma maior atividade da SOD e ação dismutadora sob o ânion superóxido proveniente da NAD(P)H oxidase. Com base nos nossos achados, e sabendo da ação vasodilatadora do peróxido de hidrogênio nos canais para potássio do músculo liso vascular, iniciamos a investigação da participação desses canais na resposta vasodilatadora.

6.4.3 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo nos canais para potássio

Os canais para potássio em células musculares lisas arteriais são importantes moduladores do diâmetro do vaso sanguíneo. A abertura de canais para K^+ na membrana celular do músculo liso arterial aumenta o efluxo de K^+ , o que provoca a hiperpolarização do potencial de membrana. Isto fecha os canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, os quais diminuem a entrada de Ca^{2+} e conduzem à vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995).

Nós demonstramos que o TEA, um bloqueador não específico de canais para K^+ , potencializou a resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ambos os grupos, mas estes efeitos foram maiores em preparações de ratos expostos ao chumbo do que em preparações de ratos não expostos. Além disso, a co-incubação TEA-catalase aboliu o efeito vasodilatador nas aortas de animais expostos ao chumbo, o que sugere que o peróxido de hidrogênio esteja atuando sobre esses canais.

Em arteríolas coronárias humanas e em cultura de células endoteliais humanas, o peróxido de hidrogênio atua como um fator chave hiperpolarizante derivado do endotélio e medeia a dilatação induzida por fluxo através de um mecanismo envolvendo a dimerização e a proteína de ativação da proteína quinase G (PKG) α , bem como a abertura subsequente dos canais BK_{Ca} no músculo liso (Zhang et al. de 2012, Dong et al., 2008). No entanto, algumas questões permanecem sem respostas. Não se sabe se o peróxido de hidrogênio é um fator difusível que ativa os canais para potássio em células musculares lisas ou um mensageiro intracelular envolvido na ativação dos canais para potássio (Félétou, 2009).

A fim de investigar possíveis participações de outras vias envolvidas na produção das EROs e na resposta vasodilatadora, continuamos a realização de nossos protocolos experimentais. A participação da xantina oxidase, cicloxigenase e sistema renina angiotensina foram investigados e serão discutidos a seguir.

6.4.4 Efeito da exposição por trinta dias ao acetato de chumbo na via da xantina oxidase, cicloxigenase e sistema renina angiotensina.

6.4.4.1 Xantina Oxidase

Neste estudo investigamos o papel da xantina oxidase na produção de EROs através da incubação dos anéis de aorta com o alopurinol, e demonstramos que esta

enzima parece não ter participação significativa no estado de estresse oxidativo produzido nos animais expostos ao chumbo.

Um estudo envolvendo pessoas ocupacionalmente expostas ao chumbo correlacionou os níveis de toxicidade ao metal com a atividade da xantina oxidase, e demonstrou que a atividade dessa enzima era significativamente elevada em pessoas expostas (Kasperczyk et al., 2013). Ariza e colaboradores, (1998) expuseram hamsters à baixas concentrações de chumbo e encontraram as atividades das xantina oxidase e da SOD Cu/Zn aumentadas. Além disso demonstraram que há uma relação de causalidade entre a indução da produção de H_2O_2 por esse metal e mutagênese.

6.4.4.2 Cicloxigenase

Os metabólitos da ciclooxigenase modulam alguns efeitos no sistema vascular como: vasodilatação (prostaciclina) e vasoconstrição (PGH₂ e TXA₂) (Karimi et al., 2002; Antman et al., 2005). Além disso, estudos descreveram que os prostanóides derivados da ciclooxigenase podem estimular a NAD(P)H oxidase e conseqüentemente induzir a produção de EROs (Inoguchi et al., 2003).

Neste estudo investigamos a participação desta via na resposta vasodilatadora induzida pela fenilefrina em aorta de ratos, e interessantemente encontramos uma resposta semelhante à encontrada com a incubação com apocinina nos animais expostos ao chumbo. A incubação com indometacina promoveu um aumento da reatividade vascular no grupo de animais tratados com o metal, o que nos sugere que essa via esteja estimulando a NAD(P)H oxidase, e quando bloqueada promove a inibição ou diminuição da liberação de um fator vasodilatador.

Em estudo do nosso laboratório no qual os animais foram submetidos a sete dias de exposição ao chumbo, não foi encontrado envolvimento dos derivados do ácido araquidônico nas respostas vasculares induzidas pela fenilefrina (Fiorim et al., 2011). Em contrapartida, em estudo no qual os animais foram submetidos a trinta dias de exposição ao chumbo por via intramuscular foi observada redução da resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina após o bloqueio da COX com indometacina, sugerindo uma participação dos prostanóides vasoconstrictores derivados do ácido araquidônico nos efeitos vasculares induzidos pela exposição ao

chumbo (Silveira et al., 2014). Em adição, Courtois et al., (2003) registraram aumento da expressão da isoforma da COX-2 em anéis de aorta perfundidos com chumbo. Grizzo et al., (2008), demonstraram que a incubação com indometacina em anéis expostos ao chumbo causou diminuição na sensibilidade, mas não alterou a resposta máxima.

6.4.4.3 Sistema renina angiotensina

Do mesmo modo que as incubações com apocinina e indometacina aumentaram a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em animais expostos ao chumbo, o bloqueio dos receptores AT1 com losartan potencializou a resposta vasoconstrictora nos anéis de aorta dos animais expostos a este metal.

Do mesmo modo sugerimos que o bloqueio deste receptor iniba ou diminua a produção de EROs pela NAD(P)H oxidase e conseqüente diminuição da liberação do peróxido de hidrogênio, já que o estímulo dos receptores AT1 pela angiotensina II é considerado um importante fator desencadeador do estresse oxidativo vascular pela estimulação da NAD(P)H oxidase. (Rajagopalan et al., 1996; Doughan et al., 2007; Qin et al., 2008; Garrido & Griendling, 2009).

Estudos tem demonstrado que o aumento da liberação de angiotensina II local e dos prostanóides vasoconstrictores potencializam a liberação de EROs em aorta de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SRH) (Alvarez et al., 2005). Em adição, Griendling et al., (2000), documentaram que a angiotensina II foi capaz de aumentar as espécies reativas de oxigênio derivadas da NAD(P)H oxidase.

Uma pesquisa realizada com sete dias de exposição ao chumbo, por via intramuscular, sugere aumento da atuação da angiotensina II em receptores AT1. Esse resultado não foi relacionado a um aumento dos receptores, e sim a um aumento da atividade da ECA plasmática e conseqüente aumento dos níveis de angiotensina II nos animais tratados com chumbo. Somam-se a esses achados uma correlação positiva entre o aumento da atividade da ECA e o aumento da PAS, sugerindo que o sistema renina angiotensina seja o mediador das alterações da pressão arterial (Fiorim, 2011).

A angiotensina II exerce numerosos efeitos no sistema cardiovascular, entre eles: vasoconstrição, crescimento de células do músculo liso celular, hipertrofia miocárdica, fibrose, disfunção endotelial e inflamação vascular (Rajagopalan et al., 1996). Além disso, a angiotensina II contribui para hipertensão arterial via seu efeito central, vascular e renal.

Significante redução na resposta vasoconstrictora à fenilefrina foi observada após a incubação com inibidores da ECA e de receptores AT1 em animais tratados com chumbo por trinta dias por via intramuscular. Esse estudo demonstrou ainda aumento da expressão de receptores AT1 e da atividade da ECA plasmática (Silveira et al., 2014).

Em virtude da resposta vasodilatadora encontrada nesse estudo, investigamos ainda a participação dos receptores AT2 nessa resposta. Porém nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos quando utilizamos o inibidor deste receptor.

A ligação da angiotensina II aos receptores AT2 induzem vasodilatação, efeitos antiproliferativos e apoptose. Uma das principais vias de ativação desses receptores é a das proteínas tirosinas fosfatases, além disso, a interação com esse receptor ativa a via de produção do NO e GMPc que estão envolvidos no processo de relaxamento do ML (Sepulveda, 2009).

6.5 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA DE RATOS EXPOSTOS AO CHUMBO

Nesse estudo demonstramos que o cotratamento com ácido ascórbico foi capaz de reverter a reatividade vascular dos anéis de aorta para a situação controle dos animais tratados com chumbo.

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é conhecido por realizar diversas funções importantes no leito vascular envolvendo as células endoteliais. Estas funções incluem o aumento da síntese e deposição de colágeno tipo IV na membrana basal, estímulo à proliferação de células endoteliais e inibição da apoptose, eliminação de

espécies radicais livres, e aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico para auxiliar a modulação do fluxo de sanguíneo (May & Harrison, 2013).

Uma das principais propriedades do ácido ascórbico é a sua capacidade de agir como um agente redutor (doador de elétrons), tornando-o capaz de reduzir alguns compostos em oxigênio molecular (Talebianet al., 2014). Essa característica pode explicar sua atuação na eliminação das EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio.

Os efeitos benéficos do ácido ascórbico na exposição ao chumbo têm sido descritos por vários autores (Bashandy, 2006; Farmand et al., 2005; Marques et al., 2001; Attri et al., 2003). Attri e colaboradores (2003) realizaram o tratamento com ácido ascórbico em animais expostos ao chumbo e observaram uma reversão do aumento de pressão arterial induzida pelo chumbo, normalização dos níveis de NO e interrupção da peroxidação lipídica. Do mesmo modo, Marques e colaboradores (2001) demonstraram que o cotratamento do chumbo com o ácido ascórbico reduziu a pressão arterial, melhorou o relaxamento induzido pela ACh e NPS e restaurou a expressão da sintase endotelial de NO e da GCs na parede vascular.

6.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO ACETATO DE CHUMBO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICO

Sabendo que a peroxidação lipídica é frequentemente associada ao aumento das EROs, o presente estudo avaliou o efeito da exposição ao chumbo sobre os níveis de MDA no plasma. Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de MDA plasmáticos após trinta dias de exposição ao chumbo.

Kasperczyk e colaboradores (2013) avaliaram a concentração de malondialdeído em trabalhadores expostos ao chumbo e demonstraram que os níveis de MDA em pessoas expostas era significativamente elevadas.

O processo de peroxidação lipídica consiste em uma cascata de reações resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando malondialdeído (MDA), de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados. Este processo acarreta em destruição de sua estrutura, falências dos

mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, morte celular (Benzie, 1996).

6.7 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

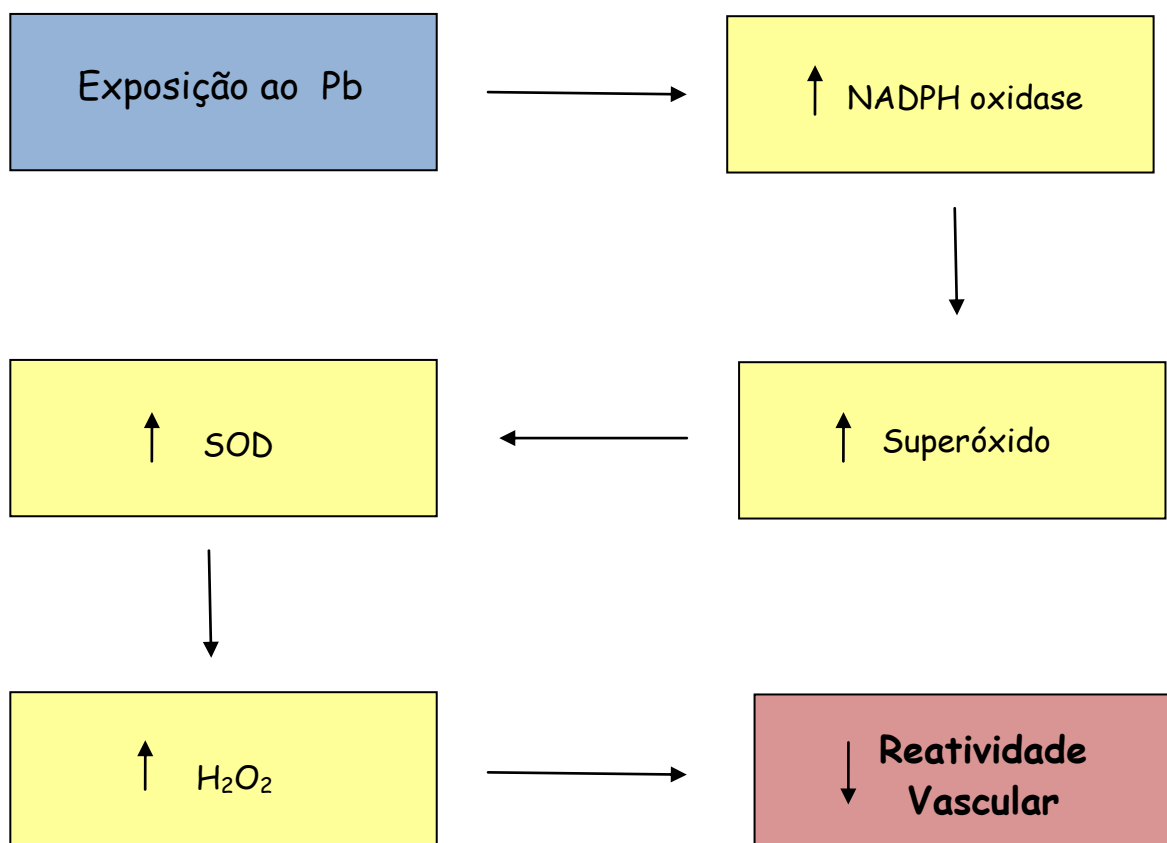


Figura 24: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. A exposição ao chumbo foi capaz de aumentar a produção de superóxido pela NAD(P)H oxidase e desencadear um aumento compensatório da atividade da SOD. O aumento da atividade dessa enzima elevou a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que foi o responsável pela diminuição da reatividade vascular.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que concentrações de chumbo no sangue de 8 µg / dL, que estão abaixo dos valores estabelecidos pela legislação internacional, foi capaz de aumentar a pressão arterial e diminuir a reatividade vascular induzida pela fenilefrina. Esta resposta é dependente do endotélio e é resultante do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e sua ação sobre os canais para potássio. Este resultado pode ser explicado pelo aumento da regulação compensatória da enzima superóxido dismutase (SOD), visualizado pelo aumento da expressão desta enzima, que catalisa a dismutação de superóxido e aumenta os níveis de peróxido de hidrogênio. Além disso os efeitos vasculares foram em parte revertidos com o tratamento com o antioxidante ácido ascórbico. Estes resultados demonstraram que baixas concentrações de chumbo são um importante fator de risco para doenças cardiovasculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Galicia, M., Drummond, H.A., Reddy, K.K., Falck, J.R., Roman, R.J., 1997. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension*. 29: 320-325.

Alvarez, Y., Briones, A.M., Balfagon, G., Alonso, M.J., Salaceis, M., 2005. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *Journal of Hypertension*. 23(4):767-777.

Andrade, C.A., 2013. O papel do peróxido de hidrogênio na tolerância de soja ao alagamento. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras – MG.

Angeli, J.K., 2009. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 113f. Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Antman, E.M., DeMets, D., Loscalzo, J., 2005. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*. 112, 759-770.

ANVISA. Certificado Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/centros/nacionais/certificacoes.asp#mg3>>. Acesso em: 04 de abril de 2014.

Ariza, M.E., Bijur, GN., Williams, M.V., 1998. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environ Mol Mutagen*. 31(4):352-361

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

Attria, J., Dhawana, V., Mahmooda, S., Pandhia, P.H.K. Natha, P.R., 2003. Effect of Vitamin C Supplementation on Oxidative DNA Damage in an Experimental Model of Lead-Induced Hypertension. *Ann Nutr Metab*. 47, 294–301.

Bashandy, S.A.E., 2010. Beneficial Effect of Combined Administration of Vitamin C and Vitamin E in Amelioration of Chronic Lead Hepatotoxicity. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 23, 371 – 384.

Batlouni, M., 2001. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 8, 328-338.

Bene, A., Obineche, E., Gillet, M., Pasha, M.A.H., Bishawi, B., 2001. Association between blood levels of lead, blood pressure, and risk of diabetes and heart disease in workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 74, 375- 378.

Beny, J.L., Brunet, P.C., 1988. Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine. *J Physiol (London)*. 398, 277–289.

Benzie, I.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 47, 233–261.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4, 517–529.

Boscolo, P., Carmingnani, M., 1988. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environmental Health Perspectives*. 78, 101-109.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Brasil., 2009. Ministério de minas e energia. Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral-SGM. Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano duodecenal (2010 - 2030) de geologia, mineração e transformação mineral.

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

Brasil., 2008. Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008. Fixa o limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar,

vernizes e materiais similares e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.

Brasil., 2013. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. Disponível: <<http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSeção=68&IDPagina=316>>.

Brasil. Ministério da Saúde., 2006. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

Brito, A.A.S., 2010. Os Materiais na História da Escrita (das placas de argila da Suméria às pastilhas de silício dos processadores atuais). 3^o Parte - Novas formas, instrumentos, técnicas e materiais de escrita, nos tempos modernos. C.Tecn. Mat. 22, 1-2.

Buñang R.D., 1973. Validation in a awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. Journal Applied Physiology. 34(2): 279-282.

Cai, H., Harrinson, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. Circulation Research. 87, 840-844.

Capitani, E.M., Paoliello, M.M.B., Almeida, G.R.C., 2009. Simpósio: Chumbo e Saúde Humana. Fontes de Exposição humana ao chumbo no Brasil. Medicina (Ribeirão Preto). 42, 311-318.

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

Carmingnani, M., Boscolo, P., Poma, A., Volpe, A.R., 1999. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. Immunopharmacology. 44(1-2), 105-110.

Carvalho, M.H.C., Nigro, D., Lemos, V.S., Tostes, R.C.A., Fortes, Z.B., 2001. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens. 8(1).

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) *Am J Cardiol.* 82, 594–599.

Cogolludo, A., Moreno, L., Bosca, L., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F., 2003. Thromboxane A₂-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C zeta. *Circ Res.* 93, 656–663.

Cordeiro, R., Lima Filho, E.C., Salgado, P.E.T., 1996. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue I: Neuropatia periférica. *Revista de Saúde Pública.* 30, 248-255.

Costa, C.A., Trivelato, G.C., Pinto, A.M., Bechara, E.J., 1997. Correlation between plasma 5 aminolevulinic acid concentrations and indicator of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem.* 43(7): 1196-1202.

Courtois, E., Marques, M., Barrientos, A., Casado, S., Lopes-Farre, A., 2003. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journal of the American Society of Nephrology.* 14, 1464-1470.

Cowan, C.L., Cohen, R.A., 1991. Two mechanisms mediate by bradykinin of pig coronary artery: NO dependent and independent responses. *Am J Physiol.* 261: H830–H835.

Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveirados-Santos, A.J., Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappel, M.C., Barkx, H., Yagil, Y., Penninger, J.M., 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 417, 822-828.

Den Hond, E., Nawrot, T., Staessen, J. A., 2002. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III National Health and Nutritional Examination Survey. *J. Hum. Hypertens.* 16, 563-568.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., et al., 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 399, 601-605.

Ding, Y., Vaziri, N.D., Gonick, H., 1998. Lead-induced hypertension. II response to sequential infusion of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environmental Research*. 76, 107-113.

Dong, D.L., Yue, P., Yang, B.F., Wang, W.H., 2008. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺-activated big-conductance K channels (BK) through cGMP signaling pathway in cultured human endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 22(1-4):119-126.

Doughan, A., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2008. Molecular Mechanisms of Angiotensin II Mediated Mitochondrial Dysfunction. *Circulation Research*. 102, 488-496.

Dusse, L.M.S., Vieira, L.M., Carvalho, M.G., 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39(4), 343-350.

Ecycle. Mercúrio, cádmio e chumbo: os inimigos íntimos presentes nos eletrônicos. Disponível em: <http://www.ecycle.com.br/component/content/article/35/428-mercúrio-cadmio-e-chumbo-os-inimigos-intimos-presentes-nos-eletronicos.html>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

Ehrlich, R., Robins, T., Jordaan, E., Miller, S., Mbuli, S., Selby, P., Wynchank, S., Cantrell, A., De Broe, M., D' Haese, P., Todd, A., Landrigan, P., 1998. Lead absorption and renal dysfunction in South African battery factory. *Occupational and Environmental Medicine*. 55, 453-460.

Ellis, A., Triggle, C.R., 2003. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarisation and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 81, 1013-1028.

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

Féléto, M., 2009. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*. 156, 545-562.

Féléto, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 26,1215-1225.

Féléto, M., Vanhoutte, P.M., 2009. EDHF: an Update. *Clinical Science*. 117:139-155.

Felizzola, L.R., Sobrinho, J.R.R., Wolfgang, G.W., Zorn, B.V.B., 1996. O papel do endotélio vascular na fisiologia circulatória. *Cir Vasc Angiol*. 12, 129-136.

Figueiredo, B.R., Capitani, E.M., Gitahy, L.C., 2005. Exposição humana à contaminação por chumbo e arsênio no Vale do Ribeira (sp-pr) 2005. Disponível: http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT12/bernardino_figueiredo.pdf.

Fioresi, M., Simões, M.R., Furieri, L.B., Broseghini-Filho, G.B., Vescovi, M.V.A., et al., 2014. Chronic Lead Exposure Increases Blood Pressure and Myocardial Contractility in Rats. *PLoS ONE*. 9(5).

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Silveira, E.A., Padilha, A.S., Vescovi, M.V.A., et al., 2011. Low-Level Lead Exposure Increases Systolic Arterial Pressure and Endothelium-Derived Vasodilator Factors in Rat Aortas. *PLoS ONE*. 6(2).

Fridovich, I., 1970. Quantitative aspects of production of superoxide anion radical of by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 245, 4053-4057.

Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L., Jr., 2007. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res*. 13, 789–794.

G1. Análise no RS revela níveis de metais acima do permitido em erva-mate. Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-elavoura/noticia/2014/07/analise-no-rs-revela-niveis-de-metais-acima-do-permitido-em-erva-mate.html>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

Garrido, A.M., Griendling, K.K., 2009. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 302, 148-158.

Gewaltig, M.T., Kojda, G., 2002. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 55, 250–260.

Glenn, S.B., Stewart, W.F., Links, J.M., Told, A.C., Schwartz, B.S., 2003. The longitudinal association of lead with blood pressure. *Epidemiology.* 14 (1): 30-36.

Gottesfeld, P., Pokhrel, A.K., 2011. Review: Lead exposure in battery manufacturing and recycling in developing countries and among children in nearby communities. *Journal Occupational and Environmental Hygiene.* 8(9): 520-532.

Goyer, R.A., 1991. Toxic effects of metals – Lead, pp. 639-646. In Mary O. Amdur, John Dull & Curtis D. Klaassen (eds.). *Casare hand Doull's toxicology – the basic science of poisons.* Editor Pergamon Press, USA.

Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W., 2000. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research.* 86, 494-501.

Grizzo, L.T, Cordelline, S., 2008. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences.* 1, 207-214.

Gurer-Orhan, H., Sabir, H.U., Ozgüneş, H., 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.* 195(2-3):147-154.

Harlan, W.R., 1998. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environmental Health Perspectives.* 78,9-13.

Hasunuma, K., Yamaguchi, T., Rodman, D., O'Brien, R., Mcmurtry, I., 1991. Effects of inhibitors of Biossay EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol.* 260, L97–L104.

Heydari, A., Norouzzadeh, A., Khoshbaten, A., Asgari, A., Ghasemi, A., Nafafi, S., Badalzadeh, R., 2006. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicology Letters.* 166, 88-94.

Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., et al., 2003. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 14, S227–S232.

[IUPAC] Commission on Atomic Weights and isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights of the Elements. 2001. *Pure and Applied Chemistry.* 75: 1107-1122. Acesso em 07 de abril de 2014.

James, M.M., Fiona, E.H., 2013. Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. *Antioxidants & Redox Signaling.*

Kang, K.T., 2014. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res.* 30(3):141-148

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

Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Ostalowska, A., Kasperczyk, A., Wilczyński, S., Wyparło-Wszelaki, M., Kiełtucki, J., Birkner, E., 2013. Lead-elevated activity of xanthine oxidase in lead-exposed workers. *Med Pr.* 64(2):175-180.

Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Weiler, E.W., Prins, B., Weber, M. A., et al., 1993. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens.* 6, 723-729.

Klassen Curtis, D., 1991. Metais pesados e seus antagonistas. In: Gilman, A. Goodman et al. *As Bases Fisiológicas da Terapêutica.* Rio de Janeiro. 8 ed. Guanabara Koogan.

Kosnett, M.J., 2003. Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: Katzung, Bertram, G. *Farmacologia Básica e Clínica.* Rio de Janeiro. 8 ed. Guanabara Koogan.

Kosnett, M.J., Wedeen, R.P., Rothenberg, S.J., Hipkins, K.L., Materna, B.L., et al., 2007. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ Health Perspect.* 115(3): 463-471.

Kozłowska, H., Baranowska, M., Gromotowicz, A., Malinowska, B., 2007. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): potential involvement in the physiology and pathology of blood vessels. *Postepy Hig Med Dosw.* 61, 555-564.

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

Landrigan, P.J., 2002. The world wide problem of lead in petrol. *Bulletin of World Health Organization.* 1p.

Lawton, L.J., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research.* 28, 83-97.

Luscher, T.F., Boulanger, C.M., Dohi, Y., Yang, Z., 1992. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension.* 19, 117-130.

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

Marques, M., Millas, I., Jimenez, A., Garcia-Colis, E., Rodriguez-Feo, J.A., Velasco, S., Barrientos, A., Casado, S., Lopez-Farre, A., 2001. Alteration of the Soluble Guanylate Cyclase System in the Vascular Wall of Lead-Induced Hypertension in Rats. *J Am Soc Nephrol.* 12, 2594–2600.

Matos, R.Q., Ferreira, O.M., 2007. Recuperação de chumbo de baterias automotivas, análise de risco dos resíduos resultantes. Universidade católica de goiás – departamento de engenharia – engenharia ambiental.

May, J.M., Harrison, F.E., 2013. Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. *Antioxidants & Redox Signaling.* 19, 2068-2083.

McCabe, T.J., Fulton, D., Roman, L.J., Sessa, W.C., 2000. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “Calcium dependent” eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 275(9): 6123-6128.

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, 1388–1394.

Moraes, G.A., 2014. Normas Regulamentadoras Comentadas. 11 edição. Revisada, ampliada, ilustrada e atualizada. Rio de Janeiro. 2; 3,1045.

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.

Navas-Acien, A., et al., 2007. Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives.* 115, 472-482.

Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E.K., Rothenberg, S.J., 2007. Lead exposure and cardiovascular disease - a systematic review. *Environ Health Perspect.* 115, 472-482.

Navas-Acien, A., Schwartz, B.S., Rothenberg, S.J., Hu, H., Silbergeld, E.K., Guallar, E., 2008. Bone lead levels and blood pressure and points A Meta- Analysis. *Epidemiology.* 19(3): 496-504.

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, 3196–3201.

Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268, C799-C822.

Ni, Z., Hou, S., Barton, C.H., Vaziri, N.D., 2004. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 66, 2329-2336.

Ostuni, M.A., Gelinotte, M., Bizouarn, T., Baciou, L., Houee- Levin, C., 2010. Targeting NADPH-oxidase by reactive oxygen species reveals an initial sensitive step in the assembly process. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 900–907.

Paoliello, M.M.B., Chasin, A.A.M., 2001. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental*. v.3.

Paravicini, T.M., Touyz, R.M., 2008. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care*. 31(2).

Park, W.S., Han, J., Kim, N., Youm, J.B., Joo, H., Kim, H.K., et al., 2005. Endothelin-1 inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46, 681–689.

Park, S.W., Noh, H.J., Sung, D.J., Kim, J.G., Kim, J.M., et al., 2014. Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive K_v currents through S-glutathionylation. *Pflugers Arch.*

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

Patrick, L., 2006. Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*. 11, 2-22.

Piccinini, F., Favalli, L., Chiari, M. C., 1977. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology*. 8: 43-51.

Pires, B.J., Bezerra, F.F., Laboissiere, F.P., Miekeley, N., Donangelo, C.M., 2001. Lead levels in erythrocytes and biomarkers of bone turnover in pregnant and lactating women with marginal calcium intakes. *Nutrition Research* 21(6): 831-841.

Qin, Z., Gongora, M.C., Ozumi, K., Itoh, S., Akram, K., Ushio-Fukai, M., Harrison, D.G., Fukai, T., 2008. Role of membrane ATPase in angiotensin II-induced Hypertension: a Key modulator extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension*. 52, 945-951.

Rabinowitz, M.B., Wetherill, G.W., Kopple, J.D., 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation* 58(2):260-270.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., Harrison, D., 1996. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NAD(P)H oxidase activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 97(8): 1916-1923.

Rattmann, Y.D., 2009. Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksoniasellowiana* (PRESL.) HOOK. Tese de Doutorado em relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.* 43(1):1-16.

Ribeiro, S.E.M., et al., 2005. A formação e os efeitos das Espécies Reativas do oxigênio no meio biológico. *Biosci J. Uberlândia*. 21(3).

Sanjuliani, A.F., Torres, M.R.S.G., Paula, L.N., Bassan, F.B., 2011. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. *Hipertensão arterial*. 10(3).

Saryan, L.A., Zenz, C., 1994. Lead and its compounds. *Occupational medicine*. Editora Mosby-Year Book, Inc., EUA.

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. *Environ Health Perspect.* 114, 1538–1541.

Schoeninger, F., Campos, v., 2011. Teores de cobre e chumbo e grau alcoólico de aguardentes coloniais comercializadas na Região do alto vale do itajaí. *Revista caminhos, on-line, "dossiê tecnologias", Rio do Sul.* 2, 4, 27-37.

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

Sepulveda, M.A.C., 2009. Participação do receptor AT2 da angiotensina II no relaxamento vascular promovido pelo hormônio tireoidiano. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.

Sharifi, A.M., et al., 2004. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicology Letters*. 153, 233–238.

Silveira, E.A., Lizardo, J.H.F., Souza, L.P., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2010. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium dependent. *Brazilian Journal Medical Biological Research*. 43(5): 492-499.

Silveira, E.A., Siman, F.D., de Oliveira Faria, T., Vescovi, M.V., Furieri, L.B., et al., Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic Biol Med*. 67: 366-76; 2014.

Skoczyńska, A., Juzwa, W., Smolik, R., Szechiński, J., Běhal, F.J., 1986. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology*. 39(3): 275-289.

Smith, R.D., Osterloh, J.D., Flegal, A.R., 1996. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from skeleton. *Environmental Health Perspectives*. 104(1): 60-66.

Somlyo, A.P., Somlyo, A. V, 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 522 Pt 2, 177–185.

Sun, C.W., Alonso-Galicia, M., Taheri, M.R., Falck, J.R., Harder, D.R., et al., 1998. Nitric oxide-20-Hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res*. 83: 1069-1079.

Talebian, R., Khamverdi, Z., Nouri, M., Kasraei, S., 2014. Effect of ascorbic acid on bond strength between the hydrogen peroxide-treated fiber posts and composites in cores. *J Conserv Dent*. 17, 220-224.

Taniyama, Y., Griendling, K.K., 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 42, 1075-1081.

Thakali, K., Davenport, L., Fink, G.D., Watts, S.W., 2006. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 47(3): 482-487.

Triggle, C.R., Hollenberg, M., Anderson, T.J., Ding, H., Jiang, Y., et al., 2003 The endothelium in health and disease - A target for therapeutic intervention.

Tsalev, D.L., Zaprianov, Z.K., 1985. Lead, pp. 137-150. In *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. CRC Press, Florida.

Urakami-Harasawa, L., Shimokava, H., Nakashima, M., Egashira, K., Takeshita, A., 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest*. 100: 2793-2799.

Vassallo, D.V., Simões, M.R., Furieri, L.B., Fioresi, M., Fiorim, J., et al., 2011. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 44(9): 939-946.

Vaziri, N. D., Ding, Y., Gonick, H. C., 1997. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effects of lazoroid therapy. *Kidney Int*. 52, 1042-1046.

Vaziri, N.D., 2002. Pathogenesis of lead-induced hypertension: Role of oxidative hypertension stress. *J. Hypertens*. 20, S15–20.

Vaziri, N.D., 2008. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., 2001. Compensatory Up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; Reversal by a superoxide dismutase mimetic drug. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* . 298, 679-685.

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

Vaziri, N.D., Khan, M., 2007. Interplay Of Reactive Oxygen Species And Nitric Oxide In The Pathogenesis Of Experimental Lead-Induced Hypertension. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*. 34, 920-925.

Vaziri, N.D., Lin, C.Y., Farmand, F., Sindhu, R.K., 2003. Superóxido dismutase, catalase, glutathione, peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney International*. 63, 186-194.

Vaziri, N.D., Sica, D., 2004. Lead-induced hypertension: Role of oxidative stress. *Curr. Hypertens. Rep.* 6, 314–320.

Weseler, A. R., Bast, A., 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacology treatment. *Curr Hipertens Rep.* 12, 154-161.

WHO. 1995. Inorganic Lead. *Environmental Health Criteria* 165. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Geneva. 300 p.

WHO. 2010. Preventing disease through healthy environments exposure to lead: a major public health concern. World health organization.

WHO. 2011. Operational framework Global Alliance to Eliminate Lead Paint. World Health Organization. 10 p.

WHO. 2013. Cardiovascular diseases (CVDs). World health organization. Disponível em: www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/en/ . Acesso em 24 de abril de 2014.

WHO. 2013. Lead poisoning and health. World Health Organization. September 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/en/>. Acesso em 22 de abril de 2014.

Wiggers, G., Peçanha, F.M., Briones, M., Pérez-Girón, J. V, Miguel, M., Vassallo, D. V, Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Salaices, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295, H1033–H1043.

Yung, L.M., Leung, F.P., Yao, X., Chen, Z.Y., Huang, Y., 2006. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord DrugTargets*. 6(1):1-19.

Zhang, X.H, Lei, H, Liu, A.J, Zou, Y.X, Shen, F.M, Su, D.F., 2011. Increased oxidative stress is responsible for severer cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *CNS Neurosci Ther.* 17(6):590-598.

Zhang, D.X., Borbouse, L., Gebremedhin, D., Mendoza, S.A., Zinkevich, N.S., et al, 2012. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ Res.* 110(3):471-480.

Chronic Lead Exposure Decreases the Vascular Reactivity of Rat Aortas: The Role of Hydrogen Peroxide

Karolini Zuqui Nunes^{1*}, Dieli Oliveira Nunes¹, Edna Aparecida Silveira¹, Camila Almenara Cruz Pereira¹, Gilson Brás Broseghini Filho¹, Dalton Valentim Vassallo^{1,3}, Mirian Fioresi^{1,2}.

¹Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

²Department of Nursing, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

³Health Science Center of Vitória - EMESCAM, Vitória, Espírito Santo, Brazil,

* Corresponding author:

E-mail: karol-zuqui@hotmail.com (KZN)

All authors contributed equally to this work.

Abstract

We investigated whether exposure to small concentrations of lead alters blood pressure and vascular reactivity. Male Wistar rats were sorted randomly into the following two groups: control (Ct) and treatment with 100 ppm of lead (Pb), which was added to drinking water, for 30 days. Systolic blood pressure (BP) was measured weekly. Following treatment, aortic ring vascular reactivity was assessed. Tissue samples were properly stored for further biochemical investigation. The lead concentration in the blood reached approximately 8 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Treatment increased blood pressure and decreased the contractile responses of the aortic rings to phenylephrine (1 nM–100 mM). Following L-NAME administration, contractile responses increased in both groups but did not differ significantly between them. Lead effects on R_{max} were decreased compared to control subjects following superoxide dismutase administration. Catalase, DETCA, and apocynin increased the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in the aortas of lead-treated rats but did not increase the vasoconstrictor response in the aortas of untreated rats. TEA potentiated the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortic segments in both groups, but these effects were greater in lead-treated rats. The co-incubation of TEA and catalase abolished the vasodilatory effect noted in the lead group. The present study is the first to demonstrate that blood lead concentrations well below the values established by international legislation increased blood pressure and decreased phenylephrine-induced vascular reactivity. The latter effect was associated with oxidative stress, specifically oxidative stress induced via increases in hydrogen peroxide levels and the subsequent effects of hydrogen peroxide on potassium channels.

Key words: lead acetate, aorta, hydrogen peroxide, oxidative stress, hypertension.

Introduction

Lead is a common industrial and environmental pollutant that exerts a variety of acute and chronic toxic effects [1]. The metal is used extensively in the industrial sector, which contributes to its wide environmental distribution [2]. In recent years, manufacturers of batteries have emerged as the largest consumer of lead, using approximately 80% of the lead produced globally. The manufacturing and recycling of these products may result in sufficient lead exposure to cause the development of acute and chronic health problems [3].

Chronic lead exposure may trigger a cascade of events that culminates in the development of hypertension and cardiovascular disease (1). Navas-Acien and collaborators (2007) [4] reviewed the link between lead exposure and cardiovascular events in several population studies, highlighting the elevation of arterial pressure. However, the cardiovascular effects of lead are not limited to increases in blood pressure. Several reports have indicated that lead treatment can either increase or decrease aortic ring vascular reactivity to phenylephrine in response to different conditions and stimuli [5,6,7,8]

Several mechanisms have been proposed as explanations for the vascular changes induced by lead, including changes in NO bioavailability and Na^+/K^+ -ATPase functional activity [8], increases in the levels of reactive oxygen species and COX-derived contractile prostanoids, and increases in renin-angiotensin activity [5]. However, lead's effects on human health depend on blood levels and exposure duration.

Using the same experimental model, we demonstrated that chronic exposure to lead promotes cardiac changes in animals with blood lead levels below the limits recommended by international legislation. Furthermore, it promotes increased systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate [9]. However, the vascular effects of exposure to low concentrations of lead over a short time period are not fully understood. Therefore, the present study aimed to evaluate vascular impairment resulting from exposure to low concentrations of lead over a period of 30 days, and to investigate the mechanisms that may be involved in vascular alterations caused by this metal.

Materials and Methods

Animals and treatment model

Male Wistar rats were used for this study in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Espirito Santo (002/2013 CEUA-UFES). During treatment, rats had free access to tap water and were fed standard chow *ad libitum*. When the rats reached two months of age, they were divided into the following two groups: the control group received distilled water for 30 days, and the lead-treated group received 100 ppm of lead acetate in drinking water for 30 days. Following treatment, the rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, ip). The rats' thoracic aortas were carefully dissected out, and connective tissue was removed. For the vascular reactivity experiments, the aortas were divided into cylindrical segments: each segment was 4 mm in length. Other segments of the aorta were stored at -80°C until they were needed for a protein expression analysis.

Blood pressure measurements

Indirect systolic blood pressure was measured at the beginning and end of treatment using tail-cuff plethysmography (IITC Life Science, Inc, Woodland Hills, CA, USA). Conscious rats were restrained for 5–10 min in a warm and quiet room and conditioned to numerous cuff inflation-deflation cycles by a trained operator. Systolic blood pressure was measured, and the mean of three measurements was recorded [10].

Blood lead level measurements

The lead concentrations of both groups were measured by atomic absorption spectrometry at the Hermes Pardini Laboratory using whole blood samples following 30 days of treatment.

Vascular reactivity measurements

Aortic segments (4 mm in length) were mounted in an organ bath at 37°C containing 5 mL Krebs-Henseleit solution (in mM: NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂-2H₂O 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄-7H₂O 1.2, glucose 11 and ethylenediamine-tetra acetic acid - EDTA 0.01) that was continuously gassed with a 95% O₂ and 5% CO₂ mixture (pH 7.4). Arterial segments were stretched to an optimal resting tension of 1.0 g. Isometric tension was recorded using a force displacement transducer (TSD125C, CA, USA) connected to an acquisition system (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA).

Following a 45 min equilibration period, all aortic rings were exposed to two doses of 75 mM KCl (30 min): the first dose was given to check their functional integrity, and the second dose was given to assess maximal induced tension. Endothelial integrity was subsequently tested with acetylcholine (10 μ M) using segments previously contracted by phenylephrine (1 μ M). Relaxation equal to or greater than 90 % represented a positive demonstration of the functional integrity of the endothelium. After a washout period (30 min), increasing concentrations of phenylephrine (10^{-10} M – $3 \cdot 10^{-4}$ M) were applied. A concentration–response curve was generated, and tension was measured once a plateau was reached. The influence of the endothelium on the response to phenylephrine in both untreated and lead-treated rats was investigated following its mechanical removal, which was accomplished by rubbing the vessel lumen with a needle. The absence of the endothelium was confirmed by the inability of 10 mM acetylcholine (ACh) to induce relaxation.

The effects of the following drugs were evaluated: the nonspecific NOS inhibitor, N-nitro-L arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M); the hydrogen peroxide scavenger, catalase (1000 U.mL⁻¹); superoxide dismutase (SOD) (150 U/mL); an SOD blocker, diethyldithiocarbamic acid (DETCA, 0.5 mM); an NADPH oxidase inhibitor, apocynin (0.3 μ M,); and the non selective blocker of K^+ channels, tetraethylammonium (TEA, 2 mM).

Another set of experiments involved the pre-contraction of aortic rings from both untreated and lead-treated rats with phenylephrine (1 μ M) and the subsequent generation of concentration-response curves to either acetylcholine (0.1 nM – 300 μ M) or sodium nitroprusside (0.01 nM – 0.3 μ M).

Western blot analyses

The arteries were rapidly frozen and kept at -80°C until needed for protein expression analyses of both catalase and superoxide dismutase in both the control and lead-treated groups. Proteins from homogenized arteries were separated using 12.5 or 10% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and were subsequently incubated overnight at 4°C with anti-catalase (1:100; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and anti-SOD (1:500; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibodies. Following washing, the membranes were incubated with secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (1:5000; StressGen, Victoria, Canada) conjugated to horseradish peroxidase. Following a thorough washing, the immune complexes were detected using an enhanced horseradish

peroxidase/luminal chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International, Little Chalfont, UK) and film (Hyperfilm ECL International). The immunoblot signals were quantified using the Image J computer program. The same membrane was used to determine anti- α -actin expression using mouse monoclonal antibodies (1:5000; Sigma, USA).

Drugs and reagents

Lead acetate Pb (CH₃COO)₂, L-phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, N-nitro-L arginine methyl ester, catalase, superoxide dismutase, diethyldithiocarbamic acid, apocynin and tetraethylammonium were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., USA). The salts and reagents used were of analytical grade and were from Sigma-Aldrich and Merck (Darmstadt, Germany).

Statistical analyses

Contractile responses were expressed as percentages of the maximal response induced by 75 mM KCl. For each concentration-response curve, the maximal effect (R_{max}) and the agonist concentration that produced 50% of the maximal response (log EC₅₀) were calculated using nonlinear regression analysis (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Agonist sensitivities are expressed as pD₂ (-log EC₅₀). In order to compare the effects of drugs on the aortic ring responses to phenylephrine, some results were expressed as differences in the areas under the concentration-response curves (dAUC) in both the control and experimental groups. AUCs were calculated from individual concentration-response curve plots: the differences are expressed as the percentage of the control AUC. For protein expression, the data are expressed as the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the protein of interest and α -actin. Two-way ANOVA was performed for the blood pressure data analysis, followed by a Bonferroni test. The results are expressed as means \pm SEM for the number of rats indicated: differences were analyzed using the unpaired Student t test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

No differences in body weight were observed between the groups before (untreated: 259 \pm 1.30 g, n= 30; lead-treated: 258 \pm 0.99 g, n=30; $P < 0.05$) or after treatment (untreated: 309 \pm 2.56 g, n= 30; lead-treated: 310 \pm 2.59 g, n= 30; $P < 0.05$).

In rats exposed to thirty-day lead treatment, the blood lead concentration was $8.4 \mu\text{g/dL} \pm 1.1 \mu\text{g/dL}$ ($n=5$). A significant rise in systolic arterial blood pressure was observed seven days following lead exposure (first day: $105 \pm 6.8 \text{ mmHg}$, seventh day: $128 \pm 4.9 \text{ mmHg}$, $n=8$; $P<0.05$) and was maintained until the 28th day of treatment ($126 \pm 2.7 \text{ mmHg}$, $n=8$; $P<0.05$). In the control animals, the pressure remained unchanged during treatment ($107 \pm 5.0 \text{ mmHg}$, $n=6$; $P<0.05$).

Effects of lead treatment on vascular reactivity

Lead treatment did not affect the response to KCl (untreated: 2.192 , $n=30$; lead treated: 2.221 , $n=30$; $P>0.05$), but it decreased the contractile responses induced by phenylephrine in rat aortas (Figure 1A). It also decreased R_{max} , but not the sensitivity to phenylephrine (Figure 1A). The concentration-dependent relaxation induced by ACh in the treated group was not different than the response observed in the untreated group (R_{max} untreated: -100 ± 1.8 , $n=7$; R_{max} lead-treated: -101 ± 1.8 , $n=7$; pD2 untreated: -6.67 ± 0.06 , $n=7$; pD2 lead-treated: -7.04 ± 0.09 , $n=7$). Similarly, the response induced by SNP was the same in both groups (R_{max} untreated: -101 ± 1.3 , $n=8$; R_{max} lead-treated: -100 ± 0.7 , $n=8$; pD2 untreated: -8.16 ± 0.05 , $n=8$; pD2 lead-treated: -8.05 ± 0.05 , $n=8$) (Figures 1B and C).

Participation of endothelial factors in the vasodilator response to phenylephrine

To evaluate the influence of the endothelium on vascular responses, we mechanically removed the endothelium. Phenylephrine reactivity following endothelial damage was increased in both experimental groups (Figure 2), but this increase was superior in the lead-treated group, as demonstrated by the dAUC values (Figure 2). These data associated with decreased vascular reactivity to phenylephrine suggest that treatment for thirty days with lead acetate causes the release of an endothelium-derived relaxation factor.

To evaluate whether lead acetate treatment altered NO-induced modulation of phenylephrine-induced contractile responses, aortic rings were incubated with the NOS inhibitor, L-NAME (100 mM). L-NAME caused similar increases in the maximum response to phenylephrine in arteries from both the control and lead-treated groups (Figure 3). However, dAUC values demonstrated that the role played by nitric oxide in the contractile response to phenylephrine did not differ between the groups (Figure 3).

Participation of reactive oxygen species in the vasodilator response to phenylephrine

Several studies have shown that lead exposure induces the generation of reactive oxygen species (ROS), which subsequently results in oxidative damage to several organ systems and alterations to antioxidant defence systems [11,12,13,14]. Among ROS, hydrogen peroxide acts as an endothelium-derived hyperpolarizing agent [15].

Beginning with the hypothesis that hydrogen peroxide acts on aortic rings and induces a vasodilatory response in the lead-treated group, we incubated aortic rings with catalase (1000 U/mL), a hydrogen peroxide scavenger. This drug incubation increased the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in the aortas of lead-treated rats, but it did not affect the responses of aortas from untreated rats (Figure 4A).

A Western blot analysis of catalase was performed to determine that the increase in hydrogen peroxide was the result of the decreased expression of this enzyme. However, our results showed no differences between the groups (Figure 4B).

We performed incubation with superoxide dismutase (150 U/mL). SOD caused reductions in the maximum response to phenylephrine in the arteries of both groups. However, values of dAUC demonstrated that these effects were greater in preparations from lead-treated rats than in preparations from untreated rats (Figure 5A). This result suggests the following two hypotheses: either SOD expression is increased in animals treated with lead, or the levels of superoxide anions involved in the contractile response to phenylephrine are greater in preparations from lead-treated rats than in preparations from untreated rats.

In order to investigate whether SOD expression was affected in lead-treated rats, we performed Western blot analyses. They demonstrated increased protein expression of SOD Cu/Zn (Figure 5B). We performed incubation with DETCA (0.5 mM), an inhibitor of Cu/Zn superoxide dismutase that increased both vasoconstrictor responses and phenylephrine sensitivity in the aortic rings of animals treated with lead (Figure 6). These results suggest that superoxide anion levels and endogenous Cu/Zn SOD activity are both increased in lead-treated animals, which may contribute to increased hydrogen peroxide levels.

In order to investigate whether NADPH oxidase was associated with increased levels of superoxide anions in lead-treated animals, we used apocynin (0.3 mM), an NADPH oxidase

inhibitor. Apocynin reduced phenylephrine's responsiveness in the untreated group, whereas the opposite response was observed in lead-treated animals, suggesting that this pathway may be involved in the production of superoxide anions and the subsequent production of hydrogen peroxide (Figure 7).

Participation of potassium channels in the vasodilator response to phenylephrine

Hydrogen peroxide-induced relaxation involves multiple pathways, including the hyperpolarization of vascular smooth muscle cells via potassium channel activation [16]. In order to investigate the involvement of potassium channels in the vasodilator response to phenylephrine, we used TEA (2 mM), a nonselective K⁺ channel blocker. TEA potentiated the vasoconstrictor response induced by phenylephrine in aortic segments from both groups, but these effects were greater in preparations from lead-treated rats than in preparations from untreated rats, as illustrated by the dAUC values (Figure 8A).

To confirm our hypothesis that hydrogen peroxide acts on potassium channels and induces a vasodilatory response in animals treated with lead, we incubated catalase (1000 U/mL) with TEA (2 mM). The co-incubation abolished the vasodilatory effect observed in the lead-treated group (Figure 8B).

Discussion

The major findings of this study indicate that chronic treatment with low concentrations of lead increases systolic arterial blood pressure and decreases the contractile responses induced by phenylephrine in rat aortas. This response is endothelium-dependent and results from increased hydrogen peroxide concentrations and action on potassium channels. This finding may be explained by the compensatory up-regulation of superoxide dismutase (SOD), which catalyzes dismutation of superoxide anions and increases hydrogen peroxide levels.

The blood concentration of lead in the treated group was approximately 8 µg/dL, whereas the control group's values were below the apparatus' limits of detection. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) lists a reference blood lead concentration of 60 µg/dL [2,17]. The Centers for Disease Control and Prevention consider blood lead concentrations greater than or equal to 30 µg/dL to be elevated in adults, whereas blood lead

concentrations greater than or equal to 10 µg/dL are considered elevated in infants and children [18]. However, our study demonstrates that chronic exposure to low concentrations of lead, which results in blood lead levels lower than those considered safe, is harmful and causes cardiovascular alterations.

In spite of the reduction in aortic vascular reactivity, we observed increases in blood pressures on the 7th day of treatment that persisted until the conclusion of treatment. This result may be related to an increase in sympathetic activity in vivo. Previous reports have indicated that lead exposure induces sympathetic hyperactivity by acting on central and peripheral sympathetic junctions, which increases the responsiveness of alpha 2-adrenoreceptors, cardiac and vascular beta-adrenergic receptors and dopaminergic receptors to stimulation. Furthermore, lead treatment increases plasma levels of noradrenaline and adrenaline [19,20].

We observed a reduction in aortic ring reactivity to phenylephrine following thirty days of lead exposure. The reduction in vascular reactivity to phenylephrine was accompanied by a concomitant increase in the endothelial modulation of such responses. We observed that L-NAME increased the reactivity of phenylephrine in both experimental groups; however, dAUC values demonstrated that the role played by nitric oxide in the contractile response to phenylephrine did not differ between the groups. Several reports have also suggested that exposure to lead increases NO bioavailability [8,21], which contributed to reductions in reactivity to phenylephrine in aortic rings. This result was associated with increased iNOS protein expression and increased eNOS phosphorylation at Ser1177, the primary regulator of NO production [22,23,8]. The increased NO may open K⁺ channels and contribute to the increased negative modulation of phenylephrine-induced contraction [16]. NO also indirectly activates BK_{Ca} channels by preventing the formation of an endogenous inhibitor of these channel [24,25].

In addition to NO, other endothelium-derived factors such as hydrogen peroxide hyperpolarize and relax underlying smooth muscle cells by activating potassium channels, which may be accomplished directly or following soluble guanylyl cyclase stimulation [16]. Hydrogen peroxide is produced in endothelial and smooth muscle cells from the superoxide anion, primarily by superoxide dismutase [26], and is converted into water and molecularoxygen by catalase [27]. Depending on the blood vessel, the presence of endothelium, the experimental conditions or the concentrations studied, hydrogen peroxide exerts either dilator or constrictor effects [16]. Incubation with catalase increased the

vasoconstrictor response induced by phenylephrine in the aortas of lead-treated rats but did not increase the response in the aortas of untreated rats, which suggests increases in the concentrations of hydrogen peroxide in animals treated with lead. Changes in the protein expression of catalase may explain the increases in hydrogen peroxide found in this study. However, no differences between the lead-treated and untreated groups were found.

Several reports have demonstrated that lead-mediated cardiovascular toxicity is strongly associated with oxidative stress-induced [5,28,29] ROS production, indicating that oxidative stress plays an important role in endothelial dysfunction, which is generally associated with cardiovascular disease [27]. Oxidative stress may occur as a result of increased ROS generation or depressed antioxidant pathways or both [30]. We observed significant decreases in the vascular reactivity of the aortic rings of lead-treated animals in the presence of SOD, which is indicative of either increased production of superoxide anions or greater activity of this enzyme. Our hypothesis was confirmed by increases in Cu/Zn-SOD protein expression and increased activity of SOD, which was detected via incubation with DETCA.

Depletion [2] and up-regulation of antioxidant reserves [12] free radical mediated have been reported. Farmand and collaborators (2005) demonstrated that lead-treated animals exhibited up-regulations in the activity of several antioxidant enzymes as a compensatory response to lead exposure. However, other enzymes did not compensate in the face of oxidative stress, suggesting an antioxidant/oxidant imbalance [12].

Lead is described as an inducer of free radical production [2]. Reactive oxygen species contribute to disease conditions such as inflammation, ischemia-reperfusion injury, atherosclerosis, diabetes mellitus, and hypertension [31,32].

Several epidemiological studies involving workers with high lead exposure have reported a relationship between lead exposure and markers of oxidative stress [33,34].

Recent studies from our laboratory observed greater local superoxide anion production in aortic rings from lead-treated rats [5]. Additionally, the blockade of the anion's production by apocynin causes a reduction in reactivity based on phenylephrine dose-response curves. These findings suggest that NADPH oxidase is also a putative site of action for lead to increase free radical generation [35]. In this study, we observed increases in vasoconstrictor responses in rings incubated with apocynin in the lead-treated group, suggesting that NADPH oxidase may

be involved in the production of superoxide anions and the subsequent production of hydrogen peroxide.

Other approaches facilitated transient increases in superoxide production, followed by rises in hydrogen peroxide production in cultured human coronary endothelial and vascular smooth muscle cells following 60 h of lead acetate (1 ppm) treatment. This response was accompanied by a compensatory increase in Cu/Zn-SOD protein expression in the same cells. The short-term exposure to lead resulted in significant elevations of both superoxide and hydrogen peroxide, whereas chronic lead exposure resulted in the elevation of hydrogen peroxide anions but not superoxide anions [13].

Potassium channels in arterial smooth muscle cells are important modulators of blood vessel diameter. The opening of K^+ channels in the cell membrane of arterial smooth muscle cells increases K^+ efflux, which causes membrane potential hyperpolarization. This closes voltage-dependent Ca^{2+} channels, which decreases Ca^{2+} entry and leads to vasodilation [36]. We demonstrated that TEA, a K^+ channel blocker, potentiated the response to phenylephrine in aortic segments from both groups, but these effects were greater in preparations from lead-treated rats than in preparations from untreated rats. Furthermore, TEA-catalase co-incubation abolished the vasodilatory effect in the aortas of lead-treated animals, which suggests that hydrogen peroxide acts on potassium channels.

In both human coronary arterioles and cultured human endothelial cells, hydrogen peroxide serves as a key endothelium-derived hyperpolarizing factor and mediates flow-induced dilation through a novel mechanism involving protein dimerization and the activation of protein kinase G (PKG)- $I\alpha$, as well as the subsequent opening of smooth muscle BK_{Ca} channels [37,38]. However, questions remain unanswered regarding whether hydrogen peroxide is a diffusible factor that activates potassium channels on smooth muscle cells or an intracellular messenger involved in the activation of endothelial potassium channels [16].

In conclusion, the present study was the first to demonstrate that blood lead concentrations of 8 $\mu\text{g/dL}$, which are below values established by international legislation, increased blood pressure and decreased phenylephrine-induced vascular reactivity. This effect was associated with oxidative stress, specifically increases in hydrogen peroxide and its actions on potassium channels. These results also demonstrated that low concentrations of lead are an important risk factor for cardiovascular disease.

References

1. Vaziri ND, Khan M (2007) Interplay Of Reactive Oxygen Species And Nitric Oxide In The Pathogenesis Of Experimental Lead-Induced Hypertension. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology* 34: 920-925.
2. Patrick L (2006) Lead Toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, Evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review* 11: 2-22.
3. Gottesfeld P, Pokhrel AK (2011) Review: Lead exposure in battery manufacturing and recycling in developing countries and among children in nearby communities. *Journal Occupational and Environmental Hygiene* 8(9): 520-32.
4. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ (2007) Lead exposure and cardiovascular disease - a systematic review. *Environ Health Perspect* 115: 472-482.
5. Silveira EA, Siman FD, de Oliveira Faria T, Vescovi MV, Furieri LB, et al. (2014) Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic Biol Med* 67: 366-76.
6. Karimi G, Khoshbaten A, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Namiranian K (2002). Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacol Res* 46(1): 31-37.
7. Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, et al. (2006) Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett* 166: 88-94.
8. Fiorim J, Ribeiro Júnior RF, Silveira EA, Padilha AS, Vescovi MVA, et al. (2011) Low-Level Lead Exposure Increases Systolic Arterial Pressure and Endothelium-Derived Vasodilator Factors in Rat Aortas. *PLoS ONE* 6(2).
9. Fioresi M, Simões MR, Furieri LB, Broseghini-Filho GB, Vescovi MVA, et al. (2014) Chronic Lead Exposure Increases Blood Pressure and Myocardial Contractility in Rats. *PLoS ONE* 9(5).

10. Grizzo LT, Cordellini S (2008) Perinatal Lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol Sc* 103(1): 207-214.
11. Ding Y, Vaziri ND, Gonick H (1998) Lead-induced hypertension. II response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environ. Res* 76: 107-113.
12. Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK (2005) Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ. Res* 98: 33-39.
13. Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND (2004) Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 66: 2329-2336.
14. Vaziri ND, Liang K, Ding Y (1999) Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 56: 1492-1498.
15. Park SW, Noh HJ, Sung DJ, Kim JG, Kim JM, et al. (2014) Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Pflugers Arch*.
16. Félétou M (2009) Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology* 156: 545-562.
17. Kosnett MJ, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL, et al. (2007) Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ Health Perspect* 115(3): 463-71.
18. Den Hond E, Nawrot T, Staessen JA (2002) The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III National Health and Nutritional Examination Survey. *J. Hum. Hypertens* 16: 563-568.
19. Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, et al. (2000) Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences* 68: 401-415.

20. Boscolo P, Carmignani M (1988) Neurohumoral Blood Pressure Regulation in Lead Exposure. *Environmental Health Perspectives* 78: 101-106.
21. Silveira EA, Lizardo JHF, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV (2010) Acute lead- induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium-dependent. *Braz J MedBiol Res* 43(5): 492-499.
22. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.
23. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “Calcium dependent” eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275(9): 6123-6128.
24. Alonso-Galicia M, Drummond HA, Reddy KK, Falck JR, Roman RJ (1997) Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension* 29: 320-325.
25. Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, Falck JR, Harder DR, et al. (1998) Nitric oxide-20-Hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res* 83: 1069-1079.
26. Ellis A, Triggle CR (2003) Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium dependent hyperpolarisation and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 1013-1028.
27. Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Ram K, Sindhu RK (2003) Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney International* 63: 186-194.
28. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, et al. (1993) Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens* 6: 723-729.
29. Vaziri ND, Ding Y, Gonick HC (1997) Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effects of laser therapy. *Kidney Int* 52: 1042-1046.

30. Weseler AR, Bast A (2010) Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacology treatment. *CurrHypertens Rep* 12: 154-161.
31. Kozłowska H, Baranowska M, Gromotowicz A, Malinowska B (2007). Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): potential involvement in the physiology and pathology of blood vessels. *Postepy Hig Med Dosw* 61: 555-564.
32. Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW (2006) Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 47(3): 482-487.
33. Costa CA, Trivelato GC, Pinto AM, Bechara EJ (1997) Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem* 43(7): 1196-202.
34. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgüneş H (2004) Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 195(2-3):147-54.
35. Vassallo DV, Simões MR, Furieri LB, Fioresi M, Fiorim J, et al. (2011) Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res* 44(9): 939-46.
36. Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol* 268: C799-C822.
37. Zhang DX, Borbouse L, Gebremedhin D, Mendoza SA, Zinkevich NS, et al. (2012) H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ Res* 110(3):471-80.
38. Dong DL, Yue P, Yang BF, Wang WH (2008) Hydrogen peroxide stimulates the Ca (2⁺)-activated big-conductance K channels (BK) through cGMP signaling pathway in cultured human endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 22(1-4):119-26.

Figure Legends

Figure 1: Effects of exposure to lead on the concentration-response curves of phenylephrine, acetylcholine, and sodium nitroprusside. Effects of 30 days of exposure to lead acetate on the concentration-response curves of (A) phenylephrine, (B) acetylcholine, and (C) sodium nitroprusside (SNP) treatment of aortic rings. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ by Student's *t* test. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's *t*-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 2: Effects of endothelium removal (E-) in aortic rings from both untreated and lead-treated rats. Effects of endothelium removal (E-) in phenylephrine induced vasoconstriction in aortic rings from both untreated and lead-treated rats. The graph demonstrates differences in the areas under the concentration-response curves (dAUC) in both endothelium-denuded and intact segments. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's *t*-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 3: Effects of L-NAME (100 mM) treatment in aortic rings from both untreated and lead-treated rats. Effects of L-NAME (100 mM) treatment on phenylephrine-induced vasoconstriction in aortic rings from both untreated and lead-treated rats. The graph demonstrates that there are no differences in the areas under the concentration-response curves (dAUC) between the groups. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's *t*-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 4: Effects of the catalase in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats (A). Effects of the hydrogen peroxide scavenger, catalase (1000 U/ml), on the concentration-response curves of phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats (A). **(B) Densitometry of catalase Western blots in aortas from untreated and lead-treated rats.** Representative blots are also shown. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's *t*-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 5: Effects of the SOD in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats (A). Effects of the superoxide anion scavenger, SOD (150 U/ml), on the concentration-response curves of phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats (A). The graph demonstrates differences in the areas under the concentration-response curves (dAUC) between the groups. **(B) Densitometry of SOD Western blots in aortas from untreated and lead-treated rats.** Representative blots are also shown. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's t-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 6: Effects of the DETCA in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats. Effects of the inhibitor Cu/Zn superoxide dismutase, DETCA (0.5 mM), on the concentration-response curves of phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's t-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 7: Effects of the apocynin in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats. Effects of the specific NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin (0.3 mM), on the concentration-response curves of phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's t-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 8: Effects of the TEA in aortic segments from both untreated and lead-treated rats (A). Effects of the co-incubation of catalase/TEA in aortic segments from untreated and lead-treated rats (B). Effects of the nonselective K^+ channel blocker, TEA (2 mM) (A), and the effects of the co-incubation of catalase (1000 U/mL) with TEA (2 mM) (B) on the concentration-response curves of phenylephrine in endothelium-intact aortic segments from both untreated and lead-treated rats. The inset shows differences in dAUC in the presence and absence of TEA. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus the corresponding control by Student's t-test. The number of animals used is indicated in parentheses.

Figure 1A

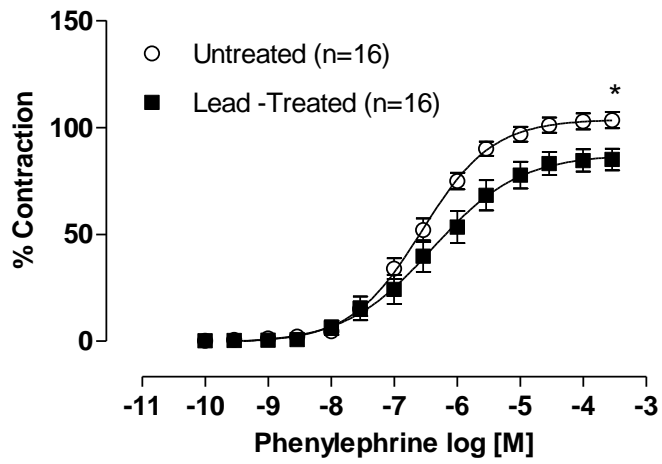


Figure 1B

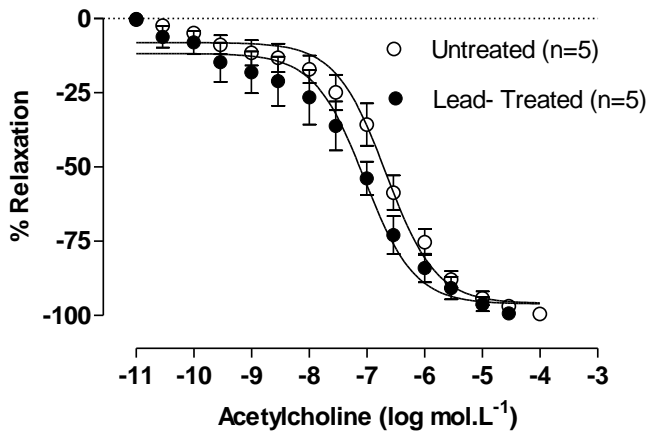


Figure 1C

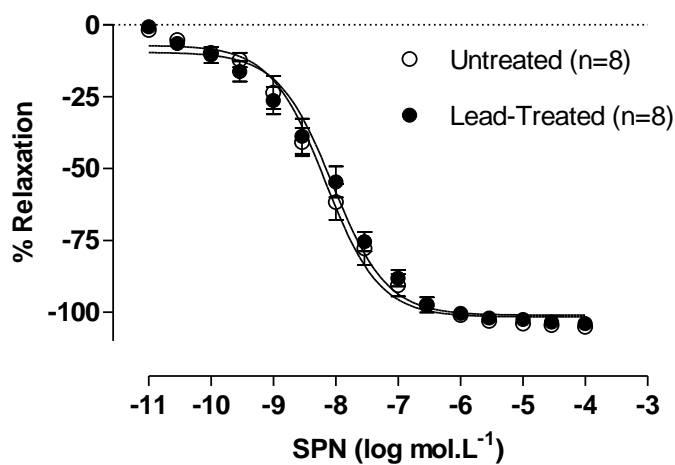


Figure 2

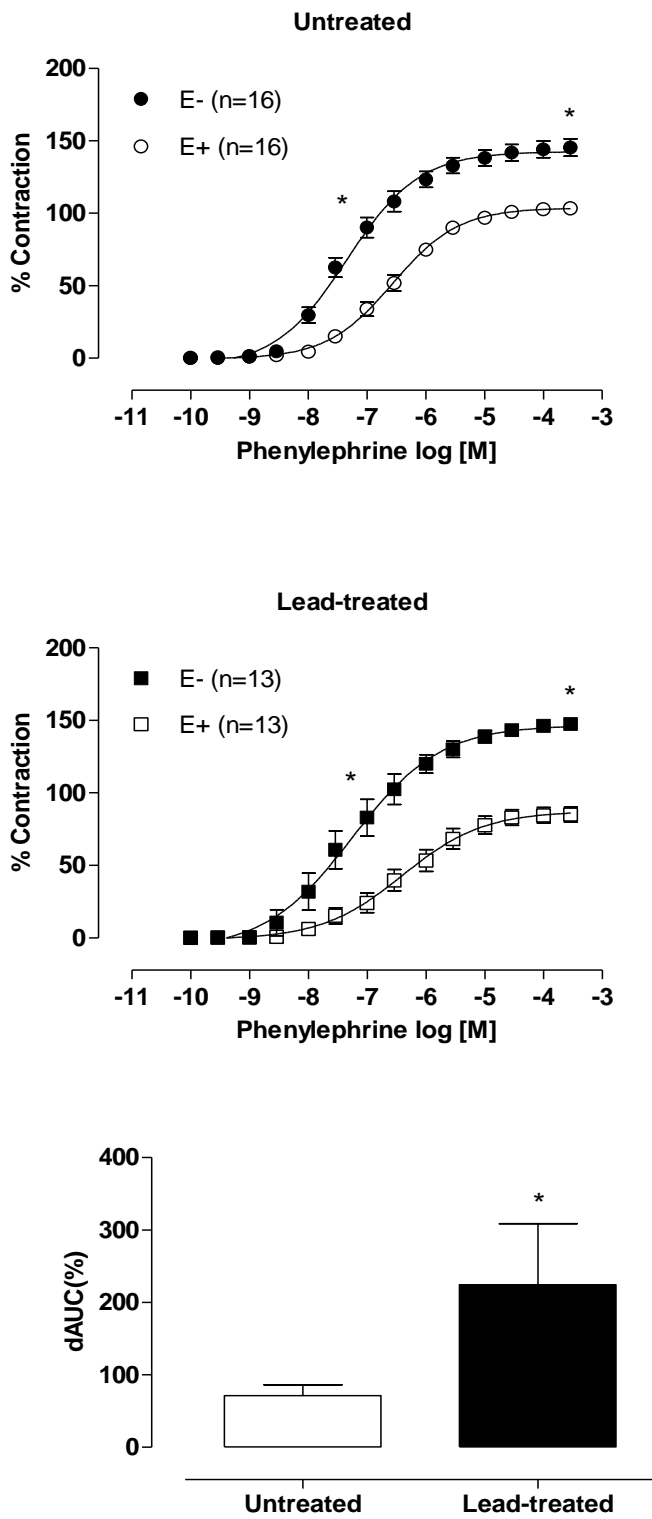


Figure 3

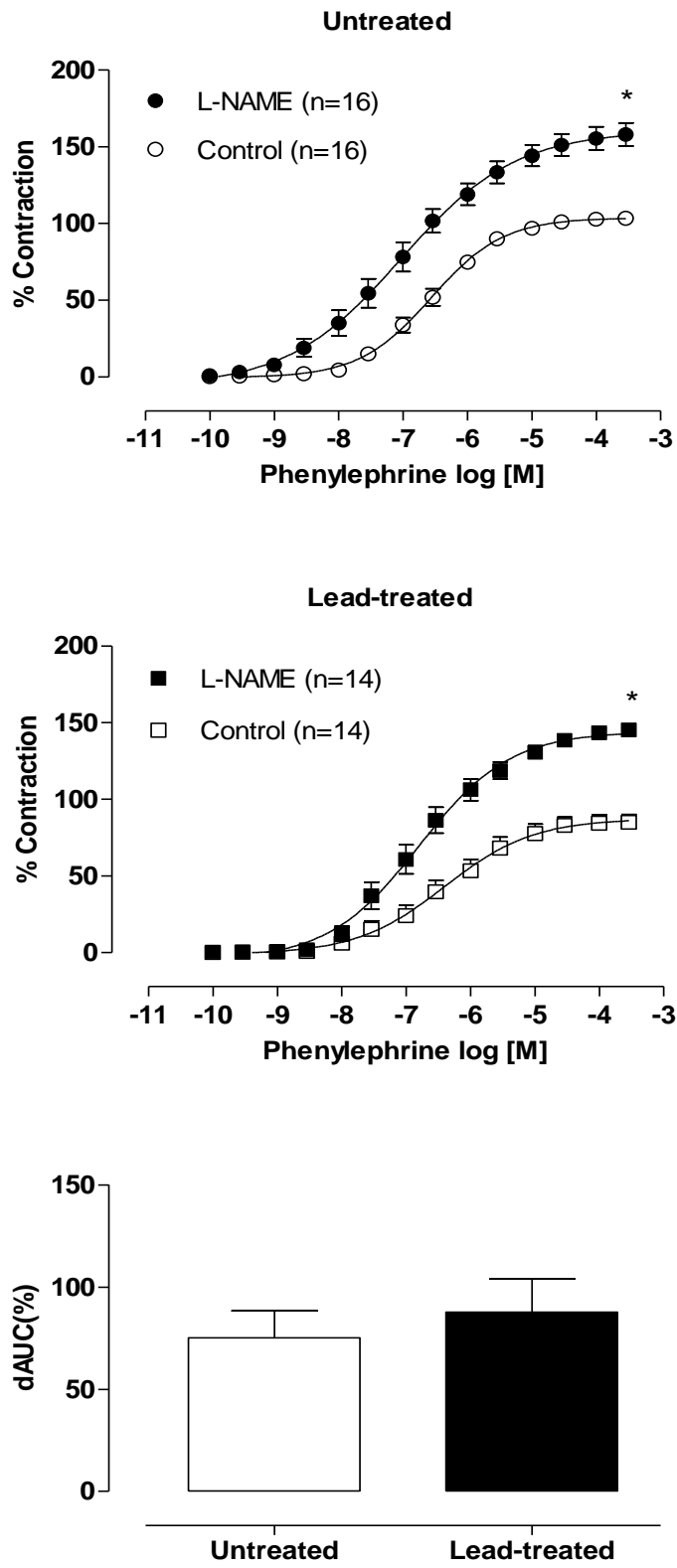


Figure 4A

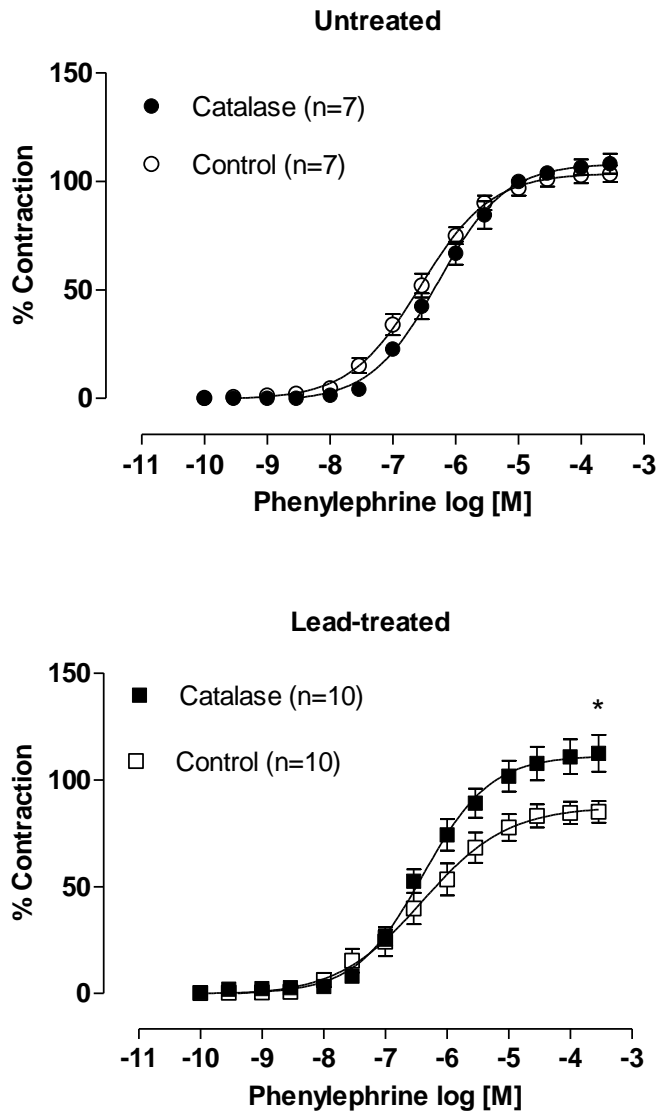


Figure 4B

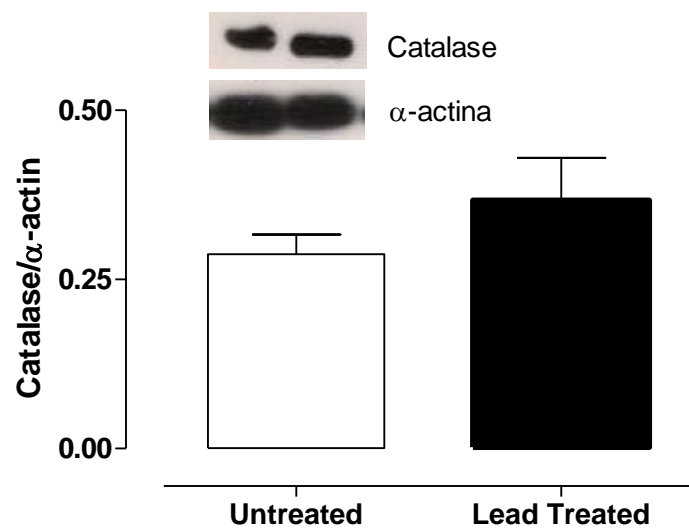


Figure 5A

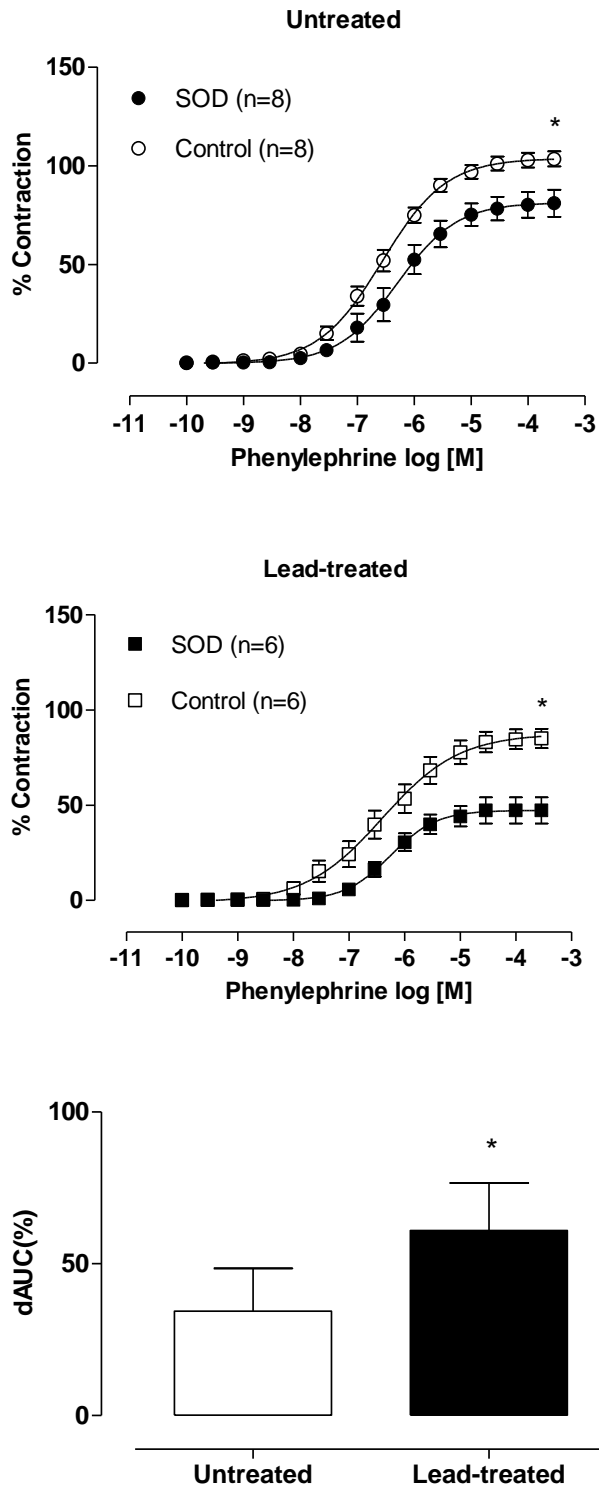


Figure 5B

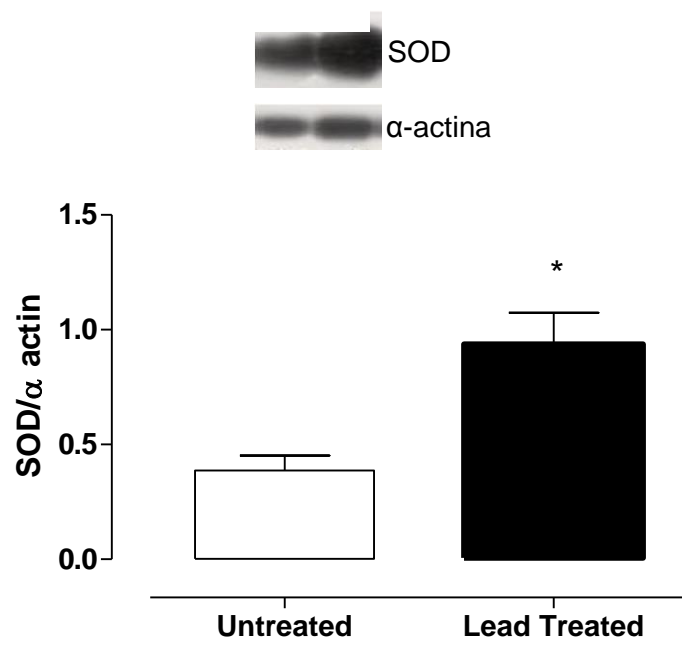


Figure 6

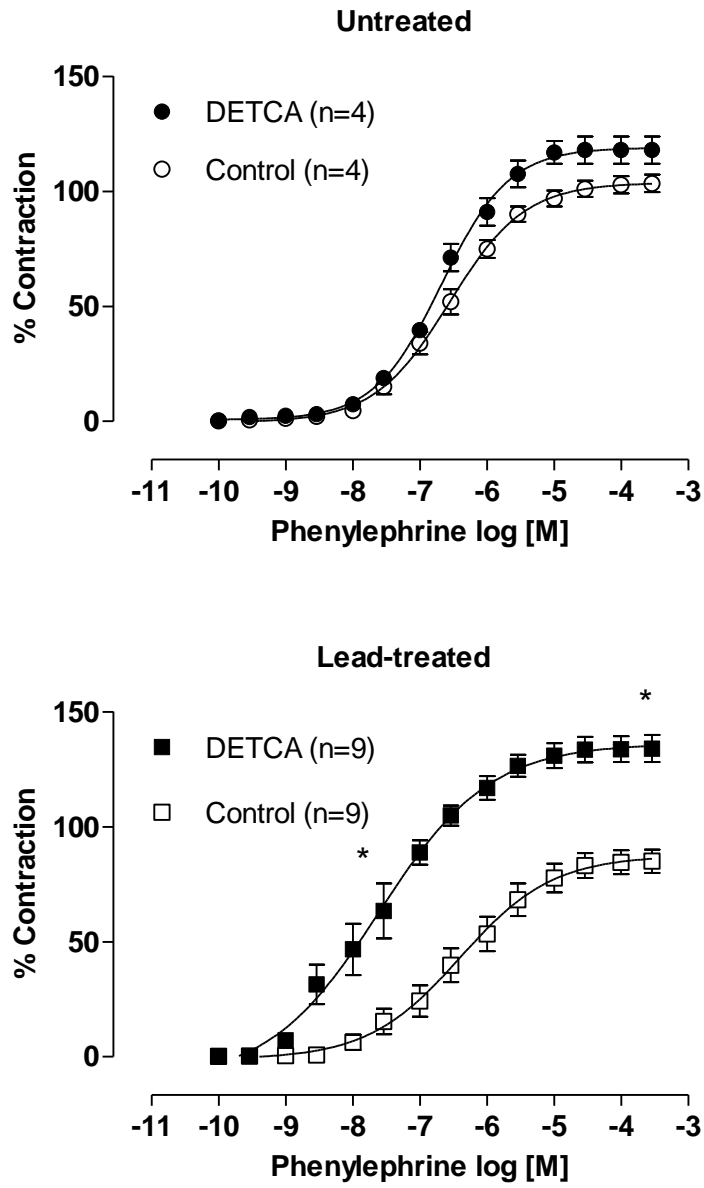


Figure 7

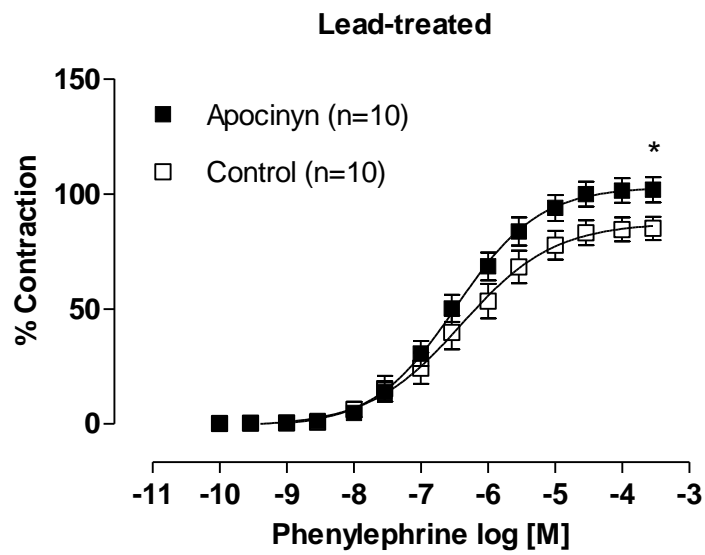
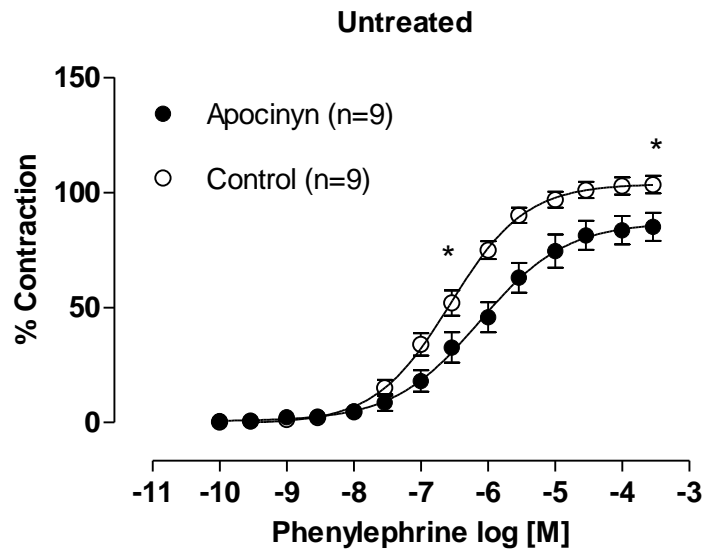


Figure 8A

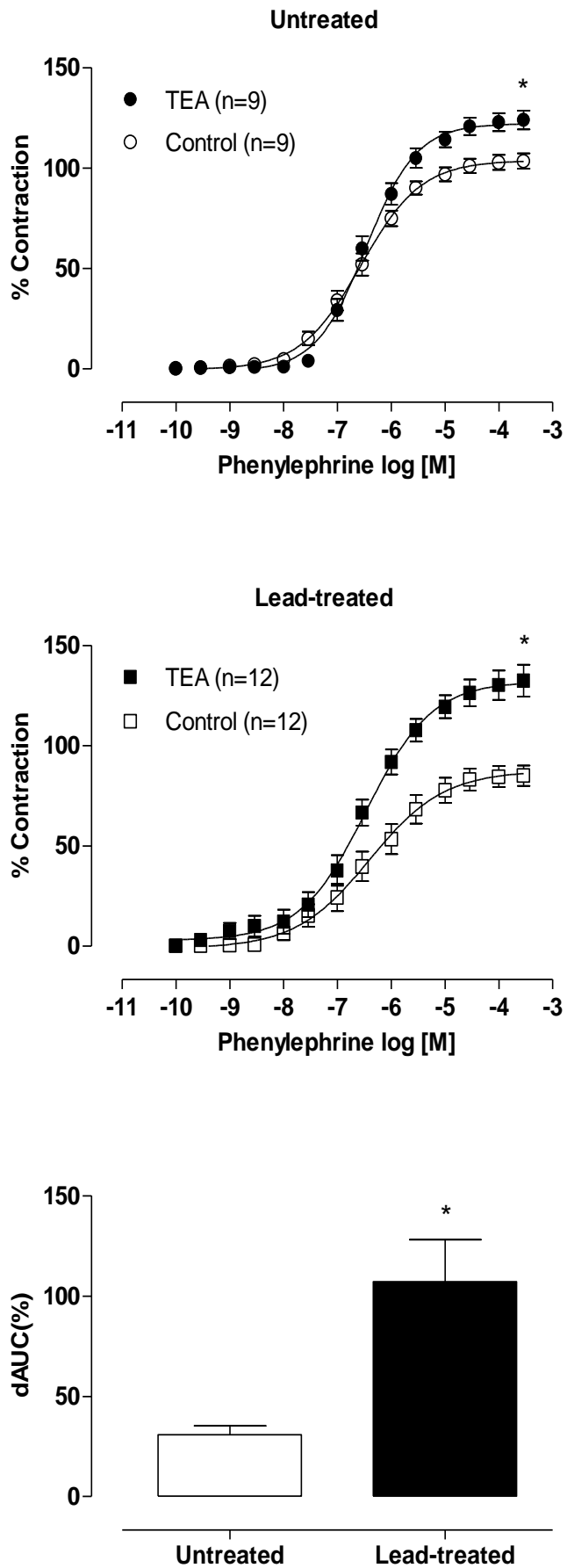


Figure 8B

