

Exposição crônica ao chumbo aumenta a pressão arterial e reduz a reatividade pressórica em ratos

Cindy Medici Toscano

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória, Agosto de 2015

Exposição crônica ao chumbo aumenta a pressão arterial e reduz a reatividade pressórica em ratos

Cindy Medici Toscano

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:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Orientador, UFES

Prof^a. Dr^a. Mirian Fioresi - Coorientadora, UFES

Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior

Prof. Dr. Franck Maciel Peçanha

Coordenadora do PPGCF: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2015

Toscano, Cindy Medici, 1990

Exposição crônica ao chumbo aumenta a pressão arterial e reduz a reatividade pressórica em ratos [Vitória] 2015

XIX, 102p., 29,7 cm (UFES, M. Sc, Ciências Fisiológicas, 2015)

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Exposição ao chumbo. 2. Pressão arterial. 3. Reatividade pressórica. 4. Sistema Nervoso Autônomo Simpático.

À minha amada família, que sempre está ao meu lado: Mara, Eduardo, Wallace, Felipe e Eduardo.

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, que tudo é na minha vida. Agradeço Senhor pelo seu amor e cuidado constante, por ser um verdadeiro Pai em todos os momentos. Agradeço por sua fidelidade, a qual me fez vencer mais essa etapa em minha caminhada.

Aos meus amados pais, **Mara e Eduardo**. Agradeço pelo amor incondicional e por abdicarem de tantas coisas em função dos meus sonhos. **Mãe**, obrigada por desempenhar com tanta destreza esse papel duplo de “pai e mãe” quando a vida teve um desfecho que não esperávamos mesmo ainda tão jovem, e por ser essa mulher valente e ao mesmo tempo tão carinhosa. Não tenho palavras para agradecer tudo o que a senhora já fez por mim. Tenho certeza de que papai estaria orgulhoso de sua princesinha.

Aos meus irmãos, **Dudu e Felipe**. Obrigada pelo incentivo e torcida em favor do meu sucesso. Agradeço pelo amor e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Ao **Wallace**, amor da minha vida, pelo incentivo, apoio e por acreditar em mim. Obrigada por dividir comigo todos os momentos e ser um verdadeiro companheiro de vida. Agradeço pelo seu amor e cuidado e por me fazer cada dia mais feliz. Você é parte fundamental desta conquista!

À minha amada família. **Vovó Odette, vovô Itamar, tios e primos**. Agradeço pelas orações e por acreditarem em mim. Sentir-me amada por vocês traz a alegria e o conforto para minha vida, essenciais para que alcançasse essa vitória.

À minha querida coorientadora. **Mirian**, obrigada por servir como um exemplo de profissional e pessoa maravilhosa desde a minha a minha formação acadêmica. Agradeço por acreditar em mim e me dar a oportunidade de ser sua orientanda na graduação, na iniciação científica e, agora, no mestrado. Saiba que Deus lhe usou para me abençoar. Serei eternamente grata.

Ao Dalton, meu querido orientador. **Chefe**, obrigada pela orientação, conselhos e ensinamentos de vida nesses últimos quatro anos. Agradeço por ter me acolhido como aluna, por sempre estar disponível para me ajudar e ensinar e por ser um exemplo de pessoa e profissional para todos que estão ao seu redor.

À Maylla, pela amizade, conselhos e momentos de aprendizado. **May**, obrigada pela disponibilidade de me ajudar com a bioquímica e com o artigo, pelos momentos de diversão e por fazer parte da minha vida de uma forma tão especial.

À Prof^a Dr^a Alessandra. **Alê**, obrigada por me aceitar como aluna na iniciação científica e por todos os ensinamentos e momentos de alegria no laboratório.

À **Karol**, pela amizade, pelo agradável convívio diário e por dividir os momentos de desespero.

À **Fabi e Priscila**. Agradeço pelo convívio agradável durante todos estes anos. É ótimo trabalhar com pessoas alegres como vocês.

À **Edna**. Obrigada por sua alegria contagiante e pelo convívio nestes últimos anos.

Ao **Gilson** e **Camila** pela agradável companhia desde a iniciação científica e pela disponibilidade em ajudar sempre quando precisei.

Ao **Marito e Dieli** pelo convívio e momentos alegres; dividi-los com vocês foi maravilhoso.

Ao Prof Dr Leonardo pelos ensinamentos e disponibilidade em todos os momentos que “bati na porta” de sua sala.

À Prof^a Dr^a **Ivanita** pelo carinho e ensinamentos. Obrigada pelo convívio e pela disponibilidade em sempre ajudar.

Aos **queridos amigos do LEMC**: Anderson, Bruna, Bianca, Camila, Carol, David, Edna, Elis, Emília, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Gilson, Jonaína, Karol, Kelly, Leonardo, Lorena, Marito, Patrícia, Prof^a Paula, Paula, Priscila, Renata, Rogério, Rosi, Sabrina, Sâmia, Tati, Teca, Vinícius e Wena. Obrigada por transformar os dias de trabalho em momentos de prazer.

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CHUMBO.....	21
1.1.1 História do chumbo.....	21
1.1.2 Aspectos gerais.....	21
1.1.3 Fontes naturais do chumbo.....	22
1.1.4 Fontes antropogênicas.....	23
1.1.4.1 Produção e consumo mundial.....	23
1.1.4.2 Formas de exposição do chumbo.....	24
1.1.5 Cinética no organismo humano.....	27
1.1.6 Efeitos nos diferentes sistemas	30
1.1.7 Efeitos cardiovasculares da exposição ao chumbo.....	32
1.1 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO.....	34
1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	36
1.3 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO.....	38
1.4.1 Óxido Nítrico.....	40
1.4.2 Prostanóides.....	41
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	45
4.1.1 Animais.....	45
4.1.2 Modelo experimental.....	45
4.2 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA PELA TÉCNICA DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA.....	46
4.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	47
4.3.1 Protocolos experimentais.....	47
4.3.1.1 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca após exposição ao chumbo.....	47
4.3.1.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina após exposição ao chumbo.....	48

4.3.1.3 Avaliação dos efeitos da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos e na reatividade pressórica antes e após bloqueio ganglionar.....	49
4.3.1.4 Envolvimento do sistema renina angiotensina nas alterações hemodinâmicas e reatividade pressórica induzidas pelo chumbo.....	49
4.3.1.5 Avaliação da participação da modulação β -adrenérgica nas alterações hemodinâmicas induzidas pelo chumbo.....	50
4.3.1.6 Influência da biodisponibilidade do Óxido Nítrico nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.....	51
4.3.1.7 Envolvimento da via da Ciclooxygenase nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.....	52
4.4 MATERIAL BIOLÓGICO.....	52
4.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....	53
4.5.1 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot.....	53
4.5.1.1 Western Blot para detecção de receptor β_1 -adrenérgico.....	53
4.5.1.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....	53
4.5.1.3 Eletroforese e transferência das amostras.....	54
4.5.1.4 Incubação com os anticorpos.....	54
4.5.1.5 Detecção das proteínas.....	55
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4.7 FÁRMACOS E REAGENTES.....	57
5 RESULTADOS.....	59
5.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS: PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	59
5.1.1 Efeito da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos basais.....	59
5.1.2 Papel dos reflexos autonômicos no aumento da pressão arterial e frequência cardíaca na exposição ao chumbo.....	61
5.1.3 Efeitos do chumbo sobre a modulação β -adrenérgica.....	62
5.1.4 Efeito do losartan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações produzidas pela exposição ao chumbo.....	64

5.1.5 Envolvimento da via da Ciclooxygenase na modulação endotelial nas alterações da pressão arterial produzidas pela exposição ao chumbo.....	65
5.1.6 Envolvimento do Óxido Nítrico na modulação endotelial nas alterações da pressão arterial e frequência cardíaca produzida pela exposição ao chumbo.....	66
5.2 REATIVIDADE PRESSÓRICA.....	66
5.2.1 Efeito da exposição ao chumbo sobre a reatividade pressórica à fenilefrina.....	66
5.2.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após o bloqueio ganglionar.....	68
5.2.3 Efeito do losartan sobre a reatividade pressórica à fenilefrina nas alterações produzidas pelo chumbo.....	71
5.3 MEDIDA BIOQUÍMICA.....	73
5.3.1 Expressão protéica dos receptores cardíacos β_1 -adrenérgicos.....	73
6 DISCUSSÃO.....	74
6.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	74
6.1.1 Efeitos do Hexametônio sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina nas alterações induzidas pelo chumbo.....	77
6.1.2 Efeitos do Isoproterenol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações induzidas pelo chumbo.....	79
6.1.3 Envolvimento do Sistema Renina Angiotensina sobre as alterações da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina induzidas pelo chumbo.....	80
6.1.4 Envolvimento da biodisponibilidade de Óxido Nítrico nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.....	82
6.1.5 Efeitos da Indometacina sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações produzidas pelo chumbo.....	83
6.2 RESUMO DOS RESULTADOS.....	85
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS

- Figura 1:** Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty..... 29
- Figura 2:** Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. Registro da pressão arterial, da pressão arterial média e da Frequência Cardíaca..... 48
- Figura 3:** Registro típico de uma curva dose-resposta à fenilefrina..... 48
- Figura 4:** Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. Registro da pressão ventricular esquerda e da frequência cardíaca estabilizada.. 51
- Figura 5:** Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos tratados (Pb, N=12) e controle (Ct, N=12), através da pletismografia, durante 4 semanas de tratamento. No eixo das ordenadas, temos a PAS exposta em mmHg e, no eixo das abscissas, temos o tempo de exposição ao chumbo, apresentado em semanas. O tempo 0 representa o início e a quarta semana de exposição corresponde ao final do tratamento. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct..... 59
- Figura 6:** (A) Pressão arterial sistólica (PAS), (B) Pressão arterial diastólica (PAD) e (C) Frequência cardíaca (FC) nos grupos controle (Ct) e expostos ao chumbo (Pb). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Número de animais na amostra = 5–8. * $p < 0,05$ vs. Ct. A análise estatística foi realizada através do teste t-de Student não-pareado..... 61
- Figura 7:** (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD), e (C) frequência cardíaca (FC) de ratos antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após o bloqueio ganglionar, no grupo controle (Ct-Hexa) e no grupo tratado (Pb-Hexa). Número de animais na amostra=5–8. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para a análise estatística foi realizado ANOVA uma-va, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct; #

p<0,05 vs. Pb; ⁺ p<0,05 vs Ct-Hexa..... 62

Figura 8: (A) Pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), (C) pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de isoproterenol, no grupo controle (Ct-iso) e no grupo tratado (Pb-iso). A variação pressórica foi calculada pela diferença entre os valores da PSVE (B), representado por Δ PSVE, e da PDfVE (D), representado por Δ PDfVE, antes e após a injeção de isoproterenol em cada grupo (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Teste t de Student e ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. *p<0,05 vs. Ct; ⁺p<0,05 vs. Ct-Iso..... 63

Figura 9: Frequência cardíaca (FC) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de isoproterenol, no grupo controle (Ct-iso) e no grupo tratado (Pb-iso) (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. A análise foi realizada por ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p<0,05 vs. Ct..... 64

Figura 10: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após administração de losartan, no grupo controle (Ct-Los) e no grupo tratado (Pb-Los) (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. A análise foi realizada por ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p<0,05 vs. Ct; [#] p <0,05 vs. Pb..... 65

Figura 11: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de indometacina, no grupo controle (Ct-Indomet) e no grupo tratado (Pb-Indomet) (Ct, N=8 e Pb, N=11). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * p <0,05 vs. Ct..... 66

Figura 12: (A) PAS, (C) PAD antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado

(Pb), e após a administração de L-NAME, no grupo controle (Ct L-NAME) e no grupo tratado (Pb L-NAME). A variação pressórica foi calculada pela diferença entre os valores da PAS (B), representado por Δ PAS, e da PAD (D), representado por Δ PAD, antes e após a injeção de L-NAME em cada grupo (N=7). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Teste t de Student e ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. *p<0,05 vs. Ct; #p <0,05 vs. Pb; + p<0,05 vs. Ct L-NAME..... 67

Figura 13: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina expressos em valores absolutos na PAS (A) e na PAD (B) do grupo controle (Ct) e do grupo tratado (Pb). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina expressos em valores percentuais na PAS (C) e na PAD (D) do grupo controle (Ct) e do grupo tratado (Pb) (Ct, N=5; Pb, N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizada ANOVA duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 vs. Ct..... 68

Figura 14: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAS no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração do hexametônio (Ct-Hexa), e no grupo exposto ao chumbo (B), antes (Pb) e após a administração do hexametônio (Pb-Hexa). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAD no grupo controle (D), antes (Ct) e após a administração do hexametônio (Ct-Hexa), e no grupo exposto ao chumbo (E), antes (Pb) e após a administração do hexametônio (Pb-Hexa) (Ct, N=5; Pb, N=8). Diferença percentual da área abaixo da curva na PAS (C) e na PAD (F) antes (Preenchido) e após a administração do hexametônio (Não-preenchido) entre os grupos. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística das curvas de concentração-resposta à fenilefrina foi utilizado ANOVA duas vias, seguido de post hoc de Bonferroni. Teste t de student foi utilizado para análise da diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC). #P<0,01 vs Pb; *P<0,01 vs Ct..... 69

Figura 15: Curva dose-resposta à fenilefrina na frequência cardíaca (FC) no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração de hexametônio (Ct-Hexa); e no grupo tratado (B), antes (Pb) e após a administração de

hexametônio (Pb-Hexa) (Ct, N=5; Pb, N=9). Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas-vias, seguido de Bonferroni. *P<0,05 vs Ct.; #P<0,05 vs Pb..... 71

Figura 16: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAS no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração do Losartan (Ct-Los), e no grupo exposto ao chumbo (B), antes (Pb) e após a administração do Losartan (Pb-Los). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAD no grupo controle (D), antes (Ct) e após a administração do Losartan (Ct-Los), e no grupo exposto ao chumbo (E), antes (Pb) e após a administração do Losartan (Pb-Los) (N=8). Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos, na PAS (C) e na PAD (F), antes (Preenchido) e após a administração do hexametônio (Não-preenchido). Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Para análise estatística das curvas de concentração-resposta à fenilefrina foi utilizado ANOVA duas vias, seguido de post hoc de Bonferroni. Teste t de student foi utilizado para análise da diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%). #P<0,01 vs Pb; *P<0,01 vs Ct..... 72

Figura 17: Efeitos da exposição ao chumbo sobre a expressão de proteínas dos receptores cardíacos β_1 -adrenérgicos (Ct, N=3; Pb, N=4). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão dos receptores β_1 e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade dos receptores β_1 e do GAPDH. O peso molecular do receptor β_1 e do GAPDH são ~50,5 kDa e ~36 kDa, respectivamente. Os dados estão apresentados em Média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado Teste t de Student, não pareado. *P<0,05 vs. Ct..... 73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%dAUC: Porcentagem da diferença da AUC

AA: Ácido araquidônico

ANOVA: análise de variância

ATP: Trifosfato de adenosina

bpm: batimentos por minuto

CEUA / UFES: Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Universidade Federal do Espírito Santo

COX: Ciclooxigenase

COX: Enzima ciclooxigenase

Ct: Controle

DCV: Doenças cardiovasculares

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS: Oxido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Frequência Cardíaca

Fe: Fenilefrina

GAPDH: Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ILZSG: International Lead Zinc Study Group

i.m.: Intramuscular

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

MLV: Músculo liso vascular

NKA: Na^+, K^+ -ATPase

NO: óxido nítrico

O_2^- : ânion superóxido

ONU: Organização das Nações Unidas

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

Pb: Tratamento com chumbo.

Pb-S: concentração de chumbo no sangue

PDfVE: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PGE_2 : Prostaglandina E_2

$\text{PGF}_{2\alpha}$: Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$

PGH_2 : Prostaglandina H_2

PGI_2 : Prostaciclina 2

PGI_3 : Prostaciclina 3

PLB: Fosfolambam

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PVC: Cloreto de polivinila

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SRA: Sistema Renina Angiotensina

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VD: Ventrículo Direito

VE: Ventrículo esquerdo

RESUMO

O chumbo tem sido associado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição crônica ao chumbo sobre a pressão arterial e reatividade pressórica com a finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos nestas alterações. Ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: controle (Ct) e expostos a 100 ppm de chumbo (Pb) adicionado à água de beber durante 30 dias. A pressão arterial sistólica caudal (PAS) foi medida semanalmente. Após o tratamento a PAS, pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram mensuradas. A exposição ao chumbo promoveu aumento da pressão arterial e diminuição da reatividade pressórica à fenilefrina. Também foram avaliados os papéis putativos do Sistema Renina Angiotensina (SRA) e os reflexos autonômicos nestas alterações. Um bloqueador do receptor AT₁ (losartan, 10 mg / kg) reduziu a PAS e PAD e, além disso, o bloqueio ganglionar (hexametônio, 20 mg / Kg) foi capaz de reduzir a PAS, PAD e FC. Estes resultados sugerem que há uma participação do Sistema Renina Angiotensina e um aumento da atividade simpática, respectivamente, causado pelo chumbo. O isoproterenol (10 mg / kg) aumentou a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final (PDFVE) e FC apenas no grupo controle. Este resultado sugere a existência de uma atividade modulada dos receptores β_1 -adrenérgicos, a qual foi confirmada pela análise da expressão protéica destes receptores pelo Western blot. Além disso, a indometacina (0,1 mg / kg, IV) reduziu a PAS e PAD no grupo Pb. O L-NAME (3 mg / kg, iv) aumentou a PAS e PAD em ambos os grupos, no entanto, a magnitude dos efeitos do grupo de controle foram superiores aos do grupo Pb. Estes resultados sugerem o envolvimento do aumento da atividade da cicloxigenase (COX) e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), respectivamente. A diminuição da reatividade pressórica pode estar associada a alterações da modulação endotelial mediada pela atividade da COX e redução da biodisponibilidade do NO. Esses resultados oferecem evidências adicionais de que a exposição crônica ao chumbo, mesmo em baixas concentrações pode desencadear mecanismos potenciais para o desenvolvimento de hipertensão e pode ser um fator de risco ambiental para a doença cardiovascular. Os resultados apresentados

forneem orientações para a revisão das concentrações de chumbo consideradas seguras.

Palavras-chave: Exposição ao chumbo, Pressão arterial, Reatividade pressórica, Sistema Nervoso Autônomo Simpático.

ABSTRACT

Lead has been associated as one of risk factors for the development of hypertension and other cardiovascular diseases. Our purpose was to investigate whether the effects of chronic exposure to low concentrations of lead on arterial pressure and pressure reactivity and to elucidate mechanisms involved in these changes. Male Wistar rats were sorted randomly into two groups: control (Ct) and treatment with 100 ppm of lead (Pb) added to drinking water for 30 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly. Following treatment, SBP, diastolic arterial pressure (DBP) and heart rate (HR) were measured. Treatment increased arterial pressure and decreased the pressure reactivity to phenylephrine. Putative roles of the renin angiotensin system and the autonomic reflexes in these changes were also evaluated. AT₁ receptor blocker (losartan, 10 mg/Kg) reduced the increase of arterial pressure and the ganglionic blockade (hexamethonium, 20 mg/Kg) was able to reduce SBP, DBP and HR. These results suggests that there is a participation of the renin angiotensin system and an increase in sympathetic activity, respectively, caused by lead. Isoproterenol increased left ventricular systolic pressure (LVSP), end-diastolic pressure (LVEDP) and HR only in the control group suggesting the existence of a modulated activity of β_1 -adrenoceptors which was confirmed by Western Blot analyses. Moreover, indomethacin (0,1 mg/kg, IV) reduced SBP and DBP from Pb group. L-NAME (3mg/kg, IV) increased SBP and DBP in both groups, however, the magnitude of the effects in the control group were higher than those of the Pb group. These results propose the involvement of cyclooxygenase (COX) activity and reduced bioavailability of nitric oxide (NO) in these changes respectively. Decreased pressure reactivity may be associated to alteration of endothelial modulation mediated by the COX activity and reduced bioavailability of NO. These findings offer further evidence that chronic exposure to lead even at low concentrations can trigger mechanisms for hypertension development and might be an environmental risk factor for cardiovascular disease. Results presented here provide guidance for reviewing the lead concentrations considered to be safe.

Keywords: Lead Exposure; Blood pressure; pressure reactivity; Autonomic sympathetic nervous system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CHUMBO

1.1.1 História do chumbo

Acredita-se que o chumbo foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo homem, tendo sua fundição já iniciado há aproximadamente 9000 anos, de acordo com descobertas arqueológicas. Os antigos egípcios já utilizavam o chumbo há mais de oito mil anos na cunhagem de moedas, fabricação de cosméticos, armas, adornos e utensílios domésticos (Capitani, et al., 2009; Paoliello & Chasin, 2001).

Durante o império romano este metal foi utilizado, na forma de óxidos, na conservação e correção do gosto de vinhos, sendo este um hábito mantido por pequenas vinícolas europeias até poucas décadas atrás. Os romanos também utilizavam o chumbo para a fabricação de canos os quais eram mantidos em casas e outras edificações mais antigas erguidas antes de 1978 (Capitani, et al., 2009; Paoliello & Chasin, 2001).

A produção de chumbo metálico no Brasil foi importante até a década de 90, momento em que duas grandes fundições primárias utilizadas no refino do minério extraído na Bahia e em Adrianópolis, PR, fecharam suas atividades industriais. Desde então a produção nacional do metal tem declinado, representando não mais de 8% do consumo anual total de chumbo no país (Capitani, et al., 2009).

Como o chumbo é utilizado por tão longo tempo, a história da intoxicação por este metal também é extensa e intoxicações por chumbo clinicamente evidenciadas têm sido identificadas há algumas décadas por vários autores (WHO, 1995).

1.1.2 Aspectos gerais

O chumbo (Pb) é um elemento químico de símbolo Pb, pertence ao grupo do Carbono (IV B) da classificação periódica dos elementos químicos (IUPAC, 2003). É encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com diversos outros metais. À temperatura ambiente, o chumbo encontra-se no estado sólido e apresenta coloração branco-azulada quando recentemente cortado, porém adquire coloração acinzentada quando exposto ao ar (Paoliello & Chasin, 2001; Brasil, 2013).

O chumbo pode apresentar estados de oxidação +2 e +4. A galena é a forma do íon estável do chumbo, Pb^{2+} , combinado com o enxofre. Esta combinação forma um dos mais abundantes minérios ($PbS=86,6\%$ de Pb e $13,4\%$ de S) de onde é extraído quase todo o chumbo primário (DNPM, 2001). O Pb^{+4} forma os compostos orgânicos de maior emprego no comércio, tetrametilchumbo ($Pb(CH_3)_4$) e tetraetilchumbo $Pb(C_2H_5)_4$, os quais já foram muito utilizados como aditivos em combustíveis (Conterato, 2007).

O referido metal é tóxico, pesado, maleável, trabalhável a frio, apresenta baixo ponto de fusão, alta ductibilidade, facilidade de formar liga, razoável condutor de calor e eletricidade, além de ser um excelente protetor da corrosão atmosférica devido a sua rápida oxidação superficial em forma de película de óxido, formando o protóxido de chumbo. Graças a essa resistência a corrosão e a todas estas propriedades, este metal encontra muitas aplicações na indústria e grande importância comercial no mercado mundial (WHO, 1995). Além disso, possui a característica singular de absorver radiações de ondas curtas, o que o torna o isolante mais utilizado no emprego de raios-x (Brasil, 2013).

1.1.3 Fontes naturais do chumbo

O chumbo é abundante na crosta terrestre sendo amplamente distribuído e encontrado livre ou associado a outros elementos. Tem como fontes naturais as emissões vulcânicas, o intemperismo geoquímico, degradações de rochas e as emissões originadas do mar. Porém, é difícil mensurar o teor de chumbo na natureza, uma vez que, nos últimos séculos este metal tem sido muito utilizado pelos homens (Quitério et al., 2003). Uma pequena quantidade de chumbo radioisotópico (^{207}Pb) é derivado do decaimento do gás radônio, lançado por fontes geológicas. As maiores fontes geológicas do chumbo são as rochas ígneas e metamórficas (WHO, 1995).

O chumbo pode ser obtido de fontes primárias ou secundárias. O chumbo primário é obtido pela extração das minas e representa a principal forma de obtenção deste metal. O chumbo secundário é obtido através da reciclagem de sucatas e baterias e representa a principal fonte de obtenção do metal no Brasil. Além disso, a forma de obtenção do chumbo secundário tem crescido muito nos últimos anos (Brasil, 2013).

Estima-se que as fontes vulcânicas são responsáveis pela emissão de 6400 toneladas de chumbo por ano (WHO, 1995). No entanto, o teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades antropogênicas e também pelo transporte deste metal através do ar, sendo a deposição seca e úmida consideradas importantes vias de contaminação do metal (WHO, 1995; Paoliello & Chasin, 2001).

1.1.4 Fontes antropogênicas

1.1.4.1 Produção e consumo mundial

A emissão de chumbo também pode ocorrer através de fontes antropogênicas além das fontes naturais. A produção mundial do minério concentrado alcançou um crescimento de 10,64% em 2011, atingindo em 2012, 89 mil toneladas nas reservas mundiais, de acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (Brasil, 2013).

Os maiores produtores de chumbo primário são também os países detentores das maiores reservas mundiais do metal: China, Austrália e Estados Unidos, os quais, juntos participaram com aproximadamente 67% das reservas globais em 2008 (Brasil, 2011). Já a produção brasileira de chumbo metálico refinado foi de 165,40 Quilotonelada, correspondendo a 1,56% da produção global, o que levou o Brasil à décima sexta posição entre os maiores produtores mundiais (Brasil, 2013).

Enquanto as reservas mundiais atingiram 171 milhões de toneladas no ano de 2008, as reservas brasileiras alcançaram 671 mil toneladas, o que representa 0,39% das reservas globais. No Brasil, o consumo do chumbo metálico em 2000 foi de 156,4 mil toneladas, já em 2010 o consumo foi de 260 mil toneladas, o que representa um crescimento significativo na demanda de chumbo. O país tem se desenvolvido, e desta forma, o consumo do metal tende a crescer consecutivamente devido às previsões de investimento das montadoras de automóveis, as quais pretendem elevar a produção de veículos nos anos futuros (Brasil, 2008; ILZSG, 2014).

A maior parte da produção brasileira de chumbo é procedente de Minas Gerais (Brasil, 2009, 2013), e em seguida os estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Tocantins e Bahia (Brasil, 2009). 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). De acordo com International Lead and Zinc Study Group (ILZSG), em 2007, a produção secundária do chumbo representou 54% da produção mundial do chumbo refinado. 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).

1.1.4.2 Formas de exposição ao chumbo

O chumbo é utilizado em mais de 200 processos industriais diferentes, podendo ser usado como um metal (40%), em ligas (25%) e em compostos químicos (35%) (ATSDR, 2007; Parmeggiani, 1983). Na forma de ligas e compostos, o chumbo é empregado na fabricação de produtos de alta tecnologia, tais como, componentes para proteção de reatores nucleares, finas placas de componentes eletrônicos, bem como de baterias, tintas e corantes, cerâmicas, cabos e munição, além de servir como elemento de adesão de superfícies (Kreusch, 2005). Atua também na indústria eletrônica, promovendo a adesão de componentes à superfície de placas, e facilitando a ligação elétrica entre os componentes dos circuitos eletrônicos (Kreusch, 2005). Portanto, materiais a base de chumbo facilitam o desenvolvimento de produtos de tecnologia avançada, beneficiando também a tecnologia para confecção de tubos de raios catódicos usados em telas de televisores, computadores e radares (Kreusch, 2005).

As baterias são as principais fontes de chumbo secundário. Para o processo de reciclagem do chumbo por meio desses materiais são utilizados alguns métodos que acabam liberando gases e particulados na atmosfera, além também de gerar resíduos em uma quantidade considerada altamente prejudicial. Por esse motivo, este processo de reaproveitamento do chumbo deveria ser disposto em aterro industrial adequado (Matos & Ferreira, 2007; Brasil, 2013).

Por ser um metal dúctil e resistente à corrosão, o chumbo metálico tem sido usado na forma de lâmina, canos e cabos, além de servir como protetor contra radiações ionizantes e utilizado como cobertura protetora, na manufatura de baterias (Kreusch, 2005).

Os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos usados, pois aumentam a durabilidade e dificultam a corrosão dos materiais. No entanto, muitos países têm restringido seu uso, por exemplo, no Brasil, a Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008, estipula um limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares (Brasil, 2008). Apesar da legislação existente no Brasil, há grande preocupação com a falta de controle na importação de brinquedos asiáticos, principalmente chineses que, em sua maioria, não estão adequados aos limites já estabelecidos (Capitani et al., 2009). Além disso, um estudo publicado em 2009 demonstrou que várias marcas de tintas para paredes vendidas no Brasil contêm altos níveis de chumbo. A análise comprovou que o chumbo ainda é bastante utilizado como pigmento e agente secante em tintas para paredes vendidas não só aqui, mas em vários países em desenvolvimento (Toxics Link Executive Summary, 2009).

Até o ano de 1970 quase toda a gasolina utilizada no mundo continha chumbo. A partir de então tem havido um contínuo movimento em relação ao combustível com chumbo, gerado pela preocupação relacionada com os efeitos do metal na saúde e também no ambiente, a fim de reduzir a emissão de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxido de nitrogênio no ar (UNEP, 1999; Paoliello & Chasin, 2001).

No ano de 1984, a combustão da gasolina com chumbo foi responsável por aproximadamente 90% do total de emissões antropogênicas. Em 1988, essa porcentagem diminuiu para 34% das emissões anuais de chumbo (ATSDR, 1993) com as medidas restritivas em relação ao uso do chumbo na gasolina, e em alguns países durante a década de 90, essa quantidade diminuiu ainda mais. Embora a combustão do chumbo na gasolina seja uma fonte antropogênica importante de liberação do metal na atmosfera, liberações industriais no solo, provenientes de fundições de metais, fábricas de baterias e indústrias químicas, são hoje os maiores contribuintes para o total de chumbo liberado (ATSDR, 1993; Paoliello & Chasin, 2001).

No Brasil foi criada uma lei que limita a utilização do chumbo tetraetila como aditivo na gasolina. A partir de 1993, a Lei nº 7823/93, levou à obrigatoriedade do uso de 22% etanol como aditivo na gasolina, tornando o emprego do chumbo tetraetila totalmente dispensável, uma vez que com essa porcentagem de etanol, o chumbo

comprometeria o funcionamento dos motores dos veículos (Paoliello & Chasin, 2001; Neder & Cotta, 1999).

Geralmente, a exposição da população ao chumbo pode ocorrer de forma ocupacional e não ocupacional. Dentre as atividades ocupacionais, as quais expõem os trabalhadores à intoxicação estão: extração, concentração e refino de minérios contendo chumbo; fundição; produção, reforma e reciclagem de acumuladores elétricos; manuseio de sucatas; produção de cerâmicas; jateamento de tintas antigas à base de chumbo; soldas à base de chumbo; produção de cristais; demolição de instalações antigas com fornos de chumbo; produção de pigmentos contendo chumbo; operações de polimento de materiais contendo chumbo, dentre outros (ATSDR, 2007; Brasil, 2006).

Após a remoção e/ou diminuição do chumbo na gasolina, tintas e soldas, houve uma redução drástica da exposição da população ao chumbo. Entretanto, como o chumbo não é degradado e continua sendo utilizado, mesmo que em menores proporções, e lançado no ambiente, a exposição não-ocupacional ainda pode ocorrer em diversas situações, tais como: proximidade em locais contaminados com chumbo; uso de medicações que contêm chumbo; ingestão de água ou alimentos contaminados com chumbo; contato com solo contaminado com pesticidas contendo chumbo; uso de tinturas de cabelo; manuseio de brinquedos pintados com tintas a base de chumbo, dentre outros. (ATSDR, 2007; Brasil, 2006; Capitani, et al., 2009).

Diante das diversas fontes de exposição ao chumbo, alguns países já estabeleceram concentrações máximas de chumbo no sangue. A “Agency for Toxic Substances and Disease Registry” (ATSDR) recomenda uma concentração de chumbo sanguínea inferior 30 µg/dL em adultos não expostos e 60 µg/dL em adultos expostos ocupacionalmente, considerando-as seguras para a saúde (ATSDR, 2005).

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (1978) do Ministério do Trabalho, determina como valor de referência em pessoas não expostas e o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) em trabalhadores expostos de 40 µg/dL e 60 µg/dL de sangue, respectivamente (Brasil, 1978; Jacob et al., 2002). Além disso, a NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), revisada em 2013, estabelece que seja feito o monitoramento anual, em trabalhadores expostos, dos efeitos do chumbo. No entanto, estudos têm demonstrado (Vander et al, 1988) que concentrações de

chumbo no sangue inferiores aos valores de referencia já podem causar alterações biológicas significantes (Vander, et al, 1988; Kasperczyk et al, 2009).

A exposição a agentes tóxicos, incluindo chumbo e outros metais, pode contribuir para o surgimento ou agravamento da hipertensão e de doenças cardiovasculares e pesquisas desenvolvidas com animais experimentais procuram eliminar os fatores que dificultam o isolamento do chumbo como um mecanismo hipertensor (Navas-Acien et al., 2007). Trabalhos recentes do nosso laboratório mostraram que a exposição a baixas concentrações de chumbo é capaz de induzir aumento da pressão arterial em animais, por alterar o Sistema Renina Angiotensina (Simões et al., 2011; Fiorim et al., 2011), induzir o estresse oxidativo, reduzir a biodisponibilidade de NO (Nunes et al., 2015) e alterar o mecanismo de contratilidade cardíaca (Fioresi et al., 2013).

1.1.5 Cinética no organismo humano

Tendo em vista a ampla utilização do chumbo pelo homem há milhares de anos, e por estar amplamente distribuído pela crosta terrestre, o chumbo se tornou um dos contaminantes mais comuns do ambiente, permitindo que todos os indivíduos estejam expostos e possuam chumbo em seus organismos. Entretanto, o metal é tóxico e não apresenta nenhum efeito fisiológico, podendo levar a diversos danos em todos os sistemas do organismo (Moreira & Moreira, 2004).

O processo de absorção do chumbo dependerá da quantidade e do tempo de exposição ao metal, do seu estado físico e químico, além de ser influenciada por fatores relacionados ao hospedeiro, tais como, estado de saúde, idade, genética, estado fisiológico e condições nutricionais (Paoliello & Chasin, 2001). De modo geral, a principal forma de absorção do chumbo ocorre pelo trato respiratório e gastrointestinal e, somente em sua forma orgânica, pode penetrar no organismo por via cutânea (Brasil, 2006; Moraes, 2014). E, além disso, o trato respiratório é a principal via de absorção do chumbo na exposição ocupacional (Paoliello & Chasin, 2001).

Após a absorção, o chumbo pode ser encontrado no sangue, tecidos moles e mineralizados. A meia-vida do chumbo nos três compartimentos é bastante diferente, sendo estimada em 36 dias para o sangue, 40 dias para os tecidos moles

e 27 anos para os ossos, baseado no modelo de distribuição de Rabinowitz e colaboradores (Rabinowitz et al., 1976; WHO, 1995).

Uma vez presente no sangue, o metal é distribuído entre os órgãos, dependendo principalmente da afinidade pelo tecido específico, permanecendo assim uma concentração de chumbo no sangue inferior a 2% do seu total no organismo (Goyer, 1991).

Estudos (Saryan & Zenz, 1994; Moraes, 2014) têm sugerido haver afinidade entre o chumbo e aorta, fígado e rins, uma vez que níveis elevados têm sido encontrados nestes órgãos. Além disso, a deposição 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; Moraes, 2014).

Considerando o chumbo como um análogo biológico do cálcio, sabe-se que o sítio primário da deposição do chumbo é o tecido ósseo, o qual possui aproximadamente 95% do conteúdo corporal em adultos (Moreira & Moreira, 2004). Acreditava-se que este era um depósito inerte de chumbo, entretanto, já se sabe que ocorre mobilização deste metal presente nos ossos para o sangue, expondo cronicamente os tecidos moles (Moreira & Moreira, 2004). Em face da meia vida longa para o chumbo nos ossos, esse compartimento serve como fonte endógena do metal para outros compartimentos, muito tempo depois de cessada a exposição (Paoliello & Chasin, 2001; Moreira & Moreira, 2004; WHO, 1995).

Ainda que a concentração sanguínea do metal seja aceita como indicador de exposição, alguns dados sugerem que esta não representa adequadamente a concentração deste metal no organismo. Deste modo, esta não deve ser utilizada como indicador de exposição crônica ao chumbo, uma vez que o organismo acumula chumbo durante toda a vida e elimina de forma lenta, devido a sua afinidade pelo tecido ósseo (Moreira & Moreira, 2004). O conteúdo total de chumbo no organismo é que está relacionado com o risco de efeitos adversos (ATSDR, 1992).

O chumbo é eliminado do organismo humano de forma lenta, com meia vida de aproximadamente 10 anos (Moraes, 2014), sendo excretado por diferentes vias, dentre as principais estão a excreção renal (75-80%) e a gastrintestinal (15%).

Existem também as outras fontes de excreção (8%) como suor, descamação cutânea, cabelo, as unhas e o leite materno (Tsalev & Zaprianov, 1985; Paoliello & Chasin, 2001; Moreira & Moreira, 2014).

A figura 1 esquematiza a cinética do chumbo no organismo humano.

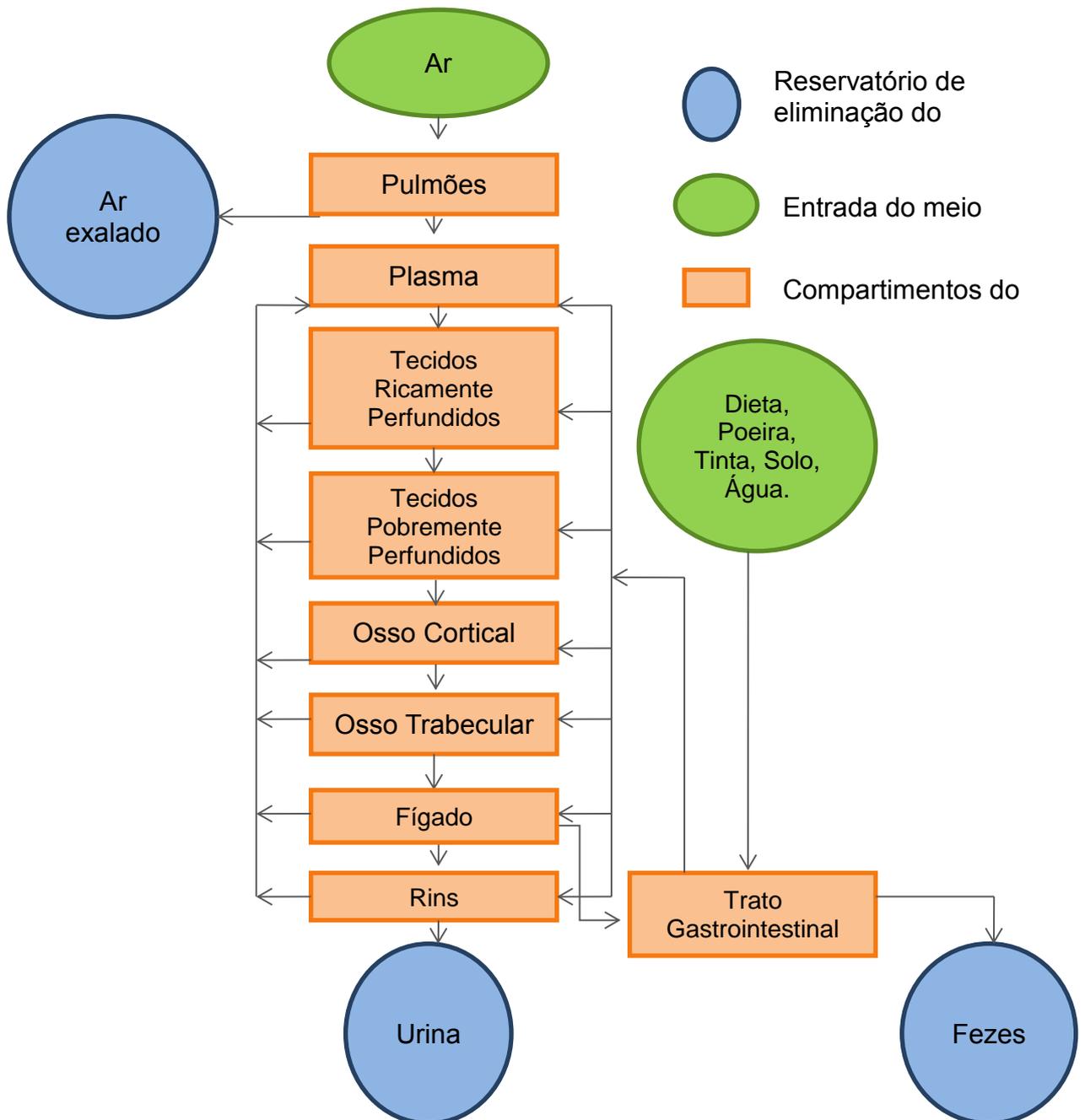


Figura 1: Compartimentos e caminhos de troca do chumbo no modelo de O'Flaherty .

Fonte: Modificado de MOREIRA; MOREIRA, 2004.

1.1.6 Efeitos nos diferentes sistemas

Os metais pesados podem danificar toda e qualquer atividade biológica desencadeando diversos efeitos (Moreira & Moreira, 2004). Na sua interação com a matéria viva, o chumbo apresenta características comuns a outros metais pesados, mas também demonstra algumas peculiaridades. Devido à sua capacidade cumulativa e por ser um metal tóxico, o chumbo pode gerar intoxicação aguda ou crônica no organismo, levando a diversos efeitos deletérios nos diferentes órgãos e sistemas, podendo até levar a morte (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnett et al., 2007).

A toxicidade do chumbo deriva, principalmente, de sua intervenção no funcionamento das membranas celulares e enzimas, permitindo a formação de complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio. As interações bioquímicas do chumbo com grupamentos sulfidril (-SH) exercem grande significado toxicológico, uma vez que, caso houver alteração em uma enzima, sua atividade pode ser alterada e gerar efeitos tóxicos (Moreira & Moreira, 2004).

O conjunto de órgãos mais sensível ao envenenamento por chumbo é o sistema nervoso, sendo que a encefalopatia é um dos mais sérios efeitos tóxicos induzido pelo chumbo em crianças e adultos. A toxicidade do chumbo na infância pode ter efeitos permanentes, tais como menor quociente de inteligência e deficiência cognitiva (Moreira & Moreira, 2004).

O sistema nervoso pode ser afetado durante o desenvolvimento de uma criança por valores sanguíneos menores do que 10 µg/L de chumbo, níveis considerados seguros (De Gennaro, 2002; Lanphear et al., 2000). Nos adultos, o sistema nervoso central também é afetado por concentrações relativamente baixas (em torno de 40 µg/dL) (Cordeiro et al., 1996; Patrick, 2006). Vale ressaltar que estes valores estão abaixo dos limites de referência para intoxicação no Brasil (Brasil, 1978) assim como nos Estados Unidos da América (Kosnett, et al., 2007). Ambos os países consideram níveis de chumbo acima de 60 µg/dL como um fator de risco para danos à saúde. Entretanto, estudos já têm demonstrado que a exposição a concentrações inferiores ao valor de referência já é capaz de gerar danos sobre o sistema cardiovascular (Fioresi et al, 2009; Silveira et al, 2010; Fiorim et al, 2011; Simões et al, 2011).

A neurotoxicidade do chumbo ocorre, principalmente, por sua competição ou mimetização da ação do íon cálcio. Por este mecanismo, o chumbo promove alterações na entrada do cálcio na célula modificando a sinalização neuronal. O resultado desta alteração consiste no aumento da liberação espontânea de neurotransmissores. Este efeito neural é, particularmente, danoso ao desenvolvimento do sistema nervoso fetal, pois o chumbo se liga às proteínas que formam a mielina, interferindo na formação da barreira hematoencefálica. Deste modo, o chumbo pode alterar permanentemente a estrutura e a função cerebral (Patrick, 2006). Os sintomas da neurotoxicidade compreendem irritabilidade, cefaléia, déficit de atenção, perda de memória, redução da cognição e alterações periféricas com comprometimento motor (ATSDR, 1993).

No sistema gastrointestinal, intoxicações leves ao chumbo podem desencadear sintomas característicos deste tipo de envenenamento, tais como diarreia, constipação intestinal, desconforto gástrico e anorexia (Moraes, 2014). E, em caso de exposições a altas concentrações de chumbo, entre 40 e 200 µg/dL, pode ocorrer espasmos intestinais mais intensos, os quais provocam fortes dores abdominais (Paoliello & Chasin, 2001; Kosnett et al., 2007).

O sistema hematológico também é um alvo importante da toxicidade do chumbo, pois o chumbo apresenta grande afinidade ao grupo sulfidril das proteínas, comprometendo a síntese do grupo heme e causando anemia. Uma vez ligado ao grupo sulfidril, o chumbo interfere na síntese do grupo heme, na molécula de hemoglobina, já que possui alta afinidade pelos eritrócitos (cerca de 99% do chumbo sanguíneo estão ligados às células vermelhas) (Lawton & Donaldson, 1991; Souza & Tavares, 2009). O chumbo inibe a capacidade do organismo de produzir Hb, afetando várias reações enzimáticas, críticas para a síntese da heme. E, quando em contato prolongado e/ou em exposição às altas concentrações de chumbo, o metal é capaz de diminuir a síntese da hemoglobina e estimular a eritropoiese, resultando no quadro de anemia (Saryan & Zenz; 1994; WHO, 1995; ATSDR, 2005).

O chumbo parecer exercer efeitos endócrinos, podendo exacerbar a liberação de hormônio estimulante da tireóide (TSH). Ao estudar homens expostos ocupacionalmente ao chumbo, Singh e colaboradores (1997) concluíram que níveis sanguíneos de chumbo ≥ 50 µg/dL podem acentuar a liberação de TSH sem que haja qualquer alteração significativa nos níveis circulantes de T3 e T4. Desta forma,

pesquisas mostram que a exposição moderada ao chumbo pode estar associada a pequenas alterações na função endócrina masculina, afetando principalmente o eixo hipotálamo-pituitária (Singh et al., 1997; Moreira & Moreira, 2004).

A exposição excessiva, aguda ou prolongada, ao chumbo pode causar doença renal progressiva e irreversível. A nefropatia por chumbo é caracterizada por uma redução gradual da função renal e é freqüentemente acompanhada por hipertensão. Os efeitos tóxicos do chumbo sobre os rins ocorrem na presença de níveis relativamente altos de chumbo no sangue e se dividem principalmente em disfunção tubular renal reversível e nefropatia intersticial irreversível (WHO, 1995; Mortada et al., 2001). Dentre as características de uma nefropatia aguda induzida pelo chumbo encontram-se disfunções dos túbulos proximais manifestadas por aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria, aumento da excreção renal de sódio e redução da excreção de ácido úrico. Na nefropatia crônica induzida por chumbo observa-se fibrose intersticial progressiva, dilatação dos túbulos, hiperplasia das células tubulares, redução da taxa de filtração glomerular, perda de capilares peritubulares, injúria tubular e presença de infiltrado inflamatório (Mortada et al., 2001; Roncal, et al., 2007).

Além destes efeitos renais, estudos têm apontado que a exposição ao chumbo pode desencadear mecanismos que levem ao surgimento ou agravamento da hipertensão, mostrando aumento na densidade de receptores β -adrenérgicos renais resultando em aumento da produção de renina (Tsao, et al., 2000) e acréscimo da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Sharifi, et al., 2004).

1.1.7 Efeitos cardiovasculares da exposição ao chumbo

Dados da Organização Mundial de Saúde apontam as doenças cardiovasculares, tais como a cardiopatia isquêmica e o infarto do miocárdio, como a principal causa de mortalidade e morbidade na maioria dos países do mundo. Além disso, demonstram que a exposição a agentes tóxicos, como o chumbo e outros metais pesados, pode colaborar para o aparecimento ou agravamento destas doenças (WHO, 2013). Sabendo que aproximadamente 17 milhões de pessoas morreram em decorrência das doenças cardiovasculares no mundo no ano de 2011, a OMS

estima que em 2030 mais de 23 milhões de indivíduos morrerão por causas cardiovasculares (WHO, 2013).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, a hipertensão arterial é um dos principais. No mundo, estima-se que 20 % da população apresenta hipertensão arterial, já no Brasil esse percentual pode chegar a 40 % de brasileiros hipertensos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010). Os fatores que contribuem para surgimento ou agravamento da hipertensão são: obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, aumento do consumo de sal, exposição a metais pesados (Vaziri et al., 1997, 1999), diabetes, hereditariedade e raça (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

Estudos populacionais têm associado a exposição ao chumbo ao desenvolvimento de hipertensão arterial e seus efeitos cardiovasculares, e enquanto isso, pesquisas realizadas em animais experimentais procuram desvendar os mecanismos envolvidos nos efeitos hipertensores e nas alterações cardiovasculares promovidas por este metal (Navas-Acien et al., 2007).

Diversos estudos que utilizam modelos animais de exposição crônica têm demonstrado que a exposição ao chumbo consiste em um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial (Vaziri, et al., 1997; Farmand et al., 2005; Sharifi et al., 2004; Vaziri, et al., 1999; Carmignani, et al., 1999; Grizzo & Cordellini, 2008). E, além disso, trabalhos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que a exposição a baixas concentrações de chumbo, por curto período de tempo, também é capaz de induzir aumento da pressão arterial em animais (Fiorim, et al., 2011, 2012; Simões, et al., 2011, 2015; Fioresi, et al, 2013).

Muitos são os estudos para se investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo chumbo. Alguns dos mecanismos propostos para explicar estes efeitos do chumbo se explicam no fato de que o metal associa-se ao aumento da atividade simpática (Carmignani et al., 2000) e da atividade da ECA plasmática (Fiorim et al., 2011; Simões et al., 2011) e também promove alterações endoteliais, tais como, alteração da biodisponibilidade de Óxido Nítrico e da participação dos canais para Potássio (K^+) (Fiorim et al., 2012; Silveira et al., 2014; Simões et al., 2015).

Outros estudos evidenciam que a exposição crônica ao chumbo causa hipertensão e doenças cardiovasculares por promover estresse oxidativo, limitando a biodisponibilidade do óxido nítrico e aumentando a produção de endotelina (Dursun et al., 2005; Nunes et al., 2015). Além disso, debilita o sistema antioxidante (ATSDR, 2005) que pode estar relacionado com a gênese e manutenção da hipertensão, considerando que altera a disponibilidade do óxido nítrico (NO), oxidando ou inativando esse fator vasodilatador derivado do endotélio (Patrick, 2006; Navas-Acien et al., 2007). O chumbo também interfere na homeostase do cálcio, seja diretamente reduzindo sua ação contráctil na musculatura lisa (ATSDR, 2005) ou intermediado pelo estresse oxidativo aumentando a concentração de Ca^{2+} no citosol de vários tipos celulares (Kosnett et al., 2007).

Desta forma, de acordo com estudos em protocolos experimentais *in vitro*, sabe-se que a exposição ao chumbo pode contribuir para o surgimento ou agravo da hipertensão e de doenças cardiovasculares (Fiorim et al., 2012; Silveira et al., 2014; Fiorelli et al., 2014; Nunes et al., 2015; Simões et al., 2015). Todavia, se faz necessário conhecer se estes mecanismos permanecem alterados quando avaliados em protocolos experimentais *in vivo*.

Assim, para melhor compreender os efeitos da exposição ao chumbo nos parâmetros hemodinâmicos, é necessária uma breve revisão sobre: Sistema nervoso Autônomo, Sistema Renina Angiotensina e endotélio vascular e suas substâncias liberadas, que participam na regulação do tônus vascular.

1.2 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

O controle geral do organismo é exercido principalmente pelo sistema nervoso e pelo sistema endócrino. O sistema nervoso, de maneira geral, pode ser dividido em sistema somático e sistema autônomo. Há uma ampla interação entre os sistemas somático e autônomo. O principal grupo de funções reguladas pelo sistema somático é a motricidade, o controle da musculatura esquelética e a sinalização e recepção de informações na superfície corporal, enquanto que o sistema nervoso autônomo (SNA) está baseado no controle de vasos sanguíneos, vísceras e glândulas (Aires, 2012; Gonçalves, 2014).

O sistema nervoso autônomo, de maneira geral, se refere ao sistema nervoso simpático e parassimpático. Ele pode ser visto como uma parte integrante do

sistema motor, porém, no lugar de músculos esqueléticos, os efetores do SNA são a musculatura lisa, o músculo cardíaco e as glândulas. Uma das principais funções do SNA é a manutenção do ambiente interno, ou seja, a manutenção da homeostase. Quando estímulos internos sinalizam a necessidade de uma determinada regulação, o Sistema Nervoso Central (SNC) ativa o sistema autônomo, que realiza as ações compensatórias, por exemplo, quando há um súbito aumento da pressão arterial, o conjunto de barorreceptores aciona o sistema nervoso autônomo, para que este possa restabelecer a pressão aos níveis anteriores (Aires, 2012; Gonçalves, 2014). O sistema nervoso autônomo não responde apenas a estímulos internos, ele está apto também a participar de respostas apropriadas e coordenadas a estímulos externos, tais como estimular a liberação de Hormônios da supra-renal, aumentar a pressão arterial e a frequência cardíaca, dilatar os brônquios, inibir a motilidade e as secreções intestinais, aumentar o metabolismo da glicose, contrair os vasos esplâncnicos e dilatar os vasos da musculatura esquelética (Czura & Tracey, 2005; Aires, 2012).

Em geral, pode-se assumir que o controle exercido pelas divisões simpática e parassimpática sobre muitos órgãos tenha um caráter antagônico, porém, esta não é uma generalização que possa ser considerada como uma regra. Desta forma, é mais correto afirmar que estas duas divisões do sistema autônomo trabalhem de forma coordenada, ou seja, em algumas situações eles agem de forma sinérgica e em outras atuam reciprocamente, no que se refere ao controle da atividade visceral (Greco et al., 1998; Gonçalves, 2014).

A estimulação do Sistema nervoso autônomo simpático ocorre por meio de neurotransmissores, conhecidos como catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) que se ligam a receptores específicos. Uma diferença entre a estimulação simpática e parassimpática está no tempo de duração. A estimulação promovida pela acetilcolina dura cerca de 5 a 10 vezes mais que a estimulação adrenérgica do simpático. A noradrenalina, assim como a acetilcolina, produzem seus efeitos nas células através da ligação a receptores específicos (Greco et al., 1998).

A noradrenalina, ao se ligar aos receptores α_1 das arteríolas, produz vasoconstrição, fazendo com que exista uma tendência ao aumento de pressão arterial, já quando este neurotransmissor se liga ao receptor α_2 ele inibe o efeito vasoconstrictor (Vander, 1988; Boscolo & Carmignani, 1988). Os receptores β_1 , normalmente se localizam no coração, e têm influência direta no aumento da frequência cardíaca,

aumento do inotropismo e da força de contração do miocárdio, ao passo que a estimulação β_2 relaxa a musculatura lisa brônquica e bronquiolar (Boscolo & Carmignani, 1988; Greco et al., 1998).

Iannaccone e colaboradores (1981) explanaram a habilidade do chumbo de alterar a atividade de componentes neurológicos e humorais, por causar aumento da atividade simpática, hiposensibilidade do barorreflexo e hipotonia parassimpática (Boscolo et al, 1979). Estudos com humanos indicam haver alterações de neurotransmissores pela exposição ao chumbo, sugerindo aumento da atividade do sistema nervoso simpático e do Sistema Renina Angiotensina causados por esta exposição (Campbell et. al, 1985; Chang et. al, 1996). Além disso, Lai e colaboradores (2002), usando injeção intratecal de PbCl em ratos, demonstraram que o chumbo possui a habilidade de estimular rapidamente a atividade do sistema nervoso simpático, sugerindo que este efeito simpático estimulatório do chumbo pode contribuir para seus efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular.

Outro trabalho realizado por Carmignani e colaboradores (2000), associa os efeitos cardiovasculares, como aumento da pressão sistólica e diastólica, aumento do inotropismo cardíaco e aumento da resistência vascular sistêmica, às alterações do sistema nervoso autonômico, pois encontraram aumento nos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticas (aumento da atividade nervosa simpática) (Carmignani et al., 2000). Diante destes estudos, os quais sugerem haver influencia do chumbo sobre o sistema nervoso autônomo, resta investigar os mecanismos pelo qual ocorrem estes efeitos do metal.

1.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) desempenha um papel fundamental na regulação dos processos fisiológicos do sistema cardiovascular. Primeiramente, o SRA foi descrito como um processo sistêmico, porém, sabe-se que existe um SRA local presente em diferentes tecidos, tais como, cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (Dzau, 1998; Danser, 1996; Bader et al., 2001).

Para que o SRA desempenhe seu papel é necessária a ação de um peptídeo principal, a angiotensina II. Para que ocorra a sua síntese as células justaglomerulares (das arteríolas aferentes renais), são estimuladas a sintetizar uma

enzima denominada pré-pró-renina, um peptídeo não ativo, que se transforma em pró-renina até sofrer ação de proteólise celular transformando-se em renina, liberada na corrente sanguínea. No sangue, a renina age sobre o Angiotensinogênio circulante inativo, transformando-o em Angiotensina I, que migra pela circulação. Ao passar pelos vasos pulmonares, a angiotensina I interage com uma ectoenzima presente nas células endoteliais, chamada Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), transformando-se em Angiotensina II, um octapeptídeo com potente ação vasoconstritora (Costerousse et al., 1993). Deste modo, a angiotensina II é um dos mais importantes fatores vasoconstritores e desempenha importante papel na regulação da pressão sangüínea, no remodelamento vascular, na regulação das funções renais e cardíacas (Timmermans et al., 1993).

A ECA pode ser encontrada no plasma, no endotélio vascular, no interstício e no interior das células, estando presente principalmente nos pulmões e na maioria dos órgãos tais como, coração, cérebro, rins, fígado, dentre outros (Hollenberg et al., 1998). A ECA 2 agindo sobre a angiotensina II, pode ainda formar angiotensina 1-7 que tem propriedades vasodilatadoras (Ferreira & Santos, 2005; Lavoie & Sigmund, 2003).

Os receptores específicos da angiotensina II são os do tipo 1 (AT₁), distribuídos no fígado, adrenais, cérebro, pulmão, rim, coração e vasos. No entanto, embora a maioria dos efeitos fisiológicos conhecidos da angiotensina II seja mediada por estes receptores, os receptores AT₂ parecem exercer ações anti-proliferativa e pró-apoptótica, em células do músculo liso vascular, principalmente por antagonizar as ações dos receptores AT₁ (Griendling et al., 1996). Generalizando, pode-se dizer que o efeito da angiotensina II sobre os receptores AT₂ determina relaxamento do músculo liso vascular, diferenciação e regeneração celular (Carey et al., 2001).

A angiotensina II pode interagir com receptor AT₁ levando a ativação sustentada da PKC e ativar a fosfolipase A2 (PLA2), levando a produção de ácido araquidônico (AA), os quais estão envolvidos na modulação do tônus e da pressão arterial (Griendling et al., 2000). Angiotensina II leva a formação de leucotrienos relacionados à vasoconstrição, hipertensão e doenças inflamatórias, além de formar os ácidos hidroxieicosatetraenoico, metabólito do AA, os quais são pro-hipertensivos, contribuindo com a vasoconstrição do músculo liso vascular por facilitar a entrada de Ca²⁺ na célula (Sarkis et al., 2004).

Novas descobertas tem demonstrado que a angiotensina 1-7 apresenta efeitos antagônicos aos da angiotensina II, mediados pela produção de prostanóides vasodilatadores, NO e EDHF, os quais promovem vasodilatação e melhora a função endotelial (Ferreira & Santos, 2005). Além destas, novos peptídeos de angiotensina e receptores foram identificados, como a angiotensina III, IV e a angiotensina 1-12 (Griendling et al., 1996) e os receptores tipo 3 (AT3) e do tipo 4 (AT4) (Stragier et al., 2004; Varagic et al., 2008; Ichihara et al., 2008). Estas descobertas foram recentemente caracterizadas e ainda não foram completamente elucidados.

Pesquisas apontam o aumento da pressão arterial em animais expostos ao chumbo, sugerindo haver alterações no Sistema Renina Angiotensina (Vaziri et al., 2001; Sharifi et al., 2004; Simões, 2011; Fiorim, 2011). No SRA, o chumbo parece influenciar as células justaglomerulares a aumentar a síntese ou liberação de renina (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani et al., 1999), além de estimular a maior produção de angiotensina I e alterar a atividade plasmática da ECA (Simões et al., 2011; Fiorim et al., 2011), culminando em maiores níveis de angiotensina II circulante.

1.4 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO

As artérias são compostas basicamente por três camadas estruturais. O endotélio, o músculo liso vascular e a túnica adventícia, respectivamente do interior para o exterior. O endotélio é a camada de células mais interna que envolve o lúmen, composta por um arranjo linear de células endoteliais e membrana basal. A camada muscular lisa é o tecido envolvido entre a lâmina elástica interna e a externa, composto por células musculares lisas dispostas e matriz extracelular rica em colágeno, elastina, fibrilina e proteoglicanos. A túnica adventícia é a camada mais externa e é composta de fibroblastos inseridos na matriz extracelular rica em colágeno e elastina, pequenos vasos e terminações nervosas (Katoh & Periasamy, 1996; Häyry, 1998; Hillebrands, et al., 2001).

A regulação do tônus do músculo liso vascular é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais, além de ser um fator determinante de resistência vascular (Lincoln et al., 2001). Estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que a exposição ao

chumbo promove alterações no tônus vascular (Fiorim et al., 2011; Silveira et al., 2014; Simões et al., 2015). Estas alterações parecem ser decorrentes do desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio e aumentam o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Fisiologicamente, o endotélio atua como barreira semipermeável entre o sangue e a musculatura lisa vascular, regulando o fluxo de nutrientes e substâncias (Ross, 1995). Pesquisas tem associado, particularmente, o envolvimento do endotélio no controle parácrino vascular, exercendo importante papel na homeostase, modulação e regulação de funções tais como na inflamação, fibrinólise, agregação plaquetária, angiogênese e mecanorrecepção (Jaffe, 1985; Vane et al., 1990; Ramos, 1992). Além disso, o endotélio é fundamental no controle do tônus vascular por liberar e manter o balanço entre os fatores que modulam a contratilidade e o relaxamento do músculo liso vascular (Triggle et al., 2003), bem como exerce efeito também sobre a promoção da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (Félétou, 2009).

O músculo liso vascular (MLV) participa do controle da resistência periférica total, pela regulação do tônus vascular e pela distribuição do fluxo sanguíneo. Neurotransmissores ou hormônios ativam os receptores localizados na membrana do MLV dando início a uma série de processos celulares que lideram a contração desse músculo. Sendo assim, para deflagrar a sua contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático, podendo resultar tanto do influxo do Ca^{+2} através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto da liberação pelo retículo sarcoplasmático. Deste modo, a oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil será aumentada (Lincoln et al., 2001). O principal determinante de mudança da resistência vascular é a alteração do diâmetro da luz do vaso (Deussen et al., 2006).

Dentre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio, os principais são o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina. Em relação aos fatores vasoconstrictores, os principais incluem as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Félétou et al., 2010). Portanto, para que haja uma perfeita regulação do tônus vascular é indispensável o equilíbrio da produção desses mediadores.

A literatura tem descrito o chumbo como um metal capaz de alterar a função endotelial em animais, podendo estar fortemente relacionado à hipertensão arterial (Triggle et al., 2003; Fiorim et al, 2011). Estas alterações parecem estar associadas à redução da biodisponibilidade de NO e a participação dos prostanóides vasoconstrictores. Deste modo, torna-se necessária uma rápida abordagem sobre o tema.

1.4.1 Óxido nítrico

O Óxido nítrico (NO) é um dos mais importantes componentes vasodilatadores produzidos pelo endotélio, fundamental na manutenção da homeostase dos vasos e na modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. É um radical livre inorgânico, altamente reativo, capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e exercer seu papel vasodilatador. Além disso, está envolvido na regulação do crescimento celular e possui ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Moncada et al., 1991; Cannon, 1998).

Sua síntese deriva da oxidação de um nitrogênio do L-arginina, e através da reação catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS), é convertido em L-citrulina. Para que ocorra ativação de sua síntese é necessária que haja a estimulação por meio de receptores situados na membrana das células endoteliais, mediados pela ação da acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, serotonina entre outros, ou um aumento do atrito das células circulantes (tensão de cisalhamento) na camada endotelial, levando a ativação da NOS e consequente produção de NO (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Quando produzido, o NO se difunde para as células musculares lisas e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, promovendo a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). Com isto, ocorre a ativação da proteína quinase G (PKG) e, conseqüentemente, relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada et al., 1991; Cannon, 1998). Além de relaxar o músculo liso, a PKG ativa canais para K^+ dependentes de Ca^{+2} , inibindo assim a entrada de Ca^{+2} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana (Lincoln et al., 2001). O NO também pode ativar diretamente os canais de K^+ , levando a hiperpolarização da célula muscular lisa

(Bolotina et al., 1994; Félétou, 2009). Desta forma, estes mecanismos contribuem para a diminuição da concentração do Ca^{+2} intracelular e consequente relaxamento do músculo liso vascular (Moncada et al., 1991., Cannon, 1998; Lincoln et al., 2001; Triggle et al., 2003). A exposição ao chumbo parecer alterar a função endotelial, seja por aumento de ROS ou por alterar a biodisponibilidade de NO. Estudos de exposição crônica ao chumbo têm demonstrado redução da biodisponibilidade de NO (Ding et al., 1998; Vaziri et al., 1999, 2001; Silveira et al., 2014; Simões et al., 2015).

1.4.2 Prostanóides

Os prostanóides são também substâncias liberadas pelo endotélio que desempenham poder vasomotor e antiplaquetário (Wright et al., 2001). Dentre eles estão a prostaciclina I₂ (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PD₂), prostaglandina F₂α (PGF₂α) e o tromboxano A₂ (TXA₂), os quais são derivados do ácido araquidônico (AA), um constituinte dos fosfolipídios de membrana liberado por ação da fosfolipase A₂ (PL A₂). Para ocorrer a síntese dos prostanóides, a fosfolipase A₂ (PL A₂) age sobre a membrana e libera o AA. Este, por sua vez, é oxidado por uma enzima essencial na síntese de prostanóides, a ciclooxigenase (COX), e é convertido a prostaglandina H₂ (PGH₂), a qual é precursora imediata de muitos prostanóides (Bos et al., 2004).

Muitos são os prostanóides derivados da via do AA e para que cada um deles exerça sua função, uma cascata intracelular deverá ocorrer. Ao se ligar em um sítio de ligação de um receptor específico ligado à proteína G_s, o prostanóide irá estimular a adenilato ciclase (AC) e, consequentemente, aumentar os níveis intracelulares de AMPc, gerando relaxamento do músculo liso vascular. Por outro lado, quando um prostanóide se acoplar a um receptor ligado à proteína G_i, haverá ação inibitória sobre a AC e, como consequência produzirá redução dos níveis intracelulares de AMPc e vasoconstrição (Félétou et al., 2010).

Cada tipo de prostanóide possui seu receptor específico de membrana, acoplados a proteínas G. A PGI₂, PGE₂ e PGD₂ se ligam respectivamente aos receptores específicos IP, EP₂/EP₄ e DP, acoplados a proteína G, tendo como resultado de sua ativação a vasodilatação (Moncada et al., 1977).

A prostaciclina (PGI₂) foi a primeira substância vasodilatadora dependente do endotélio a ser descoberta (Moncada et al., 1977). O mecanismo de ação da PGI₂ depende de receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular, ativando a adenilato ciclase e, por meio da quebra de ATP (adenosina trifosfato), leva ao aumento de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Davidge, 2001). Um outro mecanismo proposto é o de estimular também a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que pode atuar abrindo canais de K⁺ sensíveis a ATP hiperpolarizando a membrana das células musculares lisas (CML), estimulando a saída de Ca²⁺ do citosol e resultando na redução da oferta deste íon à maquinaria contrátil causando relaxamento (Parkington et al., 1995).

A PGE₂ produz efeitos antagônicos aos das prostaciclina, uma vez que, quando se liga ao receptor EP₃, acoplado a proteína G_i, causa vasoconstrição. Os próprios PGE₂, a PGF₂α e o TXA₂ produzem contração por estarem unidos respectivamente aos receptores EP₁, FP e TP, os quais estão acoplados a proteína G_q. Esta interação ativa a fosfolipase C (PLC) forma os segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), mobilizando o cálcio intracelular e ativando a PKC (proteína quinase C), dando início à contração (Bos et al., 2004). Este processo produzirá aumento de cálcio intracelular e a maior sensibilidade às proteínas contráteis (Luscher et al., 1992; Davdge, 2001).

Em um indivíduo saudável, para que haja manutenção do tônus vascular, é necessário um equilíbrio entre a formação de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores derivados a partir da COX. Todavia, pesquisas em modelos experimentais de hipertensão têm relatado a existência de um desequilíbrio neste processo, em que os prostanóides vasoconstritores podem apresentar-se aumentados (Vanhoutte et al., 2005; Alvaréz et al., 2005).

Estudos recentes mostram que o chumbo interfere no metabolismo do ácido araquidônico (Grizzo & Cordelline, 2008; Courtois et al., 2003; Karimi et al., 2002). Além disso, os prostanóides vasoconstritores derivados da COX parece contribuir com aumento da pressão arterial induzida pela exposição ao chumbo (Silveira et al., 2010, Simões, et al., 2015)

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório, sabe-se que a exposição ao chumbo pode contribuir para o surgimento ou agravamento da hipertensão e de doenças cardiovasculares (Fiorim et al., 2012; Silveira et al., 2014; Fioresi et al., 2014; Nunes et al., 2015; Simões et al., 2015). No entanto, estes estudos foram conduzidos em protocolos experimentais *in vitro*, por isso, se faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que investiguem se estes mecanismos são similares *in vivo*.

Raros são os estudos que investigam os efeitos hemodinâmicos da exposição ao chumbo. Desta forma, sabendo a importância que os reflexos da exposição ao chumbo exercem sobre hipertensão arterial e conhecendo as alterações promovidas pelo chumbo em protocolos *in vitro*, são necessários estudos que avaliem se estes efeitos permanecem alterados ao investigar os parâmetros hemodinâmicos *in vivo*, quando expostos cronicamente à baixas concentrações de chumbo, ou seja, que alcançam níveis de chumbo no sangue inferiores aos considerados seguros.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição crônica ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos e a reatividade pressórica de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar, semanalmente, a pressão arterial dos animais.
- 2) Investigar, *in vivo*, ao final do tratamento, os efeitos do chumbo na pressão arterial e na frequência cardíaca.
- 3) Avaliar a reatividade pressórica;
- 4) Averiguar a participação do sistema nervoso simpático nas alterações promovidas pelo chumbo.
- 5) Investigar a participação da modulação endotelial nas alterações pressóricas promovidas pelo chumbo;
- 6) Avaliar a participação do Sistema Renina Angiotensina nas alterações promovidas por este metal.
- 7) Pesquisar a participação da via da Cicloxigenase (COX) nas alterações promovidas por este metal.
- 8) Investigar a expressão de proteínas envolvidas nas alterações promovidas pelo chumbo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Animais

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

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

Os protocolos experimentais utilizados nesta pesquisa se adéquam aos princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA / UFES), os quais estão inscritos neste comitê sob número 014/2012.

4.1.2 Modelo Experimental

Os ratos Wistar, com aproximadamente dois meses de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (Ct) e grupo chumbo (Pb). Os animais do grupo controle receberam, por 30 dias, água de beber destilada. Os animais destinados ao grupo chumbo, receberam pelo mesmo período descrito acima, água de beber destilada acrescida de 100 ppm de acetato de chumbo (Karimi et al., 2002). Cada grupo foi alojado em gaiolas independentes, de forma que os animais do grupo controle não fossem expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado.

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

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

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

No momento do registro pressórico os animais eram acomodados em um cilindro de acrílico (*holter*) e a cauda dos animais era conectada a um sensor de pressão presente no manguito (*cuff*), o qual estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior do aquecedor a 37 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. Era observado se os animais estavam em condições ideais: posição e relaxamento do animal; temperatura e posição do *cuff* e ausência de evacuação durante o procedimento. Depois de averiguada as condições adequadas dos animais, aproximadamente dez novas medidas eram realizadas e destas, as três com menos interferências eram escolhidas para calcular a média aritmética da PAS de cada animal.

4.3 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

4.3.1 Protocolos experimentais

4.3.1.1 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca após exposição ao chumbo.

Ao final do período de exposição foi realizada a avaliação direta dos efeitos do chumbo nos parâmetros hemodinâmicos. Após os 30 dias, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretana (1,2 mg/kg, IP.) e a efetividade anestésica foi avaliada pela responsividade ao estímulo doloroso, com testes como pinçar a cauda do animal e, quando necessário, houve suplementação do anestésico utilizado. Os animais anestesiados foram submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares. A canulação foi realizada com cateter de polietileno (*PE 50 Clay-Adams*) preenchidos com salina heparinizada (50 U/mL). O cateter arterial era acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) conectado a um pré-amplificador interligado ao sistema Biopac de aquisição de dados, o qual utilizava uma taxa de amostragem de 2000 amostras/s (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA). Foram feitos registros contínuos das pressões arteriais e frequência cardíaca (FC) durante todos os protocolos experimentais, os quais foram processados por um computador.

Após 20 min de estabilização, foram analisados os seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). Estas medidas foram analisadas em ambos os grupos (Controle e Chumbo), no intuito de avaliar a efeitos da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos.

A figura 2 ilustra os registros típicos destes parâmetros hemodinâmicos avaliados.

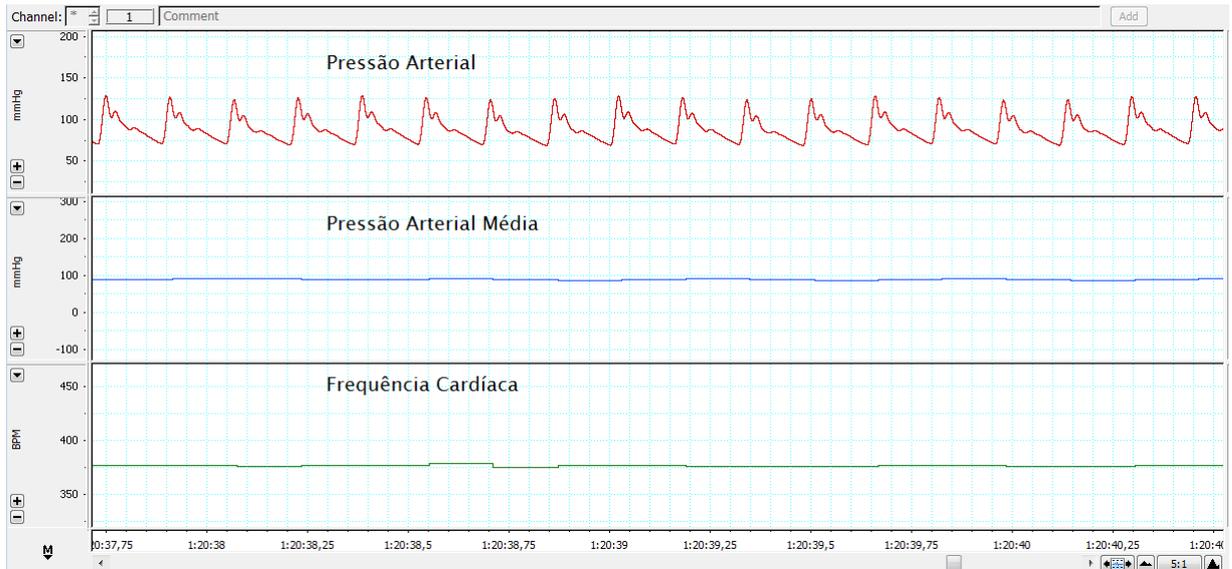


Figura 2: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. Registro da pressão arterial, da pressão arterial média e da Frequência Cardíaca.

4.3.1.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina após exposição ao chumbo

Ainda investigando os efeitos do chumbo sobre a resposta pressórica foi realizado o protocolo com fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico, com a finalidade de se avaliar possíveis alterações induzidas pelo chumbo na resposta pressórica.

Após o período de 20 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida foram administrados doses crescentes de fenilefrina (0,03 a 100 mg/kg em bólus num volume de 5 μ L/100g), com a finalidade de se obter uma curva dose-resposta.

Este protocolo foi realizado no grupo exposto ao chumbo e no grupo controle, a fim de se verificar a estabilidade experimental.

A figura 3 ilustra os registros típicos destas curvas dose-resposta avaliados.

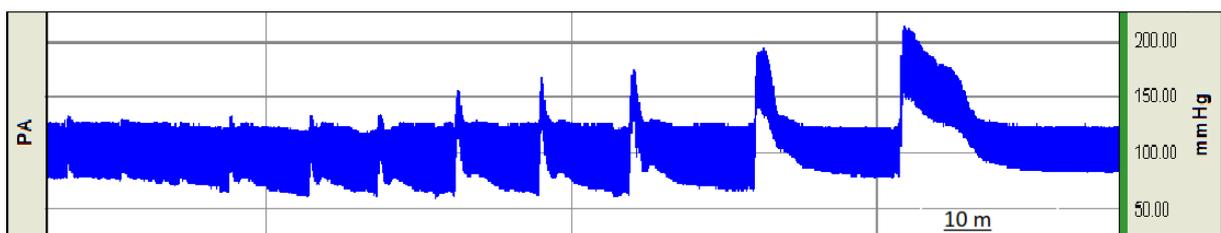


Figura 3: Registro típico de uma curva dose-resposta à fenilefrina.

4.3.1.3 Avaliação dos efeitos da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos e na reatividade pressórica antes e após bloqueio ganglionar.

O chumbo já foi descrito como um metal que tem a habilidade de estimular a atividade do sistema nervoso simpático. Este achado foi confirmado por Lai e colaboradores (2002), por meio de modelo experimental em ratos. Deste modo, têm sido demonstrados os efeitos desencadeados pelo chumbo sobre o sistema nervoso simpático, podendo contribuir para o surgimento, desenvolvimento e agravamento das alterações cardiovasculares (Carmignani et al., 2000).

Conhecendo estes fatos, este protocolo teve o intuito de avaliar uma possível participação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) nas alterações produzidas pelo chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos. Para isto, foi utilizado o hexametônio (20 mg/kg, IV.), um antagonista dos receptores nicotínicos ganglionares autonômicos, a fim de determinar uma possível capacidade do Sistema Nervoso Autônomo em modular as ações do chumbo sobre a PA, FC e reatividade pressórica.

Após o período de 20 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida foram administradas doses crescentes de fenilefrina (0,03 a 100 mg/kg em bólus num volume de 5 ul/100g), com a finalidade de se obter uma primeira curva dose-resposta. Quando novamente estabilizada a PA, foi administrado o hexametônio. Seguindo 30 minutos de estabilização após a administração do fármaco, foram realizados novos registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida, uma segunda curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada.

4.3.1.4 Envolvimento do Sistema Renina Angiotensina nas alterações hemodinâmicas e reatividade pressórica induzidas pelo chumbo.

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) pode influenciar o sistema cardiovascular tanto de forma direta, alterando a morfologia e função, como indiretamente modificando o ganho dos reflexos cardiovasculares. Desta forma, o SRA pode apresentar uma multiplicidade de efeitos cardiovasculares por meio de seus receptores angiotensinérgicos, especialmente do subtipo AT₁, os quais são

expressos no pulmão, fígado, rins, coração, aorta, cérebro, adrenal e em outras glândulas (Santos et al., 2000).

Diante destes fatos, o nosso estudo teve a finalidade de investigar a participação do Sistema Renina Angiotensina na modulação dos efeitos pressóricos do chumbo. Para isto, foi utilizado o losartan (10 mg/kg, IV.), um antagonista do receptor tipo 1 de angiotensina II (AT₁), a fim de determinar a participação da angiotensina II no bloqueio dos possíveis efeitos produzidos pelo chumbo sobre a PA, FC e reatividade pressórica.

Após o período de 20 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida foram administradas doses crescentes de fenilefrina (0,03 a 100 mg/kg em bólus num volume de 5 ul/100g), com a finalidade de se obter uma primeira curva dose-resposta. Quando novamente estabilizada a PA, foi administrado o losartan. Ao final de 30 minutos após a administração do fármaco, foram realizados novos registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida, uma segunda curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada.

4.3.1.5 Avaliação da participação da modulação β -adrenérgica nas alterações hemodinâmicas induzidas pelo chumbo.

A ativação simpática cardíaca, *in vivo*, tem como resultado efeitos inotrópico, lusitrópico e cronotrópico positivos, através da estimulação dos receptores β -adrenérgicos (Bers, 2002). Estudos relacionados ao coração relatam efeitos variáveis da estimulação do sistema nervoso simpático sobre a FC, a qual pode ser mediada pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Tsao et al., 2000; Campbell et al., 2014; Fioresi et al., 2013).

Com a finalidade de investigar se o tratamento crônico com chumbo alterou a resposta simpática cardíaca foi utilizado o isoproterenol (10 mg/kg, IV.), um agonista β -adrenérgico, para avaliar a modulação da atividade β -adrenérgica.

Os animais anestesiados foram submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e do ventrículo esquerdo, através da artéria carótida direita, para mensuração dos parâmetros cardíacos. Foram feitos registros contínuos das

pressões intraventriculares e frequência cardíaca (FC) durante todos os protocolos experimentais, os quais foram processados por um computador.

Assim, após o período de 20 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão, em que foram avaliados os seguintes parâmetros: pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), pressão diastólica final ventricular esquerda (PDFVE) e FC. Em seguida, foi administrado o isoproterenol. Quando novamente estabilizada a PA após 30 minutos da administração do fármaco, foram realizados novos registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

A figura 4 ilustra os registros típicos destes parâmetros hemodinâmicos avaliados.



Figura 4: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar. Registro da pressão ventricular esquerda e da frequência cardíaca estabilizada.

4.3.1.6 Influência da biodisponibilidade do Óxido Nítrico nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.

Esse protocolo teve como finalidade avaliar se o NO está envolvido nas possíveis alterações de pressão e FC induzidas pela exposição ao chumbo. Para isso, foi utilizado a NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg, IV.) um inibidor da síntese de Óxido Nítrico (NO), a fim de avaliar a modulação endotelial nas alterações da PA e FC induzidas pelo chumbo.

Para isto, após o período de 20 minutos de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, foram realizados registros basais da pressão arterial e frequência cardíaca. Em seguida, foi administrado o L-NAME. Após 30 minutos da administração do fármaco, quando novamente estabilizada a PA, foram realizados novos registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

4.3.1.7 Envolvimento da via da Ciclooxygenase nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.

Com a finalidade de avaliar se há participação da atividade dos prostanóides vasoconstrictores derivados da via da ciclooxygenase (COX) nas possíveis alterações de pressão e FC induzidas pela exposição ao chumbo, foi realizado um protocolo experimental utilizando a Indometacina (0,1 mg/kg), um inibidor não-seletivo da COX.

Após o período de 20 minutos de estabilização, foram realizados registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida foram administradas doses crescentes de fenilefrina (0,03 a 100 mg/kg em bolus num volume de 5 µL/100 g), com a finalidade de se obter uma primeira curva dose-resposta. Novamente foi estabilizada a PA e administrado a indometacina. Ao final de 30 minutos após a administração do fármaco, foram realizados novos registros basais de pressão arterial e frequência cardíaca e em seguida, uma segunda curva dose-resposta à fenilefrina foi realizada.

4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Ao final dos protocolos experimentais, foi realizada a eutanásia dos animais por meio da técnica de sobredose anestésica com uretana via intraperitoneal, a partir de três vezes a dose requerida para a anestesia geral, conforme recomendado pelo CONCEA (2013) e aprovado pelo CEUA/ UFES.

A confirmação da morte foi realizada por meio da certificação de ausência de movimento respiratório (apneia); ausência de batimentos cardíacos (assistolia); ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal.

Em seguida, o coração e o plasma foram coletados e armazenados a -80°C até à sua utilização para medições bioquímicas.

Após o uso, o cadáver foi recolhido e destinado ao descarte dentro das normas preconizadas pela legislação ambiental, para prover segurança para o pessoal envolvido com o descarte da carcaça e para que outros animais não possam ter acesso a ela.

4.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

4.5.1 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot

4.5.1.1 Western Blot para detecção de receptor β_1 -adrenérgico

A técnica de Western blot foi utilizada para investigar se a exposição ao chumbo altera a expressão de proteínas envolvidas na regulação dos parâmetros hemodinâmicos. A expressão proteica foi realizada a partir dos corações retirados de animais sacrificados após exposição por 30 dias ao chumbo ou ao veículo, os quais foram utilizados para realização das medidas da expressão proteica do receptor β_1 -adrenérgico.

4.5.1.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

As amostras foram preparadas utilizando coração de ambos os grupos. O órgão era congelado com nitrogênio líquido e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do experimento. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, com tampão de homogeneização contendo: Tris- HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO_3 (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C a 12.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante era recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, era feita a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976) através de espectrofotometria (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil).

Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:1250). Em seguida foram aliqüotados os volumes para uma carga de 80 μg de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 μM ; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.1.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras para quantificação das proteínas foram aplicadas (carregadas) em gel SDS-poliacrilamida 10 % (acrilamida 40 %; Tris HCl 1,5 M pH = 8,8; SDS 10 %; persulfato amônico –APS- 10 % e Temed) para β_1 . Previamente à aplicação das proteínas, os géis foram imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) a qual permanecia dentro de um recipiente com gelo. Deste modo, as proteínas eram submetidas à eletroforese através de corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura), durante aproximadamente duas horas. Isto promoveu a separação das proteínas no gel.

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

Para a transferência, o papel Whatman, a membrana e o gel foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20 % e SDS 0,1 %) à temperatura ambiente por uma hora usando uma corrente de 25 V em um “Semi-dry” (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

4.5.1.4 Incubação com os anticorpos

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5 %, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 90 minutos, sob agitação com os anticorpos primários para β_1 (anticorpos monoclonais de coelho anti- β_1 , 1:2500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA) e GAPDH (anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH, 1:5000, Abcam Cambridge MA, USA), usado para corrigir a expressão das proteínas estudadas. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5):

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

uma solução TBS-T para remoção do excesso dos anticorpos primários, sendo trocada a solução de TBS-T, a cada cinco minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários, imunoglobulina IgG anti-coelho, para o receptor β_1 e o GAPDH (1:5000, Assay Designers , Hines Drive, Ann Arbor, MI) durante 60 minutos.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do excesso de anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). As soluções eram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS.

4.5.1.5 Detecção das proteínas

As proteínas correspondentes ao β_1 e ao GAPDH foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram *scanneadas*. O programa Image J foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

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

Os resultados da expressão protéica do receptor β_1 foram expressos como a relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação ao GAPDH.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de Student não pareado, análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias, medida repetidas ou randomizadas. Quando a análise de variância apresentava significância, esta era seguida pelos testes *post-hoc* de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, para a ANOVA uma ou duas vias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA).

4.7 FÁRMACOS E REAGENTES

- Acetato de chumbo (Sigma)
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido etilodiaminotetracético (EDTA) (Merck)
- Ácido orto-fosforico (Merck)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Adenosina trifosfato (ATP) (Sigma)
- Albumina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para GAPDH (Abcam)
- Anticorpo produzido em coelho para β_1 (Sigma)
- Azul brilhante de coomassie G (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Cloridrato de verapamil (Teuto)
- Diidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (VETEC)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fenilefrina, hidroclicloratado (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Heparina (Roche)
- Hexamethonium, cloreto (Sigma)
- Hidróxido de sódio (Sigma)

- Hip-His-Leu (Sigma)
- His-Leu (Sigma)
- Imunoglobulina IgG anti-camundongo para GAPDH (Assay Designers)
- Imunoglobulina IgG anti-coelho (Millipore)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Isoproterenol (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- NG-nitro-L-arginina metil éster (Sigma)
- N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- Nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2$ (VETEC)
- *o-phataldialdeído* (OPA) (Sigma)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Tris-HCl (Sigma)
- Triton X-100 (VETEC)
- Uretana (Sigma)

5 RESULTADOS

5.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS: PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

5.1.1 Efeito da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos basais

Em relação à medida da pressão arterial realizada por pletismografia, os animais expostos ao chumbo apresentaram aumento de PAS em comparação ao grupo controle. A pressão arterial sistólica foi semelhante nos dois grupos no início do período de tratamento, $120 \pm 3,6$ mmHg e $124 \pm 4,2$ mmHg ($N=12$; $P>0,05$), respectivamente, para o grupo controle e chumbo. No entanto, a partir da primeira semana de exposição ao metal, o grupo chumbo apresentou um aumento na pressão arterial que não foi observado no grupo controle. A PAS dos animais expostos ao chumbo manteve-se elevada ao longo das semanas seguintes. Ao final do período de exposição, a PAS era de $123 \pm 2,7$ mmHg e $132 \pm 3,8$ mmHg ($N=12$; $P<0,05$), respectivamente, para o grupo controle e chumbo (Figura 5). O grupo não exposto ao chumbo manteve-se estável, para todos os parâmetros avaliados, em todo período experimental.

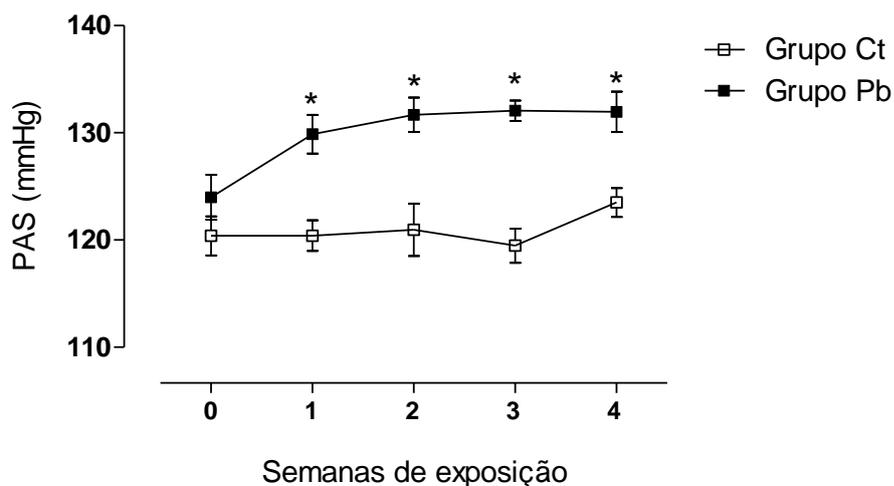


Figura 5: Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos tratados (Pb, $N=12$) e controle (Ct, $N=12$), através da pletismografia, durante 4 semanas de tratamento. No eixo das ordenadas, temos a PAS exposta em mmHg e, no eixo das abscissas, temos o tempo de exposição ao chumbo, apresentado

em semanas. O tempo 0 representa o início e a quarta semana de exposição corresponde ao final do tratamento. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. *P<0,05 vs Ct.

Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados utilizando a técnica de medição direta da pressão arterial dos animais anestesiados, ao final dos 30 dias de exposição ao metal. Foi possível observar que o grupo chumbo apresentou aumento na PAS, PAD e FC (Tabela 1 e Figura 6).

Tabela 1: Efeitos da exposição ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos de ratos anestesiados.

	Ct	Pb
PAS (mmHg)	122 \pm 4	143 \pm 3 *
PAD (mmHg)	62 \pm 4	84 \pm 3 *
FC (bpm)	299 \pm 11	365 \pm 11 *

Animais após 30 dias de exposição ao veículo (Ct); Animais após 30 dias de exposição ao Pb (Pb). PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; FC: Frequência Cardíaca. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Número de animais na amostra = 5 – 8. *P<0,05. teste t-de Student não-pareado.

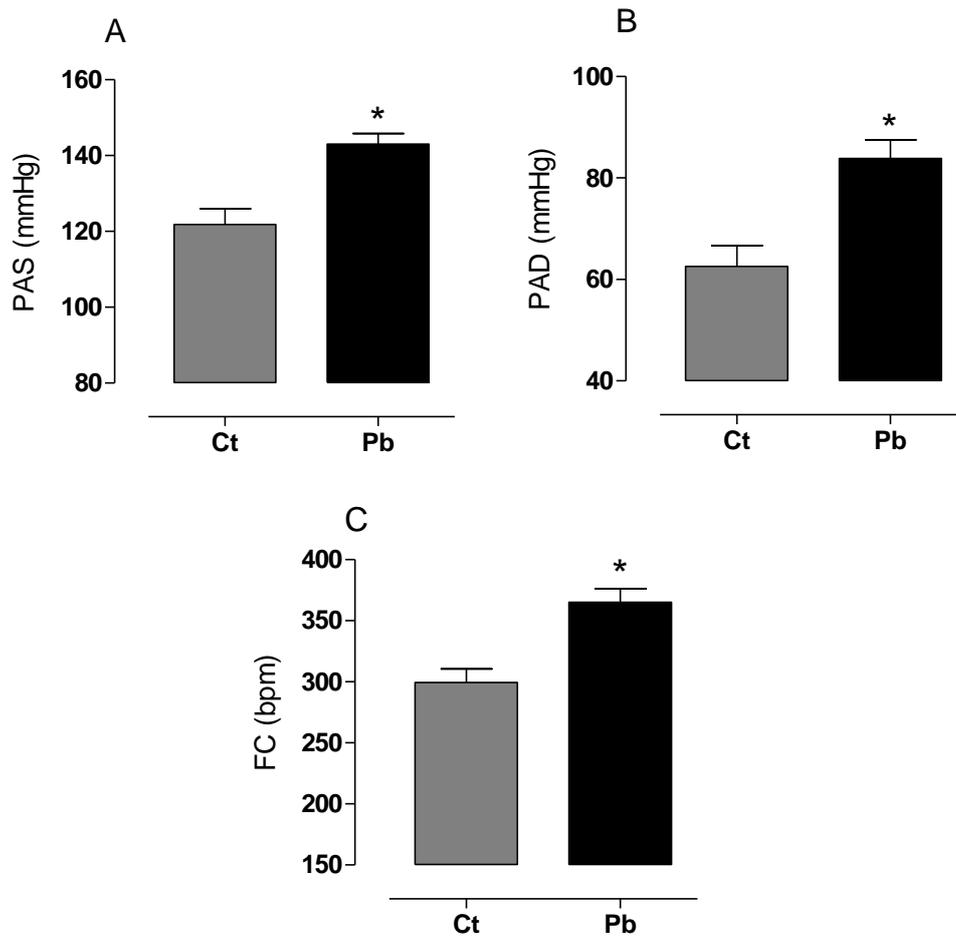


Figura 6: (A) Pressão arterial sistólica (PAS), (B) Pressão arterial diastólica (PAD) e (C) Frequência cardíaca (FC) nos grupos controle (Ct) e expostos ao chumbo (Pb). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Número de animais na amostra = 5 – 8. * $p < 0.05$ vs. Ct. A análise estatística foi realizada através do teste t-de Student não-pareado.

5.1.2 Papel dos reflexos autonômicos no aumento da pressão arterial e frequência cardíaca na exposição ao chumbo

Para determinar se os reflexos autonômicos estão envolvidos nas alterações pressóricas produzidas pela exposição ao chumbo, foi utilizado um bloqueador ganglionar (20 mg/kg, IV.), o hexametônio. O bloqueio ganglionar reduziu a PAS, PAD e FC em ambos os grupos (Controle e Chumbo), conforme o esperado. O aumento da PA e da FC, produzido pela exposição ao chumbo, foi reduzido aos parâmetros do grupo controle, ou seja, o hexametônio foi capaz de abolir o efeito pressórico desencadeado na exposição ao chumbo. No entanto, foi possível perceber que mesmo após o bloqueio ganglionar, o grupo Controle (Ct-Hexa)

permaneceu diferente do Chumbo (Pb-Hexa), o que nos sugere haver participação de outro mecanismo nos efeitos produzidos pela exposição ao chumbo (Figura 7).

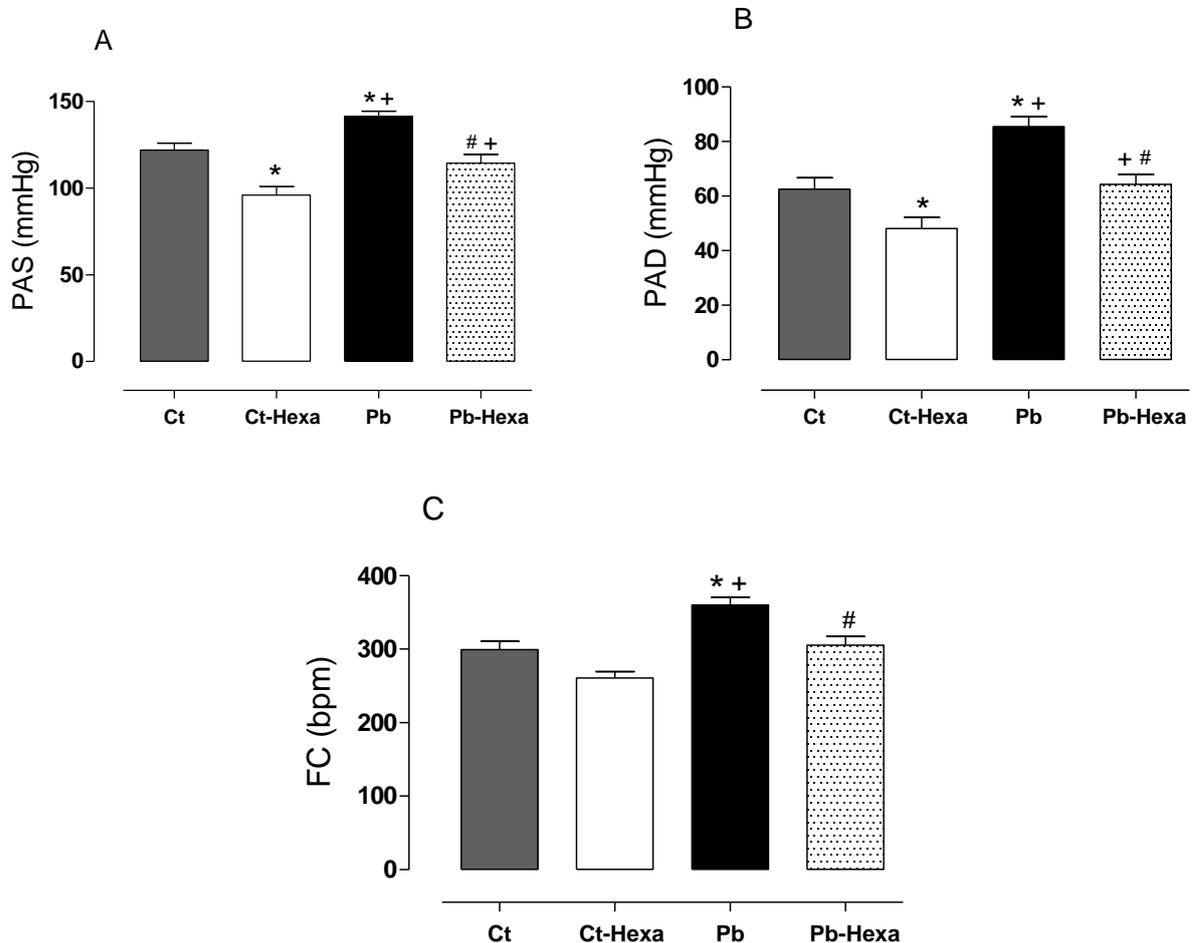


Figura 7: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD), e (C) frequência cardíaca (FC) de ratos antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após o bloqueio ganglionar, no grupo controle (Ct-Hexa) e no grupo tratado (Pb-Hexa). Número de animais na amostra = 5 – 8. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para a análise estatística foi realizado ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct; # $p < 0,05$ vs. Pb; + $p < 0,05$ vs Ct-Hexa.

5.1.3 Efeitos do chumbo sobre a modulação β -adrenérgica

Com a finalidade de avaliar possíveis alterações na modulação β -adrenérgica, como um mecanismo adaptativo em resposta ao efeito pressórico produzido pela exposição ao chumbo, foi utilizado um agonista β -adrenérgico, o isoproterenol (10 μ g/kg, IV.). Como resultado, o isoproterenol promoveu aumento da pressão sistólica e diastólica intraventricular esquerda (PSVE, PDfVE) e da frequência cardíaca (FC)

apenas no grupo controle, sugerindo a existência de uma alteração da atividade modulada pelos receptores β_1 -adrenérgicos (*downregulation*) provocada pelos efeitos da exposição ao chumbo (Figuras 8 A e C e Figura 9).

A Figura 8 (B e D) representa, respectivamente, a variação pressórica calculada pela diferença entre o valor da pressão sistólica ventricular e diastólica final ventricular antes e após a injeção de isoproterenol, em cada grupo. Houve menor estimulação adrenérgica, evidenciada através da menor variação nas pressões ventriculares estudadas, no grupo chumbo, ou seja, a magnitude do efeito no grupo controle foi superior à do grupo exposto ao chumbo. Este achado corrobora os resultados que apontam para um *downregulation* dos receptores β_1 -adrenérgicos, na exposição ao chumbo.

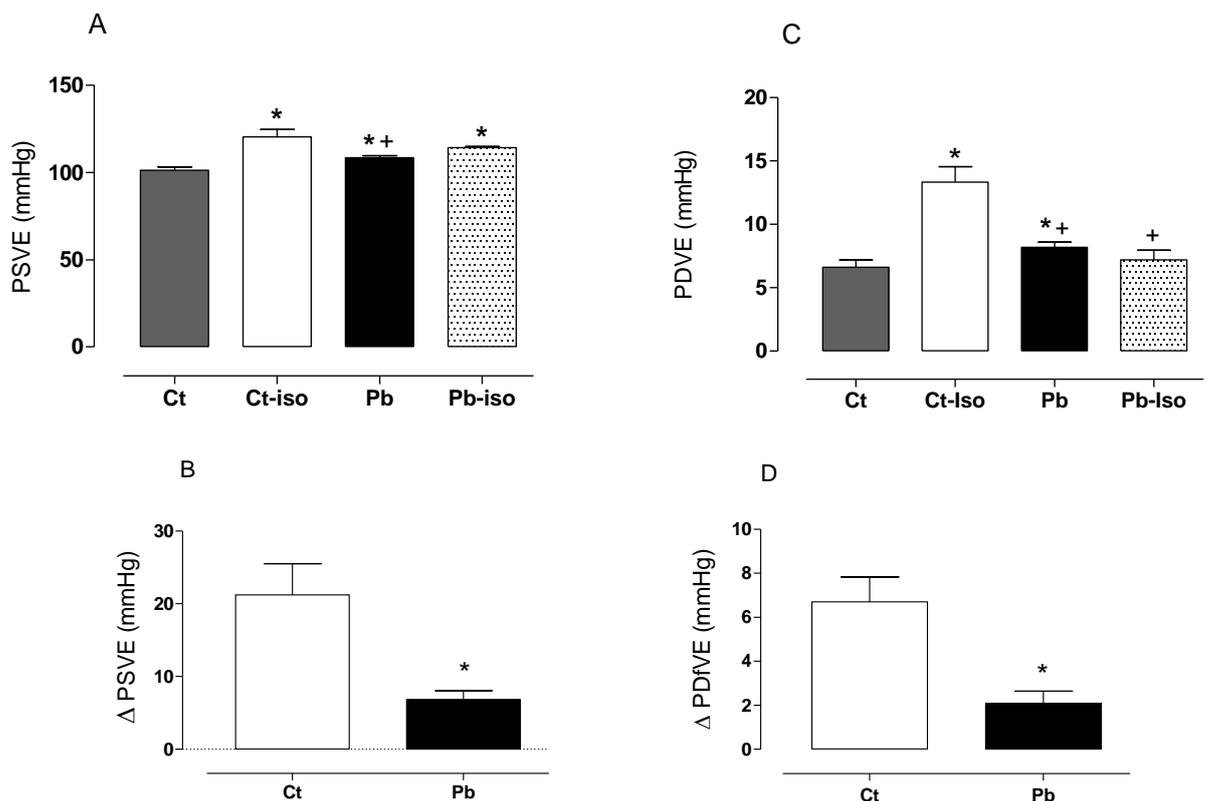


Figura 8: (A) Pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), (C) pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de isoproterenol, no grupo controle (Ct-iso) e no grupo tratado (Pb-iso). A variação pressórica foi calculada pela diferença entre os valores da PSVE (B), representado por Δ PSVE, e da PDfVE (D), representado por Δ PDfVE, antes e após a injeção de isoproterenol em cada grupo (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Teste t de Student e ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct; + $p < 0,05$ vs. Ct-Iso.

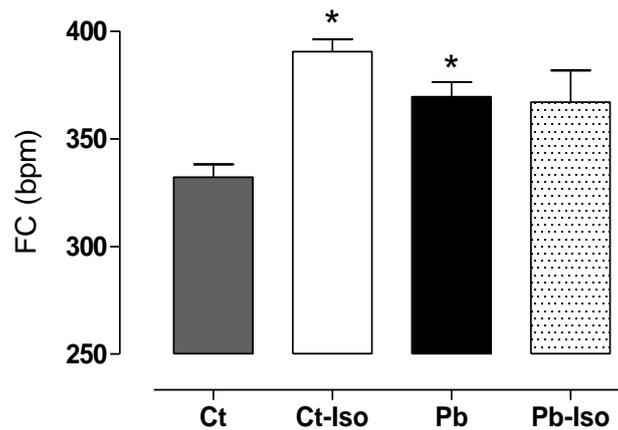


Figura 9: Frequência cardíaca (FC) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de isoproterenol, no grupo controle (Ct-iso) e no grupo tratado (Pb-iso) (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. A análise foi realizada por ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct.

5.1.4 Efeito do losartan sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações produzidas pela exposição ao chumbo

Com o intuito de avaliar a participação do Sistema Renina Angiotensina nos efeitos produzidos pela exposição crônica ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos, foi utilizado um bloqueador dos receptores do tipo I da angiotensina II (AT_1), o losartan (10 mg/kg, IV).

O bloqueio dos receptores AT_1 foi capaz de reduzir a PAS e a PAD basais, sem alterar a FC nos animais expostos ao chumbo (Figura 10). Este resultado nos mostra o envolvimento do SRA no efeito pressórico do chumbo.

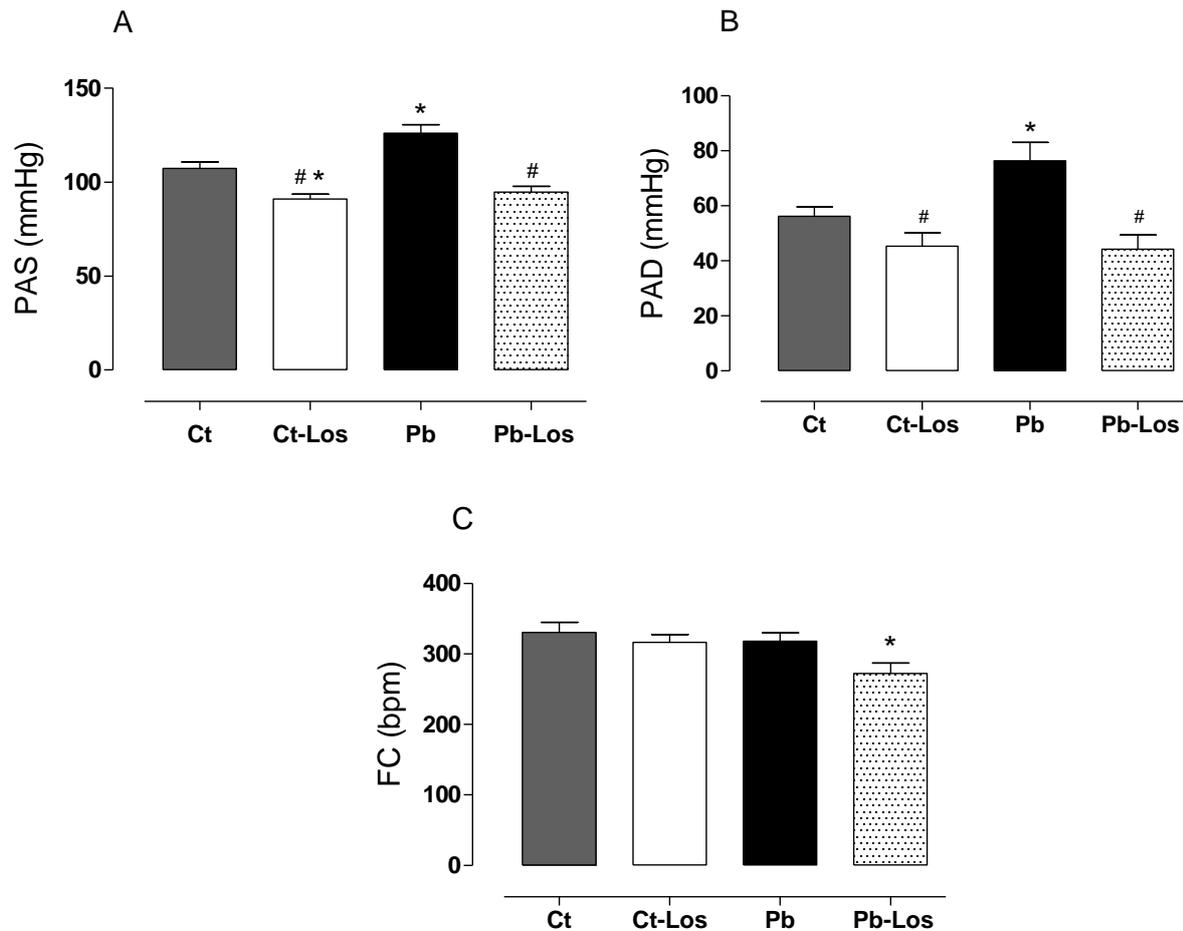


Figura 10: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após administração de losartan, no grupo controle (Ct-Los) e no grupo tratado (Pb-Los) (N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. A análise foi realizada por ANOVA uma-va, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct; # $p < 0,05$ vs. Pb.

5.1.5 Envolvimento da via da Ciclooxygenase na modulação endotelial nas alterações da pressão arterial produzidas pela exposição ao chumbo

Com a finalidade de investigar o papel dos prostanoídes derivados da via da Ciclooxygenase na modulação endotelial diante dos efeitos produzidos pela exposição ao chumbo, foi utilizado um inibidor da COX, a indometacina (0,1 mg / kg, IV).

A indometacina não alterou a PA no grupo Controle, entretanto, foi capaz de reduzir a PAS e PAD no grupo exposto ao chumbo (Figura 11). Além disso, a indometacina não produziu alterações sobre a FC e reatividade pressórica à fenilefrina na PAS e

PAD (dados não mostrados). Este achado nos sugere o envolvimento da via da COX nas alterações produzidas pela exposição ao chumbo.

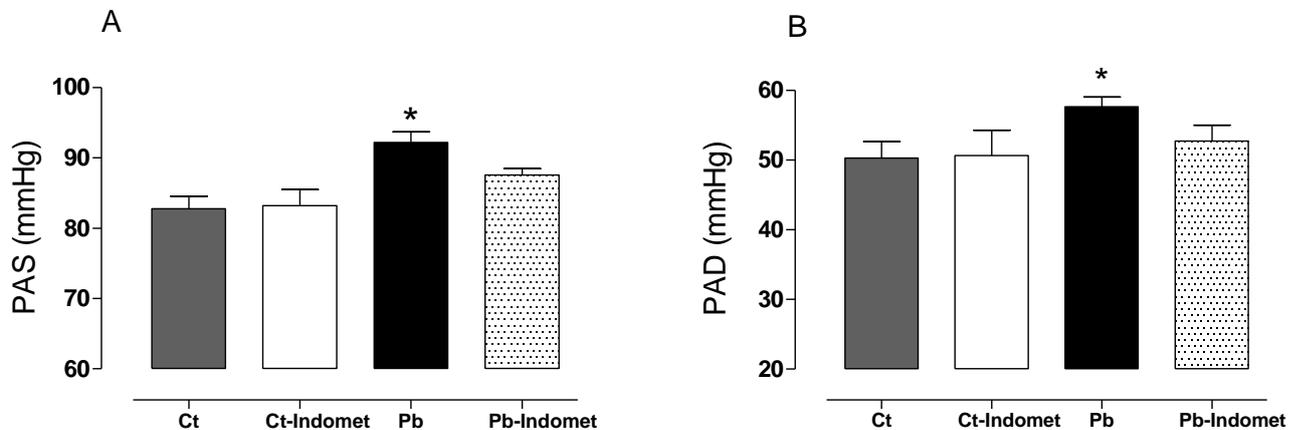


Figura 11: (A) pressão arterial sistólica (PAS), (B) pressão arterial diastólica (PAD) antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de indometacina, no grupo controle (Ct-Indomet) e no grupo tratado (Pb-Indomet) (Ct, N=8 e Pb, N=11). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct.

5.1.6 Envolvimento do Óxido Nítrico na modulação endotelial nas alterações da pressão arterial e frequência cardíaca produzidas pela exposição ao chumbo

Para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo promove alterações na modulação endotelial mediada pela biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), foi utilizado um inibidor da Óxido Nítrico sintase (NOS), o L-NAME (3 mg / kg, IV.).

O L-NAME promoveu aumento da PAS no grupo controle, e aumento da PAD em ambos os grupos, Controle e Chumbo (Figura 12 A e C). No entanto, a magnitude dos efeitos no grupo controle foram superiores aos do grupo exposto ao chumbo. A Figura 12 (B e D) representa, respectivamente, a variação pressórica calculada pela diferença entre o valor da pressão arterial sistólica (B) e diastólica (D) antes e após a injeção de L-NAME, em cada grupo. Houve menor variação nas pressões arteriais estudadas no grupo chumbo, ou seja, a magnitude do efeito no grupo controle foi superior à do grupo exposto ao chumbo. Este achado sugere que o chumbo parece estar envolvido nas alterações da biodisponibilidade do NO. O L-NAME não produziu alterações sobre a FC (dados não mostrados).

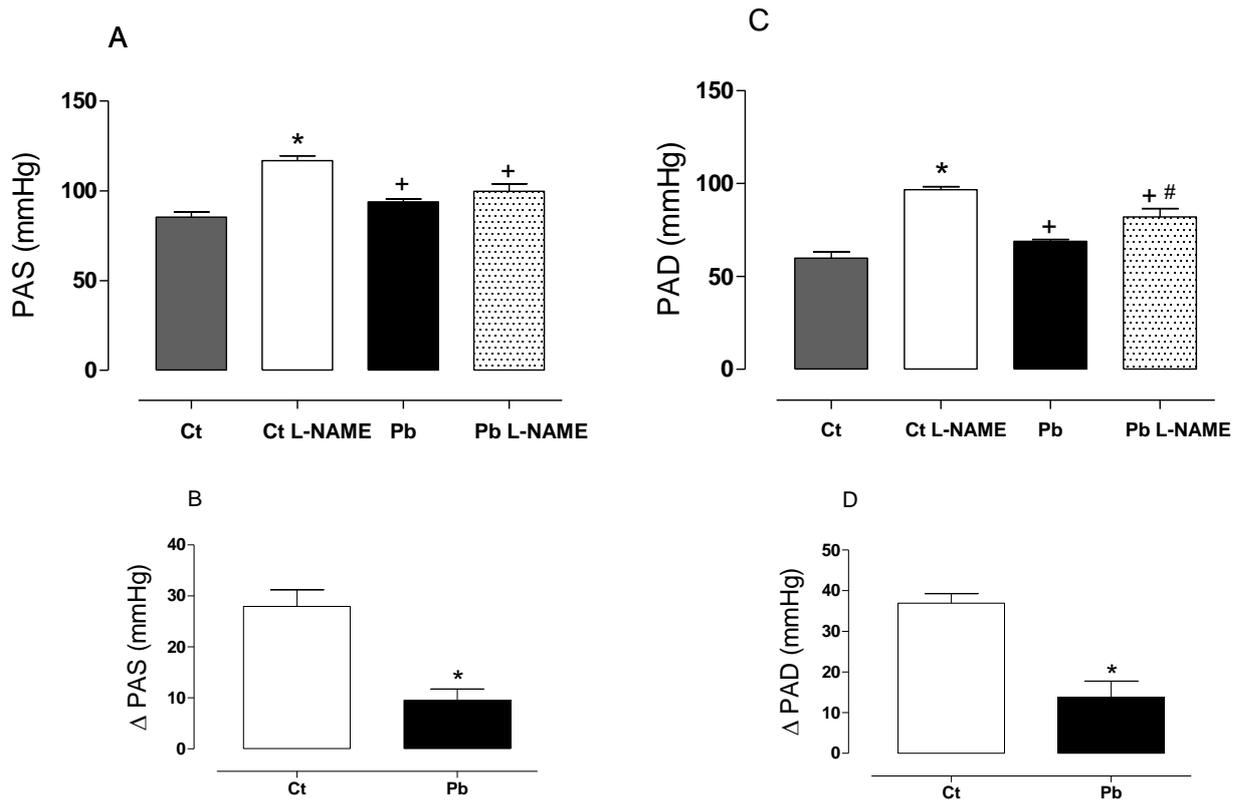


Figura 12: (A) PAS, (C) PAD antes, no grupo controle (Ct) e no grupo tratado (Pb), e após a administração de L-NAME, no grupo controle (Ct L-NAME) e no grupo tratado (Pb L-NAME). A variação pressórica foi calculada pela diferença entre os valores da PAS (B), representado por Δ PAS, e da PAD (D), representado por Δ PAD, antes e após a injeção de L-NAME em cada grupo (N=7). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Teste t de Student e ANOVA uma-via, seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ct; # $p < 0,05$ vs. Pb; + $p < 0,05$ vs. Ct L-NAME.

5.2 REATIVIDADE PRESSÓRICA

5.2.1 Efeito da exposição ao chumbo sobre a reatividade pressórica à fenilefrina

Se analisássemos a curva dose-resposta à fenilefrina, representada na figura 13 A e B, a qual apresenta os valores sob a forma absoluta, os achados nos levariam a sugerir que o chumbo provoca aumento da sensibilidade à fenilefrina nos valores basais sem alterar a resposta máxima da curva. No entanto, os valores pressóricos basais dos animais tratados com chumbo já iniciam a curva em valores mais elevados em relação aos animais controle. Portanto, esta não seria a forma de análise mais ideal a ser feita.

Desta forma, ao analisarmos estes valores sob a forma de percentil, foi possível observar que a exposição ao chumbo promoveu redução da reatividade pressórica à fenilefrina. Houve, portanto, uma diminuição na sensibilidade da curva dose-resposta à fenilefrina na PAS e PAD (Figura 13 C e D).

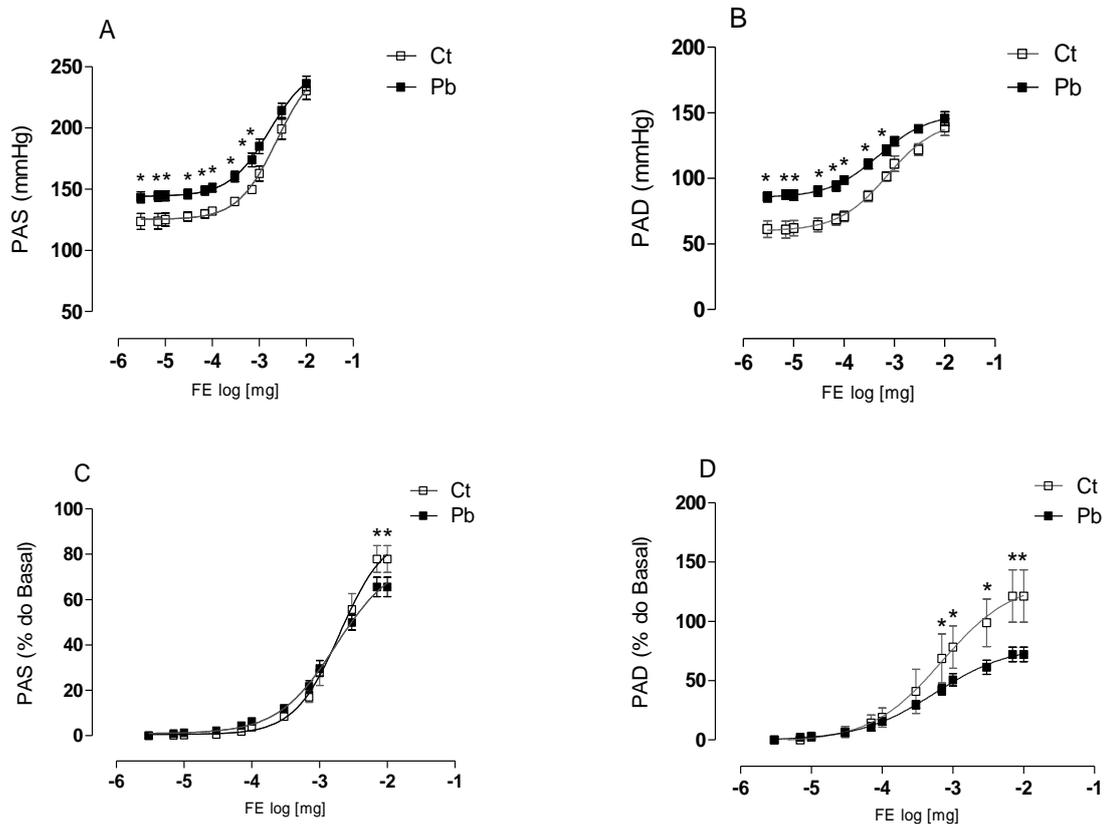


Figura 13: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina expressos em valores absolutos na PAS (A) e na PAD (B) do grupo controle (Ct) e do grupo tratado (Pb). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina expressos em valores percentuais na PAS (C) e na PAD (D) do grupo controle (Ct) e do grupo tratado (Pb) (Ct, N=5; Pb, N=8). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizada ANOVA duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Ct.

5.2.2 Avaliação da reatividade pressórica à fenilefrina antes e após o bloqueio ganglionar

A reatividade pressórica à fenilefrina foi avaliada antes e após a administração do hexametônio. Foi possível observar que o bloqueio ganglionar não modificou a resposta máxima da curva dose-resposta, tanto na PAS, quanto na PAD, entretanto promoveu redução da sensibilidade à fenilefrina na PAD, como demonstrado pelos valores dAUC (Figura 14). Ao calcular a diferença percentual da área abaixo da

curva (dAUC%) observou-se que a redução da reatividade à fenilefrina provocada pelo Hexametônio foi similar nos dois grupos experimentais na PAS (Figura 14 C). No entanto, ao calcular a diferença percentual da área abaixo da curva na PAD foi possível perceber uma maior magnitude de resposta na redução da reatividade à fenilefrina no grupo tratado (Pb) em presença de hexametônio (Figura 14 F). Este achado sugere que a resposta autonômica parece estimular os efeitos pressóricos do chumbo.

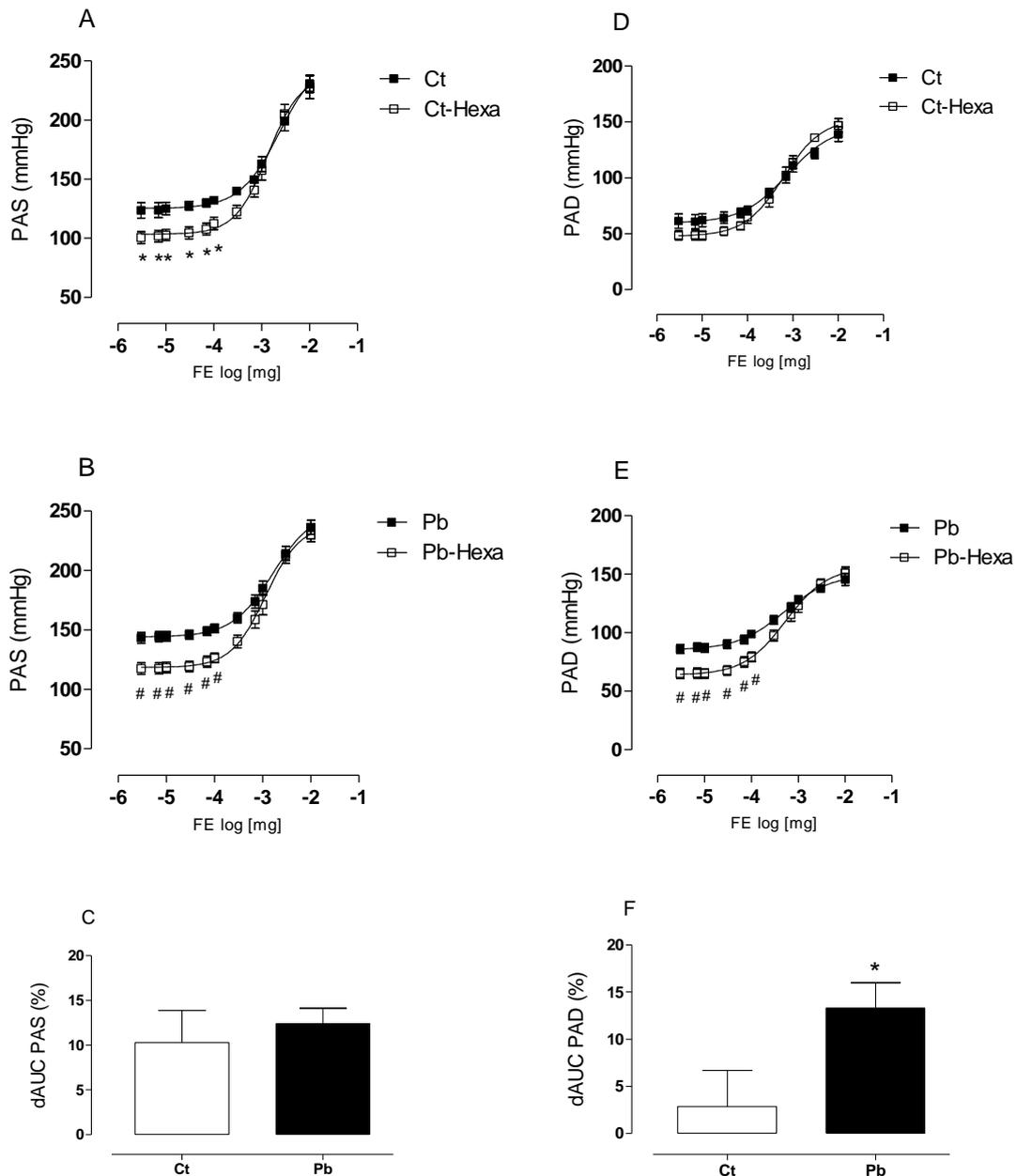


Figura 14: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAS no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração do hexametônio (Ct-Hexa), e no grupo exposto ao chumbo (B), antes (Pb) e

após a administração do hexametônio (Pb-Hexa). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAD no grupo controle (D), antes (Ct) e após a administração do hexametônio (Ct-Hexa), e no grupo exposto ao chumbo (E), antes (Pb) e após a administração do hexametônio (Pb-Hexa) (Ct, N=5; Pb, N=8). Diferença percentual da área abaixo da curva na PAS (C) e na PAD (F) antes (Preenchido) e após a administração do hexametônio (Não-preenchido) entre os grupos. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística das curvas de concentração-resposta à fenilefrina foi utilizado ANOVA duas vias, seguido de post hoc de Bonferroni. Teste t de student foi utilizado para análise da diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC). #P<0,01 vs Pb; *P<0,01 vs Ct.

Com o intuito de ponderar a efetividade da ação bloqueadora ganglionar pelo hexametônio, foi avaliada a alteração da frequência cardíaca em resposta à variação das doses de fenilefrina. Após o bloqueio ganglionar, o aumento gradativo da concentração de fenilefrina causou uma redução reflexa da frequência cardíaca. Esta redução reflexa da FC só foi visível na dose 10^{-2} mg de fenilefrina, o que nos permite afirmar a eficácia do bloqueio ganglionar produzido pelo hexametônio (Figura 15).

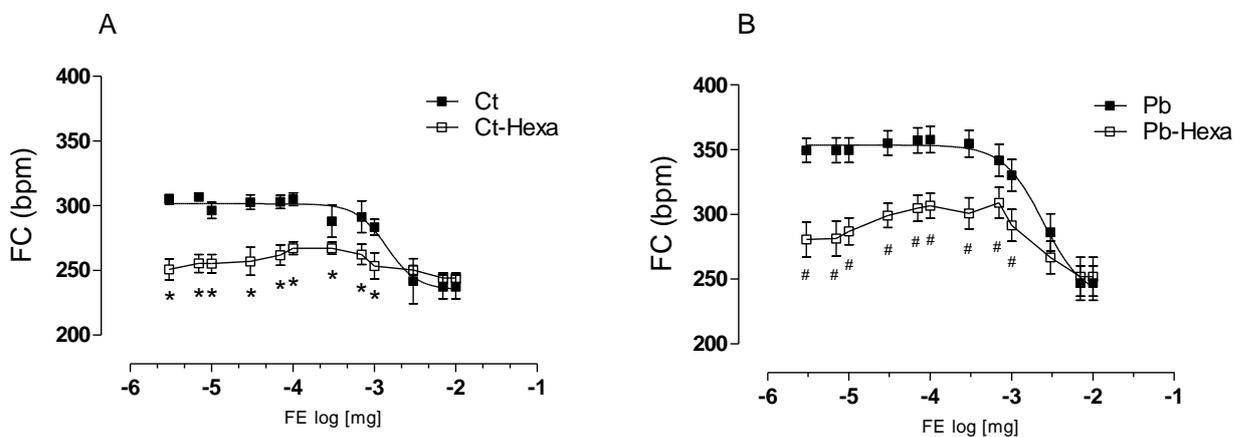


Figura 15: Curva dose-resposta à fenilefrina na frequência cardíaca (FC) no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração de hexametônio (Ct-Hexa); e no grupo tratado (B), antes (Pb) e após a administração de hexametônio (Pb-Hexa) (Ct, N=5; Pb, N=9). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas-vias, seguido de Bonferroni. *P<0,05 vs Ct.; #P<0,05 vs Pb.

5.2.3 Efeito do losartan sobre a reatividade pressórica à fenilefrina nas alterações produzidas pelo chumbo

A reatividade pressórica à fenilefrina também foi avaliada antes e após a administração de Losartan. Foi possível observar que houve uma redução na sensibilidade à fenilefrina na PAD, como demonstrado pelos valores dAUC (%) (Figura 16). Ao calcular a diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) observou-se que a redução da reatividade à fenilefrina provocada pelo Losartan foi similar nos dois grupos experimentais na PAS (Figura 16 C). No entanto, a diferença percentual da área abaixo da curva na PAD demonstrou uma maior magnitude de resposta na redução da reatividade à fenilefrina no grupo tratado (Pb) em presença de Losartan (Figura 16 F). Este achado sugere que o Sistema Renina Angiotensina parece estar envolvido nos efeitos produzidos pela exposição crônica ao chumbo.

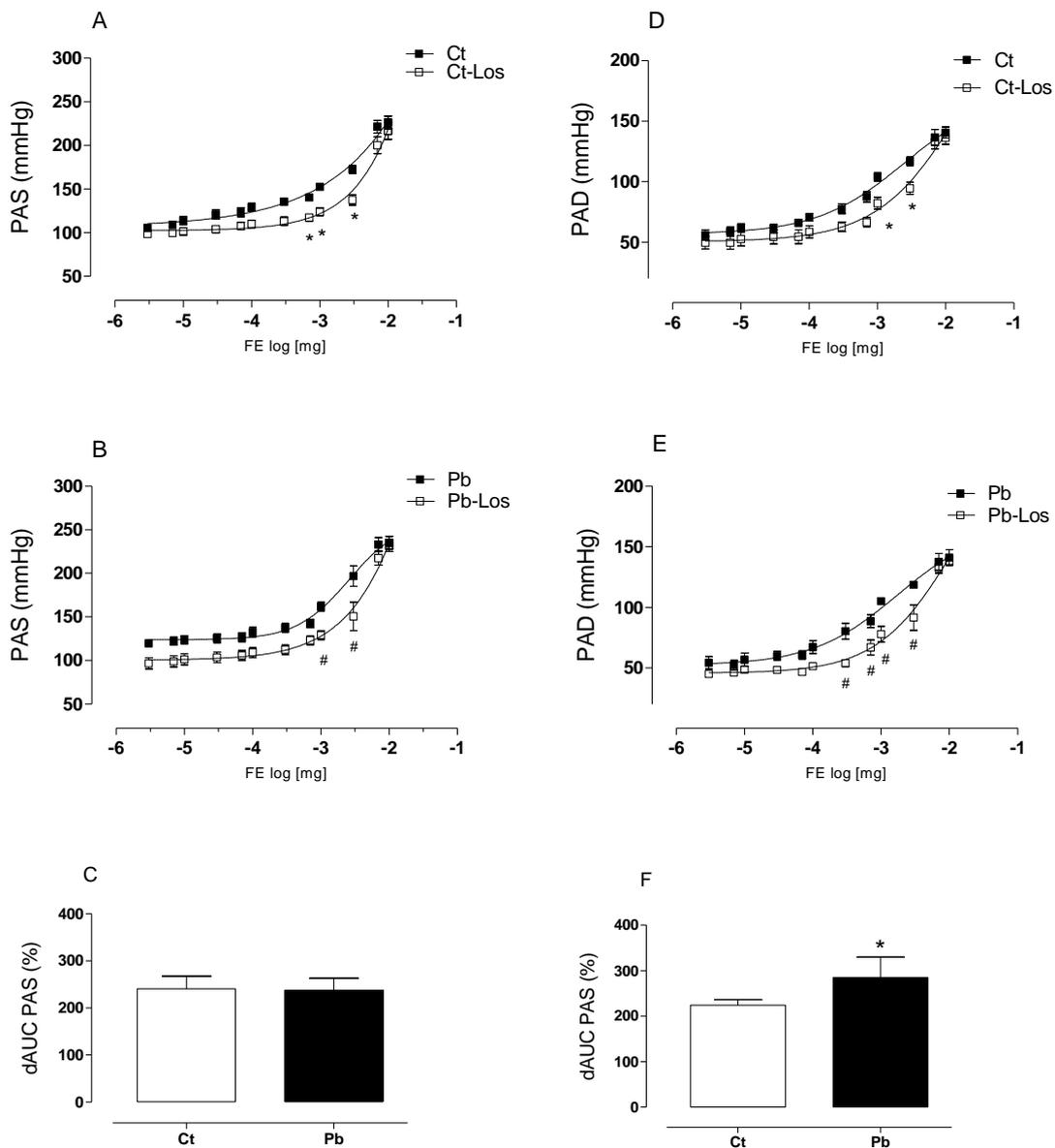


Figura 16: Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAS no grupo controle (A), antes (Ct) e após a administração do Losartan (Ct-Los), e no grupo exposto ao chumbo (B), antes (Pb) e após a administração do Losartan (Pb-Los). Curvas de concentração-resposta à fenilefrina na PAD no grupo controle (D), antes (Ct) e após a administração do Losartan (Ct-Los), e no grupo exposto ao chumbo (E), antes (Pb) e após a administração do Losartan (Pb-Los) (N=8). Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos, na PAS (C) e na PAD (F), antes (Preenchido) e após a administração do hexametônio (Não-preenchido). Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística das curvas de concentração-resposta à fenilefrina foi utilizado ANOVA duas vias, seguido de post hoc de Bonferroni. Teste t de student foi utilizado para análise da diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%). #P<0,01 vs Pb; *P<0,01 vs Ct.

5.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.3.1 Expressão protéica dos receptores cardíacos β_1 -adrenérgicos

Para confirmar esta hipótese de modulação dos receptores cardíacos β -adrenérgicos (*downregulation*), na exposição ao chumbo, foi realizada a análise da expressão protéica destes receptores cardíacos. Através da técnica de análise Western Blot foi verificado que o grupo exposto ao chumbo apresentou redução da expressão dos receptores β_1 -adrenérgicos, em comparação ao grupo controle (Figura 17). Assim, este resultado fortalece a hipótese de hiperatividade simpática com consequente redução da densidade de adrenoceptores- β_1 .

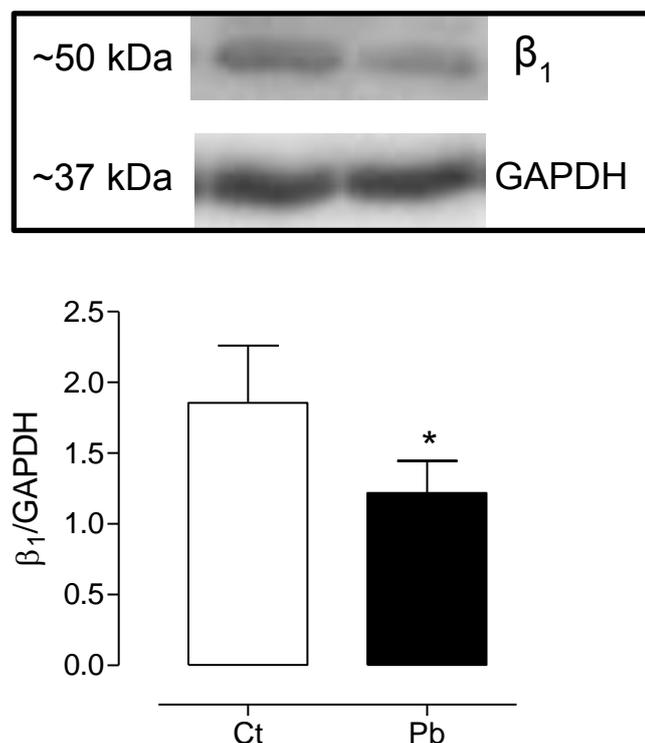


Figura 17: Efeitos da exposição ao chumbo sobre a expressão de proteínas dos receptores cardíacos β_1 -adrenérgicos (Ct, N=7; Pb, N=7). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão dos receptores β_1 e do GAPDH. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade dos receptores β_1 e do GAPDH. O peso molecular do receptor β_1 e do GAPDH estão indicados na figura. Os dados estão apresentados em Média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado Teste t de Student, não pareado. *P<0,05 vs. Ct.

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo indicam que a exposição crônica ao chumbo aumenta a PA enquanto diminuiu a reatividade pressórica à fenilefrina em ratos. Ainda, os dados obtidos apontam para a hiperatividade simpática, como a principal causa de elevação da PA. No entanto, este não é o único mecanismo responsável, uma vez que o Sistema Renina Angiotensina, a biodisponibilidade do NO e a via da COX também se mostraram alvos da exposição ao chumbo e contribuem para os danos no sistema cardiovascular, desencadeados pela exposição a este metal pesado.

Este estudo reveste-se de importância, pois pouco é conhecido sobre os efeitos do chumbo através de trabalhos realizados em protocolos experimentais *in vivo*. Pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório (Fiorim et al., 2011; Fioresi et al., 2014; Simões et al., 2015; Nunes et al., 2015) demonstraram que a exposição ao chumbo pode contribuir para o surgimento ou agravamento da hipertensão e de doenças cardiovasculares. No entanto, estes estudos foram conduzidos em protocolos *in vitro*, por isso, se faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que investiguem se os mecanismos reguladores do sistema cardiovascular, prejudicados na exposição ao chumbo, persistem alterados *in vivo*.

6.1 MEDIDA HEMODINÂMICA

O chumbo tem sido associado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Navas-Acien et al., 2007). Além disso, o valor de referência estabelecido pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) corresponde à concentração inferior a 30 mg/dL em adultos. Em ambientes de exposição ocupacional os níveis de concentração sanguínea de chumbo não devem exceder 60 µg/dL e caso esse valor seja excedido, as fontes de exposição ao metal devem ser removidas (Patrick, 2006; ATSDR, 2005; Kosnett et al., 2007). No entanto, em um mesmo modelo de tratamento, desenvolvido em nosso laboratório, foi mensurada uma concentração sanguínea de ~10 µg/dL de chumbo e mesmo assim, foi possível observar um aumento da pressão arterial nestes animais (Fioresi et al., 2014; Nunes et al., 2015). Esta concentração de chumbo no sangue é muito menor do que o valor de

referência, preconizado como seguro, sendo considerado o limite superior de exposição em pessoas expostas ao chumbo (Patrick, 2006; ATSDR, 2005; Kosnett et al., 2007).

Estudos anteriores mostraram que a exposição crônica ao chumbo promove aumento da PA (Carmignani et al., 1999, 2000; Roncal et al., 2007; Victery, 1988). Desde 1988, Victery (1988) relatou os efeitos da exposição crônica ao chumbo sobre a pressão sanguínea em animais. E assim como Patrick e colaboradores (2006), vários outros estudos realizados em animais (Carmignani et al., 1999, 2000; Roncal et al., 2007) relataram que a exposição crônica ao chumbo provoca aumento na PA. Um estudo em humanos com trabalhadores expostos ao chumbo sugere resultados consistentes com os estudos realizados em animais, o qual indicou um aumento significativo na pressão arterial nestes trabalhadores expostos ao metal (Tsao et al., 2000; Sharifi et al., 2004).

Sugere-se que a toxicidade do chumbo no sistema cardiovascular seja multifatorial. Estudos demonstram que a exposição crônica ao chumbo causa hipertensão e doenças cardiovasculares por promover estresse oxidativo, limitar a biodisponibilidade do óxido nítrico e aumentar a produção de endotelina (Vaziri, 2008; Khalil-Manesh et al., 1993). Além de debilitar o sistema antioxidante que pode estar relacionado com a gênese e manutenção da hipertensão, considerando que altera a disponibilidade do óxido nítrico (NO), oxidando ou inativando esse fator vasodilatador derivado do endotélio (Vaziri et al., 1999; Valencia et al., 2001). O chumbo também interfere na homeostase do cálcio, seja diretamente reduzindo sua ação contrátil intracelular na musculatura lisa ou intermediado pelo estresse oxidativo, aumentando a concentração de Ca^{2+} no citosol de vários tipos celulares (Valencia et al., 2001).

São várias as pesquisas que avaliam a ação do chumbo sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, são poucos os estudos *in vivo* que investigam os efeitos da exposição crônica de chumbo em baixas concentrações plasmáticas deste metal. No presente estudo observou-se aumento da PAS desde a primeira semana, a qual permaneceu elevada até o final da exposição ao chumbo. Este resultado corrobora os dados previamente obtidos em nosso laboratório por Fioresi e colaboradores (2014) e Nunes e colaboradores (2015), que mostraram um aumento significativo na

PAS a partir da primeira semana de exposição, em um mesmo modelo de tratamento.

O incremento da pressão arterial encontrado em nosso estudo pode ser resultado de um aumento da resistência vascular sistêmica, de acordo com estudo realizado por Ding e colaboradores (1998), em que avaliaram os efeitos da exposição aguda ao chumbo sobre a reatividade vascular. Estes autores demonstraram haver um aumento do estresse oxidativo, do radical hidroxila e da oxidação, além de haver inativação local do óxido nítrico, contribuindo para alteração do balanço entre os fatores vasoconstritores e vasodilatadores e, conseqüentemente, para o surgimento ou agravamento da hipertensão (Ding et al., 1998).

Nossos resultados também mostraram que a exposição crônica ao chumbo altera a FC. Este resultado corrobora o estudo de Fioresi e colaboradores (2010), os quais demonstraram que o chumbo promove um aumento do inotropismo cardíaco e da FC. Além disso, Boscolo e Carmignani (1988) também mostraram um aumento da PA e do inotropismo cardíaco por meio de uma exposição a 0, 15, 30 e 60 µg/ml de chumbo por 18 meses. Em outro estudo, realizado por estes mesmos autores (Carmignani et al., 1999), também demonstraram haver hiperatividade simpática central, redução da sensibilidade ao barorreflexo e hipotonia vagal em ratos expostos cronicamente ao chumbo, sugerindo que o chumbo pode provocar aumento da atividade simpática por mecanismos centrais.

O endotélio vascular é responsável pela regulação do tônus vascular através dos efeitos dos mediadores sintetizados localmente, principalmente, óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e ânion superóxido. Muitos mecanismos individuais estão envolvidos na adaptação vascular, incluindo a permeabilidade vascular, função endotelial, regulação do tônus muscular liso, interação endotelial leucocitária, adaptação vascular e angiogênese (Bleakley et al., 2015; Pries, 2015; Kobuchi et al., 2015).

A regulação do tônus do músculo liso vascular é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, estímulo nervoso e por estimulação hormonal, além de ser um determinante de resistência vascular (Bleakley et al, 2015; Pries, 2015; Kobuchi et al, 2015). Estudos recentes demonstraram que a exposição ao chumbo provoca alterações no tônus vascular. Estas, por sua vez, seriam mediadas pela ativação de proteínas inflamatórias, tais como a NADPH-oxidase e COX-2

(Simões et al, 2015), pelo aumento da participação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX (Simões et al , 2015; Fiorim et al, 2011), pela redução da biodisponibilidade de NO (Fiorim et al, 2011; Karimi et al, 2002) e pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Fiorim et al, 2011, 2012).

Em relação à reatividade pressórica à fenilefrina, nosso estudo mostrou que a exposição ao chumbo provocou redução da reatividade (Figura 13). Este achado pode ser explicado uma vez que o grupo Pb apresentou aumento da PA e, conseqüentemente, do tônus vascular. Este aumento do tônus pode ser regulado através dos efeitos dos mediadores sintetizados localmente com predominância de elementos vasoconstritores que provoquem redução da complacência vascular e, conseqüentemente sensibilidade reduzida à fenilefrina. A redução da reatividade pressórica observada neste estudo está de acordo com Fiorim e colaboradores (2010) que, em um modelo experimental de exposição ao chumbo por 7 dias, demonstraram haver redução da reatividade vascular em anéis de aorta de ratos.

Além disso, um aspecto a ser considerado é que o chumbo reduz a reatividade pressórica à fenilefrina, possivelmente por haver aumento da resistência periférica e, conseqüentemente, aumento da PAD. Como resultado do aumento da resistência periférica ocorre uma redução da perfusão coronária gerando um efeito inotrópico positivo, o que justificaria os dados observados neste estudo (Tucci et al., 1980; Vassallo & Mill, 1988).

6.1.1 Efeitos do bloqueio ganglionar sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina nas alterações induzidas pelo chumbo.

O chumbo já foi descrito como um metal com a capacidade de estimular a atividade do sistema nervoso simpático. Este achado foi confirmado por Lai e colaboradores (2002), por meio de modelo experimental em ratos, em que demonstraram que estes efeitos desencadeados pelo chumbo sobre o sistema nervoso simpático pode contribuir para o surgimento e desenvolvimento de efeitos cardiovasculares.

Simões e colaboradores (2011) investigaram os efeitos da exposição aguda ao chumbo sobre os parâmetros hemodinâmicos e demonstraram que o aumento da PAS não foi modificado pelo bloqueio ganglionar no início do desenvolvimento da

hipertensão. Por outro lado, nossos resultados mostraram que o aumento da PAS, PAD e FC foi revertido por meio do bloqueio ganglionar. Estes achados sugerem haver a participação dos reflexos autonômicos, ativados ao longo dos 30 dias de tratamento, como um mecanismo responsável para o desenvolvimento da hipertensão induzida pelo chumbo.

Este resultado pode estar relacionado a um aumento na atividade simpática *in vivo*, uma vez que estudos anteriores (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani et al., 2000; Tsao et al., 2000; Berg, 2015) sugeriram haver hiperatividade simpática central e periférica induzida pelo chumbo. Estes mesmos estudos (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani et al., 2000; Tsao et al., 2000; Berg, 2015) têm sugerido que o chumbo promove um aumento na capacidade de resposta dos receptores α_2 -adrenérgicos e pode provocar aumento da estimulação dos receptores β -adrenérgicos e dopaminérgicos, cardíacos e vasculares. Além disso, estudos (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani et al., 2000) têm demonstrado um aumento nos níveis plasmáticos de noradrenalina e de adrenalina em animais expostos ao chumbo, em comparação ao grupo controle. No presente estudo, o bloqueio ganglionar promoveu redução da FC, o que fortalece a hipótese de que o chumbo promova hiperatividade simpática.

Nossos resultados indicam que o bloqueio ganglionar não aboliu completamente o efeito pressórico causado pelo chumbo (Figura 7). Assim, sugerimos que o aumento da PA produzido pela exposição ao chumbo pode também estar associado a outros mecanismos hipertensores.

No que diz respeito à reatividade pressórica, o hexametônio reduziu a reatividade pressórica à fenilefrina em animais expostos ao chumbo na PAD (Figura 14), o que implica que a resposta autonômica parece estimular as alterações pressóricas induzidas pelo chumbo. Além disso, o bloqueio ganglionar causou uma redução na sensibilidade à fenilefrina nos valores basais da curva dose-resposta à fenilefrina, no entanto, não alterou a resposta máxima, em relação à PAD (Figura 14). Este achado pode ser explicado uma vez que o efeito das doses mais baixas de fenilefrina foi eliminado pelo bloqueio ganglionar. No entanto, quando exposto a doses elevadas de fenilefrina, houve saturação dos receptores α_1 e, assim, o hexametônio não causou alterações na resposta máxima da curva dose-resposta à fenilefrina.

Com o intuito de avaliar a efetividade do bloqueio ganglionar, foi verificada a variação da FC como resposta ao aumento das doses de fenilefrina. O aumento da concentração de fenilefrina causou uma redução reflexa da frequência cardíaca. Esta redução só era visível a partir da dose 10^{-2} mg de fenilefrina, após o bloqueio ganglionar, o que nos permite afirmar a eficácia do bloqueio ganglionar.

6.1.2 Efeitos do Isoproterenol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações induzidas pelo chumbo.

O coração é capaz de sofrer adaptações e mudanças rápidas do débito cardíaco provocadas principalmente pelas alterações na atividade do sistema nervoso autônomo, as quais alteram FC, força e curso temporal da contração. Estudos relacionados ao coração relatam efeitos variáveis da estimulação do sistema nervoso simpático sobre a FC, a qual pode ser mediada pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Tsao et al., 2000; Campbell et al., 2014; Fioresi et al., 2009).

Fioresi e colaboradores (2009), em um modelo de exposição aguda ao chumbo, sugeriram que o aumento da resposta β -adrenérgica e o aumento da atividade da Ca^{2+} -ATPase miosínica podem demonstrar a capacidade da exposição aguda ao chumbo em gerar aumento da atividade contrátil em músculo papilar isolado e ventrículos, respectivamente.

Tsao e colaboradores (2000) mostraram que a exposição ao chumbo por 2 meses promove aumento dos níveis de norepinefrina plasmática, redução dos receptores β -adrenérgicos e do AMPc em aorta e aumento do receptor β -adrenérgico e AMPc renal em ratos Wistar, fatores que contribuem para o aumento da PA. Esses achados corroboram os resultados que sugerem uma modulação da atividade dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos.

Os nossos resultados demonstram que o grupo exposto ao chumbo apresentou uma menor responsividade ao agonista β -adrenérgico em comparação ao grupo controle. Este achado apoia a hipótese de haver redução da atividade modulada pelos β_1 -adrenoceptores como um mecanismo de compensação. Para reforçar esta constatação, a análise de Western blot mostrou redução na expressão protéica dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos no grupo Pb (figura 17).

6.1.3 Envolvimento do sistema renina angiotensina sobre as alterações da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade pressórica à fenilefrina induzidas pelo chumbo.

A atuação do Sistema Renina Angiotensina desempenha efeitos vitais sobre o organismo, com a regulação de processos fisiológicos, atuando no controle da pressão arterial e na manutenção de sua homeostase (Campbell et al, 1985; Vander, 1988; Navas-Acien et al., 2007; Simões et al., 2011).

O Sistema Renina Angiotensina é considerado um dos mais importantes sistemas reguladores para a homeostase cardiovascular, exercendo grande influência sobre as funções cardiovasculares e renais através de múltiplos mediadores. A angiotensina II é considerada a principal molécula atuante nesse sistema e tem ações importantes em múltiplos níveis de funcionamento cardíaco e renal. Dentre as ações da Angiotensina II estão: ação trófica e mitogênica, arritmogênica, cronotrópica e inotrópica; tem efeitos diretos sobre as células do miocárdio, podendo levar à hipertrofia (Dorn, 2005); promove a liberação de aldosterona, inibição da secreção de renina, reabsorção de sódio e vasoconstrição; exerce ação proliferativa e angiogênica; promove liberação de NO e prostaglandinas, provocando disfunção endotelial e remodelamento vascular. Além disso, recentemente a angiotensina II tem sido associada como um mediador para o estresse oxidativo, seja pela ativação de receptores Toll-Like 4 (De Batista et al., 2014) ou pela ativação das NAPH oxidases, gerando superóxidos e peróxido de hidrogênio (Rajagopalan et al., 1996) .

Fiorim e colaboradores (2011) demonstraram que o chumbo parece afetar o Sistema Renina Angiotensina local, no entanto, sem alterar a expressão dos receptores AT₁ e AT₂ em aortas. Estes mesmos autores (Fiorim et al., 2011) também demonstraram que o aumento da PAS foi acompanhado de aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática em ratos expostos ao chumbo por sete dias, mostrando haver uma correlação significativa entre a PAS e a atividade da ECA plasmática. Outro estudo anterior (Simões et al., 2011) realizado em um modelo de exposição aguda ao chumbo *in vivo* mostrou resultados similares, em que o grupo exposto ao chumbo apresentou aumento da PA, na qual o Losartan e o Enalapril foram capazes de abolir este efeito hipertensor. Além disso, a atividade da ECA foi maior no grupo exposto ao chumbo do que no grupo controle, no entanto, a

exposição ao chumbo também não alterou a expressão do receptor AT_1 ou AT_2 (Simões et al., 2011).

Diante do exposto, foi investigada a participação do Sistema Renina Angiotensina nas alterações induzidas pelo chumbo. Para isto, foi utilizado um bloqueador dos receptores AT_1 , e foi possível perceber que o bloqueio destes receptores provocou uma redução da PAS e PAD, sugerindo assim o papel da angiotensina II em conduzir os efeitos da exposição crônica ao chumbo.

Estudos que utilizam modelos de exposição crônica ao chumbo têm demonstrado o envolvimento do Sistema Renina Angiotensina nas alterações promovidas por este metal. Tais como Sharifi e colaboradores (2004), que em um estudo em ratos expostos ao chumbo por 2-8 semanas, encontraram um aumento progressivo na atividade da ECA no plasma, aorta, rim e coração. Além disso, Carmignani e colaboradores (2000) verificaram um aumento significativo da atividade da ECA plasmática em ratos expostos ao chumbo durante 10 meses. Estes resultados *in vitro* corroboram os nossos resultados *in vivo*, uma vez que o losartan reduziu a PAS, PAD e, além disso, provocou redução na reatividade pressórica na PAD (Figura 10 e 16).

Em relação à reatividade pressórica, o losartan também promoveu redução da reatividade pressórica à fenilefrina na PAD (Figura 16), o que implica que o Sistema Renina Angiotensina parece afetar os efeitos produzidos pelo chumbo. O bloqueio dos receptores AT_1 promoveu uma redução na sensibilidade à fenilefrina nos valores basais da curva dose-resposta, no entanto, não alterou a resposta máxima. Uma explicação para este achado consiste na redução do efeito pressórico da angiotensina II sobre receptores AT_1 na presença do Losartan. Outro mecanismo para haver esta redução pressórica seria uma possível estimulação pela angiotensina II sobre os receptores AT_2 , uma vez que o losartan teria impedido a estimulação do receptor AT_1 (Vander, 1988).

Estudos têm mostrado o envolvimento do SRA no desenvolvimento da hipertensão induzida pelo chumbo em animais (Vander, 1988; Vaziri, 2008). Estudos anteriores demonstraram que o bloqueio dos receptores AT_1 poderia favorecer a ligação da angiotensina II aos receptores AT_2 (Masaki et al., 1998; Carson et al., 2001). Isto justificaria a redução de capacidade de resposta pressórica à fenilefrina na PAD

observada neste estudo, assim como redução dos valores basais da PA após bloqueio com o losartan (Figura 10).

6.1.4 Envolvimento da biodisponibilidade de Óxido Nítrico nas alterações hemodinâmicas produzidas pelo chumbo.

A comunidade científica tem sugerido que a exposição ao chumbo diminui a produção de óxido nítrico (Nunes et al., 2015; Tsao et al., 2000). Nunes e colaboradores (2015) observaram, *in vitro*, em um mesmo modelo de tratamento, que o L-NAME promove aumento da reatividade vascular à fenilefrina em ambos os grupos experimentais. No entanto, os valores dAUC demonstraram que o papel desempenhado pelo óxido nítrico na resposta contráctil à fenilefrina não diferiram entre os grupos. Os nossos resultados *in vivo* demonstram que o L-NAME promove aumento da pressão arterial em ambos os grupos experimentais, no entanto, a magnitude do efeito foi menor no grupo exposto ao chumbo (Figura 12). A variação pressórica calculada pela diferença entre o valor da pressão arterial sistólica e diastólica antes e após a administração de L-NAME em cada grupo (Figura 12 B e D) demonstra que houve menor variação nas pressões arteriais no grupo chumbo, ou seja, a magnitude do efeito no grupo controle foi superior à do grupo exposto ao chumbo. Este resultado sugere que o NO esteja envolvido nestas alterações produzidas pelo chumbo, promovendo uma redução em sua biodisponibilidade, o que está de acordo com Simões e colaboradores (Simões et al., 2015).

A redução da biodisponibilidade do NO pode ser devida a alterações na sua síntese. Estudos anteriores (Vaziri, 1997; Marques et al., 2001) evidenciaram um comprometimento da vasodilatação endotélio-dependente em ratos expostos ao chumbo e mostraram um aumento da expressão da proteína eNOS (isoforma endotelial de óxido nítrico sintase), que poderia ser uma resposta compensatória à degradação de NO mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro estudo (Silveira et al., 2014) mostrou também um aumento da expressão das proteínas eNOS e iNOS (isoforma induzível da sintase do óxido nítrico) em animais expostos ao chumbo. Portanto, considerando os resultados deste estudo e os dados previamente publicados por diversos autores, não se podem descartar as alterações dessas isoformas como envolvidas nos efeitos observados.

Outros estudos mostraram que o tratamento de chumbo induziu a liberação de fatores derivados do endotélio tais como o óxido nítrico e a angiotensina II (Fiorim et al., 2011; Brock et al., 1982; Gupta et al., 1994). No entanto, o NO e a angiotensina II podem estimular a bomba de Na^+/K^+ -ATPase e possivelmente reduzir o tônus vascular, podendo assim agir como um mecanismo contrarregulador contra o aumento da PAS, pelo menos nos estágios iniciais da exposição ao chumbo (Fiorim et al., 2011; Brock et al., 1982; Gupta et al., 1994). De fato, neste mesmo modelo experimental, Fioresi e colaboradores (2014) quantificaram um aumento de atividade da Na^+/K^+ -ATPase cardíaca. Ainda, dentre os possíveis mecanismos esclarecedores deste aumento de pressão arterial podemos considerar o efeito direto do NO sobre os parâmetros hemodinâmicos. A redução da biodisponibilidade do NO, observada como consequência da exposição ao chumbo, além de contribuir para o aumento da pressão sanguínea, parece cooperar com a redução da reatividade pressórica observada nos animais expostos ao metal, uma vez que o NO causaria vasodilatação e redução da PA (Moncada et al., 2001).

6.1.5 Efeitos da Indometacina sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nas alterações produzidas pelo chumbo.

Estudo anterior realizado em nosso laboratório (Silveira et al., 2010) mostrou que o chumbo induz efeitos vasoconstritores em leito de artéria caudal, os quais foram suprimidos por meio da indometacina. Este achado sugeriu que o chumbo esteja associado ao estímulo da liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX. Outro estudo (Courtouis et al., 2003) verificou um aumento na expressão da proteína da COX-2 em anéis de aorta perfundidos com chumbo, sugerindo que esta resposta esteve associada à uma desregulação da subunidade SS1-SGC e à um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como um mecanismo vasoconstritor.

Simões e colaboradores (2015) demonstraram que o chumbo provoca ativação das proteínas inflamatórias derivadas das vias de sinalização MAPK, tais como a NADPH-oxidase e da COX-2, sugerindo uma interação recíproca e contribuição para a disfunção vascular como mecanismos subjacentes para o desenvolvimento da hipertensão induzida pelo chumbo. Os nossos resultados mostraram que a indometacina reduz a PA, mas não altera a reatividade pressórica à fenilefrina. Este

achado sugere que o chumbo pode promover aumento da produção de prostanóides vasoconstritores derivados da COX, sendo este um mecanismo hipertensor. No entanto, vale ressaltar que este é um estudo *in vivo*, no qual existe a interferência de todos os mecanismos compensatórios existentes, sendo assim, estas respostas podem variar dependendo da dose e do tempo de exposição ao metal.

Por fim, vale lembrar que o estresse oxidativo tem sido descrito como um mecanismo potencial para o desenvolvimento de perturbações cardiovasculares causadas pelo chumbo mediadas por ROS, as quais desempenham um papel importante na disfunção endotelial (Vaziri et al., 2003; Weseler & Bast, 2010). Nunes e colaboradores (2015) observaram diminuição da reatividade vascular em anéis de aorta de animais expostos ao chumbo na presença de SOD, a qual é indicativa de aumento da produção de ânions de superóxido ou maior atividade desta enzima. Além disso, estudos recentes em nosso laboratório demonstraram maior produção de ânion superóxido local e aumento da contratilidade cardíaca induzidos pelo chumbo (Silveira et al., 2014). Assim, o *stress* oxidativo pode ocorrer como um resultado ao aumento da geração de ROS ou depressão das vias antioxidantes ou ambos os efeitos simultaneamente, os quais podem atuar produzindo alterações na modulação endotelial, tais como as descritas neste estudo (Weseler & Bast, 2010).

6.2 RESUMO DOS RESULTADOS

- Animais expostos cronicamente a 100 ppm de Acetato de chumbo apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e da frequência cardíaca.
- A exposição crônica ao chumbo provocou diminuição da reatividade pressórica à fenilefrina *in vivo*.
- O aumento da pressão arterial diastólica, associado à frequência cardíaca aumentada, sugere haver um incremento dos reflexos autonômicos e consequente hiperatividade simpática.
- A hiperatividade simpática promoveu uma modulação negativa da atividade dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos como um mecanismo compensatório a essas alterações.
- A análise por meio da técnica de Western Blot constatou a hipótese de *downregulation* dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos.
- A redução da reatividade pressórica à fenilefrina nos animais expostos cronicamente ao chumbo foi associada ao aumento do tônus do músculo liso e consequente redução da complacência vascular.
- O efeito pressórico do chumbo também foi associado ao envolvimento do Sistema Renina Angiotensina, mediado pela angiotensina II.
- Foi sugerido haver modulação endotelial reduzida, mediada pela ativação e liberação dos prostanóides vasoconstritores derivados da via COX e redução da biodisponibilidade de NO.
- Estes resultados demonstraram que baixas concentrações de chumbo são um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e os valores de concentração sanguínea de chumbo apresentados aqui fornecem orientações para a revisão dos valores de referência considerados seguros.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a exposição crônica a baixas doses de chumbo promove aumento da PA e FC e redução da reatividade pressórica à fenilefrina, *in vivo*. Estes achados foram associados, principalmente, à hiperatividade simpática, que promove *downregulation* de receptores β cardíacos, ativação do Sistema Renina Angiotensina e redução da modulação endotelial, mediada pela ativação da via COX e redução da biodisponibilidade de NO.

Vale ressaltar que baixas concentrações de chumbo são um importante fator de risco para doença cardiovascular, assim, nossos resultados fornecem orientação para a revisão das concentrações de chumbo consideradas seguras.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, M.M., 2012. Fisiologia. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1335.

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.

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

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2005. Toxicological profile for lead. US Department of Health and human services, Public Health Service, Atlanta.

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

Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Muller, D.N., Luft, F.C., Ganten, D., 2001. Tissue renin angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine* . 79:76-102.

Berg, T., 2015. Altered β_{1-3} -adrenoceptor influence on α_2 -adrenoceptor-mediated control of catecholamine release and vascular tension in hypertensive rats. *Frontiers in Physiology*. 6:120-132.

Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Insight review articles. Nature*. 415:198-205.

Bleakley, C.M.D., Hamilton, P.K., Pumb, R., Harbinson, M., McVeigh, G.E., 2015. Endothelial Function in Hypertension: Victim or Culprit? *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*. 17:651-654.

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

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, 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.

Brasil, 2008. Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n.º 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.

Brasil, 2008. Lei n.º 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, 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, 2013. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. Disponível:<<http://www.dnrm.gov.br/conteudo.asp?IDSeção=68&IDPagina=316>>. Acesso em 16 de julho de 2015.

Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 368:850-853.

Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P., Versteeg, H.H., 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry*. 36:1187-1205.

Boscolo, P., Finelli, V.N., Porcelli, G., Iannaccone, A., 1979. The role of occupational exposure to toxic metals on the development of hypertension. *Proc. Conf. on Heavy Metals in the Environment*. 31–42.

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

Brock, T.A., Lewis, L.J., Smith, J.B., 1982. Angiotensin increases Na⁺ entry and Na⁺/K⁺ pump activity in cultures of smooth muscle from rat aorta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:1438-1442.

Campbell, B.C., Meredith, P.A., Scott, J.J., 1985. Lead exposure and changes in the renin-angiotensin-aldosterone system in man. *Toxicology Letters*. 25:25-32.

Campbell, A.S., Johnstone, S.R., Baillie, G.S., Smith, G., 2014. β -Adrenergic modulation of myocardial conduction velocity: Connexins vs. sodium current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 77:147-154.

Cannon, R.O., 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*. 8:1809-1819.

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.

Carey, R.M., Howell, N.L., Jin, X.H., Siragy, H.M., 2001. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension*. 38:1272–1277.

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

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

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

Chang, H.R., Chen, S.S., Chen, T.J., Ho, C.H., Chiang, H.C., Yu, H.S., 1996. Lymphocyte beta 2-adrenergic receptors and plasma catecholamine levels in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 139:1-5.

Conterato, G.M.M., 2007. Efeitos do chumbo sobre a atividade da Tioredoxina Redutase Citosólica (TrxR1) e parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratos. 2007. 70 f. [Dissertação] – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria.

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*. v. 30, p. 248-255.

Courtouis, E., Marques, M., Barrientos, A., Casado, S., López-Farré, 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.

Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., Alhenc-Gelas, F., 1993. Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in Tlymphocytes. *Biochemical Journal*. 290:33–40.

Czura, C.J., Tracey, K.J., 2005. Autonomic neural regulation of immunity. *Journal of Internal Medicine*. 257:156-66.

Davidge, S.T., 2001. Prostaglandin H syntase and vascular function. *Circulation Research*. 89:650-660.

Danser, A.H., 1996. Local rennin-angiotensin systems. *Molecular and cellular Biochemistry*. 157:211-216.

De Batista, P.R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Medici, C.T., Silva, M.A.S.C., Rossi, E.M., Aguado, A., Vassallo, D.V., Salaices, M., Alonso, M.J., 2014. Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Angiotensin II Contributes to Hypertension and Vascular Dysfunction through Reactive Oxygen Species Production. *PLoS ONE*. 9(8):e104020.

De Gennaro, L.D., 2002. Lead and the developing nervous system. *Growth, Development, and Aging*. 66:43-50.

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

Deussen, A., Brand, M., Pexa, A., Weichsel, J., 2006. Metabolic coronary flow regulation-current concepts *Basic research in cardiology*. 101: 453-464.

Ding, Y., Vaziri, N.D., Gonick, H.C., 1998. Lead-induced HTN. II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environmental Research*. 76:107–113.

Dorn, G.W., 2005. Physiologic growth and pathologic genes in cardiac development and cardiomyopathy. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 15:185-199.

Dursun, N., Arifoglu, C., Suer, C., Keskinol, L., 2005. Blood pressure relationship to nitric oxide, lipid peroxidation, renal function, and renal blood flow in rats exposed to low lead levels. *Biological Trace Element Research*. 104:141-50.

Dzau, V.J., 1998. Circulating *versus* local renin angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 77:4-13.

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

Féletou, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 26:1215–1225.

Féletou, M., 2009. Calcium- activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*. 159:545-562.

Féletou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P.M., 2010. Vasoconstrictor prostanóides. *European Journal of Physiology*. 459:941-950.

Ferreira, A.J., Santos, R.A., 2005. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:499-507.

Fioresi, M., Furieri, L.B., Simões, M.R., Ribeiro Júnior R.F., Meira, E.F., Fernandes, A.A., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2013. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 46:178-85.

Fioresi, M., Simões, M.R., Furieri, L.B., Broseghini-Filho, G.B., Vescovi, M.V., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2014. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One*. 9(5):e96900.

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Silveira, E.A., Padilha, A.S., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Stefanon, I., Salaices, M., Vassallo, D.V., 2011. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One*. 6(2):e17117.

Fiorim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Azevedo, B.F., Simões, M.R., Padilha, A.S., Stefanon, I., Alonso, M.J., Salaices, M., Vassallo, D.V., 2012. Activation of K⁺ channels and Na⁺/K⁺ ATPase prevents aortic endothelial dysfunction in 7-day lead-treated rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 262:22–31.

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*. Editora Pergamon Press, USA.

Gonçalves, J., 2014. A Influencia do Sistema nervoso Autônomo na resposta inflamatória da Sepsis. *Arquivos de Medicina*. 28(1):8-17.

Greco, O.T., Ardito, R.V., Souza, D.R.S., Schaldach, M., 1998. Marcapasso com Sensor de Contratilidade Regulado pelas Variações do Sistema Nervoso Autônomo na Miocardiopatia Chagásica Crônica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 71:751-761.

Griendling, K. K., Lassegue, B., Alexander, R. W., 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 36:281-306.

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

Grizzo, L.T., Cordellini, S., 2008. Perinatal Lead Exposure Affects Nitric Oxide and Cyclooxygenase Pathways in Aorta of Weaned Rats. *Toxicological Sciences*. 103:207-214.

Gupta, S., MacArthur, C., Grady, C., Ruderman, N. B., 1994. Stimulation of vascular Na⁺-K⁺-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal of Physiology*. 266(35):H2146–H251.

Häyry P., 1998. Chronic rejection: an update on the mechanism. *Transplantation Proceedings*. 30:3993–3995.

Hillebrands, J.L., Klatter, F.A., Van Den Hurk, B.M., Popa, E.R., Nieuwenhuis, P., Rozing, J., 2001. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest*. 107(11):1411-22.

Hollenberg, N.K., Fischer, N.D.L., Price, D.A., 1998. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the rennin system. *Hypertension*. 32:387-392.

Iannaccone, A., Carmignani, M., Boscolo, P., 1981. Neurogenic and humoral mechanisms in arterial hypertension of chronically lead-exposed rats. *La Medicina del Lavoro*. 1:13–21.

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

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

<http://www.ilzsg.org/generic/pages/list.aspx?table=document&ff_aa_document_type=R&from=3>. Acesso em 14 de julho de 2015.

[IUPAC] Commission on Atomic Weights and isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights of the Elements. 2003. *Pure and Applied Chemistry*. 75:1107-1122. Acesso em 10 de julho de 2015.

Jacob, B., Ritz, B., Heinrich, J., Hoelscher, B., Wichmann, H., 2000. E. The effects of low-level bloodlead on hematologic parameters in children. *Environ. Res.* 82: 50-159.

Jaffe, E. A., 1985. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Annals of New York Academy of Science*. 454: 279-291.

Karimi, G., Koshbaten, A., Abdollahi, M., Sharifzadeh, M., Namiranian, K., Dehpour, A. R., 2002. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacological Research*. 46: 31-37.

Kasperczyk, S., Kasperczyk, J., Ostalowska, A., Zalejska-Fiolka, J., Wielkoszynski, T., Swietochowska, E., Birkner, E., 2009. The role of the antioxidant enzymes in erythrocytes in the development of arterial hypertension among humans exposed to lead. *Biological Trace Element Research*. 130:95-106.

Katoh Y, Periasamy M., 1996. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 6:100–106.

Khalil-Manesh, F., Gonick, H.C., Weiler, E.W., Prins, B., Weber, M.A., Purdy, R.E. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension*. 6:723-729.

Kobuchi, S., Miura, K., Iwao, H., Ayajiki, K., 2015. Nitric oxide modulation of endothelium - derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. *European Journal of Pharmacology*. 762:26-34.

Kosnett, M.J. Wedeen, R.P., Rothenberg, S.J., Hipkins, K.L., Materna, B.L., Schwartz, B.S., Hu, H., Woolf, A., 2007. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environmental Health Perspective*. 115:463-471.

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.

Lai, C.C., Lin, H.H., Chen, C.W., Chen, S.H., Chiu, T.H., 2002. Excitatory action of lead on rat sympathetic preganglionic neurons in vitro and in vivo. *Life Sciences*. 71:1035-1045.

Lanphear, B.P., Dietrich, K., Auinger, P., Cox, C., 2000. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Reports*. 115(6):521-529.

Lavoie, J.L., Sigmund, C.D., 2003. Minireview: overview of the renin-angiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 144:2179-83.

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

Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H., 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of applied physiology*. 91(3):1421-1430.

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

Marques, M. Millás, I., Jiménez, A., García-Colis, E., Rodriguez-Feo, J.A., Velasco, S., Barrientos, A., Casado, S., López-Farré, A., 2001. Alteration of the Soluble

Guanylate Cyclase System in the Vascular Wall of Lead-Induced Hypertension in Rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 12:2594-2600.

Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kizima, K., Maruyama, K., Horiuchi, M., Dzau, V. J., Takahashi, H., Iwasaka, T., Inada, M., Matsubara, H., 1998. Cardiac-specific Overexpression of angiotensin II AT receptor causes attenuated response to AT12 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *Journal of Clinical Investigation*. 101:527-535.

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.

Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., Vane, J.R., 1977. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*. 11:323-344.

Moncada, M., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43:109-142.

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.

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

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

Mortada, W.I., Sobh, M.A., El-Defrawy, M.M., Farahat, S.E, 2001. Study of lead exposure from automobile exhaust as a risk for nephrotoxicity among traffic policemen. *American Journal of Nephrology*. 21(4):274–279.

Navas-Acien, A., Guallar, E., Silbergeld, E.K., Rothenberg, S.J., 2007. Lead Exposure and Cardiovascular Disease - A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*. 115:472-482.

Neder, A.V.F., Cotta, T.A.R.G., 1999. Redução dos riscos de exposição ambiental e ocupacional ao chumbo. Projeto *MMA/OPAS*. Relatório da 1ª etapa. Brasília.

Nunes, K.Z., Nunes, D.O., Silveira, E.A., Pereira, C.A.C., Broseghini Filho, G.B., Vassallo, D.V., Fioresi, M., 2015. Chronic Lead Exposure Decreases the Vascular Reactivity of Rat Aortas: The Role of Hydrogen Peroxide. *PLoS ONE*. 10(3):e0120965.

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

Parkington, H.C., Tonta, M.A., Coleman, H.A., Tare, M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *Journal of Physiology*. 484(2):469-80.

Parmeggiani, L., 1983. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*, 3ª ed. Geneva: International Labour Office. 2:1200-1209.

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

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.

Pries, A. R., 2015. Physiological basis of the microcirculation: vascular adaptation. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 232(2):127-32.

Quitério, L.S., Silva, C.R.S., Arbilla, G., Moreira, M.F.R., Araújo, U.C., Mattos, R.C. O.C., Santos, L.S.C., 2003. Controle das emissões de chumbo particulado no entorno de uma reformadora de baterias da cidade do rio de Janeiro usando ar como indicador. *Caderno de Saúde Pública*. 19(2):475-480.

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

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/NADPH oxidase activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 97:1916-1923.

Ramos, K.S., 1992. Vascular toxicology: a cellular and molecular perspective. In: *Cardiovascular Toxicology*. 2:483- 516, Acosta, D., Jr. (ed.) Raven Press, New York.

Roncal, C., Mu, H., Reunqjui, S., Kim, K.M., Henderson, G.N., Ouyang, X., Nakagawa, T., Johnson, R.J., 2007. Lead, at low levels, accelerates arteriolopathy and tubulointerstitial injury in chronic kidney disease. *American Journal Physiology. Renal Physiology*. 293:1391-1396.

Ross, R., 1995. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 748:1-4.

Santos, A.S.S., Fagundes-Moura, C.R., Silva, A.C.S., 2000. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina angiotensina. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 3:227-36.

Sarkis, A., Lopez, B., Roman, R.J., 2004. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 13:205-214.

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

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

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):492499.

Silveira, E.A., Siman, F.D., de Oliveira Faria, T., Vescovi, M.V., Furieri, L.B., et al., 2014. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radical Biology Medicine*. 67:366-376.

Singh, R.P., Dabas, S., Choudhary, A., Maheshwari, R., 1997. Effect of lead on nitrate reductase activity and alleviation of lead toxicity by inorganic salts and 6-benzylaminopurine. *Plant Biology*. 40:339-404.

Simões, M.R., Ribeiro Júnior, R.F., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Padilha, A.S., Stefanon, I., Vassallo, D.V., Salaices, M., Fioresi, M., 2011. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the Renin-Angiotensin system. *PLoS One*. 6(4):e18730.

Simões, M.R., Aguado, A., Fiorim J., Silveira, E.A., Azevedo, B.F., Toscano C.M., Zhenyukh, O., Briones, A.M., Alonso, M.J., Vassallo, D.V., Salaices, M., 2015. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 283(2):127-138.

Souza, A.M., Tavares, C.F.F., 2009. Chumbo e anemia. *Medicina*. 42(3):327-30.

Stragier, B., Sarre, S., Vanderheyden, P., Vauquelin, G., Fournié-Zaluski, M.C., Ebinger, G., Michotte, Y., 2004. Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Journal of Neurochemistry*. 90:1251-1257.

Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A., Smith, R.D., 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 45:205–251.

Toxics Link Executive Summary, 2009. Global Study to Determine Lead in Paints in 10 Countries.

Triggle, C.R., Hollenberg, M., Anderson, T.J., Ding, H., Jiang, Y., Ceroni, .L, Wiehler, W.B., Ella, S.M.N., Ellis, A., Andrews, K., McGuire, J.J., Pannirselvam, M., 2003. The

endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 39(6): 249-267.

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

Tsao, D.A., Yu, H.S., Cheng, J.T., Ho, C.K., Chang, H.R., 2000. The change of β -adrenergic system in lead-induced HTN. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 164:127-133.

Tucci, P.J.F., Spadaro, J., Cicogna, A.C., Bregagnollo, E.A., 1980. Coronary perfusion pressure as a determinant of ventricular performance. *Experientia*. 36:974-975.

[UNEP] United Nations Environment Program, 1999. Phasing lead out of gasoline: an examination of policy approaches in different countries. Disponível em <http://www.unepie.org/energy/activities/Transport-gas/Lead.htm>. Acesso em 18 de julho de 2015.

Valencia, I., Castillo, E.F., Chamorro, G., Bobadilla, R.A., Castillo, C., 2001. Lead induces endothelium - and Ca^{2+} -independent contraction in rat aortic rings. *Pharmacology & Toxicology*. 89:177-182.

Vander, A.J., 1988. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environmental Health Perspectives*. 78:77-83.

Vane, J.R., Anggsrd, E.E., Botting, R.M., 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine*. 323:27-36.

Vanhoutte, P.M., Félétou, M., Taddei, S., 2005. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 144:449-58.

Varagic, J., Trask, A.J., Jessup Chappell, M.C., Ferrario, C.M., 2008. New angiotensins. *Journal of Molecular Medicine*. 86:663-671.

Vassallo, D.V., Mill, J.G., 1988. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana*. 38:87-97.

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

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

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., 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., 2008. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology / Heart and Circulatory Physiology*. 295:454-465.

Victory, W., 1988. Evidence for Effects of Chronic Lead Exposure on Blood Pressure in Experimental Animals: An Overview. *Environmental Health Perspectives*. 78:71-76.

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

Weseler, A.R., Bast, A., 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacology treatment. *Current Hypertension Reports*. 12:154-161.

World Health Organization (WHO), 1995. IPCS. *Environmental Health criteria-165 Inorganic Lead*. Geneva. 300p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.

WHO. 2013. Cardiovascular diseases (CVDs). World health organization. Disponível em: www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em 12 de julho de 2015.

Wright, D.H., Abran, D., Bhattacharya, M., Hou, X., Bernier, S.G., Bouayad, A., Fouron, J.C., Vázquez-Tello, A., Beauchamp, M.H., Clyman, R.I., Peri, K., Varma D.R., Chemtob, S., 2001. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *American Journal of Physiology*. 281:R1343-R1360.