

# **Efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos**

**Mirian Fioresi**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Agosto de 2008**

# **Efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos**

**Mirian Fioresi**

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

Aprovada em 15/08/2008 por:

---

Prof Dr Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

---

Profª Drª Ivanita Stefanon, UFES

---

Prof Dr Diogo Onofre Gomes de Souza, UFRGS

---

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos  
Schenberg

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
Vitória, Agosto de 2008

---

**Fioresi, Mirian, 1984**

**Avaliação dos efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos. [Vitória] 2008**

XVII, 94p., 29,7 cm (UFES, M. Sc, Ciências Fisiológicas, 2008)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Chumbo 2. Hemodinâmica 3. Músculo isolado 4. Ratos

---

Ao Marcelo, meu eterno amor.

À Zilma e ao Jeremia, que me deram a vida.

“Não podemos fazer grandes coisas nesta Terra. Tudo o que podemos fazer são pequenas coisas com muito amor”.  
Madre Teresa

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sua companhia fiel e por providenciar todas minhas necessidades, mesmo aquelas desconhecidas por mim.

Ao Dalton, um grande Mestre da Ciência e da Vida. “Chefe”, obrigada pela oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa e por compartilhar comigo seu extenso conhecimento.

À minha grande amiga Lorena por sua dedicação e por sua paciência. Amiga, esta dissertação é a fusão do nosso trabalho físico e intelectual, em mesma magnitude!

À Ivanita pela amizade e disponibilidade em todos os momentos que procurei sua ajuda.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do LEMC: Alessandra, Altemar, Aurélia, Edna, Eduardo, Fabiana, Fernanda, Franck, Gabriel, Guilherme, Giulia, Jhuli Keli, Juliana, Karina, Larissa, Lélia, Lili, Lorena, Luciana, Nelson, Netto, Núbia, Priscila, Rogério e Taís.

À Aurélia e ao Rogério pelos conselhos, gargalhadas e principalmente, pelos dados da atividade da NKA.

Ao Eduardo e à Cleci pela ajuda com a análise bioquímica da atividade da ATPase miosínica.

À Marcela e Nathalia (e também à Lora) por serem além de minhas amigas minha família em Vitória.

Ao Papai Jerê e à Mamãe Zilma que são exemplo de força, luta e superação. Obrigada por abdicarem de muitas coisas em função de minhas necessidades.

Aos meus familiares: Madrinha Tânea, João Alaor, Maria Gabriela, André, Maru, Rogério, Emanuely, Romário, Simone e Isabela que nos momentos mais difíceis da vida sempre estiveram por perto, me acolheram e me ampararam...Não há nada como nosso lar!

Ao grande amor da minha vida, Marcelo, que suporta minha ausência e se alegra com minhas conquistas com um indescritível amor gratuito e espontâneo.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                              | 17 |
| 1.1 CHUMBO.....  | 17 |
| 1.1.1 Propriedades físicas e químicas.....             | 17 |
| 1.1.2 Ciclo e ocorrência na natureza.....              | 17 |
| 1.1.3 Produção e consumo mundial.....                  | 18 |
| 1.1.4 Uso industrial e exposição ocupacional.....      | 19 |
| 1.1.5 Cinética no organismo humano.....                | 22 |
| 1.1.6 Efeitos nos diferentes sistemas.....             | 23 |
| 1.1.7 Efeitos do chumbo no sistema cardiovascular..... | 28 |
| 1.2 CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....                     | 37 |
| 1.2.1 Proteínas Contráteis.....                        | 37 |
| 1.2.2 Acoplamento Excitação-Contração.....             | 39 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....                               | 43 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                                | 43 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                         | 43 |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                     | 44 |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....                         | 44 |
| 3.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....                         | 45 |
| 3.3 MÚSCULO ISOLADO.....                               | 48 |
| 3.4.1 Protocolos experimentais.....                    | 49 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4.1.1 Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ sobre a força de contração isométrica de músculos papilares de VE..... | 49        |
| 3.4.1.2 Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ na cinética contrátil dos músculos papilares de VE.....                | 49        |
| 3.4.1.3 Efeitos do $Pb^{++}$ na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos.....                     | 49        |
| 3.4.1.4 Efeitos do $Pb^{++}$ nas contrações após repouso de 10 minutos.....                                       | 50        |
| 3.4.1.5 Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ nas contrações tetânicas .....   | 50        |
| 3.4.1.6 Avaliação da influencia do $Pb^{++}$ na resposta $\beta$ -adrenérgica.....                                | 51        |
| 3.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....  | 52        |
| <b>3.5.1 Efeitos do <math>Pb^{++}</math> sobre a atividade da ATPase miosínica.....</b>                           | <b>52</b> |
| <b>3.5.2. Efeitos do <math>Pb^{++}</math> sobre a atividade da <math>Na^+ - K^+</math> ATPase.....</b>            | <b>53</b> |
| <b>4 FÁRMACOS E REAGENTES.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>6 SUPORTE FINANCEIRO.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>7 RESULTADOS.....</b>  | <b>59</b> |
| 7.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....  | 59        |
| 7.3 MÚSCULO ISOLADO.....  | 62        |
| <b>7.3.1 Atividade contrátil do VE.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>7.3.2 Potenciações pós-pausas.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>7.3.3 Contrações após repouso de 10 minutos.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>7.3.4 Contrações tetânicas .....</b>   | <b>66</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>7.3.5 Resposta inotrópica à estimulação <math>\beta</math>-adrenérgica.....</b>     | <b>67</b> |
| 7.4 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....   | 68        |
| <b>7.4.1 Medida da atividade ATPásica da miosina.....</b>                              | <b>68</b> |
| <b>7.4.2 Atividade da <math>\text{Na}^+</math>-<math>\text{K}^+</math> ATPase.....</b> | <b>68</b> |
| <b>8 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>69</b> |
| 8.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....   | 70        |
| 8.2 MÚSCULO ISOLADO.....   | 73        |
| 8.3 MEDIDAS BIOQUÍMICAS.....   | 78        |
| <b>9 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>10 REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>83</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Concentrações sanguíneas de chumbo e seus respectivos efeitos em adultos e crianças.....   | 27 |
| Figura 2: Mecanismos potenciais pelos quais o estresse oxidativo participa da hipertensão e das alterações cardiovasculares induzidas pelo Pb.....   | 35 |
| Figura 3: Transporte de cálcio nos miócitos ventriculares.....   | 40 |
| Figura 4: Ativação do receptor adrenérgico e fosforilação dos alvos relevantes para o acoplamento excitação-contração.....   | 42 |
| Figura 5: Registro típico das medidas hemodinâmicas de um rato controle.....   | 47 |
| Figura 6: Registro típico da contração isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de VE de ratos.....  | 49 |
| Figura 7: Registro típico do efeito do $Pb^{++}$ sobre a potenciação relativa (PR) da potenciação pós-pausa (PPP) obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s em músculos papilares de VE de ratos..... | 50 |
| Figura 8: Registro típico de uma contração tetânica evidenciando o pico e o platô de força tetânica.....   | 51 |
| Figura 9: Parâmetros hemodinâmicos do VE de ratos expostos agudamente ao $Pb^{++}$ .....   | 60 |
| Figura 10: Parâmetros hemodinâmicos de VD de ratos expostos agudamente ao $Pb^{++}$ .....  | 61 |
| Figura 11: Efeito induzido pelo $Pb^{++}$ na FC de ratos expostos agudamente ao chumbo.....  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 12: Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ ( $8\mu M$ ) na força de contração isométrica de músculos papilares expostos agudamente a este metal..... | 62 |
| Figura 13: Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ ( $8\mu M$ ) nos tempo de ativação e relaxamento e nas $dF/dt + e -$ de músculos papilares de VE.....     | 63 |
| Figura 14: Efeitos do $Pb^{++}$ na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos.....  | 64 |
| Figura 15: Avaliação indireta dos efeitos do $Pb^{++}$ no influxo de $Ca^{++}$ transsarcolemal mensurada pela “post rest contraction”.....              | 65 |
| Figura 16: Efeitos do $Pb^{++}$ nas contrações tetânicas.....   | 66 |
| Figura 17: Efeito do $Pb^{++}$ na intervenção inotrópica promovida pelo isoproterenol em músculos papilares de VE de ratos.....                         | 67 |
| Figura 18: Efeito do $Pb^{++}$ na atividade da enzima ATPase miosínica de VE ratos.....   | 68 |
| Figura 19: Efeito do $Pb^{++}$ na atividade da NKA de VE de ratos.....  | 68 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%= porcentagem

[Ca<sup>++</sup>] = concentração de cálcio extracelular

°C= graus Celsius

ATP: 5'-trifosfato de adenosina

Ca<sup>++</sup>= íon cálcio

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CAT= catalase

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Ct: controle

dF/dt: derivada de força / derivada de tempo

dP/dt: derivada de pressão / derivada de tempo

ECA= enzima conversora de angiotensina

eNOS= sintetase endotelial do NO

EPM: erro padrão da média

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

FC: frequência cardíaca

FUNCITEC: Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia

GMPc= monofosfato cíclico de guanosina

GPX= glutathione peroxidase

*i. p.*: intra peritoneal

iNOS= sintetase induzível do NO

L<sub>max</sub>: comprimento no qual a tensão é máxima

M = molar

máx: máxima

mín: mínima

min: minuto

$Na_i$ = concentração de sódio intracelular

NKA: bomba de sódio e potássio

NO: óxido nítrico

$Pb^{++}$ : chumbo

PD: pressão diastólica

ppm: partículas por milhão

PPP: potenciação pós-pausa

PRC: contrações após repouso de 10 minutos

PSV: pressão sistólica intraventricular

PSVD: pressão sistólica do ventrículo direito

PSVE: pressão sistólica do ventrículo esquerdo

ROS: espécies reativas de oxigênio

RS: retículo sarcoplasmático

sGC= guanilato ciclase solúvel

SOD= superóxido dismutase

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UI: unidades

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

## RESUMO

Vários estudos em modelos animais e humanos populacionais têm demonstrado uma relação causal entre concentração sanguínea de  $Pb^{++}$  e aumento da pressão sanguínea, entretanto são escassos os estudos que avaliam o comprometimento cardíaco da exposição a este metal.

Considerando a carência de estudos dos efeitos do chumbo na contratilidade miocárdica o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos, nos parâmetros cardiovasculares de ratos, da exposição aguda ao referido metal.

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar (280 e 350 g) e avaliadas as medidas hemodinâmicas (desempenho ventricular *in vivo*), a contratilidade miocárdica e os parâmetros bioquímicos.

Os animais foram anestesiados e submetidos à cirurgia de cateterização dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) para mensuração dos seguintes parâmetros hemodinâmicos, antes e durante 120 minutos de exposição ao acetato de chumbo (80  $\mu\text{g/dL}$ ): pressão sistólica intraventricular (PS), derivada de pressão intraventricular (dP/dt) positiva (+) e negativa (-) e frequência cardíaca (FC).

A contratilidade miocárdica foi avaliada através de músculos papilares de VE. Para tal foram analisados: o inotropismo cardíaco, os parâmetros temporais, a atividade do retículo sarcoplasmático (RS), a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio e a responsividade das proteínas contráteis. Todas as medidas foram avaliadas antes e após a exposição aguda ao acetato de chumbo (8  $\mu\text{M}$ ).

Ainda, foram medidas as atividades específicas da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (NKA) e  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica cardíacas em amostras expostas ou não-expostas a 8  $\mu\text{M}$  de  $Pb^{++}$ .

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por: ANOVA 1 via ou teste *t*-Student.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A exposição por 2 horas ao  $Pb^{++}$  provocou aumento significativo nos parâmetros avaliados nos VE e VD (PSVE, dP/dt + VE, dP/dt - VE, PSVD, dP/dt + VD e dP/dt - VD). Todavia, não houve alteração significativa na FC destes animais.

A avaliação dos parâmetros contráteis, *in vitro*, demonstrou efeito inotrópico positivo provocado pela exposição aguda ao  $Pb^{++}$ . Em relação aos parâmetros temporais da

contração houve redução do tempo de ativação, entretanto o tempo de relaxamento manteve-se inalterado, assim como a atividade do RS. Os músculos papilares, após 1 hora de exposição ao chumbo, mostraram-se hiperreativos ao uso de um agonista  $\beta$ -adrenérgico. Ainda, os achados com papilares são sugestivos de redução do influxo de cálcio transsarcolemal.

As medidas bioquímicas evidenciaram que as amostras tratadas com  $Pb^{++}$  apresentaram aumento da atividade ATPásica da NKA e da miosina em relação às amostras que não receberam o acetato de  $Pb^{++}$   $8\mu M$ .

A redução do influxo de cálcio transsarcolemal poderia prejudicar a gênese da força nos miócitos cardíacos e, conseqüentemente, reduzir o inotropismo. No entanto, contrariando este fato, houve aumento do inotropismo cardíaco, tanto no músculo isolado, como na avaliação do animal *in vivo*. Deste modo, se agudamente o chumbo promoveu algum efeito deletério, capaz de reduzir a força de contração do músculo cardíaco, este efeito foi contrabalanceado e superado por ativação de outros mecanismos compensatórios: aumento da atividade da ATPase miosínica; alterações neuroendócrinas (aumento da atividade simpática), ou alterações de mecanismos transduccionais (a mimetização do íon  $Ca^{++}$  pelo  $Pb^{++}$  na ativação do processo contrátil).

Em conclusão, nosso trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o aumento da pressão ventricular induzida pelo chumbo possui, além do envolvimento vascular, alterações diretas na contratilidade miocárdica.

## ABSTRACT

Several studies in human population and animal models demonstrated a correlation between the  $Pb^{++}$  blood concentration and arterial pressure. However, studies that evaluate cardiac effects resulting from the exposure to this metal are still scarce.

Considering the lack of studies about lead effects on the cardiac contractility the objective of this work was to study the cardiovascular effects of the acute exposure of this metal in rats.

Wistar rats (280 to 350 g) were used to perform hemodynamic studies (ventricular performance *in vivo*), cardiac contractility and biochemical parameters.

Rats were anesthetized and the left (LV) and right ventricle (RV) catheterized to measure the following parameters during 120 minutes exposure to lead acetate (80  $\mu\text{g/dL}$ ): LV systolic pressure (SP), positive (+) and negative (-) time derivative of ventricular pressure (dP/dt) and heart rate (HR).

Cardiac contractility was evaluated with LV papillary muscles. For that we measured: cardiac inotropic responses, temporal parameters, the sarcoplasmic reticulum activity and the sarcolemmal permeability to calcium and the role of contractile proteins. All measures were undertaken before and after the acute exposure to 8  $\mu\text{M}$  lead acetate.

The specific activities of the cardiac  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (NKA) and myosin  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase were also measured in samples exposed or not to 8  $\mu\text{M}$   $Pb^{++}$ .

Results are presented as mean  $\pm$  SEM and analyzed by: one-way ANOVA or Student *t*-test.  $p < 0,05$  was considered significant.

The exposure to  $Pb^{++}$  for 2 hours produced a significant increase of the measured parameters in LV and RV (LV and RV: SP, dP/dt +, dP/dt-). However, no significant change of HR was observed.

The study of contractile parameters *in vitro* showed in positive inotropic effect after the acute lead exposure. Regarding the time parameters of the isometric contraction of papillary muscles there was a reduction of time to peak tension but the relaxation time did not change as well as the sarcoplasmic reticulum activity. After 1 hour of lead exposure the papillary muscles became hyperreactive to a  $\beta$ -adrenergic agonist.



Also, the results of post-rest contractions were suggestive of a reduction of sarcolemmal calcium influx.

Biochemical analyses showed that myocardial samples treated with  $8\mu\text{M Pb}^{++}$  showed an increase of the NKA ATPase and myosin ATPase activities compared to the untreated samples.

The reduction of the calcium influx could reduce the force production in cardiac myocytes and, consequently, reduce inotropism. However, against this fact, there was an increase of cardiac inotropism both in isolated muscles as in *in vivo*. Then, if the acute exposure to lead produces some deleterious effect, capable to reduce myocardial force development, this effect was counteracted and exceeded by the activation of other compensatory mechanisms: increase of myosin ATPase activity; neuroendocrine changes (increase of sympathetic tone), or changes in the transductional mechanisms (mimic of  $\text{Ca}^{++}$  by  $\text{Pb}^{++}$  in the contractile activation).

In conclusion, our work showed, by the first time, that the increase of ventricular pressure induced by lead have, beyond the vascular involvement, direct changes in the myocardial contractility.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CHUMBO

#### 1.1.1 Propriedades físicas e químicas

O chumbo é um metal cinza-azulado, brilhante, inodoro, maleável, insolúvel nos solventes orgânicos e muito resistente à corrosão. É encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com diversos outros metais (Paoliello, 2001). O íon estável do chumbo é o  $Pb^{++}$  e combinado com o enxofre forma a galena ( $PbS = 86,6\%$  de Pb e  $13,4\%$  de S) que é um dos mais abundantes minérios e do qual é extraído quase todo o chumbo primário (DNPM, 2001).

Na apresentação  $Pb^{4+}$  o chumbo forma, entre outros, os compostos orgânicos tetrametilchumbo  $Pb(CH_3)_4$  e tetraetilchumbo  $Pb(C_2H_5)_4$ , os mais importantes do ponto de vista comercial, visto que já foram amplamente empregados como aditivos em combustíveis (Conterato, 2007).

Além destes compostos a interação do chumbo com outros elementos dá origem a compostos, amplamente utilizados na indústria, tais como sulfeto de chumbo, monóxido de chumbo, dióxido de chumbo, brometo de chumbo, acetato de chumbo e carbonato de chumbo (Paoliello 2001; Conterato, 2007).

#### 1.1.2 Ciclo e ocorrência na natureza

O chumbo é relativamente abundante na crosta terrestre com concentração média entre 10 e 20 mg / kg. As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas. Estima-se que as taxas de emissão natural do chumbo são da ordem de 19.000 toneladas por ano. Entretanto, os processos antropogênicos são os principais responsáveis pela liberação de chumbo no ambiente (WHO, 1995).

Na atmosfera o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas, quando lançadas no ar, podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Após a deposição do chumbo na água, proveniente do ar ou da lixiviação do solo, o metal se distribui rapidamente entre o sedimento e a fase aquosa, dependendo do pH da água e dos sais nela dissolvidos (Paoliello, 2001).

O teor de chumbo no solo é muito influenciado pelas atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias fontes. Tanto a deposição seca quanto a úmida são importantes fontes de contaminação (WHO, 2003).

### **1.1.3 Produção e consumo mundial**

De acordo com as estimativas do International Lead Zinc Study Group – ILZSG (2007), a produção mundial de minério de chumbo primário, em metal contido, atingiu no ano de 2007 um total de 3,68 milhões de toneladas, sendo o continente asiático o maior produtor, superando o continente americano. A produção mundial de chumbo metálico primário, proveniente da mina, e o secundário, obtido a partir da recuperação do metal de sucatas, alcançou 8,1 milhões de toneladas no ano de 2007, sendo a Ásia e América os maiores produtores (ILZSG, 2007).

Em 2006, as reservas aprovadas (medidas e indicadas) do Brasil alcançaram, em termo de metal contido, 1,4 milhões de toneladas, valor correspondente a 27,3% da reserva global. Estas reservas estão distribuídas nos estados de São Paulo (SP), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Tocantins (TO), Bahia (BA) e Minas Gerais (MG) (DNPM, 2007).

A produção brasileira primária (*Mine Production*), em 2006, foi de 16.000 toneladas, correspondente a 0,5% da mundial. Esta produção de chumbo primário provem da Mina de Morro Agudo, no município de Paracatu, Minas Gerais, e é totalmente exportada (DNPM, 2007).

O chumbo secundário é obtido a partir da recuperação do metal de sucatas e rejeitos. A produção mundial de chumbo secundário, em 2006, somou 4,5 milhões de toneladas, enquanto que a nacional atingiu 142.653 toneladas (3,2% da global). No Brasil, o chumbo secundário é obtido, principalmente, da reciclagem de baterias automotivas, industriais e das telecomunicações, em usinas refinadoras nos estados de Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (DNPM, 2007).

Aproximadamente metade das 300 milhões de toneladas de chumbo produzidas através da história persiste na forma de contaminação e, com a ação antropogênica, a circulação do chumbo na biosfera é estimada em aproximadamente 1,2 milhões de toneladas (Bellinger & Schwartz, 1997).

#### **1.1.4 Uso industrial e exposição ocupacional**

Após a extração, o minério é britado e moído, o qual pode conter de 3 a 8 % de chumbo, e concentrado por flotação diferencial. O processamento do chumbo inclui as operações de sinterização, fundição (redução) e refinamento. Nas operações de fundição de chumbo os trabalhadores são expostos a diversos agentes tóxicos, como dióxido de enxofre, monóxido de carbono e poeira de chumbo (Burgues, 1995).

O chumbo é um metal essencial na fabricação de produtos utilizados pelo homem. Na forma de ligas e compostos é empregado na fabricação de produtos de alta tecnologia como proteção de reatores nucleares, finas placas de componentes eletrônicos, bem como de baterias, tintas e corantes, cerâmicas, cabos e munição (Kreusch, 2005).

Além de ser usado como matéria-prima, o chumbo é muito importante nos processos de soldagem. Na forma de ligas, composta geralmente por dois ou três metais, serve como elemento de adesão de superfícies. Na indústria eletrônica, além de promover a adesão de componentes à superfície de placas, têm a importante função de propiciar a ligação elétrica entre os componentes e os circuitos eletroeletrônicos. Através desta dupla função, as soldas feitas com ligas contendo chumbo apresentam um papel essencial na exploração espacial, na conservação de energia e nas telecomunicações. Portanto, os materiais à base de chumbo facilitam o desenvolvimento de computadores rápidos e televisores de alta definição, beneficiando também a tecnologia para confecção de tubos de raios catódicos usados em telas de televisores, computadores e radares (Kreusch, 2005).

O chumbo metálico é usado na forma de lâmina ou canos, nos quais a flexibilidade e resistência à corrosão são características requeridas, em indústrias químicas e da construção. É usado também para revestimentos de cabos, como um ingrediente na solda e em material de revestimento na indústria automotiva. É um valioso material protetor contra radiações ionizantes. É utilizado como metalizante para coberturas protetoras, na manufatura de baterias e, como um banho de tratamento quente, em revestimento de cabos (Kreusch, 2005). O chumbo está presente numa variedade de ligas e seus compostos são preparados e usados em grande escala em muitas

indústrias. Cerca de 40% do chumbo é usado como um metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1995, Parmeggiani, 1983).

Os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos. Muitos países têm restringido seu uso, mas no Brasil não existe uma lei específica que estabeleça limites para o uso do chumbo em pigmentos (Neder *et. al*, 1999).

No Brasil o uso do chumbo tetraetilico na gasolina foi proibido desde 1978 e no seu lugar utiliza-se o etanol. No entanto, existem outros países que ainda utilizam esse aditivo na gasolina, o qual é encontrado em quantidade considerável na biosfera (Paoliello, 2001).

Os óxidos de chumbo são usados nas placas de baterias elétricas e acumuladores. Acredita-se que a manufatura da bateria utilize cerca de 70% do consumo mundial de chumbo (ATSDR, 1995).

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

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

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

As fundições primárias e secundárias de chumbo e as fábricas e reformadoras de baterias são as fontes mais significativas de emissões industriais deste metal, provocando o aumento das concentrações no solo e na poeira em áreas vizinhas (WHO, 1995).

Há um grupo de usuários dessas baterias ácidas de chumbo no Brasil, da qual não se pode realizar qualquer estimativa, por falta de informações. Esses usuários são os navios, motocicletas, centrais telefônicas, hospitais, edifícios e outros que utilizam baterias como acumuladores de energia para serem empregadas na substituição da energia elétrica convencional (Machado, 2002).

Na indústria de acumuladores, as baterias de automóveis consumiram 199.336 toneladas, representando 89,7% e a indústria usou 13.200 toneladas (5,94%), perfazendo um total de 212.536 toneladas que representa 95,7% do consumo brasileiro de chumbo em 2006. Em seguida, vêm os óxidos utilizados na indústria química, eletrônica, vidro, cerâmica, pigmentos e indústria siderúrgica, que em conjunto, consumiram em 2006 em torno de 10.000 toneladas (DNPM, 2007).

A exposição da população, em geral, ao chumbo reduziu drasticamente após sua remoção da gasolina e redução nas tintas e soldas (Pirkle *et al*, 1998). Entretanto, em vários países, ainda há locais que são fontes permanentes de exposição a este metal. No estado da Bahia, Brasil, de 1960 a 1993 funcionou, no município de Santo Amaro da Purificação, uma fábrica de pelotização de chumbo, a Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac). Esta empresa poluiu intensamente a cidade. Os trabalhadores da fundição, seus filhos e os moradores de regiões próximas à usina foram particularmente afetados. Em 1980, o nível médio de chumbo no sangue de 555 crianças de 1 a 9 anos de idade, residentes a menos de 900 m da fundição, foi de  $59,1 \pm 25,0$  µg/dL (Carvalho *et al*, 1985); em 1985, após a adoção de medidas de controle, o nível médio observado em uma amostra de 53 crianças foi de  $36,9 \pm 22,9$  µg/dL (Silvany-Neto *et al*, 1989). Estes valores são considerados uma intoxicação relevante para crianças.

Apesar da desativação da Companhia Brasileira de Chumbo (Cobrac) em 1993, a população ainda corre riscos de contaminação por causa dos subprodutos de chumbo que foram descartados no terreno ao largo da fábrica, visto que o solo altamente contaminado passou a ser a principal fonte de poluição ambiental de chumbo em Santo Amaro. Foram registrados, até abril de 2008, 296 casos de óbitos correlacionados com a exposição ao chumbo (Carvalho, 2008).

Nos países desenvolvidos a ocorrência de casos de intoxicações ocupacionais pelo chumbo (saturnismo) vem se tornando cada vez menos freqüente e grande

investimento tem sido feito na identificação de efeitos à saúde decorrentes da exposição a baixas concentrações nos ambientes de trabalho e no meio ambiente, muitas das quais consideradas seguras pelas legislações de segurança e medicina do trabalho. No Brasil não existem registros ou estimativas confiáveis do número de indivíduos expostos ocupacional e ambientalmente ao metal, embora a literatura especializada venha apontando grupos de trabalhadores intoxicados principalmente entre os envolvidos na produção, reforma e reciclagem de baterias automotivas (Brasil, 2006).

### **1.1.5 Cinética no organismo humano**

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

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

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

A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo. Nas células vermelhas, ligado a proteínas de baixo peso molecular, estão de 90% a 99,8% do metal sanguíneo (Goyer, 1991), e o restante encontra-se no plasma provavelmente ligado à albumina,  $\alpha_2$ -globulina ou como íons livres

disponíveis para o transporte aos tecidos. É possível que esta última fração tenha maior importância toxicológica, quando comparado ao chumbo nos eritrócitos, por estar mais biodisponível para atingir os sítios-alvo da ação toxicológica. Entretanto, as concentrações plasmáticas de chumbo raramente têm sido mensuradas devido às dificuldades analíticas e, por isso, sua relação com as manifestações tóxicas não está claramente definida (Bergdahl *et al.*, 1997; Tsaih *et al.*, 1999).

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

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

O chumbo é excretado por várias rotas, porém só a excreção renal e a gastrintestinal são de importância prática (Moreira & Moreira, 2004). Todo chumbo não absorvido pelo trato gastrintestinal é eliminado pelas fezes, inclusive aquele proveniente do ar que foi engolido e não absorvido. O metal não retirado do organismo é eliminado pelos rins ou excretado pela bile para o trato gastrintestinal. No entanto, o mecanismo de eliminação pela bile e urina ainda não está completamente elucidado (Moreira & Moreira, 2004)

A presença de chumbo na urina reflete exposição atual e a medida deste parâmetro tem sido aplicada em saúde ocupacional como teste de exposição (Skerfving, 1993).

#### **1.1.6 Efeitos nos diferentes sistemas**

O sistema nervoso, a medula óssea, os rins e o sistema cardiovascular são sítios críticos na exposição ao chumbo (Elinder, 1994). O conjunto de órgãos mais sensível à intoxicação por chumbo é o sistema nervoso, sendo que a encefalopatia é um dos mais sérios desvios tóxicos induzidos pelo chumbo em crianças e adultos.



(Moreira & Moreira, 2004). Os sintomas incluem apatia, irritabilidade, dificuldade de concentração, cefaléia, tremor muscular, perda de memórias, alucinações e redução na velocidade de transmissão do impulso nervoso, tontura, fraqueza e parestesia, em concentrações de chumbo no sangue na faixa de 40 a 120  $\mu\text{g} / \text{dL}$  (Paoliello, 2001; Moreira & Moreira, 2004).

A encefalopatia crônica pode ser um estado residual após a encefalopatia aguda originada por esse metal, mas também pode resultar de uma exposição prolongada ao chumbo (Stewart, 2002). As crianças são mais suscetíveis do que os adultos aos efeitos da encefalopatia sobre o sistema nervoso central. A exposição pode começar ainda no útero, caso a mãe tenha chumbo em seu organismo, e aumentar após o nascimento, através de inúmeras fontes (ATSDR, 1995).

A toxicidade do chumbo na infância pode ter efeitos permanentes, tais como menor quociente de inteligência e deficiência cognitiva. Durante o desenvolvimento de uma criança, o sistema nervoso pode ser afetado adversamente por valores sanguíneos menores do que 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , níveis antes considerados seguros (Moreira & Moreira, 2004).

A neuropatia periférica é um sinal comum de exposição crônica a elevados níveis de chumbo, e freqüentemente se manifesta com uma fraqueza nos membros superiores e inferiores. Cordeiro et. al. (1996) estudaram 20 trabalhadores expostos ao chumbo e concluíram que dentre os 20 trabalhadores expostos, e com a plumbemia abaixo do LTB (Limite de Tolerância Biológica) brasileiro, existiam 7 (35%), com velocidade de condução nervosa no nervo radial esquerdo, situada abaixo do limite da normalidade. Considerando que os efeitos tóxicos do chumbo, no âmbito das funções nervosas superiores, começam em níveis de exposição inferiores àqueles onde iniciam seus efeitos neurológicos periféricos, os trabalhadores estudados encontram-se predispostos a doenças.

Tanto exposições agudas quanto crônicas causam danos morfofuncionais renais (WHO, 1995). As características de uma nefropatia aguda induzida pelo chumbo abrangem alterações e disfunções dos túbulos proximais manifestadas por aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria, aumento da excreção renal de sódio e redução da excreção de ácido úrico. Esses efeitos parecem ser reversíveis (Paoliello, 2003).

Historicamente, a gota satúrnica têm sido relatada em humanos intoxicados com chumbo (Batuman, 1993).

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

Vários são os mecanismos que interrelacionam a exposição ao chumbo, seus efeitos renais e a hipertensão: aumento da densidade de receptores beta adrenérgicos (Tsao *et al.*, 2000) e em conseqüência uma maior atividade simpática e aumento da produção de renina; acréscimo da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que localmente causa produção de angiotensina II e aldosterona, culminando na redução da excreção urinária de água e sódio (Sharifi *et al.*, 2004).

Em casos de indivíduos expostos a altas concentrações de chumbo, a cólica abdominal é um sintoma precoce e é caracterizada por: dor abdominal, câibras, constipação, náuseas, vômitos e anorexia. Este quadro é observado em pumbemia entre 40 e 200 µg / dL (Paoliello, 2003).

A anemia observada na intoxicação pelo chumbo resulta de dois mecanismos principais: prejuízo na biossíntese do grupo heme, por interferência na transformação da protoporfirina em heme pela inibição da ferroquelatase, e aumento da destruição das hemácias. Os limiares do chumbo em sangue para um decréscimo dos níveis de hemoglobina em adultos e crianças estão estimados em, respectivamente, 50 e 40 µg / dL (Paoliello, 2003).

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

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

Os efeitos sobre o sistema nervoso ocorrem sempre que os níveis de chumbo no sangue (Pb-S) forem da mesma ordem de grandeza daqueles que alteram a síntese da hemoglobina. Por isso, os distúrbios na biossíntese do grupo heme servem como “indicador metabólico” para a detecção precoce de exposição perigosa ao chumbo antes do aparecimento de sintomas clínicos (Tsalev, 1985).

A *figura 1* correlaciona as concentrações sanguíneas de  $Pb^{++}$ , encontradas em adultos e crianças, e os seus respectivos efeitos nos diferentes sistemas do organismo.

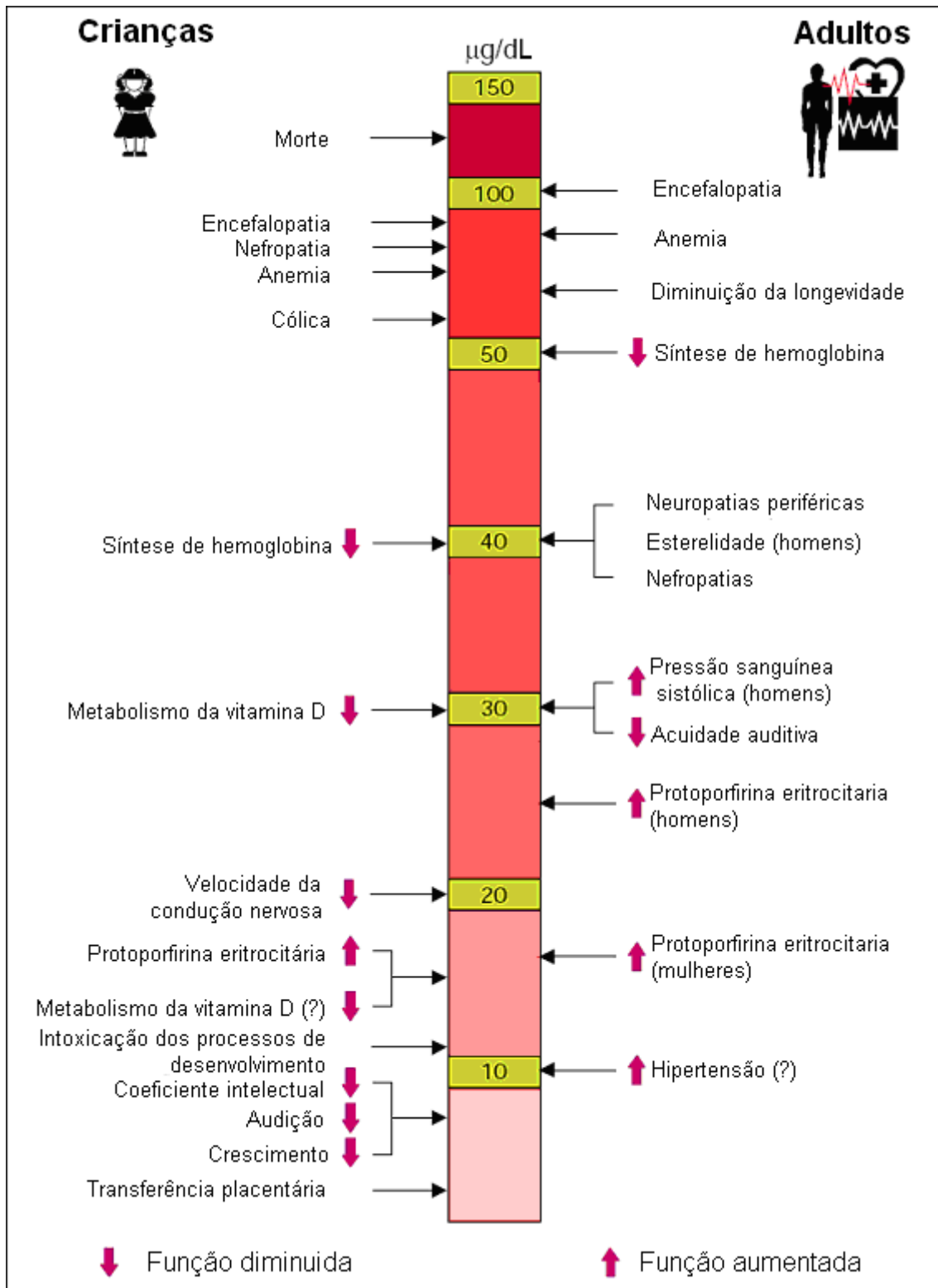


Figura 1: Concentrações sanguíneas de chumbo e seus respectivos efeitos em adultos e crianças.

Fonte: Modificado de ATSDR, 1992.

### 1.1.7 Efeitos do chumbo no sistema cardiovascular

As doenças cardiovasculares são, atualmente, a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo (Lopez *et al.*, 2006) e a exposição a agentes tóxicos, incluindo chumbo e outros metais, podem contribuir para o surgimento ou agravamento destes processos patológicos. Entretanto, após cem anos dos primeiros estudos que correlacionam a exposição ao Pb às alterações nos parâmetros cardiovasculares, a contribuição do Pb<sup>++</sup> ainda não está completamente elucidada (Navas-Acien, 2007).

Os estudos populacionais dos efeitos cardiovasculares do chumbo estão focados na associação entre a exposição ao Pb<sup>++</sup> e a hipertensão arterial (Navas-Acien, 2007) e as evidências são suficientes para inferir uma relação causal entre a exposição ao Pb<sup>++</sup> e altos valores pressóricos (NHAMES III). No entanto, ainda são necessários estudos para determinar: as concentrações sanguíneas envolvidas no aumento da pressão; as diferenças entre os efeitos das exposições agudas e crônicas; os mecanismos pelos quais o Pb<sup>++</sup> provoca estas alterações; se a magnitude da associação é diferente entre criança e adulto; e se há grupos populacionais vulneráveis.

De acordo com Vupputurri e colaboradores (2003) os negros possuem concentrações de chumbo no sangue maiores que os brancos, fato correlacionado com a divergência de exposição ocupacional entre as raças. Estes pesquisadores avaliaram 10 548 brancos e 4404 negros e sugeriram a existência de associação entre concentração sanguínea de Pb<sup>++</sup> e aumento de pressão sanguínea sistólica e diastólica em homens negros, mas não em homens brancos.

Vários estudos em modelos animais e humanos populacionais têm demonstrado uma relação causal entre concentração sanguínea de Pb<sup>++</sup> e aumento da pressão sanguínea. Entretanto, muitos fatores dificultam o isolamento do Pb<sup>++</sup> como um fator de risco para a hipertensão arterial. Entre estes fatores está a quantidade de antioxidantes da dieta, a exposição ambiental a outras toxinas (como o hábito de fumar) e as dietas ricas em sal, açúcar, gordura e álcool (Patrick, 2006). Um estudo desenvolvido por Peters e colaboradores (2007) exemplifica esta dificuldade. Eles avaliaram 2280 homens da grande Boston e concluíram que o efeito do chumbo na hipertensão é mais pronunciado em indivíduos altamente estressados,

demonstrando que o chumbo, acrescido de outros fatores, pode ser um agravante de alterações cardiovasculares.

Outra dificuldade encontrada no estabelecimento desta regressão, exposição ao chumbo *versus* hipertensão, consiste na mensuração da concentração sanguínea deste metal como biomarcador da exposição. Muitos estudos populacionais utilizam esta técnica devido a maior viabilidade e menor custo deste procedimento. Entretanto, a concentração sanguínea de chumbo não é um biomarcador ótimo e talvez subestime a concentração interna deste metal, desta forma, somente deve ser confiável como um bom indicador de exposição recente (Vupputuri *et al*, 2003; Moreira & Moreira, 2004).

A associação entre a exposição por longos períodos a baixas concentrações de  $Pb^{++}$  e o desenvolvimento da hipertensão arterial torna-se mais consistente quando a medida da concentração do chumbo é realizada no tecido ósseo em relação às medidas sanguíneas. Isto acontece devido às diferenças na meia-vida do chumbo nestes dois compartimentos, visto que no sangue é de, aproximadamente, 30 dias, enquanto no osso pode chegar aos 98 anos. Deste modo, a concentração de chumbo no osso consiste em uma valiosa ferramenta para mensurar a concentração interna de chumbo, pois, representa a exposição cumulativa (Vupputuri *et al*, 2003; Moreira & Moreira, 2004; Vaziri & Khan, 2007).

As pesquisas desenvolvidas com animais experimentais procuram eliminar os fatores que dificultam o isolamento do chumbo como um mecanismo hipertensor. Vaziri e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento crônico, por 12 semanas com 100 ppm de acetato de chumbo na água de beber, foi capaz de induzir um aumento da pressão arterial sistólica no grupo de ratos que recebeu o metal. Em outro trabalho, este grupo de pesquisadores encontrou aumento de pressão arterial sistólica a partir da segunda semana de tratamento com 100 ppm de acetato de chumbo. A pressão incrementou, progressivamente, até a oitava semana, na qual atingiu valor aproximado de 180 mmHg (Sharifi *et al*, 2004).

Os trabalhos de Carmignani e colaboradores (1999 e 2000) demonstraram aumento da pressão arterial sistólica ( $120,5 \pm 4$ , no grupo controle;  $146 \pm 6$  mmHg, no grupo tratado) e diastólica ( $97,5 \pm 3$ , no grupo controle;  $117 \pm 4$ , no grupo tratado) de ratos tratados por 10 meses com 60 ppm de acetato de chumbo na água de beber.

Corroborando com estes achados, Roncal e colaboradores (2007) demonstram que ratos submetidos ao tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo na água de beber, por 16 semanas, obtiveram aumento da pressão arterial sistólica. Estes autores encontraram uma concentração sanguínea de chumbo de 26 µg/dL, valor este menor que o observado em trabalhadores ocupacionalmente expostos (tipicamente 30 a 60 µg/dL), e mesmo assim, esta concentração foi capaz de causar altos valores pressóricos.

Os possíveis mecanismos biológicos que expliquem as alterações na pressão sanguínea e sua correlação com a exposição ao chumbo não estão inteiramente esclarecidos. Os estudos com animais procuram evidenciar os mecanismos pelos quais o chumbo induz tais alterações cardiovasculares que culminam em aumento da pressão sanguínea.

Várias espécies reativas de oxigênio, como o  $O_2^-$  e  $OH^-$ , são continuamente produzidas no organismo pelo metabolismo do oxigênio. As espécies reativas de oxigênio desempenham um importante papel como sinalizadores moleculares, conseqüentemente, contribuem para o funcionamento celular normal, além de participarem da defesa do organismo contra microorganismos infecciosos. Naturalmente, as ROS são contidas pelos antioxidantes naturais, que consistem em moléculas endógenas ou exógenas que inativam os radicais livres. O aumento da produção de radicais livres e/ou depleção do sistema antioxidante podem ser os mecanismos pelos quais o chumbo induz estresse oxidativo (Patrick, 2006). As ROS não-contidas provocam dano tecidual, citotoxicidade e disfunção por atacar moléculas estruturais e funcionais (Vaziri & Khan, 2007).

Recentes estudos têm demonstrado que o chumbo causa estresse oxidativo, principalmente em tecidos renais e cardiovasculares de animais ou culturas celulares expostas a este metal. Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da aterosclerose, desordens neurodegenerativas, câncer e outros processos patológicos, inclusive a hipertensão (Vaziri & Khan, 2007).

O chumbo é um cátion divalente e possui forte afinidade para o radical sulfidril (-SH) das proteínas, o que pode alterar a atividade de enzimas ou proteínas estruturais. O chumbo e/ou os ROS produzidos pela exposição ao  $Pb^{++}$  se ligam às enzimas que possuem o grupo sulfidril ativo e transformam estas enzimas em não funcionais,

causando um desequilíbrio no balanço de controle dos radicais livres (Lynes *et al*, 2007). Um dos efeitos do chumbo é alterar o metabolismo da glutathione, uma molécula produzida no interior dos linfócitos, que entre outras funções, é responsável pela neutralização de radicais livres. O chumbo se liga ao agrupamento sulfidril (-SH) e inibe a ação desta molécula. A concentração sanguínea de glutathione encontra-se reduzida em animais experimentais e humanos expostos ao  $Pb^{++}$  (Patrick, 2006).

Vários estudos suportam a teoria que o estresse oxidativo desempenha um papel significativo na etiologia da hipertensão e esta seja resultante da ação de ROS, que ocorre em várias condições, inclusive na exposição ao  $Pb^{++}$  (Vaziri *et al*, 1997).

O aumento das ROS pode estar relacionado com a gênese e a manutenção da hipertensão, por alterar o balanço dos fatores vasoconstritores e vasodilatadores, uma vez que o radical hidroxila e outros radicais livres reagem com o óxido nítrico (NO) provocando oxidação ou inativação local deste fator relaxante derivado do endotélio (Ding *et al*, 2000; Vaziri *et al*, 1999). O NO é um gás produzido pelo endotélio através da conversão da L-arginina em L-citrulina pela atividade da sintase endotelial do NO (eNOS). O NO produzido induz vasodilatação pela estimulação da guanilato ciclase solúvel (sGC) nas células do músculo liso adjacente (Marques *et al*, 2001).

Marques e colaboradores (2001) estudaram o relaxamento vascular em anéis de aorta de ratos tratados por 30 dias com 5 ppm de acetato de chumbo na água de beber. O  $Pb^{++}$  causou prejuízo no relaxamento, tanto dependente como independente do endotélio, acompanhado de aumento da expressão de eNOS e *downregulation* da sGC, resultado este também descrito por Farmand e colaboradores (2005). Estes efeitos foram prevenidos pela administração concomitante ao chumbo de vitamina C, na água de beber, sugerindo o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na regulação do sistema de relaxamento NO/cGMP na parede vascular dos ratos expostos cronicamente ao chumbo.

Contudo, não se sabe se este prejuízo é induzido diretamente ou indiretamente pelo  $Pb^{++}$ , pois este metal possui a habilidade de alterar a atividade de componentes neurológicos e humorais, como hiperreatividade simpática, hiposensibilidade do



barorreflexo e hipotonismo parassimpático vagal (Boscolo & Carmignani, 1988) e também induzir aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Campbell *et al*, 1985).

Para responder este paradigma, outro grupo de pesquisadores (Le-Feng *et al*, 2007) incubaram anéis de aorta por 24 horas com 4,8  $\mu\text{M}$  de acetato de chumbo e encontraram redução do relaxamento à acetilcolina. Entretanto não houve alteração do relaxamento ao nitroprussiato de sódio, o qual causa relaxamento da parede vascular, independente do endotélio, por ativação da formação do GMPc no músculo liso. Com estes achados puderam concluir que há efeito direto do  $\text{Pb}^{++}$  no endotélio vascular. Outro achado relevante deste mesmo trabalho foi a redução da excreção de nitrito no grupo tratado, entretanto, havia aumento de eNOS e iNOS, havendo um paradoxo entre a redução da biodisponibilidade do NO e o aumento das isoformas responsáveis pela síntese do mesmo (eNOS/iNOS). Uma possível explicação talvez seja a capturação do NO pelas ROS, uma vez que estes radicais encontram-se elevados na exposição ao  $\text{Pb}^{++}$  (Le-Feng *et al*, 2007).

Corroborando com estes últimos achados existe um trabalho de Vaziri e colaboradores (1999) que demonstra redução na excreção renal dos metabólitos do NO (nitrito e nitrato) no grupo tratado cronicamente com  $\text{Pb}^{++}$ . A nitrotirosina, que é um indicador da oxidação do NO por ROS, estava aumentada no grupo tratado (no plasma, no cérebro, no coração, no pulmão e no rim). Existe uma correlação positiva entre a concentração de nitrotirosina e os valores de pressão sanguínea, em contraste há uma correlação negativa entre a excreção renal de nitrato e nitrito e a pressão sanguínea. A vitamina E, um antioxidante, foi capaz de reduzir a produção de nitrotirosina (aumentar a biodisponibilidade do NO) e amenizar a hipertensão induzida pelo  $\text{Pb}^{++}$ , indicando que a peroxidação de lipídios e a nitrosilação de proteínas, provocadas pelo aumento de ROS, contribuem para as complicações vasculares e renais associadas com a exposição crônica ao  $\text{Pb}^{++}$ .

Um outro estudo da avaliação dos efeitos agudos do chumbo (5, 10 e 30 minutos de exposição a 10 ppm deste metal, valor correspondente a 48  $\mu\text{M}$ ) revelou aumento dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio nas células endoteliais e musculares lisas de coronária humana. Este achado demonstra a contribuição de ambos, músculo liso e endotélio, na patogênese do estresse oxidativo induzido pelo  $\text{Pb}^{++}$  em tecidos cardiovasculares. O estresse oxidativo desempenha um importante papel na

patogênese da aterosclerose e da arteriosclerose. Ainda, causa disfunção endotelial e alteração da função vascular por vários mecanismos. A inibição do NO pelas ROS pode resultar em vasoconstrição, aumento da adesão leucocitária e plaquetária, migração/proliferação de células musculares lisas e acumulação de matriz extracelular com conseqüente remodelamento vascular. Em adição, via ativação do fator nuclear  $\kappa$ B, NF $\kappa$ B, e a conseqüente formação de citocinas pro-inflamatórias e pro-fibróticas, o estresse oxidativo pode promover inflamação, que é um importante componente para a aterogênese. A soma destes fatores contribui para os efeitos cardiovasculares induzidos pelo estresse oxidativo provocado pela exposição ao  $Pb^{++}$  (Ni *et al*, 2004).

Foi citado previamente que o estresse oxidativo pode ser resultado da redução de sistemas antioxidantes e/ou aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. O sistema antioxidante é composto por antioxidantes endógenos e provenientes da dieta alimentar. Este sistema é constituído de enzimas antioxidantes que interagem e, conseqüentemente, inativam as ROS. Um dos principais radicais livres produzidos nos organismos aeróbicos é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) o qual é largamente citotóxico. O  $O_2^-$  é convertido em  $H_2O_2$  pela atividade da superóxido dismutase (SOD). Por sua vez, as enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) convertem a  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água.

Para avaliar se os efeitos do chumbo são induzidos por redução da atividade de antioxidantes, além do aumento na produção de radicais livres, Farmand e colaboradores (2005) estudaram a atividade catalítica de enzimas antioxidantes no córtex e na medula renal e na aorta torácica. O estresse oxidativo pode ser resultado de deficiência na SOD, CAT e/ou GPX, que constituem as principais enzimas antioxidantes de defesa do organismo. O referido estudo demonstrou aumento de atividade destas enzimas, o qual pode ser devido ao aumento na produção de  $H_2O_2$ , ou seja, um efeito compensatório ao aumento do estresse oxidativo induzido pelo  $Pb^{++}$ .

Além do estresse oxidativo, que resulta na redução da biodisponibilidade do NO, e da ligação direta com o grupo  $-SH$  de proteínas estruturais e funcionais, o chumbo pode ser um indutor da hipertensão arterial por alterar outros mecanismos fisiológicos.

Iannaccone e colaboradores (1981) demonstraram a habilidade do chumbo de alterar a atividade de componentes neurológicos e humorais, por causar: hiperreatividade simpática, hiposensibilidade do barorreflexo e hipotonismo parassimpático vagal (Boscolo *et al*, 1979). Estudos com humanos exibem alterações de neurotransmissores, sugerindo aumento da atividade do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina causados pela exposição ao chumbo (Campbell *et. al*, 1985; Chang *et. al*, 1996).

Um outro grupo de pesquisadores (Sharifi *et al*, 2004) avaliaram ratos tratados com 100 ppm de acetato de chumbo na água de beber por 2, 4, 6 e 8 semanas e encontraram aumento de pressão arterial sistólica induzida pela exposição ao chumbo. Ainda, houve aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) na fase precoce do tratamento, demonstrando a participação desta enzima no desenvolvimento da hipertensão arterial. Entretanto, na fase tardia, houve redução desta atividade (no plasma e nos tecidos). Esta redução pode ser devido a um feedback negativo do sistema renina-angiotensina induzido pelo aumento da pressão arterial. A ECA promove produção de angiotensina II e aldosterona que favorecem vasoconstrição e proliferação celular (nos vasos sanguíneos). Estes dados demonstram a participação do sistema renina-angiotensina na fase precoce do desenvolvimento da pressão arterial, entretanto, os resultados sugerem que, talvez, este sistema não esteja envolvido na manutenção da hipertensão induzida pelo  $Pb^{++}$ .

Um outro mecanismo especulativo, pelo qual o chumbo possa alterar a pressão arterial, consiste em sua interferência, direta ou indireta, na homeostasia do cálcio. De forma indireta, pelo aumento da produção de radicais livres, visto que é sabido que as ROS, principalmente o radical hidroxila, são capazes de aumentar a  $[Ca^{++}]$  citosólica em vários tipos celulares (Dreher & Jundon, 1995). De forma direta, o chumbo reduz, competitivamente, a absorção de minerais (Ercal *et al*, 2001) e talvez, possua a capacidade de substituir o cálcio e mimetizar os efeitos deste íon na contratilidade do músculo liso (Valencia *et al*, 2001).

Por promover estresse oxidativo e inflamação e por promover alterações nos sinalizadores do NO a exposição crônica ao  $Pb^{++}$  desencadeia uma cascata que pode culminar no desenvolvimento da hipertensão e doenças cardiovasculares. A

figura 2 esquematiza os mecanismos potenciais pelos quais o estresse oxidativo participa da hipertensão e das alterações cardiovasculares induzidas pelo  $Pb^{++}$ .

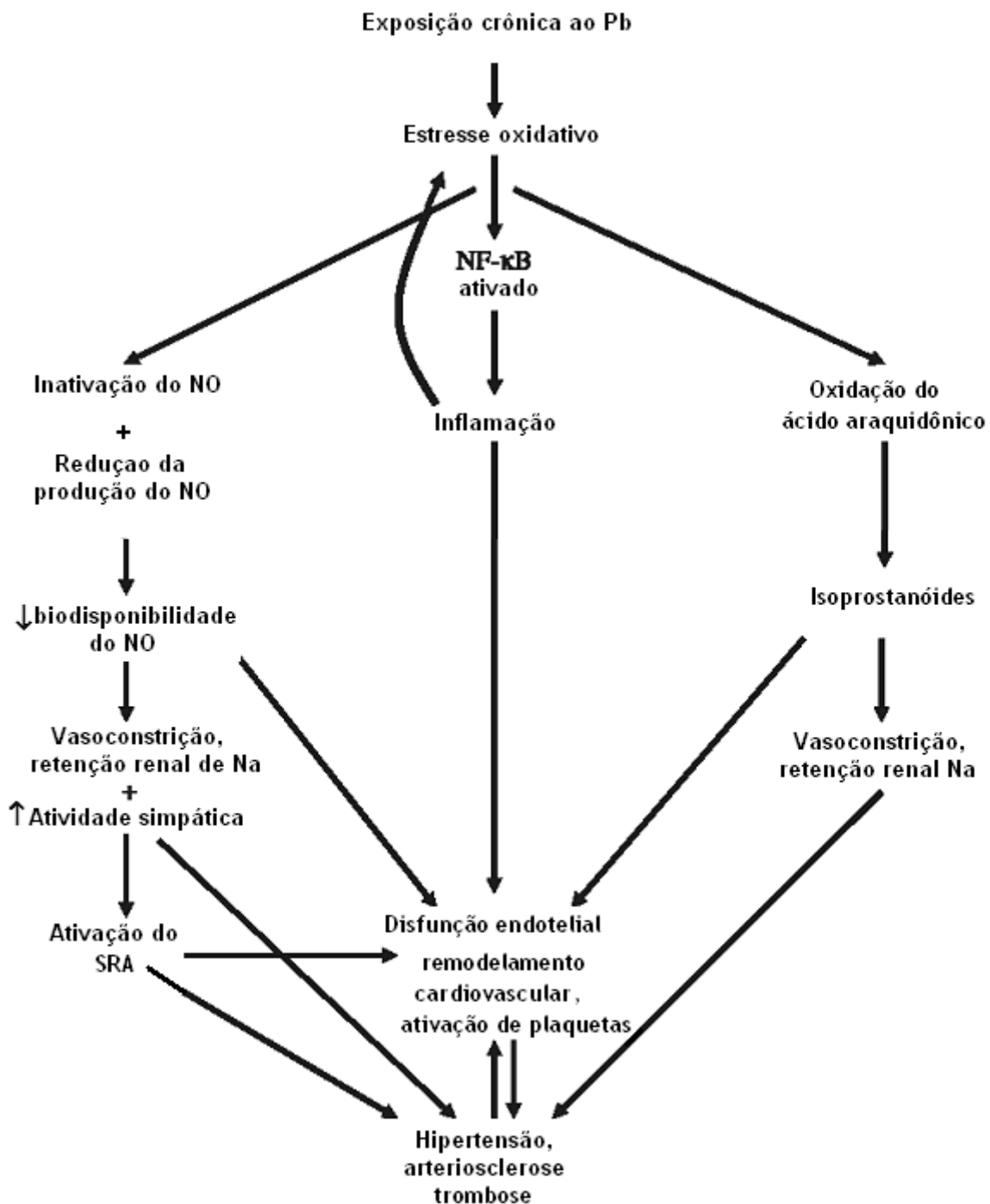


Figura 2: Mecanismos potenciais pelos quais o estresse oxidativo participa da hipertensão e das alterações cardiovasculares induzidas pelo Pb. Na presença do estresse oxidativo as ROS inativam o NO, promove a geração de isoprostanóides por oxidação do ácido araquidônico e ativação do fator nuclear de transcrição (NFκB). Juntos estes eventos podem causar vasoconstrição, retenção de sal, ativação do sistema simpático, estimulação do sistema renina-angiotensina aldosterona (RAS), adesão plaquetária, e, portanto, disfunção endotelial, hipertensão, inflamação, arteriosclerose e trombose. Fonte: modificado de Vaziri and Khan, 2007.

Dentre os escassos estudos que avaliam o comprometimento cardíaco na exposição ao chumbo está um desenho populacional desenvolvido por Jain e colaboradores (2007). Estes pesquisadores avaliaram a associação entre chumbo ósseo, o melhor biomarcador de exposição crônica ao  $Pb^{++}$ , e o risco de episódios futuros de doença isquêmica cardíaca e concluíram que os homens com maiores concentrações sanguíneas e ósseas de  $Pb^{++}$  possuem aumento do risco de desenvolvimento de doença isquêmica cardíaca.

Bernal e colaboradores (1997) mensuraram a corrente de cálcio, de cardiomiócito, na exposição aguda ao chumbo (1 a 10  $\mu M$ ) e houve redução progressiva da corrente, correspondente ao aumento da concentração do metal. Após lavar a preparação, a corrente não voltou a seus valores basais, ou seja, mesmo após a retirada do metal os efeitos no canal de cálcio foram irreversíveis.

Um outro grupo de pesquisadores (Carmignani *et al*, 1999; Boscolo *et al*, 1979; Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani *et al*, 2000) mostrou efeito inotrópico positivo, em corações de ratos, promovido pela exposição crônica ao chumbo e propôs alguns mecanismos envolvidos neste incremento da contratilidade.

Estes autores correlacionaram o inotropismo cardíaco à hiperreatividade de receptores  $\beta_1$  a qual aumenta a disponibilidade de  $Ca^{++}$  para os cardiomiócitos por alterar os níveis celulares de AMPc. Como nestes trabalhos o inotropismo cardíaco foi verificado por medidas hemodinâmicas, acredita-se que seu incremento esteja, também, associado ao aumento da resistência periférica. Além da hiperreatividade de receptores, em outro trabalho, estes mesmos pesquisadores observaram aumento de adrenalina e noradrenalina plasmáticas (aumento da atividade nervosa simpática) nos ratos tratados cronicamente com  $Pb^{++}$  (Carmignani *et al*, 2000).

A revisão literária desenvolvida acima mostra que são escassas as pesquisas que avaliam os efeitos do chumbo no funcionamento do músculo cardíaco. Entretanto, no que diz respeito às alterações promovidas por este metal na reatividade vascular e na pressão sanguínea são mais numerosos os estudos populacionais e experimentais, os quais investigam, respectivamente, a veracidade desta associação e os mecanismos pelos quais o  $Pb^{++}$  induz tais modificações.

O meio científico carece de maiores evidências dos efeitos do chumbo nos parâmetros cardiovasculares, ainda mais, no que diz respeito a estudos que avaliem os efeitos contráteis cardíacos da exposição aguda ao metal.

## 1.2 CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Nossa pesquisa objetiva avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pela exposição aguda ao chumbo e enfoca-se nas alterações de contratilidade miocárdica provocadas por este metal. Portanto, torna-se viável uma breve revisão sobre contratilidade miocárdica e acoplamento excitação-contração cardíaco.

### 1.2.1 Proteínas Contráteis

As proteínas que realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, sendo denominadas proteínas contráteis, enquanto que a tropomiosina e a troponina, modulam a sua interação, daí a denominação de proteínas moduladoras da contração (Vassallo *et al.*, 2008).

A associação das moléculas de miosina forma o filamento grosso da célula muscular. A hidrólise enzimática da miosina a divide em 2 partes: uma parte leve, formada por sua grande cauda, a meromiosina leve, e outra mais pesada, a meromiosina pesada, a qual contém a região globular. Com o prosseguimento da hidrólise a meromiosina pesada subdivide-se em 2 subunidades, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>. A subunidade S<sub>1</sub> corresponde à região globular propriamente dita, possuindo atividade ATPásica, chamada de ATPase miosínica. Esta subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica pesada e duas cadeias polipeptídicas leves. A cadeia pesada constitui o corpo da enzima (ATPase miosínica) e as cadeias leves parecem modular a atividade ATPásica da miosina, posto que sua remoção leva à perda da atividade de hidrólise de ATP (Vassallo *et al.*, 2008).

Desde 1967 já está bem estabelecido que a velocidade de contração miocárdica correlaciona-se com a atividade da ATPase miosínica (Bárány, 1967). Posteriormente, ficou demonstrado, também, que no miocárdio do rato a atividade da enzima está relacionada com as diferentes isoformas pela qual se expressa

(Swynghedaw, 1986). Estes estudos foram desenvolvidos, principalmente, no miocárdio do rato, no qual a definição das isoformas da miosina é distinguida facilmente (Mercadier *et al.* 1981; Swynghedaw, 1986; Stephens & Swynghedaw, 1990; Kurabayashi *et al.*, 1990; Rupp *et al.*, 1991). Três isoformas se expressam usualmente, representadas como V1, V2 e V3. A isoforma com maior velocidade de hidrólise do ATP é a do tipo V1, sendo a composição das cadeias pesadas da cabeça da miosina expressadas como  $\alpha\alpha$ . A isoforma com menor velocidade de hidrólise é a  $\beta\beta$ , enquanto que uma isoforma mista, com velocidade de hidrólise de ATP intermediária, se expressa como  $\alpha\beta$ . Neste aspecto, as ações do chumbo são praticamente desconhecidas.

Os filamentos finos são compostos, basicamente, por 3 proteínas: actina, tropomiosina e troponina. A actina apresenta sítios ativos capazes de interagir com a miosina e, durante esta interação a ATPase miosínica é ativada hidrolizando ATP. Deste modo ocorre a liberação de energia necessária à contração. Em repouso este sítio de interação é bloqueado pelo tropomiosina, a qual, por sua vez, liga-se a troponina (Vassallo *et al.*, 2008).

A troponina é formada por 3 subunidades; a subunidade I (TnI) que, quando interage com a tropomiosina, provoca a inibição do sítio ativo da actina; a subunidade C (TnC), que possui grande afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ ; e a subunidade T (TnT), que se liga à tropomiosina quando o  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a troponina. Nesta última situação a tropomiosina desloca-se liberando os sítios ativos da actina, garantindo a interação actino-miosina.

Os filamentos finos e grossos possuem, em suas composições, outras proteínas, algumas das quais ainda não têm suas funções perfeitamente definidas. Dentre estas proteínas estão: Proteína C; Proteína M e miomesina; Titina; Tropomodulina; e Nebulina.

As proteínas que realmente realizam a atividade contrátil são a actina e a miosina, sendo denominadas proteínas contráteis, enquanto que a tropomiosina e a troponina, modulam a sua interação, daí a denominação de proteínas moduladoras da contração.

Além destas proteínas existem outras, componentes do citoesqueleto da célula, que sustentam a estrutura espacial do sarcômero. As proteínas do citoesqueleto são proteínas cuja função principal é manter a estrutura celular (conservando a forma e

posição de organelas celulares e mantendo a estrutura da membrana celular). Entretanto, estas proteínas estão envolvidas em vários outros processos fundamentais do funcionamento celular.

### 1.2.2 Acoplamento Excitação-Contração

O acoplamento excitação-contração (AEC) consiste em um conjunto de mecanismo, desencadeados pela estimulação elétrica, que culmina na contração cardíaca (proporcionando a ejeção do sangue). O íon cálcio é essencial para a atividade elétrica cardíaca e é um ativador direto dos miofilamentos (Bers, 2002).

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

O relaxamento do cardiomiócito ocorre com o desprendimento do cálcio da TnC e a posterior redução da  $[Ca]_i$ . Esta redução é possibilitada por ação de 4 mecanismos, envolvendo: a bomba de cálcio do RS (SERCA ou RS  $Ca^{++}$ -ATPase), a qual recapta ativamente este íon para seu interior; a  $Ca^{++}$ -ATPase do sarcolema; o trocador  $Na^+$   $Ca^{++}$  do sarcolema; e o uniporte de cálcio na mitocôndria.

A *figura 3* ilustra estes mecanismos envolvidos na cinética do cálcio durante o processo de contração e relaxamento do miócito.



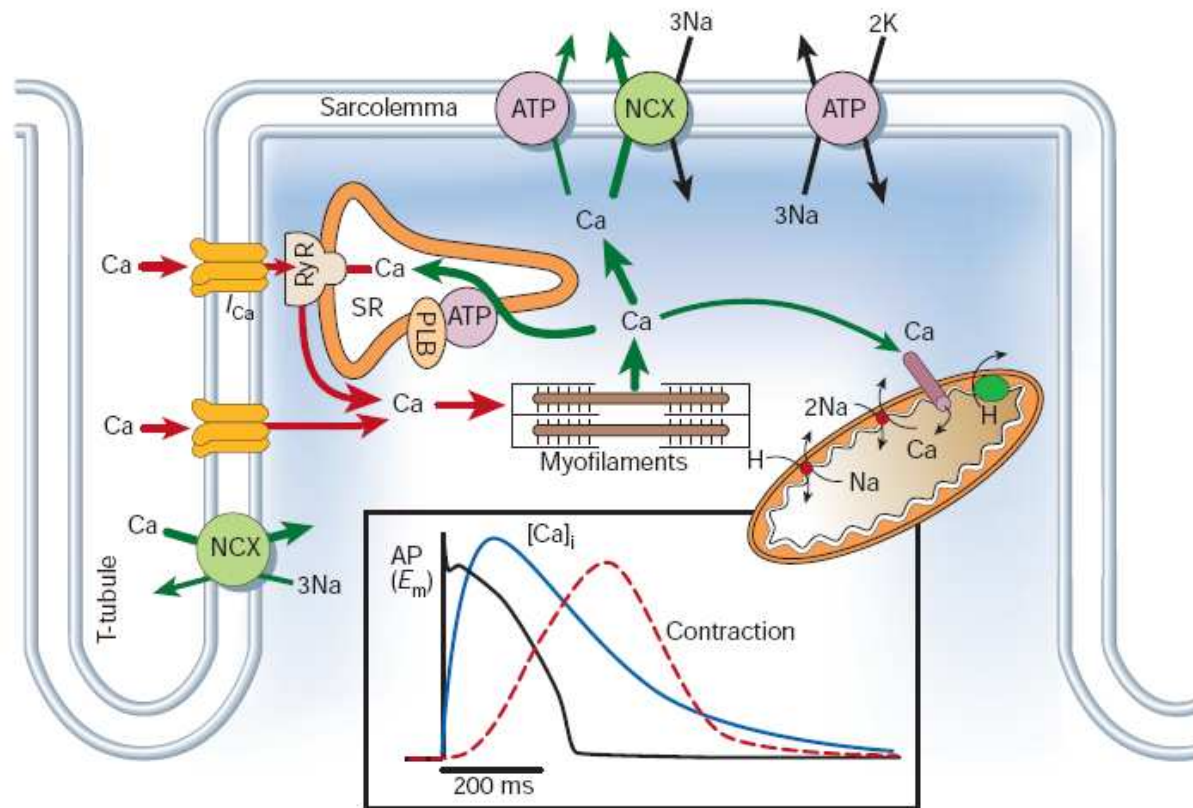


Figura 3: Transporte de cálcio nos miócitos ventriculares. Destaque para o curso temporal do potencial de ação, o transiente de cálcio e a contração, mensurados em miócitos ventriculares de coelhos a 37°C. NCX: trocador Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> do sarcolema; PLB: fosfolambam; SR: retículo sarcoplasmático.

Fonte: Bers, 2002.

O trocador Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> do sarcolema é reversível e, desta forma, além de participar do processo de contração, também auxilia no processo de relaxamento. Este trocador possui uma estequiometria de 3 Na<sup>+</sup> para cada 1 Ca<sup>2+</sup>, e gera a corrente  $I_{Na/Ca}$ , a qual pode resultar da extrusão ou do influxo de cálcio. Na repolarização ou no repouso celular o trocador trabalha em seu modo normal, ou seja, favorecendo a extrusão de cálcio e o influxo de sódio. Durante a despolarização, o potencial de membrana torna-se positivo e atinge valores maiores que o do potencial de equilíbrio do trocador. Esta alteração elétrica causa inversão do NCX, portanto, o mesmo trabalha retirando sódio e favorecendo o influxo de cálcio no miócito.

Outra forma de controlar a atividade do NCX, além das mudanças do potencial de membrana, consiste nas alterações na disponibilidade destes íons para o transporte. A elevação do Na<sup>+</sup><sub>i</sub> dificulta, rápida e intensamente, a troca Na/Ca no estado de

repouso, basicamente porque o aumento do  $\text{Na}^+_i$  diminui o gradiente difusional do  $\text{Na}^+$  através da membrana. Além disso, o trocador possui 2 sítios intracelulares onde se ligam  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A ligação do  $\text{Na}^+$  provoca redução da atividade da troca, enquanto a ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$  a estimula. Desta forma, condições que promovem elevação dos níveis de  $\text{Na}^+_i$ , tais como os digitálicos, dificultam a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  via troca Na/Ca, aumentando a força de contração (Blaustein *et al.*, 1991).

A região de junção entre o RS e as membranas dos túbulos transversos ou sarcolema é, atualmente, alvo de muitos estudos envolvendo a modulação da atividade contrátil. Estudos recentes demonstraram que a este nível são expressas moléculas de NCX e da Na, K-ATPase (NKA). Devido a esta proximidade, efeitos inibidores sobre a NKA, como os da ouabaína em pequenas concentrações, promovem aumento local do  $\text{Na}^+_i$  sem, entretanto, afetar a concentração global de  $\text{Na}^+$  intracelular. Este aumento local do  $\text{Na}^+$  inibe parcialmente o NCX aumentando a concentração local do  $\text{Ca}^{2+}$ . Este, por sua vez, é captado pelo RS e, frente a uma ativação de um músculo, é liberado em maior quantidade aumentando a força de contração (Blaustein & Lederer, 1999).

Há três formas de alterar a força de contração cardíaca: alterando a amplitude ou duração do transiente de cálcio; modificando a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio; ou através da mudança na força máxima ativada por cálcio que pode ser alcançada pelos miofilamentos, o que corresponde à variação no número de pontes cruzadas (Bers, 2002, Vassallo *et al.*, 2008).

Uma das intervenções mais comuns que afeta, tanto a disponibilidade do cálcio quanto a responsividade miofibrilar ao cálcio, é a estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Fisiologicamente a estimulação simpática dos  $\beta$ -receptores resulta em aumento da força contrátil desenvolvida (efeito inotrópico positivo) e aceleração do tempo de relaxamento (efeito lusitrópico positivo). Os agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, aumentam a produção intracelular do segundo mensageiro, AMPc, que ativa a proteína cinase A (PKA), causando fosforilação da TnI. Este mecanismo envolve interações alostéricas entre as proteínas do filamento fino, culminando na redução da afinidade da TnC pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . A *figura 4* ilustra a ativação do receptor  $\beta$ -adrenérgico no músculo cardíaco e os mecanismos intracelulares desencadeados por esta ativação.

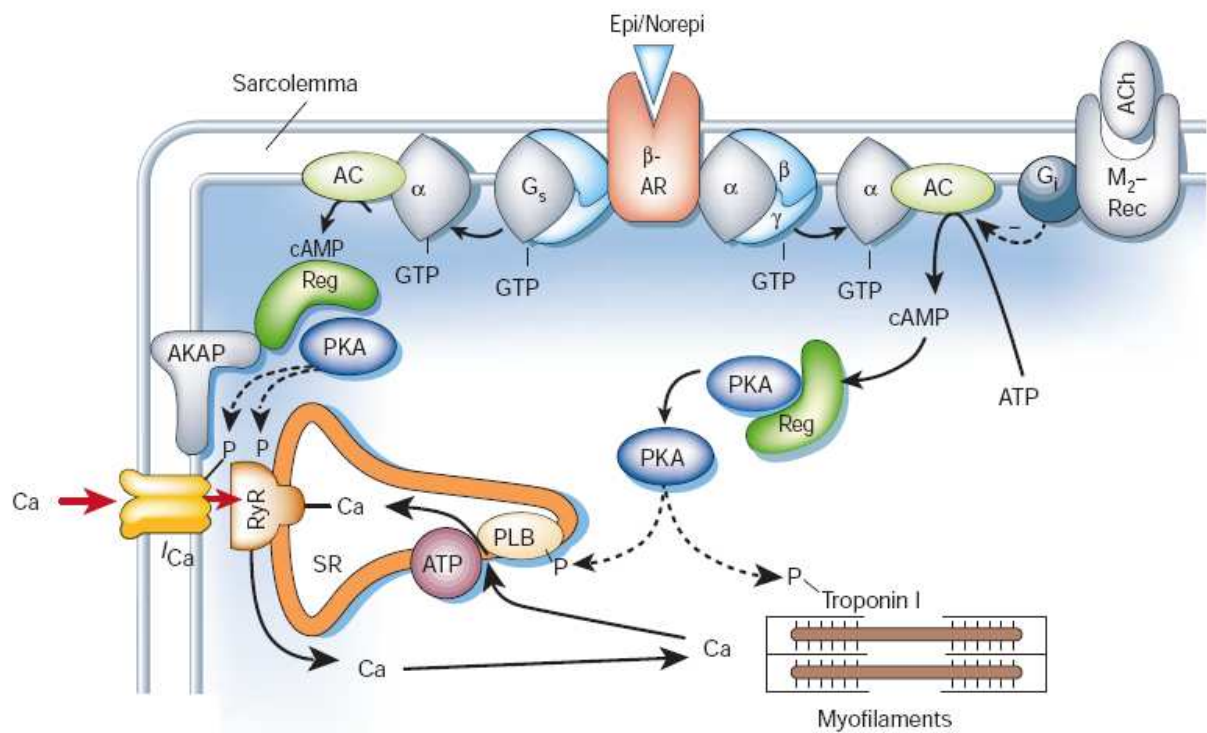


Figura 4: Ativação do receptor adrenérgico e fosforilação dos alvos relevantes para o acoplamento excitação-contracção. AC: adenilato ciclase; Ach: acetilcolina; AKAP: proteína ancoradora de cinase A;  $\beta$  AR:  $\beta$  -receptores; M<sub>2</sub>-Rec: receptor muscarínico M<sub>2</sub>; PLB: fosfolambam; SR: retículo sarcoplasmático.

Fonte: Bers, 2002.

Considerando a falta de estudos sobre o papel do chumbo na atividade contrátil do miocárdio o presente estudo visa avaliar o comprometimento cardíaco da exposição aguda ao metal através de medidas do desempenho ventricular *in vivo*, contratilidade miocárdica *in vitro* e parâmetros bioquímicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar os efeitos do chumbo na função ventricular direita e esquerda em uma preparação *in vivo* de animais expostos por um período de 120 minutos a este metal.
- 2) Avaliar o inotropismo cardíaco, os parâmetros temporais, a atividade do retículo sarcoplasmático, a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio, a responsividade das proteínas contráteis e a participação da ativação  $\beta$ -adrenérgica nos músculos papilares do VE expostos agudamente ao acetato de chumbo.
- 3) Analisar, por medidas bioquímicas, os efeitos da exposição aguda ao  $Pb^{++}$  sobre a atividade da ATPase miosínica e da NKA do músculo cardíaco.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 280 e 350 gramas (g) cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Estes animais foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controle de temperatura, com livre acesso à ração e água.

Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais (CEUA / EMESCAM) regulamentado pela portaria 059/2006 de 10 outubro de 2006.

### 3.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*) e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direitas para mensuração dos parâmetros cardiovasculares. A veia femoral direita foi cateterizada para infusão de drogas. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Para a cateterização foram utilizados cateteres de polietileno preenchidos com salina heparinizada (100 UI/ml). Para a canulação da veia femoral foi utilizado o cateter *PE 10 (Clay-Adams)* e para os vasos de maior calibre o *PE 50 (Clay-Adams)*.

Posteriormente as canulações, foram cateterizados os ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE). A pressão do VD foi adquirida pela introdução do cateter, até a cavidade ventricular, através da veia jugular direita. Já a aquisição da pressão intraventricular esquerda foi obtida com a introdução do cateter através da artéria carótida direita.

Após 20 minutos de estabilização das pressões intraventriculares os animais receberam, agudamente, solução de acetato de chumbo (Pb) e foram avaliados os seguintes parâmetros, por um período de 120 minutos (min): pressão sistólica intraventricular, derivada de pressão intraventricular (dP/dt) positiva (+) e negativa (-) e frequência cardíaca (FC) (*figura 5*).

A dose administrada de acetato de Pb foi calculada para atingir uma concentração plasmática de 160 µg/dL, valor acima do índice de tolerância biológico brasileiro (60 µg/dL), de acordo com Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho (Brasil, 1988). Considerando que o chumbo se distribui igualmente no líquido extracelular e que para cada 100 g de animal há 20 mL de líquido neste compartimento, foram infundidos 32 µg de acetato de chumbo para cada 100g do animal.

A pressão sistólica intraventricular e a FC foram mensuradas através de um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) e registradas em um microcomputador por um sistema de aquisição de dados (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA). Para a aquisição dos dados foi utilizado taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. As derivadas (dP/dt) positiva e

negativa foram obtidas dos registros de ondas de pressão intraventricular em função do tempo.

Para avaliação de possíveis alterações decorrentes do protocolo experimental foram realizados controles temporais de todos os parâmetros mensurados. Os ratos do grupo controle receberam a mesma dose do veículo (água destilada) e seus parâmetros foram avaliados pelo mesmo período que o grupo que recebeu o acetato de chumbo. Os parâmetros avaliados permaneceram inalterados, durante todo período experimental, no grupo controle.

A utilização de água destilada como veículo foi necessária frente à reação do acetato de chumbo com o cloreto de sódio presente na salina. Quando adicionado acetato de chumbo à salina, formou-se o cloreto de chumbo ( $\text{PbCl}_2$ ) que se precipitou, uma vez que este composto possui baixa solubilidade ( $K_{ps} = 1,6 \cdot 10^{-5}$ ). O volume da solução de acetato de chumbo e do veículo foi de 6,18  $\mu\text{L}$  para cada 100g de rato.

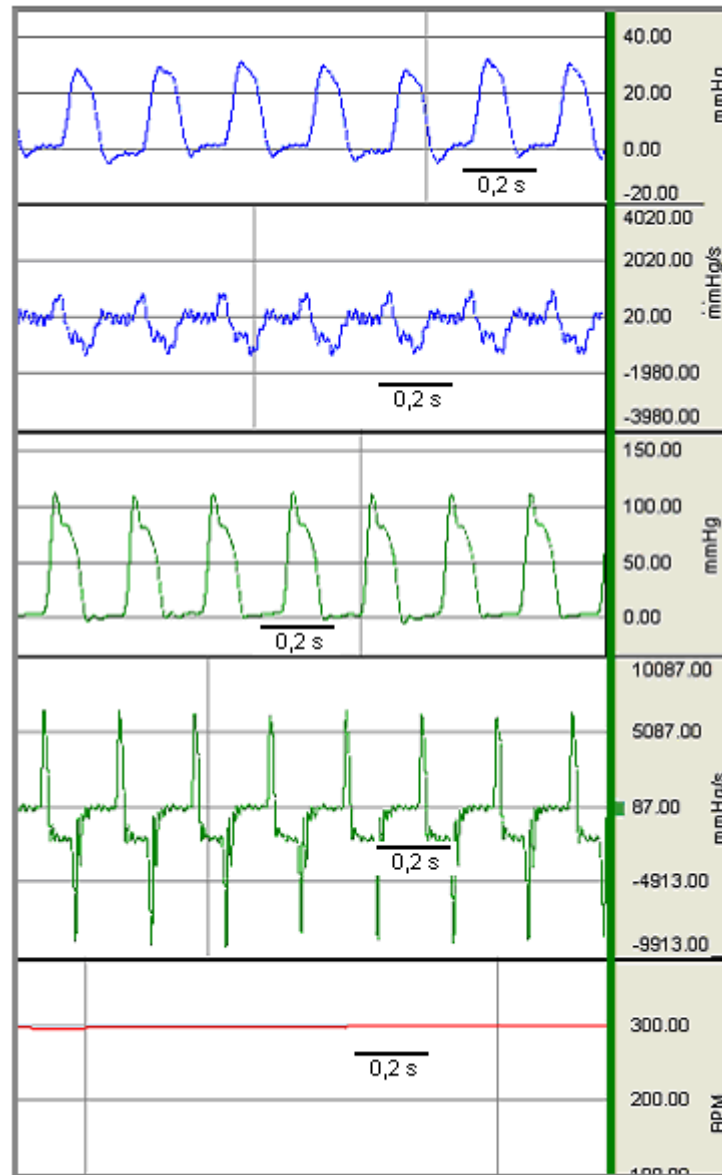


Figura 5: Registro típico das medidas hemodinâmicas de um rato controle. De cima para baixo: Pressão intraventricular direita,  $dP/dt$  do VD, pressão intraventricular esquerda,  $dP/dt$  do VE e FC, respectivamente.



### 3.3 MÚSCULO ISOLADO

Os animais foram anestesiados com Hidrato de Cloral 10% (4 ml/kg, *i.p.*) e submetidos à toracotomia. Em seguida, removiam-se os corações e os perfundiam através do coto aórtico, com solução nutritiva Tyrode modificada, composta por (em mM): NaCl 120; KCl 5,4; MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1,25; Tampão HEPES 20; Glicose 11 (Tyrode-HEPES); pH 7,45. Abriam-se os corações pelo septo interventricular e dissecavam-se os músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE). Os músculos papilares removidos ( $5,85 \pm 2,12$  mg; n= 33) eram fixados por argolas, e então presos em uma extremidade fixa e outra ligada a um transdutor de força, em câmaras de vidro com volume de 20 ml e, continuamente perfundidas com solução de Tyrode modificada. Para evitar a possibilidade de hipóxia, os experimentos foram realizados sob baixa temperatura (26° C) como previamente descrito (Vassallo & Carvalho, 1979) e, continuamente gaseificada com oxigênio.

Estimulavam-se eletricamente os músculos papilares do VE através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo (pulsos retangulares com duração de 12 ms e voltagem um e meio vezes o limiar). A frequência de estimulação padrão era de 0,5 Hz (condição-estabilizada). Os músculos eram, então, estirados até L<sub>max</sub> (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 60 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais.

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

Foram analisados os seguintes parâmetros: pico de força isométrica (F); tempo de ativação e tempo de relaxamento das contrações isométricas; derivada de força / derivada de tempo (dF/dt) positiva (+) e negativa (-); potenciação relativa obtida após pausas de 15, 30 e 60 segundos (PPP); contrações após repouso de 10 minutos (PRC); contrações tetânicas; e resposta inotrópica  $\beta$ -adrenérgica ao isoproterenol ( $10^{-5}$  M). Todos estes parâmetros foram mensurados antes e após tratamento com 8  $\mu$ M de Acetato de Chumbo (Pb<sup>++</sup>).

### 3.4.1 Protocolos experimentais

3.4.1.1 Avaliação dos efeitos do  $Pb^{++}$  sobre a força de contração isométrica de músculos papilares de VE.

Para avaliar intervenções inotrópicas do Chumbo sobre a contração isométrica, foi realizado o seguinte protocolo: após período de estabilização nas condições previamente descritas, foi mensurada a força desenvolvida (*figura 6*). Imediatamente após, foi administrado  $8 \mu M$  de acetato de  $Pb^{++}$  e a força foi registrada por um período de 60 minutos.

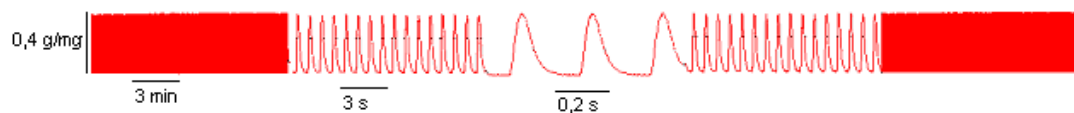


Figura 6: Registro típico da contração isométrica desenvolvida pelos músculos papilares de VE de ratos.

3.4.1.2 Avaliação dos efeitos do  $Pb^{++}$  na cinética contrátil dos músculos papilares de VE

Para avaliar possíveis alterações induzidas pelo  $Pb^{++}$  na cinética de contração e relaxamento ventricular foram avaliados os tempos de ativação e relaxamento e a  $dF/dt$  positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares. Estes parâmetros foram avaliados antes e durante 60 minutos de exposição ao metal.

3.4.1.3 Efeitos do  $Pb^{++}$  na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos

As potenciações relativas pós-pausa (PPP) foram obtidas e avaliadas antes e após 1 hora de tratamento dos músculos papilares de VE com  $Pb^{++}$  com o objetivo de avaliar de forma indireta a contribuição do retículo sarcoplasmático (RS) na contração (*figura 7*). A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração anterior à pausa. Este procedimento foi realizado com a finalidade de se evitar variações promovidas

por estado inotrópico diferenciado das contrações controle, objetivando avaliar o papel do  $Pb^{++}$  frente à atividade do RS.



Figura 7: Registro típico do efeito do  $Pb^{++}$  sobre a potenciação relativa (PR) da potenciação pós-pausa (PPP) obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s em músculos papilares de VE de ratos.

#### 3.4.1.4 Efeitos do $Pb^{++}$ nas contrações após repouso de 10 minutos

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

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

Os músculos foram lavados, por duas vezes, com solução em zero  $Ca^{++}$  (“ $Ca^{++}$  free”) até as contrações serem abolidas (Ringer, 1883), então o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Segundos antes de a estimulação ser reiniciada, as preparações foram reperfundidas com solução Tyrode-HEPES nas condições padrões previamente descritas.

As contrações obtidas após repouso de 10 minutos, também chamadas de “post rest contraction” (PRC), foram avaliadas antes e após uma hora de exposição ao metal e calculadas como a razão entre a amplitude da primeira contração após a pausa e a amplitude da contração estabilizada anterior à pausa.

#### 3.4.1.5 Avaliação dos efeitos do $Pb^{++}$ nas contrações tetânicas

A tensão tetânica era obtida após 30 minutos de tratamento com 5 mM de cafeína, numa frequência de 10 Hz, e duração de 15 segundos, como descrita previamente

(figura 8) (Leite *et al.*, 1995). As contrações tetânicas foram obtidas 15 minutos antes da adição de  $Pb^{++}$  e, em seguida, em intervalos regulares de 15 minutos, por um período de 90 minutos de exposição ao metal.

Para fins experimentais utilizamos a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações, que refletem o influxo de  $Ca^{++}$  transsarcolemal e a responsividade das proteínas contráteis ao  $Ca^{++}$ .

Para avaliar possíveis alterações decorrentes do protocolo experimental foram feitos os controles temporais das contrações tetânicas. Para tal, foram realizadas todas as manobras previamente descritas na ausência de  $Pb^{++}$ . Não foram encontradas alterações significantes decorrentes do protocolo experimental no pico e no platô destas contrações.

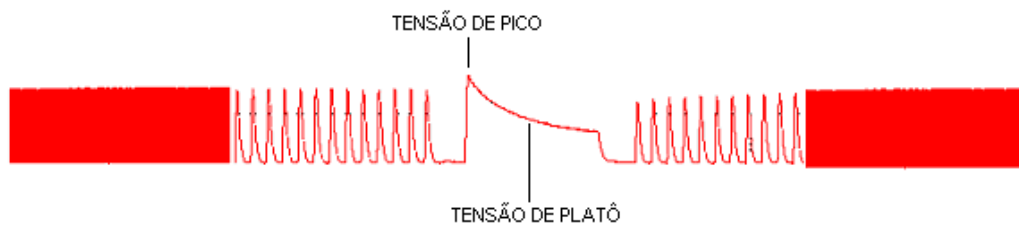


Figura 8: Registro típico de uma contração tetânica evidenciando o pico e o platô de força tetânica.

#### 3.4.1.6 Avaliação da influencia do $Pb^{++}$ na resposta $\beta$ -adrenérgica

Para avaliar a interferência do  $Pb^{++}$  na resposta  $\beta$ -adrenérgica no músculo cardíaco foi utilizado o isoproterenol ( $10^{-5}$  M), um agonista  $\beta$ -adrenérgico. Para realização deste protocolo foi utilizada solução nutritora de Tyrode com  $[Ca^{++}]$  extracelular de 0,62 mM, pois preparações isoladas de ratos exibem melhores respostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de  $Ca^{++}$  (Vassallo *et.al.* 1994). A preparação foi tratada com o isoproterenol, antes e após 1 hora de exposição ao metal. A resposta inotrópica induzida pelo agonista  $\beta$ -adrenérgico foi calculada como a razão entre a amplitude máxima na força de contração na presença do isoproterenol e a amplitude da contração estabilizada anterior à pausa.

### 3.5 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

#### 3.5.1 Efeitos do $Pb^{++}$ sobre a atividade da ATPase miosínica

Possíveis alterações induzidas pelo  $Pb^{++}$  na atividade da ATPase miosínica foram analisadas em conformidade com protocolo previamente descrito por Claude & Swynghedauw (1975) e Cappelli *et al.* (1989). A miosina foi preparada a partir de ventrículos esquerdos homogeneizados e tratados com tampão fosfato (0,3 M KCl, 0,2 M tampão fosfato [ $KH_2PO_4$ ], pH 6,5) (Bremel & Weber, 1975). Após precipitação da miosina e resíduos musculares por diluição (15 vezes com água), os resíduos musculares eram separados por filtração utilizando-se gaze. O sobrenadante contendo a miosina era centrifugado a 33.000 g por 40 minutos. Após decantação do sobrenadante, o precipitado era novamente dissolvido em 0,6 M KCl e, conseqüentemente, a miosina era diluída sob alta força iônica (1 ml de água era adicionado para cada grama de tecido para produzir nova precipitação). O material era novamente centrifugado a 33.000 g por 40 minutos e o resíduo muscular era separado por filtração. O material era mais uma vez dissolvido, agora, em 14 ml de água por grama de tecido centrifugado. O precipitado era dissolvido em 5 mM HEPES, pH 7, e 0,6M KCl mais 50%, v/v, de glicerol e estocado a  $-20^{\circ}C$ . Para o uso da miosina estocada, esta era diluída em água (1:12) e centrifugada a 3.000 g por 15 minutos. O precipitado era resuspendido em 50 mM HEPES, pH 7, e 0,6 M KCl, e centrifugado a 3.000 g novamente. O sobrenadante era utilizado.

A atividade da  $Ca^{2+}$  - ATPase miosínica era avaliada pela determinação da liberação de fosfato ( $P_i$ ) partir do ATP 1mM na presença de HEPES 50 mM, pH 7, KCl 0,6 M,  $CaCl_2$  5mM ou EGTA 10 mM na ausência e presença de  $Pb^{++}$  (8 $\mu$ M) e em um volume final de 200  $\mu$ l. O nucleotídeo foi adicionado ao meio da reação e pré-incubado por 5 minutos a  $30^{\circ}C$ . A reação era iniciada através da adição de fração da enzima (3 a 5  $\mu$ g proteína) ao meio de reação por 10 minutos. O tempo de incubação e a concentração de proteína foram escolhidos no sentido de assegurar a linearidade da reação. A reação foi interrompida através da adição de 200  $\mu$ l de ácido tricloroacético a 10%. Os controles com a adição de preparação de enzima, após a adição de ácido tricloroacético, foram utilizados para corrigir a hidrólise não enzimática do substrato. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. A

atividade da enzima foi calculada como a diferença entre a atividade observada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença de 10 mM EGTA. O fosfato inorgânico foi determinado pelo método de Chan *et al.*, 1986. A atividade específica foi expressa como nmol  $\text{P}_i$  liberado por minuto por mg de proteína. A proteína foi determinada pelo método *Coomassie Blue* de acordo com Bradford, 1976, usando-se albumina como padrão.

### 3.5.2. Efeitos do $\text{Pb}^{++}$ sobre a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase

O material enzimático utilizado para avaliar possíveis efeitos provocados por 8  $\mu\text{M}$  de acetato de  $\text{Pb}^{++}$  na atividade da bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  foi obtido, essencialmente, como previamente descrito (Velema e Zaagsma, 1981), com as seguintes modificações:

Cada Ventrículo foi homogeneizado em 4 ml de solução Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0), usando um homogeneizador de tecidos, por 4 períodos de 7 segundos com intervalos de 15 segundos de descanso.

O homogeneizado era centrifugado a 8.800 rpm por 20 minutos e, em seguida, o precipitado era descartado. Ao sobrenadante era adicionado volume equivalente de solução de Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0) e em seguida era centrifugado novamente a 10.000 rpm por 1 hora.

O precipitado era ressuspenso, na mesma solução que foi homogeneizado, em um volume que proporcionasse uma quantidade de 0,5 mg/ml de proteína.

A concentração de proteína foi determinada pelo Método de Bradford (1976).

A atividade enzimática determinada pela diferença de atividade de hidrólise de ATP (concentração final 3,0 mM) entre um meio que continha  $\text{MgCl}_2$  3,0 mM, NaCl 125 mM, KCl 20 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e um meio idêntico a esse, exceto que continha ouabaína na concentração final de 5 mM.

Assim pode-se definir como atividade  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  – ATPase aquela porção da atividade ATPase total inibida pela ouabaína.

As frações (10 a 50  $\mu\text{g}$  de proteína) eram pré-incubadas por 5 minutos a 37 °C e a reação iniciada pela adição de ATP. O tempo de reação era de 15 minutos. A

reação foi interrompida através da adição de ácido tricloroacético (concentração final 5%). O fosfato liberado foi determinado pelo método descrito por Moreira *et. al* (2003).

**4 FÁRMACOS E REAGENTES**

Acetato de Chumbo II ( Sigma)

Ácido clorídrico – HCl (Merck)

ácido tricloroacético (Merck)

Albumina, Soro Bovina (Sigma)

Álcool polivinílico (Merck)

Bicarbonato de sódio - NaHCO<sub>3</sub> (Merck)

Cafeína (B.HERZOG)

Cloreto de cálcio dihidratado - CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (Merck)

Cloreto de magnésio Hexahidratado - MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O (Merck)

Cloreto de mercúrio (Sigma)

Cloreto de potássio - KCl (Merck)

Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)

EDTA (Sigma)

EGTA (sigma)

Fosfato de sódio monobásico - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

Glicerol (Reagen)

Glicose (Vetec)

Heparina sódica (Roche)

HEPES (Sigma)

Hidrato de cloral (Reagen)

Hidróxido de Sódio (Merck)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

L-Isoproterenol (Sigma)

Molibdato de amônio (Nuclear)



Ouabaína, octahidrato (Sigma)

Sulfato de sódio - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)

Tris-HCl (Sigma)

Uretana sódica (Sigma)

Os fármacos (acetato de chumbo e isoproterenol) foram dissolvidos em água destilada e armazenados a -20°C.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foi utilizada ANOVA 1 via com *test post hoc Tukey* para as análises de todos os parâmetros hemodinâmicos. Para os resultados da preparação de músculo isolado, a ANOVA 1 via com *test post hoc Tukey* foi empregada para avaliar a força isométrica desenvolvida, suas derivadas (máx e mín) em função do tempo e os pico e platô das contrações tetânicas. O teste *t-Student* pareado foi utilizado para comparar as potenciações pós-pausas, a *post rest contraction* e a resposta  $\beta$ -adrenérgica, nos músculos papilares. Para as medidas bioquímicas foi utilizado o teste *t* não-pareado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA) e o GB-STAT (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD, USA).

## **6 SUPORTE FINANCEIRO**

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

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

Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia (FUNCITEC).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

O desempenho ventricular *in vivo* foi avaliado pelos parâmetros hemodinâmicos dos animais expostos agudamente ao acetato de  $Pb^{++}$  (80  $\mu\text{g/dL}$ ) e está apresentado na *tabela 1* e nas *figuras 9 e 10*. A exposição por 2 horas ao  $Pb^{++}$  provocou aumento significativo nos parâmetros avaliados nos VE e VD (PSVE,  $dP/dt + VE$ ,  $dP/dt - VE$ , PSVD,  $dP/dt + VD$  e  $dP/dt - VD$ ). Estes acréscimos nos parâmetros mensurados foram evidentes, em sua maioria, após 60 min de tratamento com o  $Pb^{++}$ . Todavia, não houve alterações significativas na FC destes animais (*figura 11*).

Tabela 1: Medida dos parâmetros hemodinâmicos de ratos expostos agudamente ao  $Pb^{++}$

|                               | 0 min       | 30 min      | 60 min       | 90 min       | 120 min                  |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------|
| <b>PSVE</b><br>(mmHg)         | 112 ± 3,7   | 123 ± 4,7   | 127 ± 4,4*   | 129 ± 4,3*   | 129 ± 3,2*               |
| <b>dP/dt + VE</b><br>(mmHg/s) | 5731 ± 753  | 6761 ± 891* | 6892 ± 786*  | 7269 ± 881*  | 7518 ± 869*              |
| <b>dP/dt - VE</b><br>(mmHg/s) | -5330 ± 504 | -5868 ± 442 | -5937 ± 436  | -6249 ± 438* | -6507 ± 443*             |
| <b>PSVD</b><br>(mmHg)         | 28,1 ± 1,2  | 30,5 ± 1,6  | 33,1 ± 1,1*  | 33,8 ± 1,0*  | 34,1 ± 1,2* <sup>#</sup> |
| <b>dP/dt + VD</b><br>(mmHg/s) | 1721 ± 179  | 1888 ± 203  | 2024 ± 182   | 2140 ± 193*  | 2224 ± 177*              |
| <b>dP/dt - VD</b><br>(mmHg/s) | -1662 ± 108 | -1762 ± 153 | -1979 ± 135* | -1873 ± 87   | -1959 ± 98*              |
| <b>FC</b><br>(bpm)            | 312 ± 22    | 330 ± 23    | 331 ± 17     | 334 ± 16     | 334 ± 17                 |

Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); derivada temporal máxima de pressão do VE ( $dP/dt + VE$ ) e mínima ( $dP/dt - VE$ ); pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); derivada temporal máxima de pressão do VD ( $dP/dt + VD$ ) e mínima ( $dP/dt - VD$ ); frequência cardíaca (FC). Estes parâmetros foram avaliados antes (0 min) e em diferentes tempos de exposição ao  $Pb^{++}$  (30, 60, 90 e 120 min). Os resultados estão expressos em média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de Tukey para todas as análises. (n = 9) \* $p < 0,05$  vs Ct; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs 30 min.

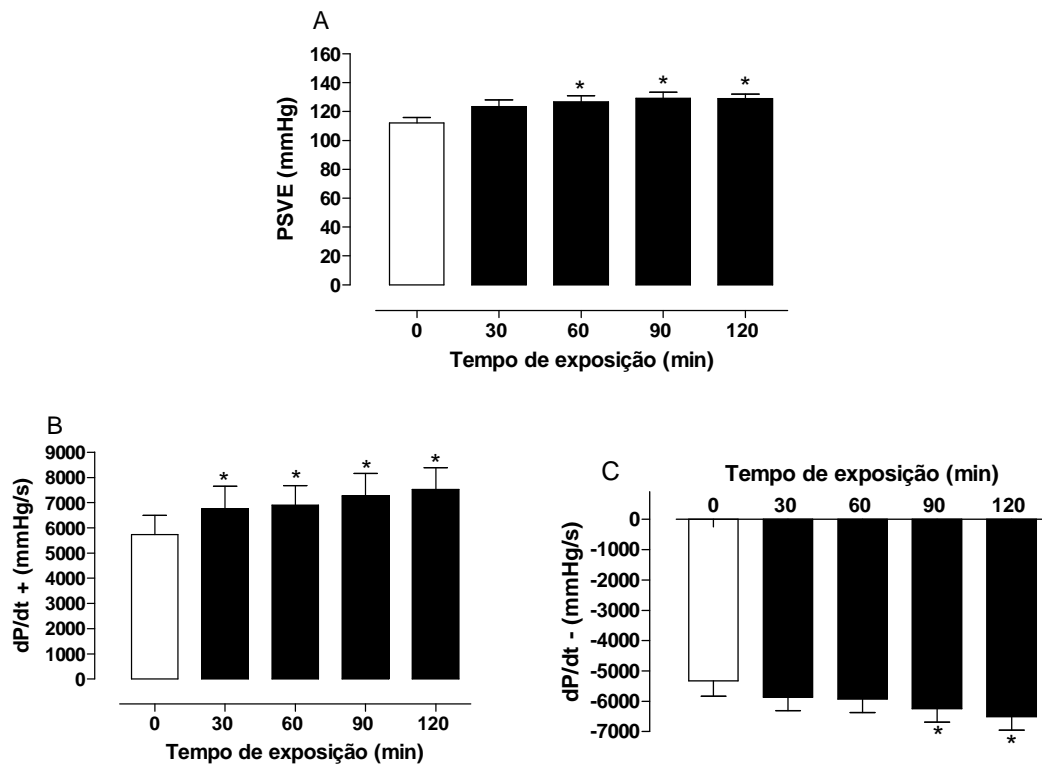


Figura 9: Parâmetros hemodinâmicos do VE de ratos expostos agudamente ao  $Pb^{2+}$ : alterações da pressão sistólica (A), da  $dP/dt+$  (B) e da  $dP/dt-$  (C). \*  $p < 0.01$ , vs Ct (n = 9). ANOVA uma via seguida teste de Tukey.

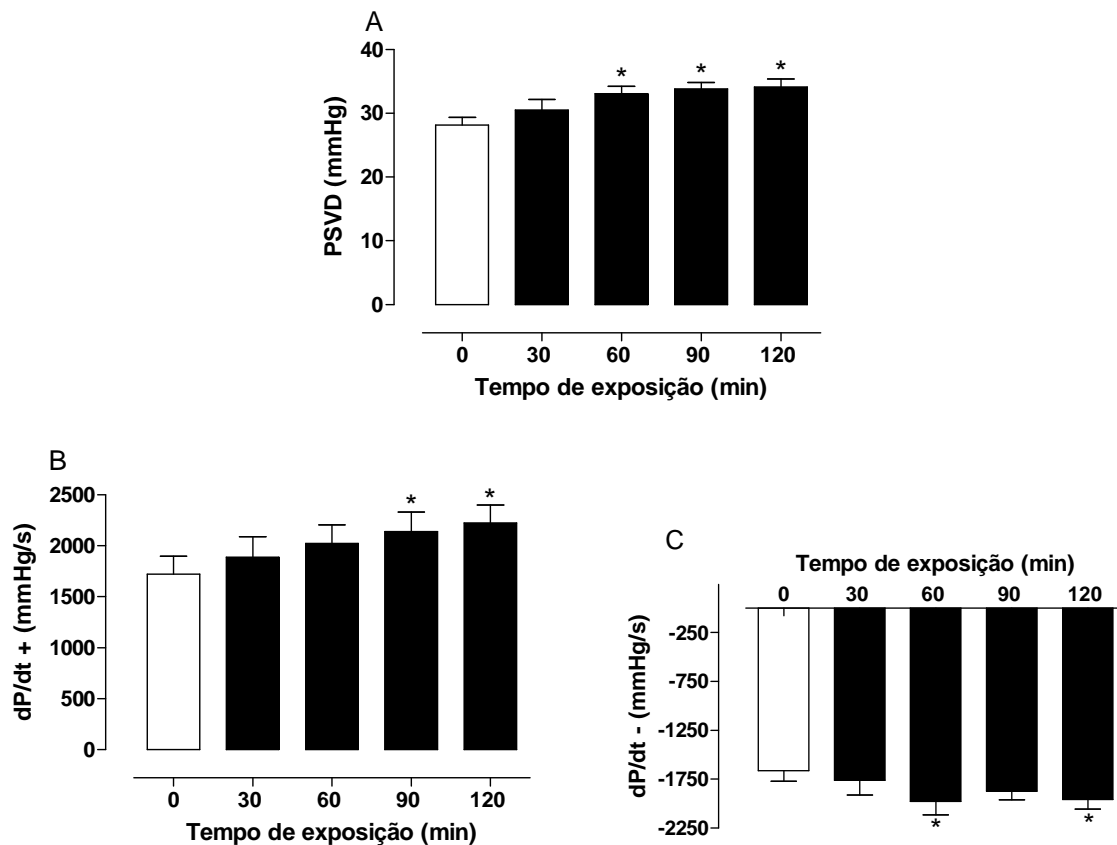


Figura 10: Parâmetros hemodinâmicos de VD de ratos expostos agudamente ao  $Pb^{++}$  : pressão sistólica (A), da  $dP/dt +$  (B) e da  $dP/dt -$  (C). \*  $p < 0,05$  vs Ct min ( $n = 9$ ). Barra branca: antes da exposição ao metal; Barras pretas: diferentes tempos de exposição ao metal. ANOVA uma via seguida de teste de Tukey.

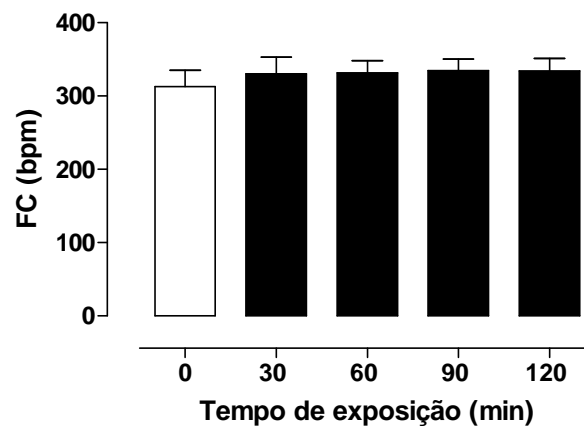


Figura 11: Efeito induzido pelo  $Pb^{++}$  na FC de ratos expostos agudamente ao chumbo ( $n = 9$ ). Barra branca: antes da exposição ao metal; Barras pretas: diferentes tempos de exposição ao metal. ANOVA uma via.

## 7.3 MÚSCULO ISOLADO

### 7.3.1 Atividade contrátil do VE

A *figura 12* demonstra os efeitos de  $8 \mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{++}$  na força contrátil de músculos papilares do VE. A exposição aguda ao metal culminou no aumento da força contrátil desenvolvida. A avaliação dos parâmetros de índice de contratilidade e relaxamento permite concluir que a exposição dos músculos papilares por 1 hora ao  $\text{Pb}^{++}$  promoveu aumento das  $dF/dt$  positiva (+) e negativa (-), respectivamente (*figuras 13C e 13D*).

Em relação aos parâmetros temporais de contração e relaxamento dos papilares expostos ao  $\text{Pb}^{++}$  houve redução do tempo de ativação enquanto o tempo de relaxamento da contração muscular manteve-se inalterado (*figuras 13A e 13B*).

Estes dados sugerem que a exposição aguda de músculos papilares de VE ao  $\text{Pb}^{++}$  promoveu aumento de inotropismo cardíaco e se o referido metal pesado promove algum efeito deletério, os mecanismos celulares envolvidos na gênese de força e encurtamento compensam estes efeitos.

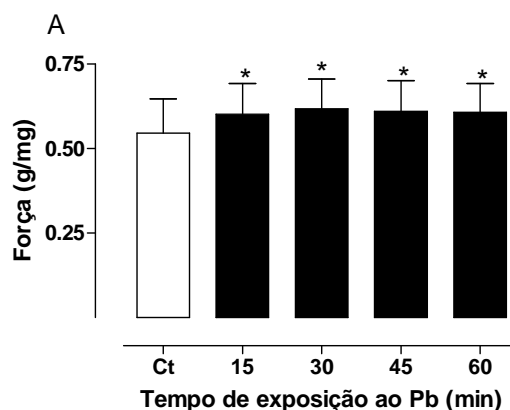


Figura 12: Avaliação dos efeitos do  $\text{Pb}^{++}$  ( $8 \mu\text{M}$ ) na força de contração isométrica de músculos papilares expostos agudamente a este metal. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 5$ ). Barra branca: antes da exposição ao metal; Barras pretas: diferentes tempos de exposição ao metal. ANOVA uma via seguida de teste de Tukey.

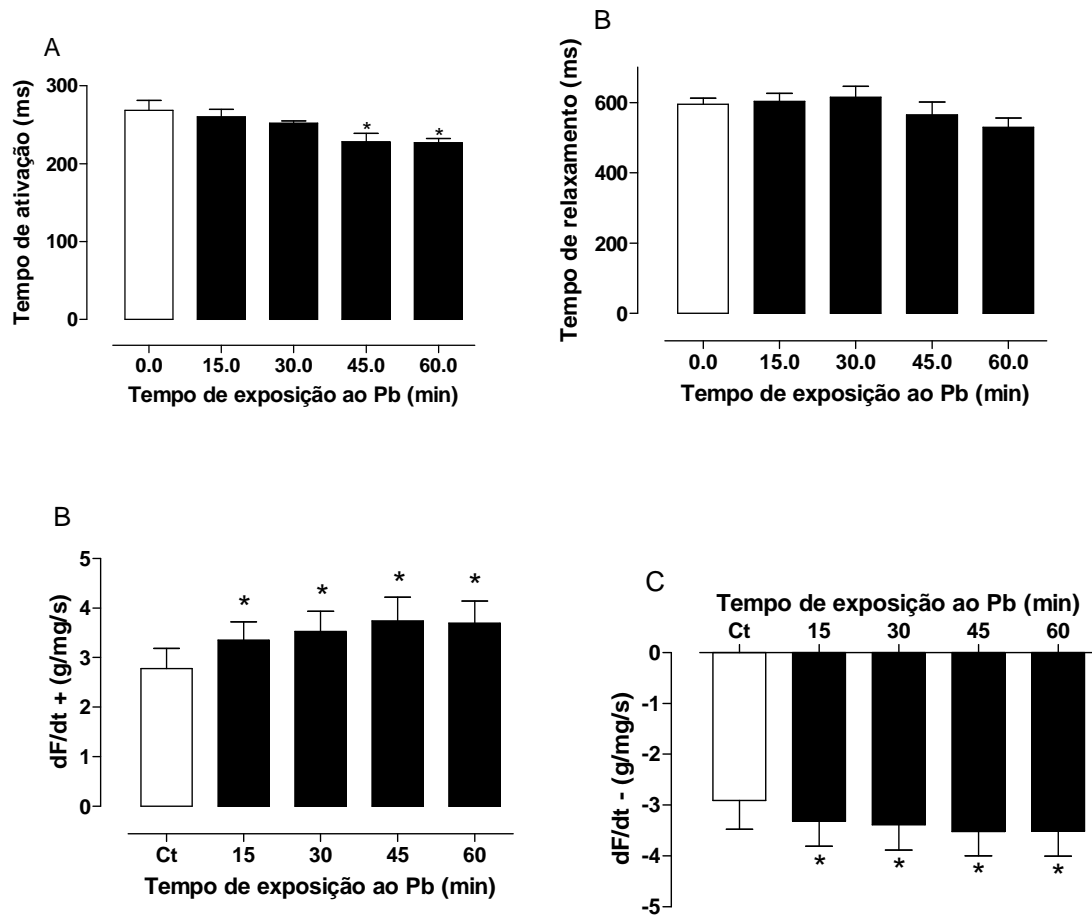


Figura 13: Avaliação dos efeitos do  $Pb^{++}$  ( $8\mu M$ ) nos tempo de ativação e relaxamento (A e B) e nas  $dF/dt +$  (C) e  $dF/dt -$  (D) de músculos papilares de VE expostos agudamente a este metal. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 5$ ). Barra branca: antes da exposição ao metal; Barras pretas: diferentes tempos de exposição ao metal. ANOVA uma via seguida de teste de Tukey.



### 7.3.2 Potenciações pós-pausas

A *figura 14* ilustra as potenciações pós-pausas (PPP), utilizadas para avaliar um possível efeito do  $Pb^{++}$  sobre a atividade do RS. As PPP foram registradas após pausas de 15, 30 e 60 segundos e analisadas como força relativa. A exposição ao  $Pb^{++}$ , por 1 hora, não promoveu diferenças estatisticamente significantes nas PPP em relação ao controle, indicando que este metal, sob as condições experimentais previamente descritas, não alterou a liberação de cálcio do RS.

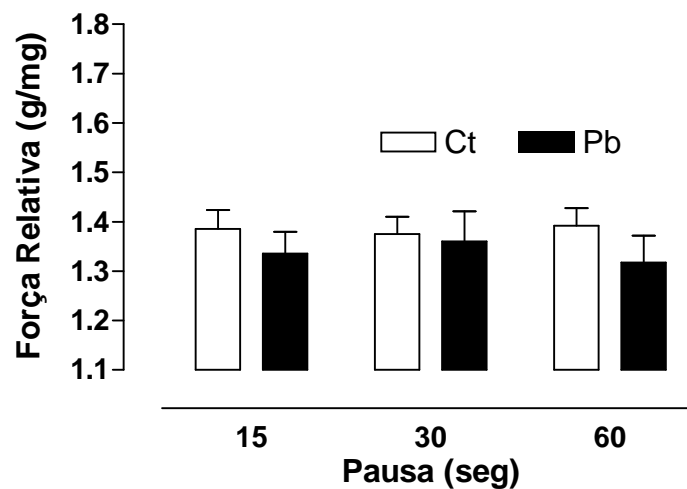


Figura 14: Efeitos do  $Pb^{++}$  na potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos. Ct: antes da exposição ao metal; Pb: após 1 h de exposição. (n = 8). Teste *t* para cada PPP de mesmo intervalo.

### 7.3.3 Contrações após repouso de 10 minutos

As contrações obtidas após repouso de 10 minutos, também chamadas de “post rest contraction” (PRC), foram avaliadas antes e após 1 hora de exposição ao metal. Na *figura 15* observa-se diminuição na PRC, de aproximadamente 50%, após a exposição ao metal em relação ao período anterior ao tratamento (Ct): de  $20 \pm 2,98$  % para  $9,8 \pm 2,52$  % (porcentagem das contrações estabilizadas anterior as pausas). Este achado sugere uma redução no influxo de  $\text{Ca}^{++}$  transsarcolemal após o tratamento com o  $\text{Pb}^{++}$ .

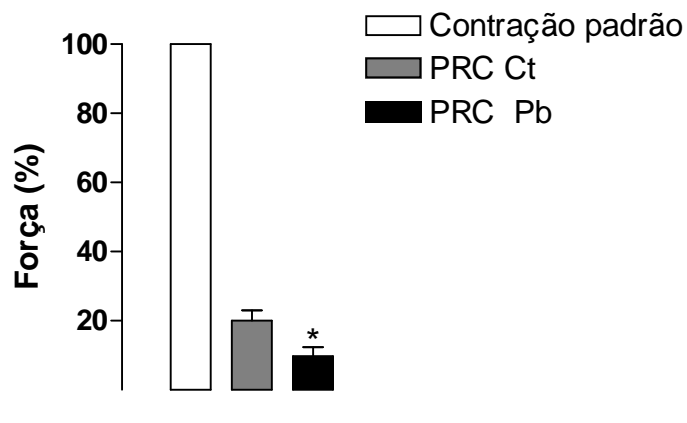


Figura 15: Avaliação indireta dos efeitos do  $\text{Pb}^{++}$  no influxo de  $\text{Ca}^{++}$  transsarcolemal mensurada pela “post rest contraction”. PRC após 1 h de exposição. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 5$ ). Teste  $t$  entre PRC Ct e PRC Pb.

### 7.3.4 Contrações tetânicas

A *figura 16* demonstra que o  $Pb^{++}$  induziu, de maneira tempo dependente, um efeito depressor sobre o pico da força tetânica desenvolvida pelos músculos papilares de VE de ratos. Entretanto, quando avaliado o platô da força tetânica, não foram encontradas alterações significativas (*figura 16B*). A análise destes parâmetros indica um prejuízo na disponibilidade de  $Ca^{++}$  para o desenvolvimento de força contrátil, sugerindo uma redução no influxo destes íons através da membrana do miócito (*figura 16A*).

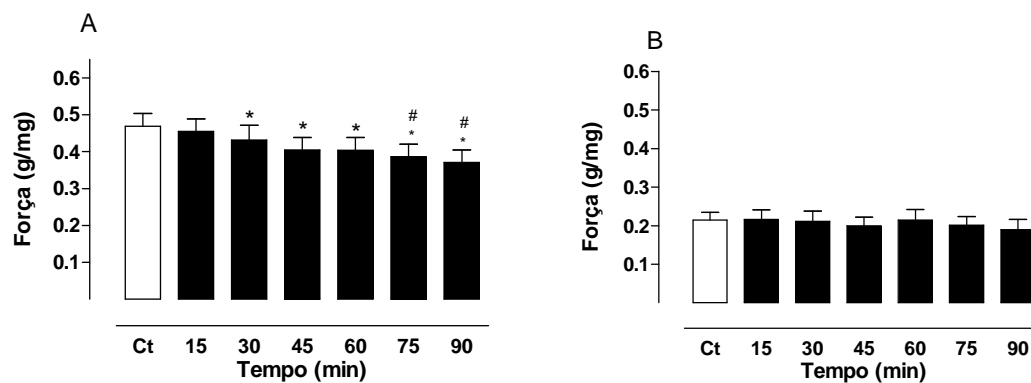


Figura 16: Efeitos do  $Pb^{++}$  nas contrações tetânicas. A: pico de força; B: platô de força. \* $p < 0,05$  vs Ct; # $p < 0,05$  vs 30 min ( $n = 8$ ). Barra branca: antes da exposição ao metal; Barras pretas: diferentes tempos de exposição ao metal. ANOVA uma via seguida de teste Tukey.

### 7.3.5 Resposta inotrópica à estimulação $\beta$ -adrenérgica

A *figura 17* mostra a intervenção inotrópica produzida por uma dose de isoproterenol (agonista  $\beta$ ) antes e após 1 hora de exposição ao  $Pb^{++}$ . Como esperado, esta interferência homeométrica promoveu aumento da força tanto antes quanto após 1 hora de tratamento com metal. Entretanto, após 1 hora de exposição ao metal, o inotropismo cardíaco positivo desencadeado por esta manobra foi potencializado em cerca de 25 % em relação ao controle (período anterior à exposição).

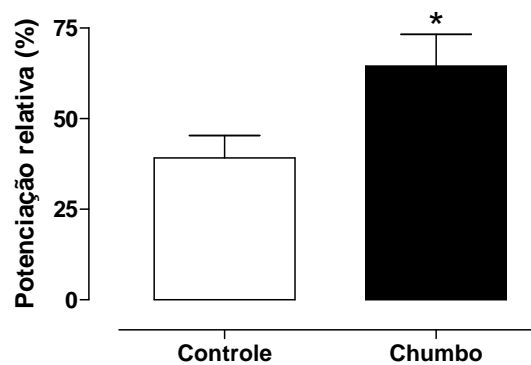


Figura 17: Efeito do  $Pb^{++}$  na intervenção inotrópica promovida pelo isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) em músculos papilares de VE de ratos. Controle: antes da exposição ao metal. Chumbo: após 1 h de exposição. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 7$ ). Teste  $t$ .

## 7.4 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

### 7.4.1 Medida da atividade ATPásica da miosina

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase miosínica foi avaliada pela determinação da liberação de fosfato ( $\text{P}_i$ ) a partir do ATP e está apresentada como porcentagem em relação aos valores das amostras que não foram expostas a  $8 \mu\text{M}$  de acetato de  $\text{Pb}^{++}$ . A *figura 18* ilustra o aumento da atividade ATPásica induzido pelo tratamento com o  $\text{Pb}^{++}$ .

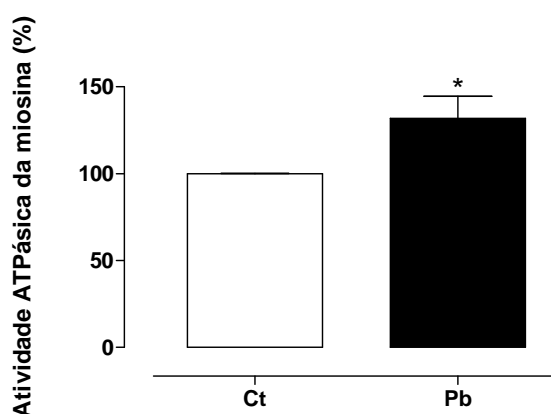


Figura 18: Efeito do  $\text{Pb}^{++}$  na atividade da enzima ATPase miosínica de VE ratos. Controle: sem chumbo; Chumbo: na presença de  $8 \mu\text{M}$  Pb. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 4$ ). Teste *t*.

### 7.4.2 atividade da $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPase

A *figura 19* demonstra os efeitos do  $\text{Pb}^{++}$  sobre a atividade da bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . As amostras tratadas com  $\text{Pb}^{++}$  apresentaram aumento da atividade ATPásica desta bomba em relação às amostras que não receberam o acetato de  $\text{Pb}^{++}$   $8 \mu\text{M}$ .

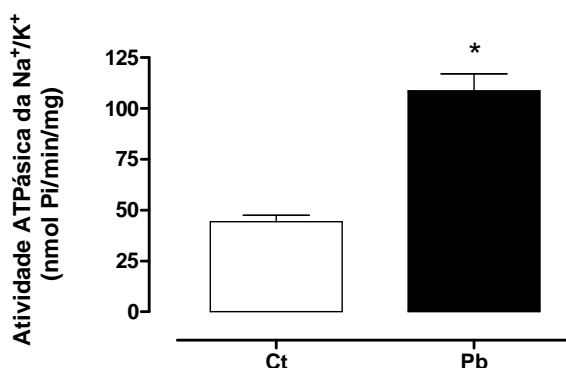


Figura 19: Efeito do  $\text{Pb}^{++}$  na atividade da NKA de VE de ratos. Ct: sem chumbo; Pb: na presença de  $8 \mu\text{M}$  Pb. \* $p < 0,05$  vs Ct ( $n = 6$ ). Teste *t*.

## 8 DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo mostram que o chumbo elevou a pressão intraventricular e o inotropismo cardíaco positivo de ratos expostos por um período de 120 minutos a uma suposta concentração plasmática de 80 µg/dL deste metal. De igual importância foram os achados na preparação *in vitro* de músculo isolado, na qual a exposição aguda ao chumbo (8 µM) provocou efeito inotrópico positivo, corroborando os achados hemodinâmicos.

Este estudo reveste-se de relevância, pois, até o momento não se havia estudado, *in vivo*, os efeitos tóxicos da exposição aguda ao chumbo nos parâmetros hemodinâmicos de ratos. De mesmo modo, foi um estudo pioneiro na avaliação dos parâmetros contráteis de músculos papilares, *in vitro*, exposto agudamente a concentrações tóxicas deste metal.

## 8.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

No presente trabalho encontramos aumento da pressão sistólica e das dP/dt (positivas e negativas) de VE e VD, entretanto não houve alteração na FC dos animais expostos agudamente (120 minutos) a uma suposta concentração plasmática de 80 µg/dL de chumbo. Nesta preparação, *in vivo*, foi demonstrado o efeito hipertensor promovido pelo Pb<sup>++</sup>. Este efeito é bem documentado em experimentos realizados com animais submetidos a tratamentos crônicos, entretanto, como previamente mencionado, ainda não havia sido documentado seus efeitos hipertensores e inotrópicos na exposição aguda. Os estudos de Vaziri e colaboradores (1999); Sharifi e colaboradores (2004); Carmignani e colaboradores (1999 e 2000); Roncal e colaboradores (2007); entre outros; demonstraram claramente a hipertensão experimental induzida pela exposição crônica ao chumbo.

Acredita-se que a patogênese da toxicidade do chumbo no sistema cardiovascular seja multifatorial, por: afetar diretamente a atividade de enzimas e a síntese de proteínas ao se ligar ao grupamento sulfidril (-SH) destas moléculas; reduzir, competitivamente, a absorção de minerais; alterar a homeostasia do cálcio; modificar fatores humorais; inibir a NKA; deprimir as reservas de antioxidantes do organismo e/ou aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando no aumento do estresse oxidativo (Ercal *et al*, 2001).

O estresse oxidativo, associado as suas conseqüências, é o principal mecanismo descrito para explicar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo chumbo, tanto em experimentos realizados cronicamente quanto agudamente (Patrick, 2006; Lynes *et al*, 2007; Vaziri & Khan, 2007; Le-Feng *et al*, 2007).

Os radicais livres produzidos na exposição ao chumbo reagem com o NO provocando oxidação ou inativação local deste fator relaxante derivado do endotélio (Ding *et al*, 2000; Vaziri *et al*, 1999). Khalil-Manesh e colaboradores (1993) demonstraram redução na concentração plasmática e renal de GMPc, em ratos com hipertensão induzida pelo Pb<sup>++</sup>. O NO é o vasodilatador mais potente, derivado do endotélio, e possui um importante papel na manutenção da pressão arterial. Muitas das ações biológicas induzidas pelo NO são mediadas por ação do segundo mensageiro GMPc, que é produzido a partir do GTP pela guanilato ciclase solúvel

(GCs). A ativação da GCs pelo NO induz a produção de GMPc, o qual promove vasodilatação.

O incremento da pressão intraventricular direita e esquerda encontrado em nosso trabalho pode ser resultado do aumento da resistência vascular sistêmica, corroborando os trabalhos que estudaram os efeitos agudos do chumbo na reatividade vascular. Ding e colaboradores (2000) examinaram cultura de células endoteliais de anel de aorta incubadas com 4,8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{++}$  por 24 e 48 horas e encontraram aumento do estresse oxidativo, indicando uma intervenção direta do  $\text{Pb}^{++}$  no metabolismo celular. Estes autores demonstram que na exposição aguda ao  $\text{Pb}^{++}$  há aumento dos radicais hidroxila e aumento da oxidação e inativação local da produção de NO. Isto contribui para a gênese da hipertensão por alterar o balanço dos fatores vasoconstritores e vasodilatadores.

Seguindo esta mesma linha, um outro grupo de pesquisadores, Le-Feng e colaboradores (2007), também demonstraram a capacidade do chumbo de induzir estresse oxidativo, na exposição aguda, e conseqüentemente, reduzir a biodisponibilidade do NO. Estes autores demonstraram redução no relaxamento de anéis de aorta incubados por 24 horas com 4,8  $\mu\text{M}$  de acetato de chumbo. Ainda, encontraram diminuição na quantidade de nitrito e sugeriram existir uma captura do NO pelas ROS, visto que, paradoxalmente, observaram aumento de eNOS e iNOS.

Em um outro trabalho que avalia os efeitos agudos do chumbo no aparelho cardiovascular, Valencia e colaboradores (2001) avaliaram a contratilidade de anéis de aorta e demonstraram que este metal necessita entrar nas células pelos canais de cálcio do tipo L e exerce efeitos contráteis, diretamente, sobre no músculo liso. Estes autores especularam a idéia que o chumbo possa substituir o cálcio e mimetizar os efeitos deste íon, visto que a atividade da proteína quinase C e da calmodulina (proteínas reguladas pelo cálcio) foram estimuladas na presença do  $\text{Pb}^{++}$ . Portanto, talvez este seja um outro mecanismo envolvido na gênese da hipertensão encontrada em nosso estudo.

Ainda, dentre os possíveis mecanismos esclarecedores deste aumento de inotropismo cardíaco podemos considerar o efeito direto do NO na contratilidade miocárdica. A redução da biodisponibilidade do NO, visualizada na exposição ao  $\text{Pb}^{++}$ , além de contribuir para o aumento da pressão sanguínea, parece cooperar



com o incremento do inotropismo cardíaco observado nos animais expostos ao metal, uma vez que o NO causa vasodilatação e redução da contratilidade miocárdica (Moncada *et al*, 2001).

Os trabalhos que avaliam os efeitos crônicos do chumbo propõem outros mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão induzida por este metal. No entanto, ainda não sabemos se os mecanismos envolvidos nas alterações da exposição crônica são extensíveis à aguda.

Além do estresse oxidativo os outros mecanismos envolvidos na hipertensão induzida cronicamente, pela exposição ao  $Pb^{++}$ , são: habilidade de alterar a atividade de componentes neurais e humorais, como hiperreatividade simpática e hipotonismo parassimpático vagal (Boscolo & Carmignani, 1988); aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Campbell *et al*, 1985; Iannaccone *et al* 1981) e da atividade da ECA (Sharifi *et al*, 2004); ligação direta com grupo -SH de proteínas estruturais e funcionais (Lynes *et al*, 2007); inibição da NKA (Weiler & Gonick, 1990); e interferência direta no metabolismo do cálcio (Ercal *et al*, 2001; Valencia *et al*, 2001).

Nossos resultados mostram que o tratamento com  $Pb^{++}$ , por 120 minutos, não provocou alteração na frequência cardíaca (FC). Este achado condiz com o trabalho de Carmignani e colaboradores (2000), no qual o tratamento crônico resultou no aumento de inotropismo cardíaco e inalteração de FC, corroborando nossos achados dos efeitos agudos induzidos pelo chumbo no aparelho cardiovascular. Entretanto, esta ausência de alterações não era esperada visto que este mesmo grupo de pesquisadores demonstraram haver hiperreatividade simpática central, redução da sensibilidade do barorreflexo e hipotonismo vagal em ratos tratados cronicamente com chumbo (Boscolo & Carmignani, 1988).

## 8.2 MÚSCULO ISOLADO

A elevação da pressão intraventricular e do inotropismo cardíaco, encontrados em nosso estudo *in vivo*, podem estar relacionados com o aumento da reatividade vascular periférica provocado pelos diversos fatores (locais, humorais e neurais) já discutidos acima. Entretanto, há resultados sugestivos de efeitos diretos do chumbo no inotropismo cardíaco (Carmignani *et. al*, 1999 & 2000). Nosso estudo, com músculo papilar, procurou avaliar se o chumbo produz efeitos diretos na contratilidade miocárdica, ou, se o efeito inotrópico positivo induzido pelo chumbo (visualizado pelo incremento da PSV e da dP/dt positiva) é consequência, exclusivamente, de alterações na reatividade vascular. Portanto, o uso de músculo papilar dissecado de ratos exclui a participação dos componentes neurais e hormonais na resposta aguda causada pelo  $Pb^{++}$  no músculo cardíaco.

A exposição aguda ao metal culminou em aumento discreto, porém estatisticamente significativo, da força contrátil desenvolvida pelos músculos papilares de VE. Este efeito inotrópico positivo, também, foi observado pelo aumento da dF/dt positiva (+) destas contrações. Este é um resultado inédito na literatura por avaliar os parâmetros contráteis de músculos isolados e expostos agudamente ao chumbo. Carmignani & Boscolo (1999) avaliaram o inotropismo cardíaco, através de medidas hemodinâmicas, de ratos submetidos ao tratamento crônico com chumbo. Eles encontraram aumento do inotropismo cardíaco, verificado por elevação da dF/dt (+) de VE. Ainda, verificaram redução do fluxo sanguíneo da artéria carótida. Estes autores correlacionaram o aumento da pressão sanguínea encontrado ao aumento do inotropismo cardíaco (provavelmente associado à hiperreatividade de receptores  $\beta_1$  a qual aumenta a disponibilidade de  $Ca^{++}$  para os cardiomiócitos por alterar os níveis celulares de AMPc) e ao incremento do débito cardíaco somado ao aumento da resistência periférica.

Outro trabalho, deste mesmo grupo de pesquisadores, exemplifica o tropismo que o  $Pb^{++}$  possui pelo sistema cardiovascular ao demonstrar aumento da pressão sistólica e diastólica, aumento do inotropismo cardíaco e redução do fluxo sanguíneo da artéria carótida, indicando o aumento da resistência vascular sistêmica. Estes autores associaram estes achados a alterações do sistema nervoso autonômico, pois encontraram aumento de adrenalina e noradrenalina plasmáticas (aumento da atividade nervosa simpática) (Carmignani *et al*, 2000).

Para avaliar a cinética de contração e relaxamento do músculo cardíaco, foram mensurados os tempos de ativação e relaxamento da contração. O tempo de ativação mede a cinética dos processos que aumentam a disponibilidade do cálcio ou interferem na sensibilidade dos miofilamentos a este íon. O tempo de relaxamento mede a cinética dos processos que retiram o cálcio do mioplasma. Em geral este tempo depende mais da capacidade do retículo sarcoplasmático em captar cálcio, principalmente em rato, no qual esta organela é responsável por retirar, aproximadamente, 92% do cálcio citoplasmático durante o relaxamento (Bers, 2002). Qualquer intervenção que aumente a atividade da bomba de cálcio do retículo reduz este tempo.

Nossos resultados demonstram redução no tempo de ativação, entretanto, o tempo de relaxamento manteve-se inalterado, após 60 minutos de exposição a  $8 \mu\text{M Pb}^{++}$ . Não há relatos na literatura de alterações nos parâmetros temporais contráteis de corações expostos agudamente ao chumbo, entretanto Carmignani e colaboradores (1999) demonstraram haver aumento da  $dP/dt$  positiva e inalteração da  $dP/dt$  negativa, em ratos expostos cronicamente ao  $\text{Pb}^{++}$ . Este trabalho é sugestivo de alterações, induzidas pelo  $\text{Pb}^{++}$ , na cinética contrátil, uma vez que a  $dP/dt$  é utilizada como índice de estado contrátil e é diretamente proporcional à força e inversamente proporcional ao tempo da contração.

No que diz respeito à propriedade de relaxamento do miócito, os resultados com músculos papilares corroboram aqueles da hemodinâmica, ou seja, em ambas preparações as respectivas derivadas temporais de força e pressão (negativas) aumentaram. Este achado sugere uma melhor performance no relaxamento cardíaco observada na presença do metal.

Uma outra manobra realizada com os músculos papilares foram as potenciações-pós-pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica. Sabe-se que em músculos cardíacos de mamíferos a primeira contração após curto período de pausa é potencializada (Vassallo & Mill, 1988; Leite *et.al*, 1991; Mill *et. al*, 1992). Esta potencialização, é dependente, principalmente, da liberação de cálcio de sítios intracelulares (Leite *et.al*, 1991), e como os ratos possuem o retículo sarcoplasmático (RS) muito desenvolvido, esta manobra é utilizada para avaliar a contribuição desta organela para a contração. Nossos resultados demonstraram ausência de alterações na potenciação da contração, antes e após a exposição ao

$Pb^{++}$ , para todos os tempos de pausa. Este achado, associado à ausência de modificação do tempo de relaxamento da contração, sugere a inexistência de alterações no RS, comprometedoras da atividade deste, induzidas pela exposição aguda ao  $Pb^{++}$ .

As contrações tetânicas foram utilizadas com o intuito de verificar, de forma indireta, a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a disponibilidade do cálcio para a contração, através de seu influxo pelos canais de cálcio do tipo L (Leite *et. al*, 1995). A exposição aguda ao chumbo provocou redução, tempo dependente, no pico das contrações tetânicas, no entanto, o platô destas contrações não foi alterado. Este fato é sugestivo de alteração na disponibilidade de cálcio para a contração, talvez pela redução de seu influxo através dos canais de cálcio do tipo L. Como não foram registradas alterações nos platôs das contrações tetânicas, acredita-se que a sensibilidade das proteínas ao cálcio manteve-se inalterada.

O chumbo é, sabidamente, um metal tóxico e se por algum mecanismo provoca efeito deletério na contratilidade cardíaca, nossos resultados são sugestivos de que, agudamente, este efeito não é por redução na sensibilidade das proteínas contráteis e nem por afetar o funcionamento do retículo sarcoplasmático.

De fato a exposição ao  $Pb^{++}$  provocou aparente redução no influxo de cálcio transsarcolemal mensurado indiretamente pela “post rest contraction” (PRC). Nesta manobra, a presença do chumbo por 1 hora na solução nutritiva reduziu a contração após o repouso de 10 minutos, e como esta contração é ativada pela entrada de cálcio através da membrana do miócito é sugestiva de interferência direta do chumbo na entrada de cálcio pelos canais de cálcio do tipo L. Esta diminuição da entrada de cálcio no miócito é corroborada pela redução do pico das contrações tetânicas e indica intervenção direta do chumbo na disponibilidade do  $Ca^{++}$  para a contração. Entretanto, nossos dados não nos permitem concluir se esta redução é devido ao bloqueio do canal de cálcio do tipo L (Bernal *et al*, 1997) ou se há competição entre estes dois íons pela entrada na célula (Valencia *et al*, 2001), mas é sugestivo da redução do influxo de cálcio.

É sabido que o  $Pb^{++}$  pode atuar como um bloqueador de canal de cálcio do tipo L. Um trabalho desenvolvido por Bernal e colaboradores (1997) demonstra claramente esta propriedade. Estes autores mensuraram a corrente de cálcio na exposição ao

metal (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) e observaram redução progressiva da corrente correspondente ao aumento da concentração de chumbo na solução. Após a lavagem da preparação (retirada do  $\text{Pb}^{++}$ ) a corrente não voltou a seus valores basais, ou seja, mesmo após a retirada do metal os efeitos no canal de cálcio foram irreversíveis.

Entretanto há um paradoxo em nossos resultados: se o chumbo está reduzindo o influxo de cálcio transsarcolemal por que não observamos redução na força contrátil desenvolvida pelos músculos papilares, visto que o miócito necessita deste transiente de cálcio para desencadear a contração (Bers, 2002)?

A interferência do chumbo na cinética do cálcio visualizada em nosso trabalho é descrita por vários autores e pode ser explicada pela analogia biológica entre estes dois íons (Moreira & Moreira 2004). Esta semelhança entre os dois íons é demonstrada em um estudo de Valencia e colaboradores (2001), o qual demonstrou que o chumbo necessita entrar nas células, através dos canais de cálcio do tipo L, para exercer seus efeitos contráteis no músculo liso e uma explicação para os possíveis efeitos deste íon na contratilidade do músculo liso, talvez seja a capacidade do chumbo de substituir o cálcio e mimetizar os efeitos deste íon (Chai & Webb, 1988).

Corroborando com a possibilidade de mimetização do cálcio, o chumbo ( $8\mu\text{M}$ ) promoveu aumento da atividade da ATPase miosínica e da potencialização da resposta a um agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol).

O uso do isoproterenol foi para avaliar a influência da exposição aguda ao chumbo na resposta  $\beta$ -adrenérgica no músculo cardíaco. Estudos realizados com ratos submetidos a tratamentos crônicos com  $\text{Pb}^{++}$  demonstram alterações do tônus simpático central (Boscolo & Carmignani 1988); hiperreatividade de receptores  $\beta_1$  (Carmignani *et. al*, 1999); aumento da resposta cardiovascular aos agonistas  $\beta_{1,2}$  nas células miocárdicas (Boscolo *et. al*, 1979); aumento das catecolaminas circulantes e redução na densidade de  $\beta$ -receptores em artérias (Carsia *et. al*, 1995); e aumento da biodisponibilidade de  $\text{Ca}^{++}$  via AMPc (por ativação  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ -adrenérgica) para a contração, tanto do músculo liso vascular, quanto do músculo cardíaco (Carmignani *et. al*, 2000). Entretanto, é arriscado comparar estes achados da atividade simpática na exposição crônica com os efeitos agudos da exposição ao chumbo.

Um dos efeitos produzidos no miócito pela ativação  $\beta$ -adrenérgica consiste na fosforilação dos canais de cálcio do sarcolema. (McClellan et al., 1995; Bers 2002; Vassallo *et al.*, 2008). Esta fosforilação possibilita a entrada de cálcio por este canal e culmina em efeito inotrópico positivo, claramente visualizado na presença de um  $\beta$ -agonista. Se, realmente, o chumbo entra nas células pelos canais de cálcio do tipo L, como demonstrado por Valencia e colaboradores (2001) e exerce efeitos similares ao cálcio na contração (Chai & Webb, 1988), talvez esta seja a explicação para o incremento da atividade do agonista  $\beta$ -adrenérgico visualizada após 1 hora de exposição ao  $Pb^{++}$ .

Na tentativa de justificar o efeito inotrópico positivo encontrado em nosso trabalho podemos, ainda, considerar a possibilidade de um aumento da atividade dos  $\beta$ -receptores promovido pela exposição aguda ao chumbo, entretanto é inviável acreditarmos no aumento da densidade destes, visto que nossa preparação manteve-se exposta, a este metal, por apenas 1 hora. Supondo a veracidade da primeira afirmação, especula-se que a exposição aguda ao chumbo causou aumento do sincronismo de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, através da fosforilação dos receptores de rianodina, pela proteína cinase A (PKA) (Bers, 2004). Ainda, pode-se especular um aumento da fosforilação dos canais de cálcio do tipo L (Bers, 2002) e da atividade ATPásica da miosínica. Associados, estes fatores, resultariam no aumento do inotropismo cardíaco, visualizado em nossos experimentos.

### 8.3 MEDIDAS BIOQUÍMICAS

A exposição aguda a 8  $\mu\text{M}$  de acetato de chumbo resultou em incremento da atividade da ATPase miosínica avaliada pela determinação da liberação de fosfato ( $\text{P}_i$ ) a partir do ATP. Este resultado explica, mesmo que parcialmente, o efeito inotrópico positivo encontrado em nossos experimentos, evidenciado pelo aumento de força contrátil, da  $dF/dt$  (+), da pressão sistólica intraventricular e da  $dP/dt$  (+). Ainda, auxilia na explicação da redução no tempo de ativação da contração, visto que este parâmetro depende da disponibilidade do cálcio para a contração e da sensibilidade das proteínas contráteis a este.

A atividade ATPásica da miosina (mensurada pela hidrólise da ATP) é dependente do íon cálcio, portanto, esta enzima, na verdade, consiste em uma  $\text{Ca}^{++}$  ATPase miosínica (Moreira et al, 2003). O referido aumento da atividade ATPásica da miosina exposta ao chumbo pode ser devido à capacidade deste íon mimetizar os efeitos do cálcio. Esta ativação de proteínas já foi descrita por Markovac & Goldstein (1988), os quais demonstraram ativação da proteína cinase C (PKC) dependente de cálcio. Chao e colaboradores (1990), também, descreveram a propriedade do chumbo de substituir o cálcio ao demonstrar a ativação da troponina C (TnC) de músculo esquelético por este metal.

Outra medida bioquímica realizada em nosso trabalho consistiu na mensuração da atividade da bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (NKA). As amostras tratadas com  $\text{Pb}^{++}$  apresentaram aumento da atividade ATPásica desta bomba em relação às amostras que não receberam o acetato de  $\text{Pb}^{++}$  8  $\mu\text{M}$ . Este nosso achado está em desacordo com o trabalho de Weiler & Gonick (1990) que demonstra inibição do funcionamento desta bomba em amostras tratadas com  $\text{Pb}^{++}$ .

A inibição do funcionamento da NKA (cujo papel funcional é de retirar sódio da célula ao mesmo tempo em que potássio é transportado para o citosol) determina aumento do  $\text{Na}_i$ . A elevação do  $\text{Na}_i$  dificulta, rápida e intensamente, a troca  $\text{Na}/\text{Ca}$  no estado de repouso, basicamente porque o aumento do  $\text{Na}_i$  diminui o gradiente difusional do  $\text{Na}^+$  através da membrana. Além disso, o trocador possui 2 sítios intracelulares onde se ligam  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A ligação do  $\text{Na}^+$  provoca redução da atividade da troca, enquanto a ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$  a estimula. Com o aumento do  $\text{Na}_i$  reduz-se a atividade da troca  $\text{Na}/\text{Ca}$ , ou seja, a extrusão de cálcio pelo trocador

é reduzida e, conseqüentemente, há aumento da concentração deste íon no citoplasma do miócito, o que se traduzirá pelo aumento da força desenvolvida (Blaustein & Lederer, 1999).

Entretanto, a avaliação da contratilidade através de músculos papilares do VE e da performance ventricular por medidas hemodinâmicas evidenciou o efeito inotrópico positivo resultante da exposição aguda ao chumbo. Portanto, a redução da troca sódio/cálcio, proposta como mecanismo secundário ao aumento da atividade da NKA, não foi capaz de prejudicar o desenvolvimento de força e, talvez, outro mecanismo esteja envolvido na correlação gênese de força e atividade da NKA.

Gelband e colaboradores (1975) demonstraram que a hiperpolarização (pela acetilcolina) foi capaz de resultar em efeito inotrópico positivo e sugeriram que este efeito era devido ao melhor sincronismo da contração dos cardiomiócitos. O aumento da atividade da NKA resulta em hiperpolarização, que por sua vez, aumenta a velocidade de condução elétrica e melhora sua uniformidade temporal. Esta conjuntura favorece o sincronismo da contração da população total de células do coração que possibilita aumento do pico de força desenvolvida, como observado em nosso estudo.

Ocorreu um mecanismo que poderiam prejudicar a gênese da força nos miócitos cardíacos e, conseqüentemente, reduzir o inotropismo: redução do influxo de cálcio transsarcolemal. No entanto, contrariando este fato, houve aumento do inotropismo cardíaco, tanto no músculo isolado, como na avaliação do animal *in vivo*. Deste modo, se agudamente o chumbo promoveu algum efeito deletério, capaz de reduzir a força de contração do músculo cardíaco, este efeito foi contrabalanceado e superado por ativação de outros compensatórios. *In vitro*, pelo aumento da atividade da ATPase miosínica e da NKA e, *in vivo*, pelas alterações neuroendócrinas (catecolaminas), de autacóides (produção de renina) e/ou mecanismos transducionais (NO, AMPc, Ca<sup>++</sup>).

Nosso trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o aumento da pressão ventricular induzida pelo chumbo possui, além do envolvimento vascular, alterações diretas na contratilidade miocárdica. Estas alterações se sumarizam por: efeito inotrópico positivo, alterações no tempo de ativação da contração, redução do influxo de cálcio



transsarcolemal, aumento da atividade da enzima ATPase miosínica e da NKA assim como maior responsividade da preparação ao agonista  $\beta$ -adrenérgico.

Como o trabalho foi realizado com animais experimentais, os mecanismos aqui discutidos não podem ser, totalmente, extrapolados para humanos devido a possíveis diferenças na toxicocinética do metal nas diferentes espécies. Entretanto, é possível o envolvimento dos mesmos mecanismos implicados nas alterações cardiovasculares induzidas pelo  $Pb^{++}$  em ratos e em humanos expostos ocupacionalmente ao metal.

## 9 CONCLUSÃO

- Os animais expostos por um período de 120 minutos ao  $Pb^{++}$  (80  $\mu g$  / dL) apresentaram elevação da pressão sistólica intraventricular e do inotropismo cardíaco, em ambos os ventrículos.
- A frequência cardíaca destes animais manteve-se inalterada.
- A avaliação dos parâmetros contráteis, *in vitro*, apresentou aumento da força contrátil desenvolvida e da  $dF/dt$  positiva confirmando o efeito inotrópico positivo encontrado na avaliação hemodinâmica.
- Em relação aos parâmetros temporais da contração houve redução do tempo de ativação, entretanto o tempo de relaxamento da contração dos papilares manteve-se inalterado.
- A exposição a 8  $\mu M$  de  $Pb^{++}$ , por 1 hora, não promoveu mudanças nas potenciações pós-pausas indicando que não houve alteração na atividade do retículo sarcoplasmático.
- Os registros obtidos após 1 hora de exposição a 8  $\mu M$  de acetato de chumbo mostram redução da potenciação após repouso de 10 minutos. Este achado permite-nos especular a existência de um mecanismo redutor do influxo de cálcio transsarcolemal.
- A exposição aguda ao chumbo, provocou redução, tempo dependente, no pico das contrações tetânicas, no entanto, o platô destas contrações não foi alterado. Este fato é sugestivo de alteração na disponibilidade de cálcio para a contração, talvez pela redução de seu influxo através dos canais de cálcio do tipo L.
- O tratamento agudo com chumbo resultou em potencialização da resposta a um agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol) e aumento da atividade da ATPase miosínica. Estes resultados explicam, ainda que parcialmente, o efeito inotrópico positivo encontrado em nossos experimentos e auxilia no esclarecimento da redução no tempo de ativação da contração, visto que este parâmetro depende da disponibilidade do cálcio para a contração e da sensibilidade das proteínas contráteis a este.

- 
- A capacidade do chumbo de mimetizar o cálcio talvez seja o fator determinante para o aumento da atividade enzimática da ATPase miosínica.
  - As amostras tratadas com  $Pb^{++}$  apresentaram aumento da atividade ATPásica da bomba de sódio e potássio em relação às amostras que não receberam o acetato de  $Pb^{++}$   $8\mu M$ .
  - O aumento da atividade da NKA resulta em hiperpolarização do cardiomiócito, que por sua vez, aumenta a velocidade de condução elétrica e melhora sua uniformidade temporal. Esta conjuntura favorece o sincronismo da contração da população total de células do coração que possibilita aumento do pico de força desenvolvida.
  - Ocorreu um mecanismo que poderia prejudicar a gênese da força nos miócitos cardíacos e, conseqüentemente, reduzir o inotropismo: a redução do influxo de cálcio transsarcolemal. No entanto, contrariando este fato, houve aumento do inotropismo cardíaco, tanto no músculo isolado, como na avaliação do animal *in vivo*. Deste modo, se agudamente o chumbo promoveu algum efeito deletério, capaz de reduzir a força de contração do músculo cardíaco, este efeito foi contrabalanceado e superado por ativação de outros compensatórios.
  - A força de contração apresenta um pequeno incremento, embora o influxo transsarcolemal de cálcio esteja reduzido. Este fato sugere que os miócitos possuem outros mecanismos (aumento da atividade da ATPase miosínica, incremento na resposta  $\beta$ -adrenérgica e melhora do sincronismo da contração) capazes de compensar a ação redutora do influxo de cálcio, culminando em efeito inotrópico positivo.
  - Em conjunto, nossos dados são sugestivos de que o aumento de pressão ventricular induzida pelo chumbo possui, além do envolvimento vascular, alterações diretas na contratilidade miocárdica.

## 10 REFERÊNCIAS

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

\_\_\_\_\_. *Toxicological profile for lead*. United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta; 1995.

Bárány M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of General Physiology* 1967; 50: 197-216.

Batuman V. Lead nephropathy, gout, and hypertension. *American Journal of Medicine. Science* 1993; 305: 241–247.

Bellinger, D., Schwartz, J. Effects of Lead in Children and Adults. In: STEELAND, K., SAVITZ, D.A. A. (Eds.). *Topics in Environmental Epidemiology* 1997; New York: Oxford University Press, cap.14, p. 314 – 349.

Bergdahl IA, Schutz A, Gerhardsson L, Jensen A & Skerfving S. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health* 1997; 23: 359-436.

Bernal J, Lee J, Cribbs LL, Perez-Reyez E. Full Reversal of Pb Block of L-Type Ca Channels Requires Treatment with Heavy Metal Antidotes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 282:172–180.

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

Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004; 37: 417-419.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiological Reviews* 1999; 79: 763-854.

Blaustein, M.P., DiPolo, R e Reeves, JP. Sodium-calcium exchange. Proceedings of the second international conference. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991; 639.

Boscolo P, Finelli VN, Porcelli G, Iannaccone A. The role of occupational exposure to toxic metals on the development of hypertension. In: Perry, R. Ed. Management and Control of Heavy Metals in the Environment. CEP Consultants Edinburgh 1979; 31–42.

Boscolo P., Carmignani M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environmental Health Perspective* 1988; 78: 101–106.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 218-254.

BRASIL. Ministério do Trabalho. *Norma Regulamentadora nº 7*. In: Pimenta, A. L. & Capistrano, F. D., org. Saúde do trabalhador. Hucitec: São Paulo; 1988.

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

Bremel, RD & Weber, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochemistry Biophysics Acta* 1975; 376: 366-374.

Burgues, W. A. *Recognition of health hazards in industry: a review of materials and processes*. 2 ed. New York: *John Wiley e Sons* 1995; p.537.

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

Cappelli, V; Bottinelli, R; Poggesi, C; Moggio, R; Reggiani, C. Shortening velocity and myosin and myofibrillar ATPase activity related to myosin isoenzyme composition during postnatal development in rat myocardium. *Circulation Research* 1989; 65: 446-457.

- Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology* 1999; 44: 105–110.
- Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Niao N, Gioacchino MD, Grilli A, Felaco M. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sciences* 2000; 68: 401–415.
- Carsia RV, Forman D, Hock CE, Nagele RG, Mcillroy PJ. Lead alters growth and reduces angiotensin II receptor density of rat aortic smooth muscle cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1995; 210: 180–190.
- Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Lima MEC, Tavares TM, Waldron HA. Lead poisoning among children from Santo Amaro, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1985; 19: 165-175.
- Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Tavares TM, Costa ACA, Chaves CR, Nascimento LD, Reis MA. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública* 2003; 13:19-23.
- Carvalho, N. Chumbo mata 296 pessoas na Bahia. Disponível em: <http://g1.globo.com/VCnoG1/0,,MUL420526-8491,00.html>. Acessado em: 17 mai. 2008.
- Chai SS, Webb RC. Effects of lead on vascular reactivity *Environmental Health Perspectives* 1988; 78: 85–89.
- Chan, K; Delfert, D; Junger, KD. A direct colorimetric assay for  $Ca^{2+}$  activity. *Annual Biochemistry* 1986; 157: 375-380.
- Chang H, Tsao D, Yu H, Ho C. The Change of  $\beta$ -Adrenergic System in Lead-Induced Hypertension. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000; 164: 127–133.
- Chang HR, Chen SS, Chen TJ, et al. Lymphocyte beta 2-adrenergic receptors and plasma catecholamine levels in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996; 139:1-5.

Chao S, Bu CH, Cheung WY. Activation of troponin C by Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. *Archives of Toxicology* 1990; 64: 490–496.

Claude, D & Swynghedauw, B. A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pflüegers Archives* 1975; 355: 39-47.

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

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

[DNPM] Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2001. Disponível em:<<http://www.dnpm.gov.br/sm2001.html>>. Acesso em 27/mar/2008.

\_\_\_\_\_Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2007. <http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=1063>. Acesso em: 29/ mar/ 2008.

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

Dreher D, Jundon AF. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cellular Physiol* 1995; 162:147–153.

Elinder CG, Friberg L, Kjellström T, Nordberg G, Oberdoerster G. Biological monitoring of metals. *The global environmental epidemiology network* 1994; Geneva: World Health Organization.

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

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

Gelband H, Myerburg RJ, Hoffman, BF, Basset AL. Acetylcholine-Induced Reversal of Canine and Feline Atrial Myocardial Depression during Stretch, Cardiac Failure, and Drug Toxicity. *Circulation Research* 1975; 37: 542-549.

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

[ILZSG]. [International Lead and Zinc Study Group] *Statistic Lead and Zinc*; 2007. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/statistics.asp>>. Acesso em 24/mar/2008.

[IPCS]. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 165.-inorganic lead, Geneva, 300p. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environmental Program, The International Labour Organization, and the World Health Organization; 1995.

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

Jain NB, Potula V, Schwartz J, Vokonas PS, Sparrow D, Wright RO, Nie H, Hu H. Lead Levels and Ischemic Heart Disease in a Prospective Study of Middle-Aged and Elderly Men: the VA Normative Aging Study. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115:871–875.

Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead induced hypertension: Possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension*. 1993; 6: 723 –729.



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

Kurabayashi M, Shibasaki Y, Komuro I, Tsuchimochi H, Yazaki Y. The myosin gene switching in human cardiac hypertrophy. *Japanese Circulation Journal* 1990; 54: 1192-1205.

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

Le-Feng Z, Shuang-Qing P, Sheng W, Bian-Lan L, Gang H, Yan-Sheng D. Direct effects of lead ( $Pb^{2+}$ ) on the relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. *Toxicology Letters* 2007; 170: 104–110.

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1991; 24: 843-846.

Leite, CM, Vassallo, DV, Mill, JG. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1995; 73: 638-643.

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367:1747–1757.

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

Machado, I. P. *Avaliação Ambiental do Processo de Reciclagem de Chumbo*, [Dissertação de Mestrado de Engenharia Mecânica]. Campinas:Unicamp, pp. 144, 2002.

- Markovac J and Goldstein GW. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 1988; 334: 71–73.
- Marques M, Millas I, Jiménez A, García-Colis E, Rodriguez-Feo J, Velasco S, Barrientos A, Casado S; Ló Pez-Farré A. Alteration of the Soluble Guanylate Cyclase System in the Vascular Wall of Lead-Induced Hypertension in Rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001; 12: 2594–2600.
- McClellan G, Weisberg A, Winegrad S. cAMP can raise or lower cardiac actomyosin ATPase activity depending on  $\alpha$ -adrenergic activity. *American Journal of Physiology* 1994; 267: 431-442.
- Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circulation Research* 1981; 49: 525-532.
- Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 399-408.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 109–142.
- Moreira C.M., Oliveira E.M., Bonan C.D., Sarkis J.J., Vassallo D.V. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comparative Biochemistry And Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 2003; 135: 269-275.
- Moreira FR, Moreira JC. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva* 2004; 9: 167-181.
- Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications, *Revista Panamericana del Salud Publica* 2004; 15: 119-129.
- Moss RL, Razumova M, Fitzsimons DP. Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. *Circulation Research* 2004; 94: 1290-1300.

Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 472-482.

Neder, AVF; Cotta, TARG. *Redução dos riscos de exposição ambiental e ocupacional ao chumbo*. Brasília, maio de 1999. Projeto MMA/OPAS. Relatório da 1ª etapa do projeto, 1999.

NHANES III [National Health and Nutrition Examination Survey]. Hond ED, Nawrot T, Staessen JA. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. *Journal of Human Hypertension* 2002; 16: 563–568.

Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney International* 2004; 66: 2329-2336.

Paoliello, M. M. B.; Chasin, A. A. M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental* 2001; v.3. Salvador: CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS-CREA.

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

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

Patrick, L. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. Part 2. *Alternative Medicine Review* 2006; 11: 114-127.

Peters JL, Kubzansky L, McNeely E, Schwartz J, Spiro A, Sparrow D, Wright RO, Nie H, Hu H. Stress as a Potential Modifier of the Impact of Lead Levels on Blood Pressure: The Normative Aging Study. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 1154–1159.

Pirkle JL, Kaufmann RB, Brody DJ, Hickman T, Gunter EW, Paschal DC. Exposure of the US population to lead, 1991–94. *Environmental Health Perspective* 1998; 106: 745–750.

Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *The Journal of Clinical Investigation* 1976; 58: 260-270.

Ringer, SA. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *Journal of Physiology* 1883; 4: 29-47.

Roncal C, Mu W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Nakagawa T, Johnson RJ. Lead, at Low Levels, Accelerates Arteriopathy and Tubulointerstitial Injury in Chronic Kidney Disease. *American Journal Physiology. Renal Physiology* 2007; 293: 1391-1396.

Rossoni LV; Amaral SMC; Vassallo PF; França A; Oliveira EM; Varner KJ; Mill JG; Vassallo DV. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Brazilian Journal of medical and Biological Research* 1999; 32: 987-997.

Rupp H, Berger HJ, Pfeiffer A, Werdan K. Effect of positive inotropic agents on myosin isoenzyme population and mechanical activity of cultured rat heart myocytes. *Circulation Research* 1991; 68: 1164-1173.

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

Silvany-Neto AM, Carvalho FM, Chaves MEC, Brandão AM, Tavares TM. Repeated surveillance of lead poisoning among children. *Science of the Total Environment* 1989;78:178-186.

Skerfving S. Inorganic Lead, pp. 125-238. In BB Lundberg (edit.). *Criteria documents from the Nordic Expert Group* 1993. International Labour Organization, Estocolmo.

Stephens NL & Swynghedauw B. Cardiovascular adaptations to mechanical overload. *Japanese circulation journal* 1990; 93: 1-6.

Stewart WF, Schwartz BS, Simon D, Kelsey K, Todd AC. ApoE genotype, past adult lead exposure, and neurobehavioral function. *Environmental Health Perspective* 2002; 110: 501–505.

Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiological Review* 1986; 66: 710-771.

Tsaih SW, Schwartz J, Lee M, Amarasiriwardena C, Aro A, Sparrow D, Hu H. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 391-396.

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

Valencia I, Castillo EF, Chamorro G, Bobadilla RA, Castillo C. Lead Induces Endothelium- and Ca<sup>2+</sup>-Independent Contraction in Rat Aortic Rings. *Pharmacology & Toxicology* 2001; 89: 177–182.

Vassallo DV, de Carvalho AP. Influence of temperature on isometric contractions of rabbit atria during inotropic interventions. *Acta Physiologica Latinoamericana* 1979; 29: 131-135.

Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM, Mill JG. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacology Research* 1994; 29: 251-260.

Vassallo DV, Mill JG. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana* 1988; 38: 87-97.

Vassallo DV, Oliveira EM, Stefanon I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p 435-469.

Vaziri ND and Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clinical and Experimental*

---

*Pharmacology and Physiology. Frontiers in Research Review: Gaseous Molecules and Radicals in Health and Disease* 2007; 34: 920–925.

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

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

Velema J., Zaagsma J. Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Archives Biochemical and Biophysics* 1981; 212: 678-688.

Vupputuri S, He J, Muntner P, Bazzano LA, Whelton PK, Batuman V. Blood Lead Level Is Associated With Elevated Blood Pressure in Blacks. *Hypertension* 2003; 41: 463-468.

[WHO] World Health Organization. *Human Exposure to Lead. In. Human Exposure Assessment Series*, WHO; 2003.

Weiler E, Gonick H. Effects of lead and low molecular weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium potassium activated ATPase. *Clinical Science* 1990. 79, 185–192.