

**EFEITO DO ÍON CHUMBO NA CONTRAÇÃO
ISOMÉTRICA DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS**

Evandro Carlos Lebarch

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, junho de 2006.**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO ÍON CHUMBO NA CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS

Evandro Carlos Lebarch

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

Aprovado em __/__/2006, por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

Prof. Dra. Ivanita Stefanon, UFES

Prof. Dr. Carlos Estevam Nolf Damiani, UFPR

Coordenador do PPG-CF: _____
Prof. Dr. José Geraldo Mill

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, junho de 2006

Lebarch, Evandro Carlos, 1969

EFEITO DO ÍON CHUMBO NA CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS [Vitória] 2006

XVII, 76p.,29,7 cm (UFES, M Sc, Ciências Fisiológicas, 2006)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1- Chumbo; 2- Contração Isométrica; 3- Metais pesados, 4-Ratos

"A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério."

Einstein

Dedico este trabalho, principalmente a minha filha Ana Clara,
a meus pais Cecília e Felix, a minha segunda mãe Creusa,
ao meu irmão Marcelino *in memoriam*,. Obrigado pelo amor e carinho.

Ao Professor Dalton Valentim Vassallo, minha profunda admiração, grande pesquisador e ser humano magnífico. Chefe, obrigado pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Agradecimentos

A Deus, por tudo o que alcancei na minha vida, pela força e pela realização deste trabalho.

A minha filha Ana Clara, que por muitas vezes ficou sem o “papai”, por estar ocupado me dedicando a este trabalho.

À Profa. Dra. Ivanita Stefanon, minha co-orientadora, que muito me ajudou na realização deste trabalho.

A Doutora Cleci Menezes Moreira, que tanto me ajudou no desenvolvimento e na compreensão dos resultados, tendo paciência jamais vista em um ser humano. Minha sincera admiração.

Aos meus grandes amigos (irmãos) Franck, Giulia, Karina, Adriana, Alessandra e Eduardo. Obrigado pelo apoio e carinho. Os momentos com estes amigos foram de muita alegria e também acompanhadas por algumas partidas de Pebolim com Franck, partidas estas sempre controversas para disputar quem era o “melhor” no “totó Plano”. E que nossa amizade seja eterna.

Aos meus amigos: Élio, Tiago Mello, Patrícia e a todos os outros companheiros do LEMC: Flávia, Raquel, Fabiana, Rita, Carmem, Saulo, Luis, Diego, Altemar, Liliana, Ana Paula, Fabiano, Leo , Carlos e demais colegas.

A Enildo e ao Prof. Dr. José Geraldo Mill, por terem cedido o espaço do laboratório para o equilíbrio do pH da minha solução nutritiva.

Aos funcionários Cláudia, Fonseca e Flávio, pelo apoio Técnico.

A todos os professores da pós-graduação, pelos ensinamentos e amizade.

A todos os amigos e colegas dentro e fora da Pós-graduação.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO	17
1.1. FONTES DE EXPOSIÇÃO.....	19
1.2. Ação do Chumbo em Órgãos e Sistemas.....	20
1.2.1. Efeitos Neurológicos.....	20

1.2.2. Efeitos Renais.....	21
1.2.3. Efeitos Cardiovasculares.....	22
1.3. CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	25
II OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
3.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM MÚSCULO CARDÍACO.....	34
3.2.1. Metodologia para as preparações.....	35
3.2.2. Parâmetros avaliados.....	35
3.2.3. Protocolos experimentais.....	36
3.2.3.1. Efeitos do Pb^{++} sobre a força e parâmetros temporais da contração isométrica do ventrículo direito.....	36
3.2.3.2. Intervenções inotrópicas.....	37
3.2.3.3. Efeitos do Pb^{++} sobre as proteínas contráteis cardíacas.....	37

3.2.3.4. Efeitos do Pb^{++} sobre a atividade da ATPase miosínica.....	38
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3.4. FÁRMACOS E REAGENTES.....	41
IV RESULTADOS.....	42
4.1. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM MÚSCULO CARDÍACO VENTRÍCULO DIREITO.....	42
4.1.1 Efeitos do chumbo (Pb^{++}) sobre a força de contração cardíaca.....	42
4.1.2 Intervenções inotrópicas.....	47
4.1.3 Efeitos do Pb^{++} sobre as contrações tetânicas.....	51
4.1.4 Efeitos do Pb^{++} sobre a atividade da ATPase miosínica.....	52
V	
DISCUSSÃO.....	53
VII CONCLUSÃO.....	59
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 01: Efeitos do Pb^{2+} sobre a força (F) das contrações isométricas no VD de ratos.	43
Tabela 02: Efeitos do Pb^{2+} sobre o tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR) da tensão isométrica desenvolvida pelo VD de ratos.	45
Tabela 03: Efeitos do Pb^{2+} sobre a potenciação relativa (PR) da contração pós-pausa em uma dose de 100 μ M após pausas de 15, 30 e 60 s em contrações dos VD de ratos.	46
Tabela 04: Dependência do desenvolvimento da força isométrica da concentração de cálcio externo na ausência e na presença de Pb^{2+} (100 μ M) evidenciada pelos VD de ratos.	48
Tabela 05: Dependência do desenvolvimento da força isométrica em relação a variação de frequência de estimulação na	50

ausência e na presença de Pb^{2+} (100 μM) em VD de ratos.

Tabela 06	Efeitos do Pb^{2+} sobre a força (F) desenvolvida pelas contrações tetânicas dos VD de ratos.	51
------------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 01: Registro típico mostrando traçado para cálculo do Tempo de Ativação (TA) e do Tempo de Relaxamento (TR).	36
Figura 02: Registros típicos das contrações isométricas em resposta a concentrações crescentes de Pb^{++} em tiras de VD de ratos.	42
Figura 03: Efeitos de diferentes concentrações de Pb^{++} sobre a força isométrica desenvolvida pelas tiras de VD de ratos. Contrações controle em azul escuro e as contrações com Pb^{++} em azul claro.	43
Figura 04: Efeito de concentrações crescentes de Pb^{++} sobre (A) tempo de ativação (TA) e (B) tempo de relaxamento (TR) da contração isométrica das tiras de VD de ratos. Contrações controle em azul escuro e as contrações com Pb^{++} em azul claro.	44
Figura 05: Registros típicos dos efeitos do Pb^{++} sobre a potenciação relativa (PR) da contração pós-pausa obtidas em	46

intervalos de 15, 30 e 60 s em tiras de VD de ratos, antes e após da adição de Pb (100 μ M).

- Figura 06:** Potenciação relativa das contrações pós-pausas com intervalos de pausa de 15, 30 e 60 segundos em tiras de VD de ratos antes e após administração 100 μ M de Pb⁺⁺. Contrações controle em azul escuro e as contrações com Pb⁺⁺ em azul claro 47
- Figura 07:** Efeito da variação da concentração de Ca⁺⁺. (0,62; 1,25 e 2,5 mM) sobre o desenvolvimento da força da contração isométrica, na ausência e presença de Pb⁺⁺ (100 μ M) em tiras de VD de ratos. Contrações controle traçadas em azul escuro e as contrações com Pb⁺⁺ em azul claro 48
- Figura 08:** Efeitos do isoproterenol e do Pb⁺⁺ sobre a força isométrica desenvolvida pelas tiras de VD de ratos superfundidos com solução de tyrode modificada, contendo 0,62 mM Ca²⁺. Contrações controle traçadas em azul escuro, as contrações do Isoproterenol em verde, contrações controle com Pb⁺⁺ em azul claro e as contrações isoproterenol mais Pb⁺⁺ em verde claro. 49
- Figura 09:** Efeitos do Pb⁺⁺ sobre a variação da frequência (Hz) em tiras de VD de ratos. Contrações controle em azul escuro e as contrações com Pb⁺⁺ em azul claro. 50

- Figura 10:** Efeitos do Pb^{++} sobre pico de força **(A)** e platô de força **(B)**, 51
evidenciados pelas contrações tetânicas de VD de ratos. Contrações controle em azul escuro e as contrações com Pb^{++} em azul claro.
- Figura 11:** Alterações na atividade da Ca^{2+} ATPase miosínica 52
expressas em % produzidas pelo Pb^{++} (100 μ M) em ventrículo direito. A porcentagem controle em azul escuro e as com Pb^{++} em azul claro

RESUMO

A intoxicação crônica com chumbo (Pb^{2+}) pode causar hipertensão arterial, mas pouco se sabe a respeito dos seus efeitos diretos sobre a contração do músculo cardíaco. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito agudo de concentrações micromolares de chumbo na contração isométrica do ventrículo direito (VD) de ratos.

Para avaliar esses efeitos, foram utilizadas tiras de VD de ratos Wistar, contraindo isometricamente em solução de Tyrode modificada, tampão HEPES, a 30°C e gaseificada com oxigênio. Os experimentos foram realizados por meio de registros da tensão isométrica, obtidos a partir de estimulações condição-controle (0,5 Hz), na presença e na ausência de diferentes concentrações de Pb^{2+} (Pb^{2+} = 3, 7, 10, 30, 70, 100 e 300 μ M). Os resultados mostraram que o Pb^{2+} reduziu a força de modo concentração-dependente nas concentrações maiores que 30 μ M (Controle 828 ± 66 mN vs. Pb^{2+} 30: $653,6 \pm 51,7^*$ mN, $P < 0,05$), não reduziu os parâmetros temporais, tais como, tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR). Contrações após pausas de estimulação de 15, 30 e 60 s foram registradas e analisadas como potenciação relativa (PR). Sob estimulação na condição-controle, o aumento da concentração de Pb^{2+} produziu contrações menores, porém, com aumento progressivo da potenciação relativa (15'' = Controle: $1,49 \pm 0,03$ vs Pb^{+2} $1,62 \pm 0,06^*$, $P < 0,05$) sugerindo, assim,

que os efeitos do Pb^{2+} são muito mais dependentes do influxo de cálcio pela membrana do que pela liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS).

O efeito do Pb^{2+} (100 μ M) também foi investigado, fazendo-se variar a frequência de estimulação (0.1-1.5 Hz), em diferentes concentrações de Ca^{2+} (0,62; 1,25 e 2,5 mM) e o efeito inotrópico positivo induzido pelo isoproterenol (ISO) (20 ng/ml). Os resultados mostraram que, a força desenvolvida em relação à variação de frequência de estimulação, foi menor do que na condição-controle (0.8 Hz = Controle: 1362,1 \pm 140,4 vs. Pb: 1087,3 \pm 133,1 *, $P < 0,05$). A administração de concentrações crescentes de Ca^{2+} promoveu aumento do desenvolvimento de força do VD. No entanto, após administração de Pb^{2+} (100 μ M), essa força foi reduzida de forma significativa (0,62 mM Controle: 944 \pm 92 vs. Pb: 535 \pm 69*; Controle: 1,25 mM 1514 \pm 144 vs. Pb: 1044 \pm 114*, $P < 0,05$) embora o efeito inotrópico positivo do Ca^{2+} estivesse presente. Por outro lado, o efeito inotrópico negativo induzido pelo Pb^{2+} foi revertido pelo ISO (Controle: 736.15 \pm 87.37 vs Controle + Pb^{2+} : 389.62 \pm 54.59*; Controle+ISO: 975.17 \pm 91.15 vs ISO+ Pb^{2+} : 536.53 \pm 80.59*, $P < 0,05$). Tais resultados sugerem que o efeito induzido pelo Pb^{2+} foi atenuado por esses tratamentos. Assim o influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema, de alguma forma, foi afetado.

Para investigar se o efeito depressor do Pb^{2+} poderia também afetar as proteínas contráteis, foram realizados experimentos sob estimulação tetânica (10 Hz) (Controle: 858,9 \pm 131,7 vs. Pb^{2+} : 607,9 \pm 76,7*, $P < 0,05$). Esses resultados sugerem que, de algum modo, o Pb^{2+} afetou a sensibilidade das proteínas contráteis.

Desde que o desenvolvimento da tensão depende da atividade da ATPase miosínica, o Pb^{2+} poderia estar reduzindo a atividade dessa enzima. O Pb^{2+} foi capaz de reduzir a atividade da Ca^{2+} ATPase miosínica.

Esses resultados sugerem uma ação inotrópica negativa do Pb^{2+} , independente da ação do RS, sendo resultado da redução do influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema reduzindo a atividade da Ca^{2+} ATPase miosínica.

ABSTRACT

The chronic lead (Pb^{2+}) poisoning can cause arterial hypertension; however, its direct effects on the myocardial contractility are unknown. The aim of this study was to assess the acute effect at micromolar concentrations of lead in the isometric contraction of the right ventricle (RV) of rats.

Right ventricle strips (RV) from male Wistar rats, were used in isometric contraction preparations using modified Tyrode's solution, HEPES buffer, at 30°C and gassed with O_2 100%. Experiments were performed with isometric tension recordings elicited at steady-state stimulations (0.5 Hz) in the absence and presence of different concentrations of Pb^{2+} (Pb^{2+} = 3, 7, 10, 30, 70, 100 e 300 μM). Pb^{2+} promoted a reduction in the force of contraction in concentrations higher than 30 μM (Control: 828 ± 66 mN vs. Pb^{2+} 30: $653,6 \pm 51,7^*$ mN, $P < 0,05$). The results showed that Pb^{2+} reduced the force on a concentration-dependent way but did not reduce time parameters, such as, time to peak (TTP) and relaxation time (RT). Post-rest contractions obtained after 15, 30 and 60 s pauses were recorded and analyzed as relative potentiation (15'' = Control: $1,49 \pm 0,03$ vs Pb^{+2} $1,62 \pm 0,06^*$, $P < 0,05$). The increase of Pb^{2+} concentration produced smaller steady-state contractions but, a progressive increase in relative potentiation suggesting that the effects of Pb^{2+} were much more dependent on membrane calcium influx than through calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR).

The effect of Pb^{2+} (100 μM) was also investigated when varying the stimulation rate (0.1-1.5 Hz), at different Ca^{2+} concentrations (0.62; 1.25 and 2.5 mM) and on the positive inotropic effect produced by isoproterenol (ISO) (20 ng/ml). Results showed that when varying the stimulation rate, Pb^{2+} promoted a reduction in the force of contraction in frequencies higher than 0.8 Hz. When calcium concentration was increased to 1.25 and to 2.5 mM, a positive inotropic effect was observed, but after addition of Pb^{+2} (100 μM), force reduction was verified (0,62 mM Control: 944 ± 92 vs. Pb: $535 \pm 69^*$; Control: 1,25 mM 1514 ± 144 vs. Pb: $1044 \pm 114^*$, $P < 0,05$). However, the positive inotropic effects elicited by Ca^{2+} was preserved. Otherwise, the negative inotropic effect elicited by Pb^{2+} was reversed by ISO (Control: 736.15 ± 87.37 vs Control + Pb^{+2} : $389.62 \pm 54.59^*$; Control+ISO: 975.17 ± 91.15 vs ISO+ Pb^{+2} : $536.53 \pm 80.59^*$, $P < 0,05$). Results suggested that the effect induced by Pb^{2+} was

attenuated by these treatments. So, the sarcolemmal Ca^{2+} influx, at some range, was affected.

To investigate if the depressant effect of Pb^{2+} might also affect contractile proteins, experiments were performed with tetanic contractions (10 Hz) (Control: $858,9 \pm 131,7$ vs. Pb^{2+} : $607,9 \pm 76,7^*$, $P < 0,05$). Results suggested that, at some extension, Pb^{2+} affected the sensitivity of the contractile proteins.

Since tension development depends on myosin Ca^{2+} ATPase activity, Pb^{2+} could be reducing the activity of this enzyme. Results showed that Pb^{2+} reduces the myosin Ca^{2+} ATPase activity.

The present results suggest that Pb^{2+} depresses force development, supporting the idea of a reduction of sarcolemmal Ca^{2+} influx, probably acting as a calcium channel blocker, not affecting SR function and reduced the myosin Ca^{2+} ATPase activity.

I - INTRODUÇÃO

O chumbo é um metal pertencente à família IV B da tabela periódica. Seu símbolo é Pb, possui número atômico 82 e massa atômica de 207,2 (IUPAC, 2003). É maleável de cor cinza prateado e se funde com facilidade a $327,5^\circ \text{C}$. Possui alta resistência a corrosão, mas é solúvel em ácido sulfúrico e nítrico. A valência comum para os seus sais é +2, mas forma compostos orgânicos estáveis, no estado de oxidação +4, como o chumbo tetraetila e tetrametila.

A emissão do chumbo ao ambiente pode se por fontes naturais e antropogênicas. As principais fontes naturais são as provenientes da atividade vulcânica e intemperismo geoquímico (WHO, 1995). As emissões de chumbo na atmosfera são bastante elevadas cerca de 330.000 toneladas ao ano e alguns autores consideram apenas que 4% deste chumbo seja proveniente de fontes naturais (emissões vulcânicas, erosão, e depósitos naturais). No entanto, as principais fontes que incrementam a concentração de chumbo no meio-ambiente são geradas principalmente pelas ações antropogênicas, que são derivadas da fabricação e reaproveitamento de baterias; da queima de combustíveis, como a gasolina; da

produção de pigmentos; de alguns medicamentos; da produção de bebidas alcoólicas, cerâmica e cristais (Nriagu & Pacyna, 1988).

A utilização deste metal data desde a antiguidade, onde sua utilização era freqüente na preparação de comidas e bebidas alcoólicas. Os romanos gregos e egípcios foram os primeiros a identificar os malefícios do chumbo e descreveram o plumbismo ou saturnismo (Gilfillan, 1965; Green, 1985; Nriagu, 1983). Nos séculos 18 e 19, na Europa, a intoxicação por chumbo ainda era comum entre os ricos e influentes, devido ao grande consumo de vinho contaminado com chumbo, causando uma doença crônica ocupacional, também conhecida como gota saturnina ou “Doenças do Reis” (Green, 1985).

A contaminação por tintas ricas em sais de chumbo vitimou o pintor Vincent Van Gogh. Os sintomas de debilidade inicial, estomatite com perda dos dentes, recorrente dor abdominal, anemia, pele com aparência acinzentada, neuropatia radial, encefalopatia saturnina, incluindo crises de epilepsia, mudanças progressivas de caráter e períodos de delírios demonstraram a possibilidade de ele ter sido contaminado (Gonzalez & Gonzalez, 1997).

Hoje existem várias fontes de contaminação por chumbo no mundo e ainda continua sendo um significativo problema de saúde (Brody *et al.*, 1994). O chumbo contido nos alimentos, ar, água e solo são os maiores riscos em potencial para contaminação humana, especialmente em adultos jovens e crianças que se contaminam por ingestão de tintas (American Academy of Pediatrics, 1993; ATSDR, 2005).

Na década de 70, a combustão de gasolina era a responsável por 90% das emissões antropogênicas nos EUA. Diante disto foi banida em 1996 pela EPA (Environmental Protection Agency) a utilização de aditivo na gasolina contendo chumbo. No entanto, hoje existem alguns países, como o México, em que este tipo de uso persiste (Romieu, *et al.*, 1995). No Brasil, o chumbo tetraetila não é mais utilizado como antidetonante da gasolina desde 1993, conforme a lei nº 7823/93, que tornou obrigatória a utilização de 22% de etanol como aditivo na gasolina, uma vez que a associação destes compostos compromete o funcionamento dos motores. (Neder & Cotta, 1999).

O efeito do chumbo sobre a saúde humana depende dos níveis e da duração da exposição. Os efeitos vão desde inibições enzimáticas, mudanças morfológicas até a

morte (WHO, 1995). Nas crianças, o efeito tóxico do chumbo atinge o sistema nervoso, enquanto nos adultos a exposição ocupacional leva à neuropatia periférica e a nefropatia crônica. A síntese do heme na hemoglobina também é afetada em alguns casos e parece ser um indicador da intoxicação pelo chumbo, quando da ausência de efeitos químicos clinicamente perceptíveis. O sistema gastrointestinal e reprodutivo também são alvos deste tipo de intoxicação (Moreira & Moreira, 2004). Alguns estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido a relação entre a exposição ao chumbo e o desenvolvimento da Hipertensão Arterial (Moller & Kristensen, 1992)

Vários esforços têm sido feitos para diminuir a contaminação do chumbo no meio ambiente. No México apesar de ter ocorrido um decréscimo de chumbo na gasolina em 300% entre 1981 a 1986, mais de 80% dos automóveis ainda utilizam a gasolina com grande quantidade de chumbo tetraetila, haja vista que a enorme frota de automóveis que foi produzida antes de 1985 e não possuía conversores catalíticos para a utilização da gasolina sem chumbo (Romieu *et al.*, 1995).

Devido a grande importância deste metal para o homem na indústria e, principalmente, ao que se refere à contaminação ambiental, passaremos a apresentar informações mais detalhadas sobre suas principais fontes de exposição e ação nos diversos órgão e sistemas.

1.1 FONTES DE EXPOSIÇÃO

As formas mais comuns de captação do chumbo pelo organismo são a gastrointestinal e a inalatória, sendo mínima a absorção percutânea. Dependendo do tamanho da partícula e solubilidade nos fluidos corporais cerca de 50% do chumbo inalado pode ser absorvido.

O ar é a maior fonte de distribuição antropogênica do chumbo pelo meio ambiente. Essas fontes incluem a combustão de produtos de petróleo com aditivos, fundições, incineradores e algumas indústrias que queimam combustíveis fósseis (WHO, 1995).

Os trabalhadores de fundição, refinarias e indústrias possuem uma exposição prolongada ao chumbo. Os que possuem um alto risco são: os trabalhadores de fundição de bronze, com produtos de borracha, na indústria de plástico, com baterias, os que cortam e soldam o aço, incineradores, que reparam radiadores e aqueles que

trabalham com soldas de chumbo. Esses trabalhadores se expõem por meio da inalação de pó de chumbo ou por exposição secundária pela superfície de suas roupas onde esta substância fica aderida.

O chumbo que contamina a água e a comida, não pode ser observado, degustado ou cheirado. A contaminação da água encanada ocorre quando o pH está mais ácido, facilitando o desprendimento do chumbo das tubulações e soldas, principalmente em antigas construções. O valor máximo permitido em águas para consumo é de 15µg/L (ATSDR, 2005).

A contaminação de alimentos geralmente ocorre em sua produção, processamento e embalagem. Os vegetais podem sofrer captação de chumbo através do solo contaminado, ou através da deposição atmosférica (Mushak, *et al.* 1989).

Devido a grande exposição humana ao chumbo, cada vez mais tem sido observados efeitos em diversos órgãos e sistemas, gerando doenças incapacitantes, e tornando este tipo de exposição uma questão de saúde pública.

1.2 Ação do Chumbo em Órgãos e Sistemas

1.2.1 Efeitos Neurológicos

O sistema nervoso parece ser o mais atingido pela contaminação do chumbo, e as crianças são as mais vulneráveis, devido ao processo de desenvolvimento de todo o sistema e da barreira hemato-encefálica que ainda está incompleta. A intoxicação aguda em altos níveis pode produzir a encefalopatia e seus sintomas como: irritabilidade excessiva, ataxia, convulsões estupor e coma ou morte. A concentração de chumbo no sangue que provoca encefalopatia varia e segue na ordem de 70 a 80 µg/dL. Foi estipulado pelo Centro de Controle de Doenças Americano (CDC, 1978) um limite menor que 10 µg/dL para as crianças, sendo que os que possuem uma exposição continuada a baixos níveis, estão susceptíveis a um déficit de quatro a sete pontos no QI para um incremento de 10 µg/dL de chumbo no sangue (ATSDR, 2005). A exposição ao chumbo em doses abaixo daquelas que produzem os sintomas graves o bastante para ser diagnosticada clinicamente, já demonstra efeitos neuropsicológicos

que podem interferir no desempenho escolar, além de apresentar absenteísmo, dificuldade na leitura, déficit em habilidades motoras finas e vocabulário (Needleman *et al.*, 1979).

Em estudo mais recente, estes déficits em crianças e adolescentes estão relacionados com a concentração de 5 µg/dL de chumbo no sangue (Lanphear *et al.*, 2000).

A concentração de chumbo que revela o início de efeitos adversos à saúde em trabalhadores ainda não é bem conhecida. Sugere-se a existência de anormalidades comportamentais com intoxicação moderada (≤ 70 µg/dL). No entanto, Parkinson *et al.* (1986) encontraram poucas diferenças significativas de comportamento em trabalhadores expostos e não expostos ao chumbo nestas concentrações. Em metanálise realizada por Goodman *et al.* (2002) não foram encontrados dados conclusivos acerca das alterações comportamentais com chumbo abaixo de 70 µg/dL.

A encefalopatia em adultos pode ocorrer em níveis extremamente altos 460 µg/dL (Kehoe 1961).

1.2.2 Efeitos Renais

Tanto a exposição aguda ao chumbo, quanto a crônica causam efeitos renais. A intoxicação aguda em altas doses é caracterizada por diminuição da reabsorção de pequenas moléculas e compostos no túbulo renal, em particular aminoácidos, glicose e fosfato. Estes efeitos podem ser reversíveis. Entretanto, na exposição crônica ocorrem danos tóxicos irreversíveis, levando a nefropatia crônica (WHO, 1995; ATSDR, 2005).

Historicamente, a gota foi associada a vários pacientes com intoxicação pelo chumbo (Batuman 1993). Estudos recentes em trabalhadores expostos associaram medidas de chumbo com níveis de ácido úrico sérico (Ehrlich *et al.* 1998; Wang *et al.* 2002). O chumbo sanguíneo provoca a diminuição da filtração glomerular e da secreção tubular. O aumento de ácido úrico sérico parece não ser o único mecanismo da toxicidade renal pelo chumbo (Shadick *et al.* 2000; Weaver *et al.* 2005).

Na gota saturnínica, embora as taxas de formação de ácido úrico sejam normais, o depósito nas articulações se torna elevado devido a conseqüente função tubular reduzida, resultado da hiperuricemia (Moreira & Moreira, 2004, ATSDR,2005).

Muitos mecanismos para os efeitos adversos do chumbo nos rins e sua ligação direta com o sistema vascular têm sido propostos (Nolan and Shaikh 1992; Sanchez-Fructuoso *et al.* 2002; Vaziri 2002). Um número de investigações tem demonstrado que a estimulação do nervo simpático renal ou catecolaminas induz ao aumento da renina plasmática mediada pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos intrarenais (Keeton & Capbell, 1981). Tsao *et al.* (2000) sugerem que o aumento da renina plasmática está significativamente relacionado ao aumento do número de receptores β -adrenérgicos renais em animais expostos ao chumbo. O aumento da renina plasmática ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), e a angiotensina II liberada inicia mecanismos responsáveis por um aumento na pressão arterial (Garovic & Textor, 2005).

1.2.3 Efeitos Cardiovasculares

Alguns estudos têm demonstrado que somente exposição a baixos níveis de chumbo causa Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) (Sharp *et al.*, 1987; Harlan, 1988). Perry *et al.* (1988) observaram que exposição a 0,1 a 100 ppm de chumbo, que são níveis semelhantes ao encontrados no ambiente, promove aumento da Pressão Arterial Sistólica em ratos. Este dado foi encontrado também em homens americanos (Harlan, 1988). Vupputuri *et al.* (2003), examinando a concentração de chumbo e a pressão sanguínea de 14.952 indivíduos brancos e negros através de um estudo epidemiológico, Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), conduzido entre 1988 e 1994, observou uma correlação positiva entre concentração de chumbo e pressão sanguínea aumentada em mulheres e homens negros.

Os mecanismos pelos qual o chumbo leva a hipertensão arterial sistêmica têm sido amplamente investigados. Piccinini *et al.* (1977) observaram que o chumbo, administrado de forma crônica, promove aumento da contratilidade vascular pelo aumento da concentração de cálcio [Ca^{++}] intracelular da fibra muscular lisa vascular. Já Weiler *et al.* (1990) observaram o efeito inibitório do chumbo sobre a Na^+/K^+ ATPase, levando a alteração no transporte de Na^+ e, conseqüentemente, elevando a [Ca^{+2}] intracelular na fibra muscular lisa (Blaustein *et al.*, 1977).

A redução da formação do Óxido Nítrico (NO) pela inibição de sua síntese ou diminuição da biodisponibilidade causa severa hipertensão arterial, porquanto que possui papel importante na regulação da pressão arterial por promover vasodilatação.

O ânion Superóxido e outras espécies reativas de oxigênio produzem oxidação do NO em peróxinitrito (ONOO^-), pois é vasoconstritor, e também altamente citotóxico, podendo modificar proteínas, lipídios, DNA e outras moléculas (Halliwell, 1997). Vaziri *et al.* (2001) demonstraram que ratos tratados com chumbo por 12 semanas apresentavam hipertensão e redução da excreção urinária de metabólitos do NO (NO_x), ocorrendo a diminuição da sua biodisponibilidade. O tratamento com um mimético da superóxido dismutase, o agente tempol, melhorou a hipertensão produzida, assim como a excreção de NO_x , causando “up-regulation” das sintases do NO.

Khalil-Manesh *et al.*, (1993) encontraram em ratos tratados por 12 meses com baixas concentrações de chumbo (0,01%) aumento da pressão arterial sugerindo que este resultado é devido a um aumento de endotelina 3 (ET-3, vasoconstritora), e também a uma redução de fatores vasorrelaxantes derivados do endotélio (observados indiretamente pela diminuição de GMPc). E também foi observado que ratos tratados com alta concentração de chumbo (0,5%) por 3 meses a pressão arterial não se alterou e, por 12 meses, houve redução da pressão arterial talvez devido a uma redução dos fatores contráteis derivados do endotélio (endotelina 1, ET 3).

Courtois *et al* (2003) analisaram que incubando segmentos aórticos de ratos com chumbo, ocorria a participação da via ciclooxigenase-2 (COX-2) e das espécies reativas de oxigênio em promover uma “downregulation” da subunidade β_1 da porção solúvel da guanilil ciclase (sGC- β_1) no músculo liso vascular. Sendo que, ocorre redução de maneira dose dependente a expressão desta proteína, que era parcialmente revertido pela vitamina C e por inibidores seletivos da COX-2 (Rofecoxib), sugerindo o papel das espécies reativas de oxigênio e da COX-2 na patologia da hipertensão produzida pelo chumbo.

Alguns estudos, em que foram utilizadas concentrações de chumbo de forma aguda no sistema cardiovascular, apresentaram resultados contraditórios, Shelkovnikov & Gonick (2001) mostraram em seu experimento que o chumbo só alterou as contrações induzidas no leito aórtico incubadas em altas concentrações de chumbo e com concentrações de cálcio acima das encontradas fisiologicamente.

A exposição ocupacional ao chumbo tem sido descrita como um fator que prejudica o sistema cardiovascular (Sokas *et al.*, 1997). Boscolo & Carmignani (1988) investigaram o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNS) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O chumbo aumenta o tônus e a

hiperatividade vascular por estimular a responsividade dos receptores α_2 -adrenérgicos periféricos. Ocorre também o aumento da concentração plasmática de aldosterona, por efeitos diretos do chumbo sobre a Na/K-ATPase do túbulo renal, que por sua vez, alterando a homeostasia do sódio, influencia a síntese e liberação de renina.

Carmignani *et al.* (1999) expuseram ratos a 60 ppm de chumbo observando aumento na pressão sistólica e diastólica, aumento no inotropismo cardíaco e na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), sugerindo um aumento da angiotensina II (vasoconstritor) e diminuição da bradicinina (vasodilatador). Este mesmo grupo de pesquisadores observou que esta mesma concentração de chumbo também é capaz de afetar seletivamente as vias neuroendócrina (ex: catecolaminas), autacoidal (ex: calicreína-cinina e sistema renina angiotensina) e transducional (ex: AMPcíclico, cálcio) que envolvem a função cardiovascular (Carmignani *et al.*, 2000).

O chumbo parece induzir a HA por meio de mecanismos que envolvem componentes neurogênicos centrais e periféricos. Entre os mecanismos neurogênicos centrais, o chumbo promove hiperreatividade do sistema nervoso simpático (SNS), redução da sensibilidade do barorreflexo com redução do tônus parassimpático (Boscolo & Carmignani, 1988; Boscolo *et al.*, 1992). Em relação aos mecanismos neurogênicos periféricos, o chumbo promove o aumento de catecolaminas e do SRAA (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani *et al.*, 2000). O conseqüente aumento da produção de aldosterona (Goodfriend *et al.*, 1995), associado à inibição da Na⁺/K⁺ ATPase (Glenn *et al.*, 2001) e o aumento das espécies reativas de oxigênio (Gonick *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 1997) são fatores importantes pelo qual o chumbo leva a HAS.

Chang *et al.* (1997) demonstraram que a exposição a altos níveis de chumbo, em ratos, promove aumento das catecolaminas plasmáticas, mas reduz o número de receptores beta-adrenérgicos vasculares, responsáveis pelo relaxamento, induzindo à diminuição do AMPc nos vasos sanguíneos. Os autores sugerem que o aumento destas catecolaminas plasmáticas estão relacionadas com a diminuição da responsividade dos receptores beta-adrenérgicos. Já Carsia *et al.*, (1995) observaram que o chumbo não promove alterações nos receptores alfa e beta-adrenérgicos, mas reduz o número de receptores AT1.

Além das alterações citadas acima, o chumbo pode promover alterações cardíacas diretas de forma aguda. Williams *et al.*, (1983) encontraram um efeito inotrópico negativo em corações isolados e um aumento no intervalo PR. Estes efeitos

poderiam se dever a uma possível alteração do chumbo na liberação do neurotransmissor, requerida por cálcio nos nervos autonômicos do coração. Já a administração intravenosa do chumbo (*in vivo*) produziu apenas uma pequena alteração do intervalo PR, sugerindo, desta forma, a existência de um mecanismo protetor no animal intacto.

Os estudos dos efeitos do chumbo sobre a contratilidade miocárdica não demonstram claramente como essas alterações poderiam contribuir para as ações nocivas diretamente no músculo cardíaco. Devido a isso, o presente trabalho investigou as ações desse metal sobre a contratilidade do ventrículo direito de ratos.

No entanto, para melhor compreensão dos resultados apresentados nesse trabalho, se faz necessário o entendimento dos mecanismos que envolvem a contratilidade miocárdica.

1.3 Contratilidade Miocárdica

O músculo cardíaco é formado por células contráteis especializadas e são conhecidas como miócito ou cardiomiócito (Brilla *et al.* 1991). O miócito é revestido por uma camada externa chamada sarcolema. Esta membrana possui estruturas especializadas: os túbulos transversos e discos intercalados. Na parte mais externa da membrana temos o glicocálce constituído principalmente por polissacarídeos. Esta estrutura possui aproximadamente 50 nm de espessura, rica em sítios aniônicos e é importante para a ligação de vários íons, incluindo o Cálcio (Ca^{++}) (Ferrari, 2002).

Os túbulos transversos (túbulos-T) são invaginações do sarcolema, aumentando a superfície celular. O sistema de túbulos-T não é um sistema transversal simples, mas é um sistema complexo que se ramifica com elementos transversais e longitudinais (Forbes *et al.*, 1984). Esses túbulos possuem papel importante na modulação da contração, principalmente no que se refere à entrada e saída do Ca^{++} da célula. O trocador sódio-cálcio (NCX- Sodium Calcium Exchange), presente nos túbulos-T, parece possuir papel importante nesta modulação (Brette & Orchard, 2003). Próximos aos túbulos-T, temos o retículo sarcoplasmático (RS) que é uma estrutura delineada por uma bicamada lipídica semelhante ao sarcolema. O papel do RS é basicamente liberar e recaptar cálcio do meio intracelular, influenciando na contração e relaxamento do

músculo cardíaco (Moorman *et al.*,1995). A junção entre um túbulo transverso e duas cisternas laterais do RS recebe o nome de tríade (Blaustein & Lederer, 1999).

Acidentalmente, Ringer, em 1883, observou que o coração de batráquios parava de bater quando eles eram emersos em solução que não possuía o íon Ca^{++} . A força contrátil do músculo cardíaco depende do Ca^{++} extracelular. Esse cálcio, proveniente do influxo dos canais Ca^{++} do Tipo-L do sarcolema, possui papel importante na liberação do Ca^{++} dos estoques do RS, contribuindo em grande parte para o aumento da concentração de Ca^{++} intracelular. Cerca de 70 % do Ca^{++} liberado para o citosol, para o desenvolvimento de força máxima, é oriunda do RS. Os outros 30 % são resultantes do influxo deste íon através do sarcolema (Sperelakis *et al.*, 1996). A resposta de liberação do cálcio dos estoques do RS, iniciada pelo influxo de cálcio, é conhecida como liberação de cálcio-cálcio induzida, (CICR - *calcium induced calcium release*) (Fabiato, 1983).

No retículo sarcoplasmático são conhecidos dois tipos diferentes de canais, chamados de receptores de rianodina (RyR) e receptores de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). A densidade dos receptores de RyR é significativamente maior que os IP3. O IP3 pode provocar a liberação de Ca^{++} do RS do músculo liso e do retículo endoplasmático em muitos tipos de célula (Perez *et al.*,1997, Lipp *et al.*,2000). Embora as concentrações elevadas de IP3 possam causar a liberação de Ca^{++} em miócitos cardíacos (particularmente nos atriais, que possuem mais receptores IP3), a quantidade de liberação de Ca^{++} é menor do que para os receptores de RyR no processo de CICR. Embora os agonistas α_1 -adrenérgicos cardíacos aumentem a produção de IP3 e a força contrátil, esse efeito inotrópico é mediado mais pela proteína quinase C (PKC), do que pelo IP3 (Endoh,1996, Gambassi *et al.*,1998). Já os RyR são os mais importantes para o mecanismo de acoplamento excitação-contração (Marks, 1997). O RyR sensível ao cálcio está imediatamente vicinal ao canal de cálcio do tipo-L na membrana sarcolemal (Cheng *et al.*,1993). O receptor de RyR é formado por uma estrutura tetramérica compreendida por quatro subunidades monoméricas com aproximadamente 600.000 daltons e possuem uma condutância 10 vezes maior que os canais de Ca^{++} e de Na^+ (Marks, 2000). Como os receptores de rianodina, os receptores de IP3 também são estruturas tetraméricas, cada uma das 4 subunidades constitui-se de um domínio citosólico e de 2 segmentos trans-membrana α -helicoidal. Apesar de apresentar um tamanho menor, o receptor IP3 é funcionalmente homólogo ao receptor de rianodina.

As quatro subunidades, em ambos os receptores, formam um poro através do qual o cálcio ativador pode ser liberado quando o canal é aberto (Tsien & Tsien, 1990; Katz, 1996).

No processo de relaxamento muscular, o íon cálcio é recaptado para o RS pela atividade de uma bomba chamada Retículo Sarcoendoplasmática Ca^{++} ATPase (SERCA), que constitui quase 90 % do conteúdo protéico do RS. O peso desta proteína é de aproximadamente 110 KDa e se estende na membrana do RS de tal maneira, que a parte dela se projeta realmente no citosol. A isoforma 2 é a forma cardíaca dominante (Loukianov *et al.*, 1998).

Fazendo parte da estrutura intracelular do miócito, encontramos as miofibrilas, compostas de pequenas estruturas repetitivas denominadas “sarcômeros”. Essa estrutura é limitada por duas linhas Z e possui aproximadamente 2,2 μ m de comprimento, quando o sarcômero está em repouso. Entre as linhas Z, temos as regiões claras (banda I) e as regiões escuras (banda A). A banda I é isotrópica (não desvia a luz polarizada) e é formada por filamentos finos de actina que ligam as linhas Z. A banda A, que é anisotrópica (desvia a luz polarizada), é formada por filamentos grossos de miosina. Na região central destes filamentos grossos, encontramos a linha M. Na banda A, em sua porção lateral, temos a sobreposição dos filamentos de actina e miosina. Na porção central, encontramos somente filamentos de miosina chamada de banda H. (Rayment *et al.*, 1993; Obermann *et al.*, 1995) Envolvendo o filamento grosso, e formando o filamento conexão com a linha Z, temos a titina. A interação desses filamentos finos e grossos desenvolve a força ativa na contração muscular, e os filamentos de titina desenvolvem a força passiva (Granzier & Irving, 1995).

Na constituição protéica do sarcômeros, temos a α - actinina que compõe basicamente a estrutura do Disco Z (borda do sarcômero). Essa proteína liga a titina a actina, tornando o Disco Z ponto de ancoramento destas proteínas. (Young *et al.*, 1998).

A miosina, que faz parte do filamento grosso das proteínas contráteis, é uma proteína hexamérica e se subdivide em dois segmentos: a meromiosina leve e a meromiosina pesada. A meromiosina leve é formadora, principalmente, de uma longa cauda com aproximadamente 130 nm de comprimento, com estrutura α -helicoidal. A meromiosina pesada é importante na formação da cabeça globular, possuindo atividade ATPase e se subdivide em dois subfragmentos: o subfragmento 1 (S1) e o

subfragmento 2 (S2). O S1 contém locais para a hidrólise do ATP, importante no mecanismo da contração muscular e faz parte da cabeça globular da miosina. O S2 representa, basicamente, a parte caudal da miosina. Associada às cabeças de miosina, existem duas cadeias leves que têm como função principal a regulação da hidrólise do ATP (Rayment *et al.*, 1993; Warshaw *et al.*, 1996; Morano *et al.*, 1996).

O filamento fino é constituído de actina, troponina e tropomiosina. Essas duas últimas proteínas são importantes mediadores da contração cardíaca (Michele *et al.*, 1999). O principal constituinte do filamento fino é a actina-G (Globular), que se converte, em presença de ATP, rapidamente à temperatura fisiológica (37° C) em actina-F (Fibrilar) (Barany & de Tombe, 2004).

A Troponina C (TnC) junto com a Troponina I (TnI), Troponina T (TnT) e Tropomiosina (Tm) formam o sistema regulatório do aparelho contrátil. Os filamentos de actina e miosina têm uma grande afinidade e ligam-se facilmente sem a presença do complexo TnI/Tm. Nota-se que esse complexo impede a ligação na ausência de Ca^{++} . O mecanismo de liberação do sítio de ligação actina/miosina começa com a chegada do potencial de ação à membrana do músculo, promovendo a entrada maciça de íons Ca^{++} . Esse íon se liga à troponina C, causando uma mudança conformacional da mesma, que se reflete na molécula de tropomiosina, liberando então, os sítios da actina que estavam bloqueados. A interação actina/miosina se dá imediatamente desde que haja ATP e magnésio (ambos presentes em condições normais). A contração ocorre quando a cabeça da miosina do filamento grosso interage com o filamento fino da actina, causando um deslizamento entre estes dois filamentos, encurtando o sarcômero (Reinach *et al.*, 1997).

A miosina pode interagir com a actina em presença de cálcio, aumentando a possibilidade da ATPase da miosina em hidrolisar o ATP, sendo esta energia química estocada no ATP que se transforma em energia mecânica e trabalho. A teoria do deslizamento que compõe o modelo físico para esta transdução vieram dos trabalhos realizados por Huxley, em 1969, utilizando técnica de difração de raio-X, e dos estudos de perturbação mecânica (Huxley & Simmons, 1971). Quando em repouso, as cabeças de miosina (ou pontes cruzadas) se estendem desde os filamentos grossos perpendicularmente ao longo do eixo do filamento fino. Sob ativação, a ponte cruzada pode interagir com os filamentos finos e produzir tanto geração de força, como um movimento relativo do filamento através da rotação da

cabeça de miosina. A força isométrica poderia ser análoga ao armazenamento da energia potencial dessa rotação da cabeça de miosina temporariamente em um componente elástico da molécula de miosina. Os passos químicos envolvidos no ciclo das pontes cruzadas foram caracterizados extensivamente por Goldman & Brenner (1987). A miosina (M) em repouso está complexada com o ATP(M-ATP) ou em rápido equilíbrio M-ADP-Pi onde este ATP é hidrolisado tecnicamente, mas a energia não foi usada. Como a $[Ca]_i$ aumenta, M-ADP-Pi pode interagir com a actina e o fosfato é rapidamente liberado. A afinidade da miosina pela actina aumenta ao longo desta série de passos e é mais forte após a dissociação do ADP (isto é A-M). Entretanto, em $[ATP]_i$ normal A-M liga ATP rapidamente e isto induz a dissociação da actina e M-ATP. O ciclo pode continuar até a $[Ca]_i$ declinar, entretanto, a interação do filamento cessa (no estado M-ADP-Pi), ou até o ATP ser depletado.

A contração do músculo cardíaco começa por um rápido aumento da concentração de cálcio intracelular. Quando o miócito é eletricamente estimulado, ocorre entrada deste íon pelos canais de cálcio ativados por despolarização. O miócito cardíaco exhibe dois tipos de canais de Ca^{++} voltagem-dependente: o tipo-L e o tipo-T. A corrente de Ca^{++} (I_{Ca}) dos canais do tipo-T é insignificante na maioria dos miócitos ventriculares. Geralmente, quando se refere a I_{Ca} , esta é resultante dos canais de cálcio do tipo-L. Os canais de Ca^{++} do tipo-L são ativados e desativados por potenciais de membrana (E_m) mais positivos e são desativados mais lentamente. Em contraste, os canais de cálcio tipo-T ativam e desativam com E_m mais negativos e sendo mais transientes e menos sensíveis ao bloqueio com dihidropiridinas. A inativação da I_{Ca} depende dos níveis citosólicos de Ca^{++} e da quantidade de entrada de Ca^{++} durante o potencial de ação cardíaco. Esse efeito é mediado pela calmodulina ligada ao terminal carboxila do canal de Ca^{++} do tipo-L (Peterson *et al.*, 1999, Zühlke *et al.*, 1999, Hirano *et al.*, 1989, Mehrke *et al.*, 1994). O cálcio intracelular liga-se à proteína Troponina C (TnC) do miofilamento, o que traduz em contração da maquinaria contrátil. Já o processo de relaxamento é resultante da diminuição da concentração do cálcio intracelular e sua dissociação com a TnC (Bers, 2002).

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem medeiam o influxo do cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares, tais como a contração, secreção, neurotransmissão e a expressão gênica. Sua atividade é

essencial para acoplar sinais elétricos nos eventos fisiológicos e superfície celular. São membros das super famílias de genes das proteínas transmembranas dos canais iônicos que incluem os canais de sódio e potássio voltagens dependentes. Esses canais de cálcio são caracterizados bioquimicamente por um complexo de proteínas, composto de quatro ou cinco subunidades. Os canais de cálcio tipo-L requerem uma forte despolarização para sua ativação, sendo bloqueados por antagonistas, incluindo dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzodiazepinas. São presentes em células musculares e endócrinas, onde regulam a contração e a secreção (Catterall, 2003). Os canais de Ca^{++} do tipo-L estão em sua maioria concentrados nos túbulos-T, principalmente em ventrículos de ratos, quando comparado à superfície sarcolemal. Já os canais de rianodina do retículo sarcoplasmático estão concentrados muito próximos a esses túbulos, mostrando a importância do túbulo-T no acoplamento excitação-contracção (Frank *et al.*, 1992; Takagishi *et al.*, 2000).

Uma das formas que faz com que se aumente a força da contração do músculo cardíaco é a estimulação β -adrenérgica. No coração dos mamíferos, o agente isoproterenol, um agonista β -adrenérgico não seletivo, faz aumentar a contratilidade, a frequência cardíaca e a amplitude do potencial de ação cardíaco. O aumento na I_{Ca} não é causado apenas pelo aumento da condutância ou número de canais funcionais, mas por um aumento no tempo e probabilidade de abertura desses canais. A subdivisão clássica dos receptores β -adrenérgicos define o subtipo β_1 , que estimula o músculo cardíaco e o subtipo β_2 , que estimula o músculo liso. Ambos, β_1 e β_2 , ativam a proteína G estimulatória (Gs) que eleva a adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), possuindo distintas sinalizações, sendo que β_1 diminui a contratilidade do músculo liso, e o β_2 aumenta a contratilidade no músculo cardíaco. Entretanto, os receptores β_1 relaxam o sistema venoso, e o receptor β_2 estimula a contratilidade cardíaca (mesmo predominando β_1 no músculo cardíaco), promovendo o estímulo mais forte para a função cardíaca (Chruscinski *et al.*, 2001). Os receptores β_3 são encontrados principalmente em tecidos adiposos (Krief *et al.* 1993). Um quarto tipo também é postulado: é o receptor β_4 , que parece estar ligado a efeitos cárdioestimulatórios (Kaumann *et al.*, 1998).

O isoproterenol aumenta I_{Ca} por aumentar o nível de AMPc (Yatani *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1993). A sinalização dos receptores β -adrenérgicos é feita pela ativação da adenilato ciclase via proteínas Gs, resultando em aumento do AMPc. O primeiro alvo do

AMPC é a proteína quinase A (PKA), que fosforila várias proteínas essenciais para a função cardíaca, como canais de cálcio tipo-L, fosfolambam, TnI, receptores de rianodina, proteína ligante de miosina (MyBP-C) e a proteína fosfatase inibitória-1. Isso afeta a contratilidade do cardiomiócito, aumentando o influxo de Ca^{++} pelo canal de cálcio tipo-L, a recaptação do retículo sarcoplasmático (fosfolambam e SERCA) e modula a sensibilidade do miofilamento ao Ca^{++} (TnI e MyBP-C) (Strang *et al.*, 1994; Lohse *et al.*, 2003).

As proteínas G, acopladas aos receptores β -adrenérgicos, são membros das superfamílias das GTPases, constituem uma família de proteínas heterotriméricas. São compostas de subunidades α , β e γ . As unidades β e γ atuam como uma única subunidade funcional. A subunidade α se divide em duas unidades α : α_s , que estimulam e a α_i , que possuem efeito inibitório. A *guanossina difosfato* (GDP), está ligada à subunidade $G\alpha$. Na condição de repouso, o acoplamento do primeiro mensageiro β -adrenérgico ao seu receptor ativa o sistema, deslocando GDP pelo GTP. A subunidade estimulatória (α_s) de G_s se combina com GTP e, em conseqüência, se separa das duas outras subunidades para promover a ativação da adenilato ciclase e formação do *AMPC* (Gao *et al.*, 1998).

A capacidade do músculo cardíaco de encurtar e desenvolver tensão depende também do estado inicial do comprimento do sarcômero, sendo denominada “Lei de Frank-Starling” sendo conhecido como mecanismo heterométrico. Ela faz parte de um dos mecanismos que regulam a contratilidade cardíaca. Os mecanismos que alteram a força de contração a partir do cálcio intracelular e da afinidade da maquinaria contrátil chamam-se mecanismo homeométrico e são modificados a partir da ativação do sistema nervoso simpático, variação da freqüência de estimulação cardíaca. (Vassallo & Tucci, 1978).

Os estudos descritos neste trabalho demonstram os efeitos tóxicos do chumbo em diversos órgãos e sistemas. A exposição deste metal de forma crônica em baixas concentrações, no sistema cardiovascular, causa um aumento da pressão arterial. Sendo assim, alguns mecanismos foram propostos: aumento dos componentes vasoconstritores (endotelina 3), diminuição da biodisponibilidade do NO (vasorelaxante), alteração no Sistema Nervoso Autônomo Simpático, alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona e aumento da responsividade do receptores

α 2-adrenérgicos periféricos. Esses estudos ainda são controversos quando nos referimos à ação do chumbo em relação à hipertensão arterial causada na população em geral (Dolenc *et al.*, 1993). Destes trabalhos apresentados, ainda existe uma lacuna no que se refere aos efeitos do Pb^{++} de forma aguda no músculo cardíaco.

Levando em consideração a escassez de estudos relacionados ao íon chumbo de forma aguda na contratilidade miocárdica, o objetivo principal desse trabalho é verificar os possíveis efeitos da administração direta desse íon no ventrículo direito de ratos, assim como, propor um possível mecanismo de ação desse poluente ambiental tão freqüente nos dias atuais e capaz de causar sérios problemas de saúde à população.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram divididos em duas etapas de estudo:

A primeira etapa do trabalho teve como objetivo o estudo dos possíveis efeitos do Pb^{++} sobre as atividades mecânicas do coração de rato. Os protocolos foram desenvolvidos, objetivando elucidar os possíveis mecanismos de ação do Pb^{++} .

A segunda etapa teve como objetivo averiguar os possíveis efeitos do Pb^{++} sobre a atividade ATPase miosínica

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar os possíveis efeitos agudos do Pb^{++} sobre a atividade mecânica do coração em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Estudar o efeito inotrópico do Pb^{++} em concentrações únicas e/ou cumulativas, sobre a amplitude e sobre os parâmetros temporais da contração isométrica em tiras de VD de ratos.

2.2.2. Estudar a possível relação do efeito inotrópico do Pb^{++} e sua possível interação com intervenções inotrópicas no músculo cardíaco.

2.2.3. Averiguar um possível efeito do Pb^{++} sobre as proteínas contráteis do músculo cardíaco, usando-se, para tal, o desenvolvimento de contração tetânica na ausência e na presença do Pb^{++} e averiguar um possível efeito do Pb^{++} sobre a atividade da ATPase miosínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 250-300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso a ração e água.

Todos os experimentos realizados neste estudo seguiram os princípios da legislação e ética da experimentação animal de acordo com o Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - 1991)

3.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM MÚSCULO CARDÍACO

3.2.1. Metodologia para as preparações

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg, ip). Após um tempo aproximado de 10 minutos, era realizada a toracotomia. Os corações eram removidos rapidamente e levados à perfusão através do coto aórtico para permitir adequada seleção e dissecação do ventrículo direito (VD), sendo então, seccionado em duas tiras de forma longitudinal, obtendo um máximo de comprimento. As preparações eram, então, montadas em câmaras de vidro com volume de 50 ml e continuamente superfundidas com solução de Tyrode modificada, composta por (em mM): NaCl 120; KCl 5,4; MgCl₂ 6H₂O 1,2; CaCl₂ 2H₂O 1,25; Tampão HEPES 20; Glicose 11. O pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 4 M, os experimentos eram realizados a 29 ± 1°C e continuamente gaseificada com oxigênio (Vassallo *et al.*, 1994).

As tiras de VD eram estiradas até L_{max} (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima) e estimuladas por pulsos retangulares (10 a 15 V, duração de 12 ms) através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A frequência de estimulação padrão era de 0,5 Hz (condição-estabilizada). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de 60 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais. A força desenvolvida (F) era medida por meio de transdutor de força isométrica (Nihon-Kohden, TB 612T, Tokyo) e registrados em polígrafo (Nihon-Kohden, RM 6200, Tokyo), normalizadas através do peso. A força resultante foi expressa em mN. Essa força é calculada multiplicando-se o peso do VD em mg pela aceleração da gravidade (9,81 m/s²).

3.2.2. Parâmetros avaliados

Foram analisados os seguintes parâmetros: pico de força isométrica (F), potenciação relativa (PR) obtida após pausas de 15, 30 e 60 s, antes e após tratamento com Pb⁺⁺ sob estimulação a 0,5 Hz. Para o cálculo do tempo de ativação e do tempo de relaxamento, era traçada uma linha na base do registro e uma linha vertical através do pico do registro realizado nas diferentes condições testadas.

Em seguida, procedia-se a contagem dos milímetros desde a interseção dessas linhas para a esquerda (TA) e para a direita (TR) até o encontro com a linha do

registro. Os valores do tempo eram obtidos de acordo com a velocidade do papel que era dado em milímetros e transformados em ms. (Figura 1).

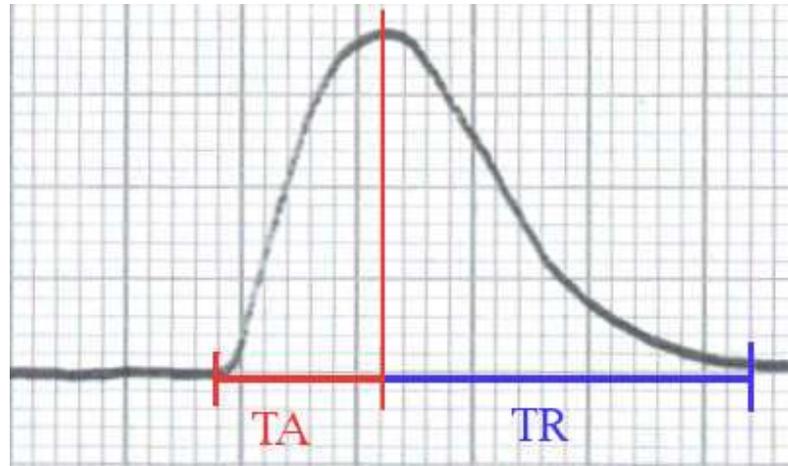


Figura 1 – Cálculo do Tempo de Ativação TA e Tempo de Relaxamento TR

Os protocolos para estes experimentos foram assim divididos:

3.2.3. Protocolos experimentais

3.2.3.1. Efeitos de diferentes concentrações do Pb^{++} sobre a força e parâmetros temporais da contração isométrica do ventrículo direito

Para avaliar um possível efeito do Pb^{++} sobre a força da contração isométrica, foi realizado o seguinte protocolo: Após período de estabilização, foram administradas concentrações crescentes de Acetato de Chumbo (Pb^{++}) (3; 7; 10; 30; 70; 100 e 300 μM) aguardando um intervalo de tempo de 10 min entre cada concentração. Foram medidos, a força de contração isométrica desenvolvidas pelas tiras de VD (n=8) bem como seus parâmetros temporais da contração (tempo de ativação, TA; tempo de relaxamento, TR).

O efeito inotrópico negativo na tiras de VD foi observado a partir da concentração de 30 μM de chumbo, e a concentração de 100 μM promovia uma diminuição de força

da ordem de aproximadamente de 25% em relação à contração controle, sendo essa a concentração escolhida para realizar as intervenções inotrópicas.

Em seguida era obtida a potenciação relativa (PR), avaliada antes e após tratamento das tiras de VD (n=12) com Pb^{++} e sob estimulação de 0,5 Hz. A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração antes da pausa. Este procedimento era realizado com a finalidade de se comparar contrações com estado inotrópico diferente das contrações controle, objetivando avaliar o papel do Pb^{++} frente à atividade do RS.

3.2.3.2. Intervenções inotrópicas

Com a finalidade de avaliar um possível efeito do Pb^{++} sobre as intervenções inotrópicas foram realizados os seguintes estudos:

1) Após período de estabilização, avaliamos a dependência do desenvolvimento da força da contração isométrica (F) das tiras de VD frente à alterações da concentração extracelular de cálcio [Ca^{2+}] (0,62; 1,25; e 2,5 mM) na ausência e na presença de Pb^{++} (100 μ M) e sob estimulação de 0,5 Hz.

2) Foram também investigadas a influência do Pb^{++} (100 μ M) sobre a força de contração (F) das tiras de VD (n= 11) frente ao efeito inotrópico positivo produzido pelo isoproterenol (20 ng/ml).

3) Foi avaliada também, após período de estabilização, a dependência do desenvolvimento da força de contração isométrica (F) frente a alterações da frequência de estimulação (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 Hz) na ausência e na presença de Pb^{++} (100 μ M) em VD (n=8).

3.2.3.3. Efeitos do Pb^{++} sobre as proteínas contráteis cardíacas

Objetivando avaliar uma possível influência do Pb^{++} sobre as proteínas contráteis, foram realizados os seguintes protocolos:

1) O efeito do Pb^{++} (100 μ M) foi estudado em um outro grupo de VD (n= 10) durante estimulações tetânicas. A tensão tetânica era obtida após tratamento com 5 mM de cafeína numa frequência de estimulação de 10 Hz, e duração de 15s, como descrita

previamente (Leite *et al.*, 1995). Entre cada estimulação tetânica, os músculos eram mantidos sob estimulação de 0,5 Hz por, pelo menos, 10 minutos.

3.2.4. Efeitos do Pb^{++} sobre a atividade da ATPase miosínica

Para avaliar se o Pb^{++} era capaz de afetar a atividade da ATPase miosínica, os efeitos desse composto foram analisados em conformidade com protocolo previamente descrito (Delcayre & Swynghedauw, 1975; Cappelli *et al.*, 1989). A miosina foi preparada a partir de ventrículos direitos e esquerdos, cada um em experimentos separados, sendo então 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 para diluir a miosina sob alta força iônica, e 1 ml de água era adicionado para cada grama de tecido, objetivando 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, só que desta feita em 14 ml de água por grama de tecido centrifugado. O precipitado era dissolvido em 5 mM HEPES, pH 7, e 0,6 M KCl mais 50%, v/v, glicerol e estocado a $-20^{\circ}C$. Para o uso da miosina estocada, diluía-se em água (1:12) e centrifugava-se a 3.000 g por 15 minutos. O precipitado era ressuspenso 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) a partir de ATP 1mM na presença de 50 mM HEPES, pH 7, 0,6 M KCl, 5 mM $CaCl_2$, ou 10 mM EGTA na ausência e presença de Pb^{++} (100 μ M), e num volume final de 200 μ 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 μ g proteína) ao meio de reação por 10 minutos. Tempos de incubação e concentração de proteína foram escolhidos no sentido de assegurar a linearidade da

reação. A reação foi interrompida através da adição de 200 µl de ácido tricloroacético a 10%. 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 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 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.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores foram analisados, usando ANOVA (uma e duas vias). Quando ANOVA revelava uma diferença significativa, o teste de Tukey era aplicado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. A análise estatística dos dados da atividade da ATPase miosínica foi realizada por teste “t” de Student pareado, e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

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

3.4. Fármacos e Reagentes

Acetato de Chumbo II (Sigma)

Ácido Ascórbico (Merck)

Albumina, Soro Bovino (Sigma)

Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)

Cloreto de Magnésio Hexahidratado (Merck)

Cloreto de Potássio (Merck)

Cloreto de Sódio (Merck)

EDTA (Hoeschst)

Éter Etílico (Merck)

Glicose (Reagem)

Hepes (Sigma)

Hidróxido de Sódio (Merck)

L- Isoproterenol (hidroclorato - Sigma)

Pentobarbital sódico 3 % (Cristália)

Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)

EGTA (Sigma)

Todas as soluções estoques concentradas de isoproterenol foram dissolvidas em água bidestilada e mantidas no congelador a -20°C.

RESULTADOS

IV RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM MÚSCULO CARDÍACO VENTRÍCULO DIREITO

4.1.1 Efeitos do chumbo (Pb^{++}) sobre a força de contração cardíaca

Registros típicos mostram que o Pb^{++} de maneira concentração-dependente, reduziu a força (F) da contração isométrica em preparações de tiras de ventrículo direito (VD) de ratos (Figura 2).

O gráfico, na Figura 3, mostra os efeitos do Pb^{++} em diferentes concentrações (3, 7, 10, 30, 70, 100 e 300 μM), sobre a força isométrica (F) desenvolvida pelas tiras de VD. Pode-se notar que o Pb^{++} reduziu a força de maneira concentração-dependente, e que o Pb^{++} na concentração de 100 μM reduziu força em cerca de 30% em relação à contração controle (Tabela 1).

Em relação ao tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR), o Pb^{++} não promoveu alteração de maneira significativa nas concentrações 3, 7, 10, 30, 70, 100 e 300 μM em relação à contração controle (Figura 4 A , 4B e Tabela 2).

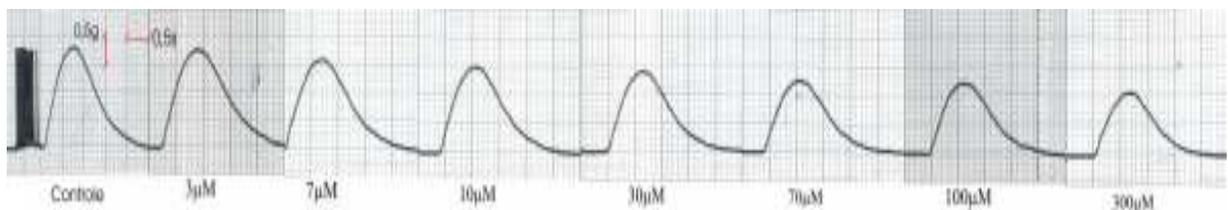


Figura 2: Registros típicos das contrações isométricas em resposta as concentrações crescentes de Pb^{++} em tiras de VD de ratos.

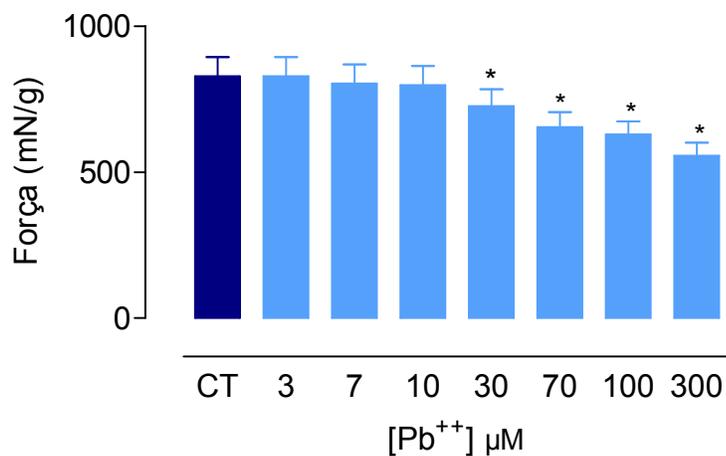


Figura 3: Efeitos de diferentes concentrações de Pb²⁺ sobre a força isométrica desenvolvida pelo VD de ratos. * p < 0,05; ANOVA (uma via) não randomizada seguida pelo teste de Tukey; Pb²⁺ vs CT.

Tabela 1: Efeitos do Pb²⁺ sobre a força (F) das contrações isométricas no VD de ratos.

Concentrações de Pb ²⁺ (μM)	Força (mN/g)	n
CT	828,6 ± 65,5	8
3	803,6 ± 64,6	8
7	797,5 ± 65,1	8
10	726,3 ± 57,4	8
30	653,6 ± 51,7 *	8
70	628,6 ± 45,2 *	8
100	556,9 ± 43,3 *	8
300	828,6 ± 65,5 *	8

Dados expressos em média ± EPM; * p < 0,05; ANOVA (uma via) não randomizada seguida pelo teste de Tukey; Pb²⁺ vs CT.

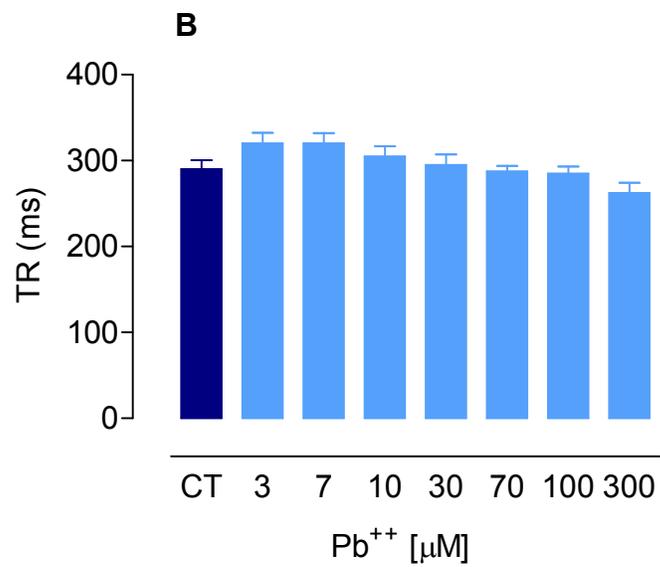
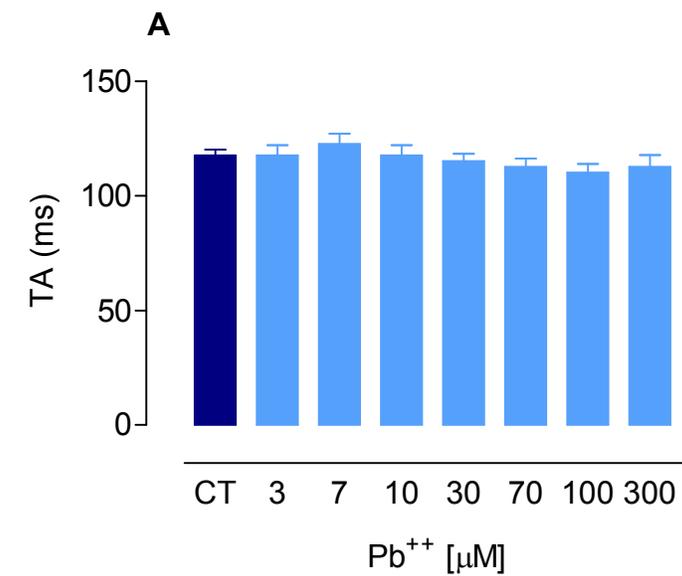


Figura 4: Efeito de concentrações crescentes de Pb²⁺ em VD em relação ao **(A)** tempo de ativação (TA) e **(B)** tempo de relaxamento (TR) da contração isométrica das tiras de VD de ratos.

Tabela 2: Efeitos do Pb^{++} sobre o tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR) da tensão isométrica desenvolvida pelo VD de ratos.

Concentrações de Pb^{++} (μM)	TA (ms)	TR (ms)
CT	117,5 \pm 2,5	290,0 \pm 10,7
3	117,5 \pm 4,5	320,0 \pm 12,5
7	122,5 \pm 4,5	320,0 \pm 11,9
10	117,5 \pm 4,5	305,0 \pm 11,8
30	115,0 \pm 3,3	295,0 \pm 12,4
70	112,5 \pm 3,7	287,5 \pm 6,5
100	110,0 \pm 3,8	285,0 \pm 8,2
300	112,5 \pm 5,3	262,5 \pm 11,6

Dados expressos em média \pm EPM;

A potenciação pós-pausa foi utilizada para avaliar um possível efeito do Pb^{++} sobre a atividade do retículo sarcoplasmático (RS). Podemos observar os registros típicos das contrações pós-pausas na condição de controle e quando sob tratamento com Pb^{++} na concentração de 100 μM (Figura 5).

Contrações pós-pausa (CPP) foram registradas após pausas de 15, 30 e 60 segundos e analisadas como potenciação relativa (PR). É possível observar um progressivo aumento na potenciação relativa em todos os tempos de pausa (Tabela 3, Figura 6).

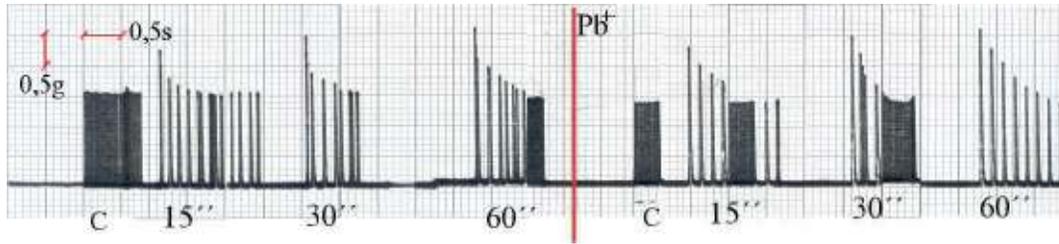


Figura 5: Registros típicos dos efeitos do Pb^{++} sobre a potenciação relativa (PR) da contração pós-pausa (CPP) obtidas em intervalos de 15, 30 e 60 s em tiras de VD de ratos, antes e após da adição de Pb (100 μM).

Tabela 3: Efeitos do Pb^{++} sobre a potenciação relativa (PR) da contração pós-pausa (CPP) em uma concentração de 100 μM após pausas de 15, 30 e 60 s em contrações dos VD de ratos.

Grupos	15''	30''	60''	n
Controle	1,49 \pm 0,03*	1,62 \pm 0,06*	1,69 \pm 0,07*	11
Pb⁺⁺ 100 μM	1,62 \pm 0,06*	1,79 \pm 0,07*	1,89 \pm 0,08*	11

Os resultados são apresentados como média \pm EPM dos valores relativos, * $p < 0,05$; chumbo vs Controle. ANOVA (duas vias) seguida pelo teste de Tukey.

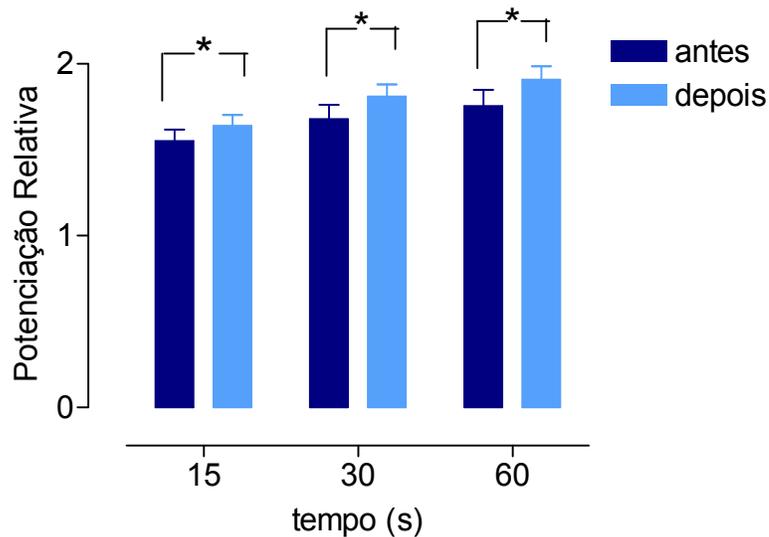


Figura 6: Potenciação relativa das contrações pós-pausas (CPP) com intervalos de pausa de 15, 30 e 60 segundos em tiras de VD de ratos antes e após administração 100 μ M de Pb⁺⁺. * p<0,05; ANOVA (duas vias) seguida pelo teste de Tukey; CPPs vs Controle.

4.1.2 Intervenções inotrópicas

O controle fisiológico e farmacológico da contratilidade cardíaca pode ser exercido através de alterações da concentração extracelular de cálcio [Ca²⁺]. A magnitude da resposta contrátil induzida pelo cálcio em tiras de VD incubados em solução com baixa concentração de cálcio (0,62 mM) é resultante da corrente de influxo de cálcio pela membrana e da conseqüente liberação de cálcio a partir dos estoques intracelulares.

A dependência do desenvolvimento da força frente a alterações da [Ca²⁺] (0,62, 1,25 e 2,5 mM) pode ser observada na Figura 7 e Tabela 4. Na condição de controle, ocorreu um aumento da força de contração proporcional ao incremento da concentração extracelular de cálcio. Quando o Pb⁺⁺ (100 μ M) foi adicionado à preparação, ocorreu uma redução da força de contração em todas as concentrações

extracelulares de cálcio testadas, sem que o efeito inotrópico positivo do aumento da $[Ca^{++}]$ fosse afetado.

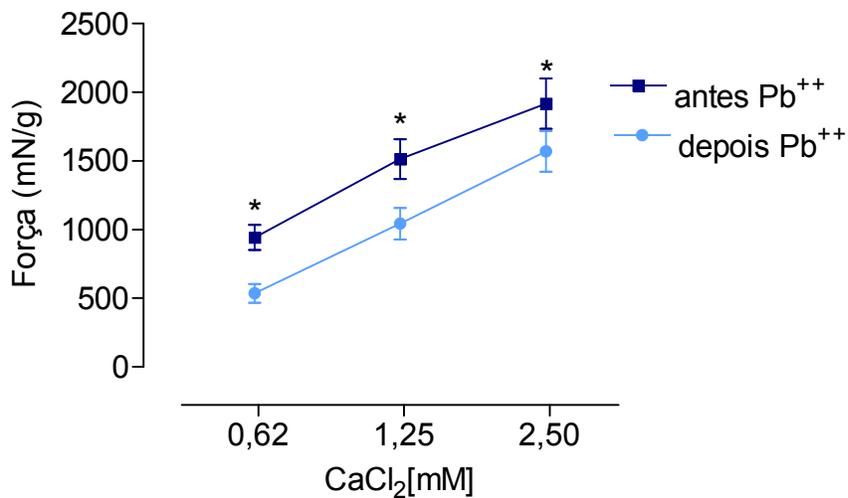


Figura 7: Efeito da variação da concentração de Ca^{++} . (0,62; 1,25 e 2,5 mM) sobre o desenvolvimento da força da contração isométrica, na ausência e presença de Pb^{++} (100 μM) em tiras de VD de ratos. * $p < 0,05$; ANOVA (duas vias) pós-teste de Tukey; Pb^{++} vs CT.

Tabela 4: Dependência do desenvolvimento da força isométrica (F) da concentração de cálcio externo na ausência e na presença de Pb^{++} (100 μM) evidenciada pelos VD de ratos.

[] Ca^{+2} mM	F – Controle (mN/g)	F - Pb^{++} (mN/g)	n
0,62	944,2 \pm 91,7	534,8 \pm 68,8 *	8
1,25	1514,1 \pm 144,1	1044,5 \pm 114,4 *	8
2,50	1917,3 \pm 182,3	1570,7 \pm 149,2 *	8

Dados expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$; Pb^{++} vs CT. ANOVA (duas vias) pós-teste de Tukey.

Numa outra intervenção inotrópica, observamos que, quando sob baixa concentração de Ca^{2+} (0,62 mM), o efeito inotrópico negativo induzido pelo Pb^{++} (100 μM) foi revertido pelo isoproterenol (ISO) (20 ng/ml), um conhecido agonista β -adrenérgico (Figura 8).

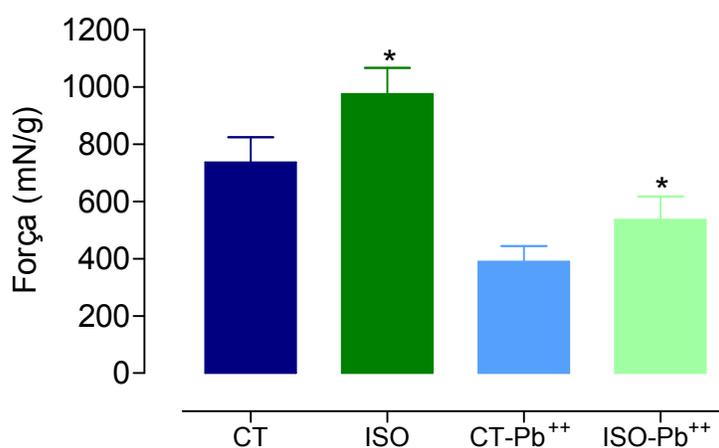


Figura 8: Efeitos do ISO e do Pb^{++} sobre a força isométrica desenvolvida pelos VD de ratos superfundidos com solução de Tyrode modificada, contendo 0,62 mM Ca^{2+} .

* $p < 0,05$; ANOVA (uma via) seguida pelo teste de Tukey.

Alguns trabalhos demonstram que a freqüência de estimulação em ratos depende mais do acúmulo de Ca^{++} no RS do que do seu transiente pelo sarcolema. Aumentando a freqüência de estimulação, a força desenvolvida diminui devido ao pequeno tempo necessário para a reposição do Ca^{2+} no RS (Figura 9, Tabela 5). Embora a força desenvolvida diminuísse após a adição de Pb^{++} , essa diminuição ocorreu de forma proporcional.

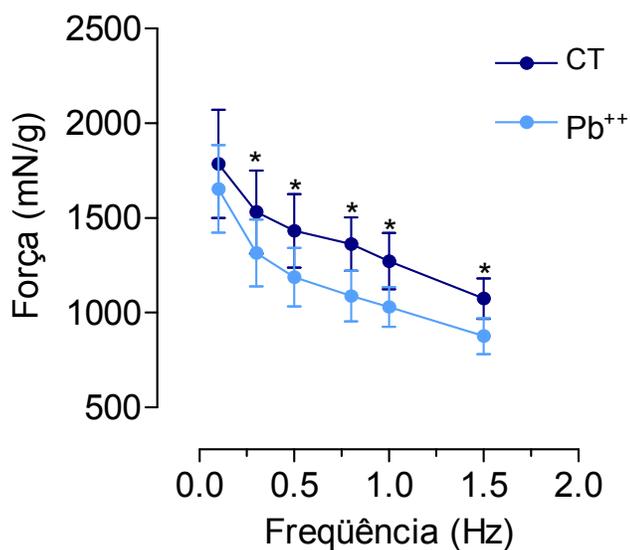


Figura 9: Efeitos do Pb^{++} sobre a variação da freqüência (Hz) em tiras de VD de ratos. * $p < 0,05$; ANOVA (duas vias) pós-teste de Tukey. Pb^{++} vs CT.

Tabela 5: Dependência do desenvolvimento da força isométrica (F) em relação a variação de freqüência de estimulação na ausência e na presença de Pb^{++} (100 μM) em VD de ratos.

Frequência (Hz)	F – CT (mN/g)	F – Pb ⁺⁺ (100 μM) (mN/g)	n
0,1	1785,9 ±284,9	1653,2 ±230,9	8
0,3	1531,6 ±219,2	1316,4 ±176,0 *	8
0,5	1432,9 ±194,4	1187,2 ±153,9 *	8
0,8	1362,1 ±140,4	1087,3 ±133,1 *	8
1,0	1271,7 ±149,1	1030,4 ±106,0 *	8
1,5	1074,3 ± 107,1	876,0 ±95,1 *	8

Dados expressos em média ± EPM dos valores relativos.

* p<0,05; Pb⁺⁺ vs CT. ANOVA (duas vias) pós-teste de Tukey.

4.1.3 Efeitos do Pb⁺⁺ sobre as contrações tetânicas

O efeito do Pb⁺⁺ sobre as proteínas contráteis cardíacas foi indiretamente avaliado através de contrações tetânicas induzidas na ausência e na presença de Pb⁺⁺. A Figura 10 mostra o efeito depressor que o Pb⁺⁺ (100 μM) induz na contração tetânica em VD de ratos. Esse efeito foi relativamente maior sobre o pico de força tetânica, do que o observado sobre o platô de força tetânica (Tabela 6).

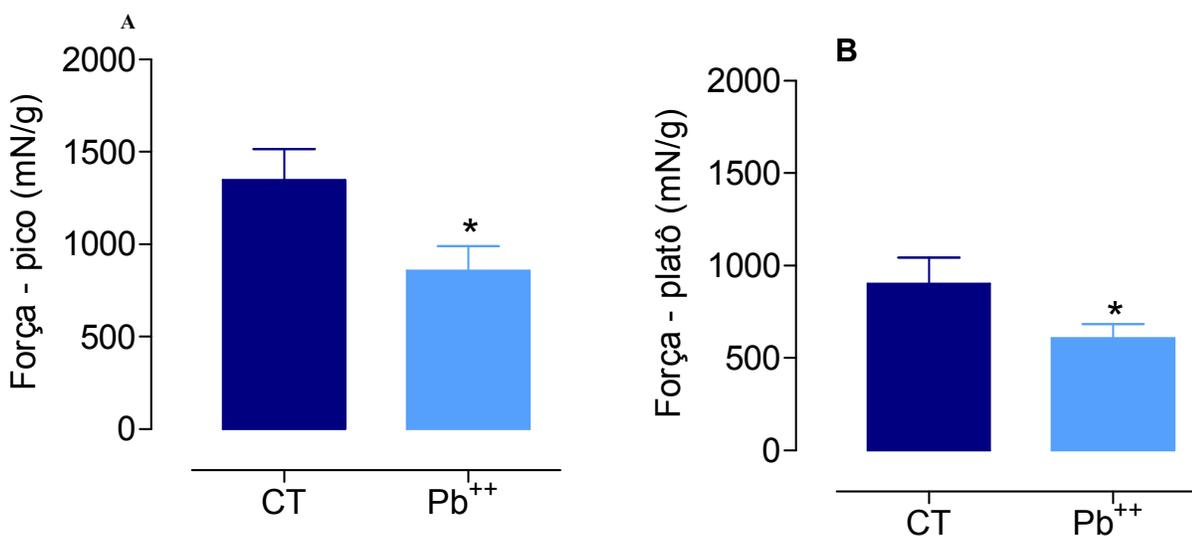


Figura 10: Efeitos do Pb⁺⁺ sobre pico de força (A) e platô de força (B), evidenciados pelas contrações tetânicas de VD de ratos.

Média \pm EPM; * $p < 0,05$; Teste t de Student. Pb^{++} vs CT.

Tabela 6: Efeitos do Pb^{++} sobre a força (F) desenvolvida pelas contrações tetânicas dos VD de ratos.

Grupos	Tétano: Pico F (mN/g)	Tétano: Platô F (mN/g)	n
CT	1348,3 \pm 166,9	901,9 \pm 140,9 *	10
Pb^{++}	858,9 \pm 131,7	607,9 \pm 76,7 *	10

Dados expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$ Pb vs Controle; Teste t de Student

4.1.4 Efeitos do Pb^{++} sobre a atividade da ATPase miosínica

Desde que o desenvolvimento da tensão depende da atividade da ATPase miosínica (Huxley, 1969; Huxley & Simmons, 1971; Goldman & Brenner, 1987), o efeito inotrópico negativo induzido pelo Pb^{++} , poderia estar associado a uma redução da atividade dessa enzima. Foram analisados 100 μ M em tiras de VD. Nessa concentração de 100 μ M houve diminuição de atividade da enzima em 25% em tiras de VD quando adicionado o chumbo (225.9 ± 35.9 vs 150.0 ± 49.2 nmolesPi/min/mg de ptn) (Figura 11).

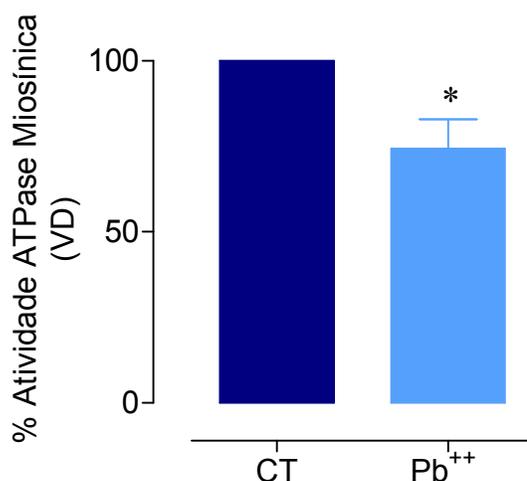


Figura 11: Alterações na atividade da Ca^{2+} ATPase miosínica expressas em % produzidas pelo Pb^{++} (100 μM) em ventrículo direito. Dados expressos em \pm EPM; * $p < 0,05$ realizada por teste t de Student.

DISCUSSÃO

V DISCUSSÃO

Poucos trabalhos têm demonstrado os efeitos agudos do íon chumbo diretamente no coração. Estudos de eletrofisiologia mostraram a capacidade do Pb^{++} de bloquear o influxo do íon Ca^{++} , através dos canais de Ca^{++} tipo-L, em miócitos isolados (Bernal *et al*, 1997). Em outro estudo, quando o coração isolado era perfundido por uma solução de Pb^{++} apresentava efeito inotrópico negativo e anormalidades na condução do marcapasso cardíaco, sendo registrado em eletrocardiograma (Williams *et al.*,1983). Embora o efeito inotrópico negativo tenha sido observado, encontramos poucos estudos delineando o perfil fisiológico da ação do Pb^{++} no coração isolado, principalmente quando nos referimos à atividade do retículo sarcoplasmático e da interação desse metal nas proteínas contráteis e na atividade da ATPase Miosínica. No presente trabalho, foi avaliado o efeito deste metal diretamente, de forma aguda, no músculo cardíaco (tiras de VD) em concentrações crescentes deste íon, delineando um perfil concentração-resposta deste efeito nocivo. Foram também realizadas intervenções inotrópicas, a fim de se avaliar mais profundamente o mecanismo de ação deste metal, assim como, a possível interação do Pb^{++} na atividade das proteínas contráteis e na ATPase miosínica, que possui papel importante no desenvolvimento de força da maquinaria contrátil.

Neste estudo, verificamos que o Pb^{++} em concentração dependente promoveu um efeito inotrópico negativo, em tiras de ventrículo direito de ratos, provocando redução na atividade da ATPase miosínica e também sugeriu não alterar a atividade do retículo sarcoplasmático.

A avaliação do papel do Pb^{++} em relação à contratilidade miocárdica foi obtida a partir dos registros de contração isométrica referentes às variações da força de contração, bem como a avaliação dos parâmetros temporais. A amplitude do gráfico da contração fornece a quantidade de força desenvolvida pelo músculo cardíaco. Já os parâmetros temporais da contração isométrica são importantes para a avaliação da cinética de ativação e relaxamento do músculo. Assim, o tempo de ativação (TA),

medido no início da contração até seu pico máximo, informa indiretamente a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, os processos que aumentam o Ca^{++} mioplasmático; o tempo de relaxamento (TR) medido do pico da contração até seu término está relacionado à cinética dos processos envolvidos no relaxamento, ou seja, nos processos que diminuem o Ca^{++} mioplasmático (Vassallo & Stefanon, 2000).

A adição de concentrações crescentes de chumbo não demonstrou resultados significantes em relação ao TA e TR, mostrando com isso que a cinética de ativação e a cinética de relaxamento do músculo cardíaco estavam preservadas. Já o desenvolvimento de força pelas tiras de ventrículo direito (VD) foi proporcionalmente diminuído. Esse dado corrobora com os estudos realizados por Williams *et al* (1983), que demonstraram que o Pb^{++} na concentração de 10^{-6} M induzia uma resposta inotrópica negativa em corações isolados de ratos.

Nas contrações pós-pausa, o Pb^{++} mostrou um comportamento similar aos bloqueadores de canais de Ca^{++} . Experiências em nosso laboratório (Mill *et al*, 1992) demonstraram que a presença de dois conhecidos bloqueadores de canais de Ca^{++} (verapamil e manganês), reduz o influxo de Ca^{++} pelo sarcolema. Foi verificada uma diminuição da amplitude das contrações nas condições controle estabilizado a 0,5 Hz e a manutenção das amplitudes das contrações pós-pausa. Em consequência a essa diminuição da contração controle, a potencialização relativa é aumentada. Nos ratos, a participação da bomba de Ca^{++} sarcolemal e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ durante a pausa, não são suficientes para que o Ca^{++} seja extrusado de forma eficiente do meio intracelular, o que não ocorre em outras espécies como, por exemplo, em cobaias (Nayler & Dunnet, 1975). A força desenvolvida na pausa é resultante, principalmente, da liberação de Ca^{++} armazenado no retículo sarcoplasmático acumulado pelo tempo de pausa. Este fato foi sugerido por Vassallo *et al* (1995), que demonstraram que em músculo cardíaco de rato a amplitude das contrações pós-pausa depende do armazenamento de Ca^{++} intracelular, pois tomou por base a utilização de rianodina, droga que abre os canais do Ca^{++} do RS e transformou a amplitude dessas contrações em uma depressão. O Pb^{++} , de forma semelhante, diminuiu as amplitudes das contrações controle, com aumento relativo das contrações pós-pausa

em todos os tempos de pausa, corroborando com os dados obtidos por Mill *et al.* (1992)

No acoplamento excitação-contração tanto a entrada de cálcio via influxo de Ca^{++} através do sarcolema (I_{Ca}), quanto a liberação dos estoques de cálcio através do RS, são importantes eventos que desencadeiam a contração muscular cardíaca. A entrada de cálcio pelo sarcolema possui papel importante na ativação da liberação do Ca^{++} armazenado no RS, além de contribuir para o aumento do cálcio mioplasmático. A quantidade de Ca^{++} liberado pelo RS depende da quantidade de Ca^{++} proveniente de I_{Ca} . Sendo assim, quanto mais cálcio entra pelo sarcolema, mais cálcio é liberado pelo RS. Experimentos têm demonstrado que ocorre aumento proporcional de força quando são adicionadas quantidades baixas de Ca^{++} livre ao citosol (Yue *et al.*, 1986; Harrison & Bers, 1989; Gao *et al.*, 1994). A resposta contrátil do músculo cardíaco no aumento de Ca^{++} extracelular foi avaliada através da adição de concentrações crescentes e cumulativas de CaCl_2 na ausência e na presença de Pb^{++} . A adição de CaCl_2 induziu aumento da contração de maneira concentração-dependente. Entretanto, a presença do Pb^{++} reduziu proporcionalmente a força da contração isométrica desenvolvida pelo VD, sugerindo que o Pb^{++} , de alguma forma, estaria reduzindo o influxo de Ca^{++} através do sarcolema, mas sem afetar o efeito inotrópico positivo promovido pelo Ca^{++} .

A sinalização dos receptores β adrenérgicos é feita pela ativação da adenilato ciclase via proteína G estimulatória, Os efeitos dos agentes β -adrenérgicos no músculo cardíaco promovem o aumento da corrente de Ca^{++} pelo sarcolema (Brown *et al.*, 1984; Kokubun *et al.*, 1986), redução da sensibilidade do Ca^{++} pelos filamentos devido a fosforilação da troponina I (Endoh, 1998), aumento da atividade da Ca^{++} ATPase do retículo sarcoplasmático (DeMeis & Vianna, 1979; Bassani *et al.*, 1994) e alteração da atividade do receptores de rianodina (Xu *et al.*, 1998). A ativação dos receptores β -adrenérgicos pode causar todos os principais efeitos adrenérgicos cardíacos (inotropismo, lusitropismo e cronotropismo positivos).

O agonista β -adrenérgico ativa a entrada de uma quantidade maior de Ca^{++} a cada excitação devido ao aumento de I_{Ca} . Com isso, o retículo sarcoplasmático acumula mais Ca^{++} citosólico durante o processo de relaxamento (devido a ativação da SERCA). Assim, ocorre uma grande saída de Ca^{++} do RS durante a excitação do miócito e isso é responsável por um pico de contração muito maior na presença do

isoproterenol (Spurgeon *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2000), Neste estudo, foi observado que o isoproterenol aumentou a força de contração desenvolvida pelo VD de ratos. Na presença de Pb^{++} ocorreu redução da força contrátil. No entanto, quando administrado isoproterenol, associado ao Pb^{++} , observou-se aumento da força de contração de VD, o que demonstrou que a ação do isoproterenol está preservada sugerindo, com isso, que o Pb^{++} pode reduzir, de forma significativa, a entrada de Ca^{++} pelo sarcolema, mas não foi capaz de abolir o efeito inotrópico positivo promovido pelo isoproterenol.

Orchard & Lakatta (1985) demonstraram que a força desenvolvida durante a variação da freqüência de estimulação em músculo cardíaco de ratos, depende principalmente da duração do acúmulo de Ca^{++} no RS e não do influxo deste pelo sarcolema. Isso se deve ao fato de que a Ca-ATPase sarcolemal no miocárdio de ratos possui pouca atividade, e que o aumento da freqüência de estimulação diminui a força de contração devido ao pequeno tempo disponível para a reposição de Ca^{++} no RS. Ao avaliarmos a influência do Pb^{++} no desenvolvimento de força resultante da variação da freqüência, verificamos redução da força de contração, redução que ocorreu de forma proporcional à condição controle, sugerindo novamente que o Pb^{++} , apesar de não afetar a função do RS, provavelmente altera a condutância do Ca^{++} pelo sarcolema, haja vista que Bernal *et al.*, (1997), através de estudos de eletrofisiologia, utilizando voltage-clamp, mostraram claramente que o Pb^{++} é um potente bloqueador dos canais de cálcio do tipo-L em miócitos de ratos.

Desta forma, os achados com as intervenções inotrópicas realizadas no músculo cardíaco em presença do Pb^{++} , variação na concentração de Ca^{++} , contração pós-pausa, ação do isoproterenol, variação da freqüência, sugerem um possível efeito do Pb^{++} no influxo de Ca^{++} pelo sarcolema, sem afetar as funções do RS.

Foi avaliada também uma possível ação deste metal sobre as proteínas contráteis. Então, para se avaliar o papel do chumbo na maquinaria contrátil, foram realizadas contrações tetânicas do músculo cardíaco. A estimulação tetânica foi realizada através da inibição do retículo sarcoplasmático com cafeína (Yue *et al.*, 1986, Leite *et al.*, 1995). A cafeína depleta os estoques de Ca^{++} do RS, diminuindo também a velocidade na recaptção de cálcio pelo RS (Henderson *et al.*, 1974; Bassani *et al.*, 1994) e em altas concentrações é capaz de aumentar a probabilidade de abertura dos canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (Rosseau *et al.*, 1987;

Sitsapesan & Williams, 1990). Leite *et al.* (1995) sugerem que as contrações tetânicas são parcialmente dependentes do influxo de cálcio sarcolemal. Em nosso estudo, os registros obtidos após a adição de 100 μ M de Pb⁺⁺ demonstram a diminuição no pico de ativação e do platô da contração tetânica desenvolvida, corroborando com dados que afirmam que o chumbo pode estar afetando a entrada de Ca⁺⁺ pelo sarcolema, mas, existindo ainda a possibilidade de estar alterada a função das proteínas contráteis.

Vários estudos têm demonstrado a ação do Pb⁺⁺ na diminuição da atividade de uma série de enzimas (WHO, 1995), Altindag *et al.* (2003) demonstraram que a Dihidropteridina redutase é uma enzima que possui grande quantidade de grupos tiois (SH) em seu sítio de ação, e que sofreu redução de sua atividade com Pb⁺⁺ tanto na forma de dietil chumbo quanto na forma de cloreto. O mesmo ocorreu com os metais mercúrio e cádmio. Moreira *et al.* (2003) demonstraram que o mercúrio reduzia a atividade da ATPase miosínica, mesmo em baixas concentrações, sugerindo um forte efeito tóxico, sendo que o Pb⁺⁺ também tem preferências de ligação nos grupos SH dessas enzimas (Anner *et al.*, 1992). Comparando com a atividade do mercúrio e com base nestes achados, foi avaliada a possível interação do Pb⁺⁺ na atividade desta enzima. Como a capacidade do coração de gerar força contrátil é principalmente dependente da atividade da ATPase miofibrilar, no presente estudo foi observada a diminuição significativa na atividade enzimática no ventrículo direito. Isso contribui para explicar a redução de força promovida pelo metal.

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÕES

- 6.1.** O Pb^{++} , de maneira concentração-dependente, deprimiu a força da contração isométrica desenvolvida pelas tiras de VD de ratos.
- 6.2.** Os parâmetros temporais da contração isométrica, o tempo de ativação (TA) e o tempo de relaxamento (TR), não foram afetados pelo Pb^{++} , sugerindo a não interferência do Pb^{++} nas cinéticas de ativação e relaxamento da contração.
- 6.3.** Em músculo cardíaco de rato, a força de contração é aumentada à medida que se aumenta o tempo de pausa. Os resultados, ao evidenciarem que na presença do Pb^{++} , apesar das contrações sob estimulação condição controle terem sido progressivamente deprimidas, as contrações pós-pausas foram potencializadas em todos os tempos de pausa testados. Dessa forma, o efeito depressor do Pb^{++} sugere, não haver, interferência do metal sobre a atividade do retículo sarcoplasmático (RS), com ação similar aos bloqueadores de canais de Ca^{++} .
- 6.4.** O aumento da contração, concentração-dependente, induzido pela adição cumulativa de $CaCl_2$ foi, proporcionalmente, reduzido pelo Pb^{++} . Tal evento sugere estar o Pb^{++} reduzindo o influxo de Ca^{++} através da membrana sarcolemal, e não alterando a resposta inotrópica do Ca^{++} .
- 6.5.** Em relação às intervenções inotrópicas do Ca^{++} e ISO o Pb^{++} foi capaz de reduzir a força final da contração, mas não foi capaz de abolir os efeitos inotrópicos positivos tanto do aumento da concentração de Ca^{++} quanto à ação do isoproterenol, sugerindo com isso que este metal estaria afetando de alguma forma a entrada de Ca^{++} através do sarcolema.
- 6.6.** A diminuição da força devido ao aumento da frequência foi reduzida proporcionalmente com a adição de Pb^{++} , sugerindo mais uma vez a atuação deste metal no influxo do Ca^{++} através do sarcolema sem afetar a função do RS.

- 6.7.** Os resultados demonstraram que as contrações tetânicas foram deprimidas quando adicionado 100 μM de Pb^{++} , sugerindo que este estaria reduzindo o influxo sarcolemal de Ca^{++} ou de alguma maneira, afetando as proteínas contráteis.
- 6.8.** O Pb^{++} *in vitro* foi capaz reduzir a atividade da Ca^{2+} -ATPase miosínica.
- 6.9.** Podemos assim, sugerir que o efeito inotrópico negativo do Pb^{++} independe da ação do retículo sarcoplasmático, sendo resultado de redução do influxo de Ca^{++} pelo sarcolema e redução da atividade da ATPase miosínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altindag ZZ, Baydar T, Engin AB, Sahin G. Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicol. In Vitro*, 2003; 17:533-537.
- American Academy of Pediatrics. Lead poisoning: from screening to primary prevention. *Pediatrics*, 1993; 92:176–83.
- Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *Am. J. Physiol.*, 1992; 262:F830-F836.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Lead Toxicity. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/lead/index.html>. Acesso em: 10 novembro de 2005.
- Barany M, de Tombe PP. Rapid exchange of actin-bound nucleotide in perfused rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004; 286:H1394-H13401.
- Bassani JWN, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.*, 1994; 476: 279-293.
- Batuman V. Lead nephropathy, gout, and hypertension. *Am. J. Med. Sci.*, 1993; 305:241–247.
- Bernal J, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Full reversal of Pb⁺⁺ block of L-type Ca⁺⁺ channels requires treatment with heavy metal antidotes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997; 282:172-80.
- Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 2002; 415:198–205.
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.*, 1999; 79: 763-854.

- Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am. J. Physiol.*, 1977; 232:C165-C173.
- Boscolo P, Carmignani M, Carelli G, Finelli VN, Giuliano G. Zinc and copper in tissues of rats with blood hypertension induced by long-term lead exposure. *Toxicol. Lett.*, 1992; 63:135-139.
- Boscolo P, Carmignani M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure *Environ. Health Perspect.*, 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. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254.
- Bremel, RD & Weber, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1975; 376: 366-374.
- Brette F, Orchard C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ. Res.*, 2003; 92:1182-1192.
- Brilla C, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ. Res.*, 1991; 69:107-115.
- Brody DJ, Pirkle JL, Kramer RA, et al. Blood lead levels in the US population. Phase 1 of the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988 to 1991). *JAMA*, 1994; 272:277-283.
- Brown AM, Kunze DL, Yatani A. The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels. *Nature*, 1984; 311:570-572.

- 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. *Circ. Res.*, 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, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, Felaco M. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci.*, 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. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1995; 210: 180–190.
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E; International Union of Pharmacology: International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, 2003; 55:579-581.
- Centers for Disease Control. Criteria for a recommended standard: occupational exposure to inorganic lead revised criteria. Atlanta: US Department of Health, Education, and Welfare. Report no. (NIOSH). 1978. p78-158.
- Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.*, 1986; 157: 375-380.
- Chang HR, Chen SS, Tsao DA, Cheng JT, Ho CK, Yu HS. Reduced vascular beta-adrenergic receptors and catecholamine response in rats with lead induced hypertension. *Arch. Toxicol.*, 1997; 71: 778–781.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993; 262: 740-744.

- Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, Hein L. Differential distribution of β -adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking β 1- or β 2-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60:955–962.
- Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, Lopez-Farre A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003; 14:1464-1470.
- Delcayre C, Swynghedauw B. A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pfluegers Arch.*, 1975; 355: 39-47.
- DeMeis L, Vianna AL. Energy interconversion by Ca^{2+} dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, 1979; 48: 275-292.
- Dolenc P, Staessen JA, Lauwerys RR, Amery A. Short report: low-level lead exposure does not increase the blood pressure in the general population. Cadmibel Study Group. *J. Hypertens.* 1993;11:589–593.
- Ehrlich R, Robins T, Jordaan E, Miller S, Mbuli S, Selby P, et al. Lead absorption and renal dysfunction in a South African battery factory. *Occup. Environ. Med.*, 1998; 55:453–460.
- Endoh, M. Cardiac $\alpha(1)$ -adrenoceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neurochem. Res.*, 1996; 21: 217–229.
- Endoh, M. Changes in intracellular Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} sensitization as mechanisms of action of physiological interventions and inotropic agents in intact myocardial cells. *Jpn. Heart J.*, 1998; 39:1-44.

Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, 1983; 245:C1-C14.

Ferrari R. Healthy versus sick myocytes:metabolism, structure and function. *Eur. Heart J. Suppl.*, 2002; G1–G12.

Forbes MS, Hawkey LA, Sperelakis N. The transverse-axial tubular system (TATS) of mouse myocardium: its morphology in the developing and adult animal. *Am. J. Anat.*, 1984; 170:143–162.

Frank JS, Mottino G, Reid D, Molday RS, Philipson KD. Distribution of the Na⁺/Ca⁺⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J. Cell. Biol.*, 1992; 117:337–345.

Gambassi G, Spurgeon HA, Ziman, BD, Lakatta EG, Capogrossi MC. Opposing effects of alpha 1-adrenergic receptor subtypes on Ca²⁺ and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiology*, 1998; 274: H1152–H1162.

Gao WD, Backx PH, Azan-Backx M, Marbán E. Myofilaments Ca²⁺ sensitivity in intact versus skinned rat ventricular muscle. *Circ. Res.*, 1994; 74: 408-415.

Gao MH, Ping PP, Post S, Insel PA, Tang RY, Hammond HK. Increased expression of adenylylcyclase type VI proportionately increases β-adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 1998; 95:1038-1043.

Garovic VD, Textor SC. Renovascular Hypertension and Ischemic Nephropathy. *Circulation*, 2005; 112:1362-1374.

Gilfillan, S.C. "Lead Poisoning and the Fall of Rome". *J. Gnathol.*, 1965; 85:53-60.

- Glenn BS, Stewart WF, Schwartz BS, Bressler J. Relation of alleles of the sodium-potassium adenosine triphosphatase alpha 2 gene with blood pressure and lead exposure. *Am. J. Epidemiol.*, 2001; 153:537-545.
- Goldman, YE & Brenner, B. Special topic: Molecular mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Physiol.*, 1987; 49: 629-636.
- Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND. Lead-induced hypertension: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension*, 1997; 30:1487–1492.
- Gonzalez Luque FJ, Montejo Gonzalez AL: Implication of lead poisoning in psychopathology of Vincent van Gogh [in Spanish]. *Actas Luso Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines.*, 1997; 25:309–326.
- Goodfriend TL, Ball DL, Elliott ME, Shackleton C. Lead increases aldosterone production by rat adrenal cells. *Hypertension*, 1995; 25: 785–789.
- Goodman M, LaVerda N, Clarke C, Foster E D, J Iannuzzi, and J Mandel; Neurobehavioural testing in workers occupationally exposed to lead: systematic review and meta-analysis of publications *Occup. Environ. Med.*, 2002; 59:217-223.
- Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys. J.*, 1995; 68:1027–1044.
- Green DW: The saturnine curse: A history of lead poisoning. *South. Med. J.*, 1985; 78:48–51.
- Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.*, 1997; 411:157–160.
- Harlan WR. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environ. Health Perspect.*, 1988; 78:9-13.

- Harrison SM, Bers DM. The influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J. Gen. Physiol.*, 1989; 93: 411-427.
- Henderson AH, Brutsaert DL, Forman R, Sonnenblick EH. Influence of caffeine on force-development and force-frequency relations in cat and rat heart muscle. *Cardiovasc. Res.*, 1974; 8: 162-172.
- Hirano Y, Fozzard HA, January CT. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells.. *Am. J. Physiol.*, 1989; 256:H1478–H1492.
- Huxley AF, Simmons RM. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, 1971; 233: 533-538.
- Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*, 1969; 164:1356-1369.
- IUPAC - Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights Of the Elements 2001, *Pure and Applied Chemistry*, 2003. 75:1107–1122
- Katz AM. Calcium channel diversity in the cardiovascular system. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1996; 28: 522-529.
- Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli JP, Giacobino JP. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.*, 1998; 53:670-675.
- Keeton T. K, Campbell W. B. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.*, 1981; 32:81–227.
- Kehoe RA. The metabolism of lead in man in health and disease: present hygienic problems relating to the absorption of lead: the Harben lectures. *J R Inst Public Health*, 1960; 24:177–203.

- Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am. J. Hypertens.*, 1993; 6:723-729.
- Kokubun, S; Prod'hom, B; Becker, C; Porzig, H; Reuter, H. Studies on Ca channels in intact cardiac cells: Voltage-dependent effects and cooperative interactions of dihydropyridine enantiomers. *Mol. Pharmacol.*, 1986; 30: 571-584.
- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91:344–349.
- Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep.* 2000; 115:521–529.
- Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1995; 73: 638-643.
- Li L, DeSantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in b-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol.*, 2000; 278: H769–H779.
- Lipp L., M. Laine, S. Tovey, K. Burrell, M. Berridge, W. Li, M. Bootman. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Cur. Biol.*, 2000; 10: 939–942.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.*, 2003; 93:896-906
- Loukianov E, Ji Y, Grupp IL, Kirkpatrick DL, Baker DL, Loukianova T, Grupp G, Lytton J, Walsh RA, Periasamy M. Enhanced Myocardial Contractility and Increased Ca²⁺

Transport Function in Transgenic Hearts Expressing the Fast-Twitch Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase. *Circ. Res.*, 1998; 83:889-897

Marks AR. Cardiac intracellular calcium release channels-role in heart failure. *Circ. Res.*, 2000; 87: 8-11.

Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am. J. Physiol.*, 1997; 272: 597-605.

Mehrke G, Zong XG, Flockerzi V, Hofmann F. The Ca channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type Ca channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994; 271:1483–1488.

Michele DE, Albayya FP, Metzger JM. Thin filament protein dynamics in fully differentiated adult cardiac myocytes: toward a model of sarcomere maintenance. *J. Cell. Biol.*, 1999; 145:1483-1495.

Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz. J. Méd. Biol. Res.*, 1992; 25:399-408.

Moller L, Kristensen T. Blood lead as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Epidemiol.* 1992; 136:1091–1100.

Moorman AF, Vermeulen JL, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR. Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. *Circ. Res.*, 1995; 76:616-625.

Morano M, Zacharzowski U, Maier M, Lange PE, Alexi-Meskishvili V, Haase H, Morano I. Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98:467-473.

Moreira CM, Oliveira EM, Bonan CD, Sarkis JJ, Vassallo DV. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat.

Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 2003; 135C:269-275.

Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications, *Rev. Panam. Salud Publica*, 2004; 15:119-129.

Mushak P, Davis JM, Crocetti AF, et al. Prenatal and postnatal effects of low-level lead exposure: integrated summary of a report to the US Congress on childhood lead poisoning. *Environ. Res.*, 1989; 50:11–36.

Naylor WG, Dunnet J. A possible explanation for the peculiar contractile behavior displayed by rat heart muscle. *Recent Adv. in Stud. Cardiac Struct. Metab.*, 1975; 5:171-175.

Neder, A. V. F.; Cotta, T.A.R.G. Redução dos riscos de exposição ambiental e ocupacional ao chumbo. Brasília, maio 1999. Projeto MMA/OPAS. Relatório da Primeira etapa do projeto.

Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, et al. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N. Engl. J. Med.*, 1979; 300:689–695.

Nolan CV, Shaikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology*, 1992; 73:127–146.

Nriagu JO: Saturnine gout among Roman aristocrats: Did lead poisoning contribute to the fall of the Empire? *N. Engl. J. Med.*, 1983; 308:660–663.

Nriagu, JO, Pacyna, JM. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 1988; 333:134-139.

Obermann WM, Plessmann U, Weber K, Furst DO. Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein from bovine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 1995; 233:110-115.

- Orchard CH, Lakatta EG. Intracellular calcium transients and developed tension in rat heart muscle. A mechanism for the negative interval-strength relationship. *J. Gen. Physiol.*, 1985; 86:637-651.
- Parkinson D, Ryan C, Bromet E, Connell MM. A psychiatric epidemiologic study of occupational lead exposure. *Am. J. Epidemiol.*, 1986; 123:261–9.
- Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:23961–23969.
- Perry HM Jr, Erlanger MW, Perry EF. Increase in the blood pressure of rats chronically fed low levels of lead. *Environ. Health Perspect.*, 1988; 78:107-111.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Yue DT. Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron.*, 1999; 22: 549–558.
- Piccinini F, Favalli L, Chiari MC. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology*, 1977; 8:43-51.
- Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. Structure of actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993; 261:58-65.
- Reinach FC, Farah CS, Monteiro PB, and Malnic B. Structural interactions responsible for the assembly of the troponin complex on the muscle thin filament. *Cell. Struct. Funct.*, 1997; 22:219–223.
- Ringer S. 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.

- Romieu I, Aprea CBP, Orsi D, Porcelli B. Fuentes de exposición a plomo em la ciudad de México. In: Avila, M.H. Rendón, E. P. (Eds.) Intoxicación por Plomo en México: prevención y control. Morelos: *Instituto Nacional de Salud Publica*, 1995. p 57-76.
- Rousseau E, Smith JS, Meissner G. Ryanodine modifies conductance and gating behaviour of single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.*, 1987; 253: C364-C368.
- Sanchez-Fructuoso AI, Blanco J, Cano M, Ortega L, Arroyo M, Fernandez C, et al.. Experimental lead nephropathy: treatment with calcium disodium ethylenediaminetetraacetate. *Am. J. Kidney Dis.*, 2002; 40:59–67.
- Shadick NA, Kim R, Weiss S, Liang MH, Sparrow D, Hu H. 2000. Effect of low level lead exposure on hyperuricemia and gout among middle aged and elderly men: the normative aging study. *J. Rheumatol.*, 2000; 27:708-712.
- Sharp DS, Becker CE, Smith AH. Chronic low-level lead exposure. Its role in the pathogenesis of hypertension. *Med. Toxicol.*, 1987; 2:210-232.
- Shelkovnikov SA, Gonick HC. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. *Am. J. Hypertens.*, 2001; 14:873-878.
- Sitsapesan R, Williams AJ. Mechanism of caffeine activation of single calcium release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.*, 1990; 423: 425-439.
- Sokas RK, Simmens S, Sophar K, Welch LS, Liziewski T. Lead levels in Maryland construction workers. *Am. J. Ind. Med.*, 1997; 31:188–94.
- Sperelakis N, Katsube Y, Yokoshiki H, Sada H, Sumii K. Regulation of the slow Ca^{++} channels of myocardial cells. *Mol. Cel. Biochem.*, 1996; 163-164: 85-98.
- Spurgeon HA, Stern MD, Baartz G, Raffaelli S, Hansford RG, Talo A, Lakatta EG, Capogrossi MC. Simultaneous measurements of Ca^{2+} , contraction, and potential in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, 1990; 258: H574-H586.

- Strang KT, Sweitzer NK, Greaser ML, Moss RL. Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ. Res.*, 1994; 74:542-549.
- Takagishi Y, Yasui K, Severs NJ, Murata Y. Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca(2+) channels of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cel. Physiol.*, 2000; 279:C1963–C1969.
- Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000; 164:127-133.
- Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1990; 6:7715-7760.
- Vassallo DV, Stefanon I. Contratilidade Miocárdica. Em *Fisiologia 2ª Edição*. Ed. Aires MM, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, Cap. 34, págs 368-391.
- Vassallo DV, Tucci PJF. Intensidade da ação de intervenções inotrópicas em diferentes graus de estiramento da miofibrila. Aparente inter-relação entre o mecanismo de Frank-starling e o inotropismo cardíaco. *Arq. Bras. Cardiol.*, 1978; 31:155-158.
- Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Faria AN, Mill JG. Mechanisms underlying the genesis of post-extrasystolic potentiation in rat cardiac muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1995; 28: 377-383.
- 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. *Pharmacol. Res.*, 1994; 29(3): 251-260.
- Vaziri ND, Ding Y, Ni Z and Gonick HC. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Int.*, 1997; 52:1042–1046.

- Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Compensatory up-regulation of nitric-oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001; 298:679-685.
- Vaziri ND. Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *J. Hypertens. Suppl.*, 2002; 20:S15–S20.
- 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.
- Wang VS, Lee MT, Chiou JY, Guu CF, Wu CC, Wu TN, et al. Relationship between blood lead levels and renal function in lead battery workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2002; 75:569–575.
- Warshaw DM. The in vitro motility assay: A window into the myosin molecular motor. *News Physiol. Sci.*, 1996; 11: 1-7.
- Weaver VM, Jaar BG, Schwartz BS, Todd AC, Ahn KD, Lee SS, Wen J, Parsons PJ, Lee BK. Associations among lead dose biomarkers, uric acid, and renal function in Korean lead workers. *Environ. Health Perspect.*, 2005; 113:36-42.
- Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick HC. Effects of lead and a low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin. Sci. (Lond)*. 1990; 79:185-192.
- Williams BJ, Hejtmancik MR Jr, Abreu M. Cardiac effects of lead. *Fed. Proc.*, 1983; 42:2989-2993.
- World Health Organization. Environmental health criteria 165: inorganic lead. Em: IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva, 1995.

- Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G. Potential for pharmacology of ryanodine receptor calcium release channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998; 853:130-148.
- Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM. A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science*, 1987; 238:1288-1292.
- Young P, Ferguson C, Banuelos S, Gautel M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J.*, 1998; 17:1614-1624.
- Yu HJ, Ma H, Green RD. Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, 1993; 44:689–693.
- Yue DT, Marban E, Wier WG. Relationship between force and intracellular Ca^{2+} in tetanized mammalian muscle. *J. Gen. Physiol.*, 1986; 87: 223-242.
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*, 1999; 399:159-162.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)