

**EFEITO DO ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 100 μ M DE
ACETATO DE CHUMBO NA REATIVIDADE VASCULAR
À FENILEFRINA NO LEITO VASCULAR CAUDAL DE
RATOS**

Edna Aparecida Silveira Almeida

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, março de 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Edna Aparecida Silveira Almeida, 1970

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE 100 μ M DE ACETATO DE CHUMBO NA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA NO LEITO VASCULAR CAUDAL DE RATOS. [Vitória] 2005

118p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2005)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las".

(Aristóteles)

**Dedico esse trabalho ao meu
querido e respeitável mestre, Dalton.**

Agradecimentos

A Deus, pela sabedoria, inspiração, determinação, proteção e força para a realização desse trabalho e por mais uma vitória em minha vida;

Ao meu marido Aroldo, pelo apoio incondicional, compreensão, paciência e motivação. Sou-lhe eternamente grata, por você ter-me permitido ir ao encontro dos meus objetivos. Essa conquista meu amor, é nossa!

Ao meu querido e amado filho, pela compreensão e entendimento nos momentos em que estive ausente. Filho você é minha grande motivação!

À minha família, especialmente à minha mãe a quem me inspiro ao lutar pelos meus sonhos, à minha irmã Mariângela e cunhada Nanan que sempre estiveram ao meu lado e a minha sobrinha Gabriela, minha grande incentivadora;

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, antes de tudo pela oportunidade, ensinamentos e orientação. Obrigada por ter confiado a mim esse trabalho. “Chefe”, serão eternos para mim os momentos de amizade e carinho, os quais iniciaram ainda em minha vida acadêmica. Sua sabedoria, desprendimento e bom humor me inspiram a cada dia;

À Ivanita pelos momentos de aprendizagem, amizade, cuidado e atenção científica. Sua perspicácia e senso científico, muito me inspiram;

A todos os meus colegas do LEMC, obrigada pela presença, amizade e apoio técnico. Sem dúvida alguma vocês contribuíram muito para o meu crescimento acadêmico e científico. Os nossos momentos de confraternização, jamais serão esquecidos;

À Alessandra, Flávia e Guília pela colaboração, ensinamentos e amizade;

Às minhas queridas amigas, Juliana, Aurélia, Fernanda, Fabiana, Viviane e Luciana, pelo incentivo, apoio e companheirismo constate. Dividir os meus momentos difíceis com vocês foi fundamental para realização desse trabalho. Sou grata a Deus por ter-me presenteado com as suas vidas;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pelo apoio técnico;

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Abreviaturas

Resumo

Abstract

I.

INTRODUÇÃO.....1

7

1.1.

Chumbo.....17

1.1.1 Fontes de Exposição ao

Chumbo.....19

1.1.2 Cinética do Chumbo no Organismo

Humano.....21

1.1.2.1

Absorção.....22

1.1.2.2

Distribuição.....22

1.1.2.3

Eliminação.....24

1.1.3 Toxicologia Geral do

Chumbo.....25

1.2 Hipertensão

Arterial.....26

1.2.1 Papel do Endotélio na Regulação do Tônus

Vascular.....29

1.2.1.1 Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio.....	30
1.2.1.1.1 Óxido nítrico.....	30
1.2.1.1.2 Prostaciclina.....	33
1.2.1.1.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	34
1.2.1.2 Fatores Contráteis Derivados do Endotélio.....	36
1.2.1.2.1 Angiotensina II.....	36
1.2.1.2.2 Prostaglandinas vasoconstritoras.....	37
1.2.1.2.3 Espécies reativas de oxigênio.....	38
1.2.2 Mecanismos Envolvidos na Contração do músculo Liso Vascular.....	
.39	
1.2.3 Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial.....	43
1.2.4 Efeitos do Chumbo na pressão Arterial.....	45
II.OBJETIVOS.....	
49	
2.1. Objetivo Geral.....	49
2.2. Objetivos Específicos.....	49

III. MATERIAIS E

MÉTODOS	50
3.1. Animais	
Experimentais	50
3.2. Metodologia Aplicada para Estudos de Reatividade Vascular no Leito Arterial Caudal	50
3.2.1 Obtenção do leito vascular caudal – procedimento cirúrgico50
3.2.2 Protocolo	
Experimental	55
3.2.2.1 Efeito da administração aguda de acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial	
.....	53
3.2.2.2 Modulação do endotélio no efeito agudo do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....	54
3.2.2.3 Estudo dos possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....	55
3.2.2.4 Envolvimento da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre o efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....	55
3.2.2.5 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....	56

3.2.2.6 Envolvimento da dos radicais livre local sobre o efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....57

3.2.2.7 Efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo sobre a atividade funcional da Na^+ K^+ - ATPase.....57

3.3 Expressão dos dados e análise estatística.....58

3.4 Fármacos e reagentes utilizados.....59

IV RESULTADOS

4.1 Efeito da administração aguda de 100 μM de acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....61

4.2 Modulação do endotélio no efeito acetato de chumbo 100 μM sobre a resposta pressora à fenilefrina.....63

4.3 Estudo dos possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito de 100 μM acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina.....66

4.3.1 Efeito de 100 μM acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico.....66

4.3.2 Efeito de 100 μM acetato de chumbo sobre os prostanóides derivados da Cicloxigenase.....69

4.4 Participação da Angiotensina II local no efeito de 100 μ M acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....

72

4.4.1 Avaliação do possível efeito de 100 μ M de acetato de chumbo sobre a enzima conversora de angiotensinogênio.....72

4.4.2 Avaliação do possível efeito do acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II: AT₁.....75

4.5 Efeito de agentes antioxidantes sobre o efeito de 100 μ M de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal.....

78

4.6 Estudo da atividade fncional da Na⁺ K⁺ -ATPase antes e após da infusão de 100 μ M de acetato de chumbo.....81

V

DISCUSSÃO.....8

2

VI

CONCLUSÃO.....93

VII REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS.....94

VIII ANEXOS

Anexo	
1.....	121

Lista de Figura

- Figura 1: Desenho esquemático da preparação do leito arterial caudal. 52
- Figura 2: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses

- crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, na presença do endotélio funcional. 61
- Figura 3: Mudanças no relaxamento à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) no leito arterial caudal de ratos *Wistar* antes e após 1 hora de infusão de 100 μM de acetato de chumbo. 62
- Figura 4: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar* antes (E^-) e após ($E^- \text{ Pb}^{2+}$) 1 hora de infusão de 100 μM de acetato de chumbo na ausência do endotélio. 63
- Figura 5: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar* na presença (E^+) e na ausência (E^-) do endotélio funcional. Nesta mesma condição porém, na presença de 100 μM de acetato de chumbo ($E^+ \text{ Pb}^{2+}$ vs $E^- \text{ Pb}^{2+}$). Antes e após 1 hora de infusão de 100 μM de acetato de chumbo com o endotélio funcional e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos . 65
- Figura 6: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, antes e após 1 hora de infusão de 100 μM de acetato de chumbo; antes e após 1 hora infusão com L-NAME ou L-NAME + Pb^{2+} e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos. 67
- Figura 7: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, antes e após 1 hora de infusão com 100 μM de acetato de chumbo; antes e após 1 hora de infusão com Indometacina ou Indometacina + Pb^{2+} e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos. 70
- Figura 8: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, antes e após 1 hora de infusão com 100 μM de acetato de chumbo (Pb^{2+}); antes e após com 1 hora de infusão

de Enalapril ou Enalapril + Pb^{2+} e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos representados nos gráficos. 73

Figura 9: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, antes e após 1 hora de infusão com 100 μM de acetato de chumbo (Pb^{2+}); antes e após 1 hora de infusão com Losartan ou infusão de Losartan + Pb^{2+} e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos representados nos gráficos. 76

Figura 10: Mudanças na pressão de perfusão média em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, antes e após 1 hora de infusão com 100 μM de acetato de chumbo (Pb^{2+}); antes e após 1 hora de infusão com Tempol ou infusão de Tempol + Pb^{2+} e comparação da diferença da área sob a curva entre os grupos 79

Figura 11: Curvas de relaxamento induzida pelo cloreto de potássio no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, na ausência e na presença de 100 μM de acetato de chumbo 81

Lista de Tabela

Tabela1: Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito

	arterial caudal de ratos Wistar antes e após a infusão com acetato de chumbo, na presença do endotélio funcional.	62
Tabela 2:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar antes e após a infusão com acetato de chumbo e com endotélio lesado.	64
Tabela 3:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de L-NAME, com endotélio funcional.	68
Tabela 4:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos <i>Wistar</i> com e sem acetato de chumbo na presença de Indometacina, com endotélio funcional.	71
Tabela 5:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Enalapril, com endotélio funcional.	74
Tabela 6:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Losartan, com endotélio funcional.	77
Tabela 7:	Parâmetros referentes à resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Tempol, com endotélio funcional.	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. **PA:** Pressão arterial
2. **HÁ:** Hipertensão arterial
3. **DC:** Débito cardíaco
4. **RVP:** Resistência vascular periférica
5. **Ca²⁺-ATPase:** Canais de cálcio sensíveis a ATP
6. **Na⁺/Ca²⁺:** Trocador sódio cálcio
7. **EDRFs:** Fatores relaxantes derivados do endotélio
8. **EDCFs:** Fatores contráteis derivados do endotélio
9. **NO:** óxido nítrico
10. **PGI₂:** Prostaciclina
11. **EDHF:** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
12. **O₂⁻:** ânions superóxido
13. **TxA₂:** Tromboxano A₂
14. **PGH₂:** Prostaglandina H₂
15. **PGF_{2α}:** Prostaglandina F_{2α}
16. **NOS:** NO sintase
17. **NAPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
18. **BH₄:** Tetrahydrobiopterina
19. **FAD:** Flavina adenina dinucleotídeo
20. **FMN:** Flavina mononucleotídeo
21. **eNOS:** NO sintase endotelial
22. **nNOS:** NO sintase neuronal
23. **iNOS:** NO sintase indizível
24. **ADP:** Adenosina difosfato
25. **GCs:** Guanilato ciclase solúvel
26. **GCa:** Guanilato ciclase ativa
27. **GTP:** Trifosfato de guanosina
28. **GDP:** Difosfato de guanosina
29. **GMPc** – 3'5'-monofosfato cíclico de guanosina
30. **PKG:** Proteína quinase dependente de GMPc
31. **IP₃:** 1,4,5 trifosfato de inositol

- 32. **MLCK**: Cadeia leve da miosina
- 33. **AMPc**: 3'5'-monofosfato cíclico de adenosina
- 34. **NO₂⁻**: nitrato
- 35. **NO₃⁻**: nitrato
- 36. **ONOO⁻**: Peroxinitrito
- 37. **OH⁻**: Radicais hidroxila
- 38. **COX**: Ciclooxygenase
- 39. **PGG₂**: Prostaglandina G₂
- 40. **AC**: Adenilato ciclase
- 41. **ATP**: Trifosfato de adenosina
- 42. **Ca²⁺**: Cálcio
- 43. **H₂O₂**: Peróxido de hidrogênio
- 44. **ECA**: Enzima conversora de angiotensina
- 45. **L-NAME** – N^G-nitro-L-argininina metil ester
- 46. **PLC**: Fosfolipase C
- 47. **PKG**: Proteína quinase dependente de GMPc
- 48. **DAG**: Diacilglicerol]
- 49. **RVP**: Resistência vascular periférica

RESUMO

A exposição a pequenas concentrações de chumbo resulta em hipertensão arterial em humanos e animais. Estudos prévios demonstraram que esse metal altera o endotélio e o músculo liso vascular, bem como suas vias vasodilatadoras e/ou vasoconstritoras. Contudo, estudos sobre os efeitos agudos desse metal na reatividade vascular são poucos e controversos. Sendo assim, este estudo propôs avaliar o efeito da administração aguda de 100 μM de acetato de chumbo sobre a reatividade vascular à FE no leito vascular caudal. Para realização dos experimentos, foram utilizados ratos Wistar com três meses de idade, pesando entre 250-300g. Os animais foram anestesiados e heparinizados, depois a artéria caudal foi dissecada e canulada para infusão de drogas e mensurações da pressão de perfusão média (PPM). A perfusão do leito vascular foi mantida a um fluxo constante (2,5 ml/min) nutrida com solução Tyrode modificada, aerada com 100% O_2 , temperatura até $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$ e pH: 7.45. Após 30 min. de equilíbrio da preparação, foi iniciado o protocolo experimental. A integridade do endotélio e do músculo liso vascular foi testada pela administração de acetilcolina (Ach, 5 $\mu\text{g}/100\mu$) e nitroprussiato de sódio NPS (0,1 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ respectivamente, em artérias pré-contraídas com FE (10^{-7} M). A reatividade vascular à FE (0,001 – 300 μg , *in bolus*) foi avaliada antes e após 1 hora de perfusão com acetato de chumbo (100 μM), nas seguintes condições: na presença (E^+) e ausência (E^-) de endotélio e após tratamento com 10^{-4} M de L-NAME 10^{-5} M de indometacina; 1 μM de enalapril; 10 $\mu\text{mol/l}$ de losartan; e 1 μM de tempol. A atividade funcional da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ também foi avaliada, através da técnica de relaxamento ao potássio, sendo que a curva de relaxamento ao potássio foi obtida antes e após perfusão contínua com acetato de chumbo (100 μM). A PPM basal não foi diferente entre os grupos, independentes da administração de acetato de chumbo, exceto no grupo sem endotélio (E^+ : $79,5 \pm 2.4$ vs E^- : 118.10 ± 2.2 , $p < 0.05$). O acetato de chumbo aumentou a resposta máxima ($\text{R}_{\text{máx}}$) e a sensibilidade (pD_2) à FE ($\text{R}_{\text{máx}}$ antes: 364.4 ± 36 vs após: 480.0 ± 27 ; pD_2 antes: 1.98 ± 0.07 vs após: 2.38 ± 0.14 , $p < 0.05$). Todavia, esses parâmetros aumentaram ainda mais, ao associar o acetato de chumbo com L-NAME ($\text{R}_{\text{máx}}$ antes: 490.38 ± 35.77 vs após:

816.69 ± 35.77; pD₂ antes: 1.89 ± 0.10 vs após: 2.81 ± 0.13, p<0.05) e com o tempol (Rmáx antes: 443.2 ± 15.2 ± 36 vs após: 480.0 ± 27; pD₂ antes: 1.58 ± 0.07 vs após: 2.42 ± 0.06, p<0.05). Por outro lado, a ação potencial do acetato de chumbo sobre a Rmáx e a pD₂ foi abolida na presença de indometacina e de enalapril. Por fim, o tratamento agudo com acetato de chumbo foi suficiente para inibir a atividade funcional da Na⁺ K⁺ -ATPase no leito vascular caudal de ratos. Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que a administração aguda de 100 µM de acetato de chumbo, aumenta a reatividade vascular caudal ao agente vasoconstritor FE. O endotélio possivelmente modula esse efeito, por estimular a liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase; promover liberação de angiotensina II, via aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina. Ademais, sob as mesmas condições, o acetato de chumbo, foi capaz de inibir a atividade funcional da Na⁺ K⁺ -ATPase, evento que, certamente, contribuiu para o aumento na Rmáx e na pD₂ à FE.

ABSTRACT

The chronic exposure to small concentrations of lead results in arterial hypertension in humans and in animals. Previous studies demonstrated that this metal directly affects that vascular endothelium and its vasoconstrictors and/or vasodilators pathways. However studies regarding acute effects on vascular reactivity are still controversial. Thus, this study aimed to investigate the effects of acute administration (100 μ M) of lead acetate on the pressor response to phenylephrine (PHE) in the rat tail vascular bed. For the experiments, Wistar rats, weighting 250-300g, with 3 months age, were used. The animals were anesthetized with sodium pentobarbital and heparinized. The tail artery was dissected and cannulated for drug infusion and mean perfusion pressure (MPP) measurements. The vascular bed was perfused (constant flow, 2.5 mL/min) with modified Tyrode solution, HEPES buffer, bubbled with 100% O₂, at 36 ± 0.5 °C and pH: 7.45. After 30 min equilibration period, the experimental protocol was initiated. The endothelium and vascular smooth muscle relaxation were tested by administration of acetylcholine (Ach, 5 μ g/100 μ l) and sodium nitroprussiate (NPS, 0,1 μ g/100 μ l), respectively, in arteries precontracted with PHE (10^{-7} M). Reactivity to PHE (0.001 - 300 μ g in bolus) was evaluated before and after 1 hour perfusion with 100 μ M lead, in the following conditions: in the presence (E⁺) and absence (E⁻) of the endothelium. The same protocol was performed after treatment with 10^{-4} M L-NAME; 10^{-5} M indomethacin; 1 μ M enalapril; 10 μ mol/l of losartan and 1 μ M of tempol. The functional activity Na⁺ K⁺ -ATPase was also, by using the technique of KCl relaxation curve, obtained before and after continuous perfusion with lead acetate (100 μ M). The basal MPP was not different among the groups, independently of lead acetate administration, except in the group withhold endothelium (E⁺: $79,5 \pm 2.4$ vs E⁻: 118.10 ± 2.2 , $p < 0.05$). Lead acetate increased the maximum response (R_{max}) and the sensitivity (pD₂) to PHE (R_{máx} before: 364.4 ± 36 vs after: 480.0 ± 27 ; pD₂ before: 1.98 ± 0.07 vs after: 2.38 ± 0.14 , $p < 0.05$). However, these parameters increased still more, when associating lead acetate with L-NAME (R_{max} before: 490.38 ± 35.77 vs after:

690.1 ± 35.4; pD₂ before: 1.89 ± 0.10 vs after: 2.81 ± 0.13, p<0.05) and tempol (R_{max} before: 443.2 ± 15.2 ± 36 vs after: 480.0 ± 27; pD₂ before: 1.58 ± 0.07 vs after: 2.42 ± 0.06, p<0.05). On the other hand, the potential action of lead on the R_{max} and pD₂ was abolished in the presence of indomethacin and enalapril. Finally, the acute treatment with lead acetate was enough to inhibit the functional activity of the Na⁺ k⁺ -ATPase pump, in the tail vascular bed of rats. These results are consistent with the hypothesis that the acute administration of 100 μM of lead acetate increases the vascular reactivity to PHE. The endothelium possibly modulates this effect releasing vasoconstrictors from derived the ciclooxigenase pathway and to promote releasing angiotensin II, by increasing the angiotensin converting enzyme activity. Moreover, under the same conditions, lead acetate was able to inhibit the functional activity of the Na⁺ K⁺ -ATPase, which helps to explain the increase in R_{max} and pD₂ to PHE.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Chumbo

O chumbo é um elemento tóxico de ocorrência natural, amplamente utilizado há milhares de anos. Atualmente, é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição (Moreira & Moreira, 2004). Sendo assim, todos os seres humanos possuem chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas (Saryan & Zenz, 1994). Apesar desse metal não apresentar nenhuma função fisiológica conhecida no organismo, seus efeitos tóxicos sobre os homens e animais são conhecidos há muito tempo por promoverem alterações em praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano (Xie et al., 1998).

Trata-se de um metal cinza-azulado, inodoro, maleável. Pertence ao grupo IVB da Tabela Periódica, é representado pelo símbolo Pb, possui número atômico 82 e massa atômica de 207,2 e apresenta quatro isótopos de ocorrência natural, com as seguintes abundâncias: ^{204}Pb (1.4%), ^{206}Pb (24,1%), ^{207}Pb (22,1%) e ^{208}Pb (52.4%) (IUPAC, 1998). Além disso, ele contém quatro elétrons na sua última camada, sendo que apenas dois ionizam-se rapidamente. E nos compostos inorgânicos, esse cátion, possui estado de oxidação +2 e +4, onde o +2 é mais prevalente.

Na atmosfera o chumbo encontra-se na forma particulada. Todavia, quando lançadas no ar, essas partículas, podem ser removidas da atmosfera e serem transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição úmida ou seca. Sua emissão ao meio ambiente se dá por fontes naturais e

antropogênicas, sendo que suas principais fontes naturais são oriundas da atividade vulcânica, do intemperismo geoquímico e das névoas aquáticas (WHO, 1995; Paoliello, 2001).

Ademais, esse cátion possui excepcional maleabilidade, baixo ponto de fusão, alta resistência à corrosão, elevada densidade, alta opacidade aos raios X e gama, reação eletroquímica com o ácido sulfúrico e estabilidade química no ar, no solo e na água. Essas propriedades determinam sua ampla aplicação na indústria e grande importância comercial (WHO, 1995). Dessa forma o chumbo representa um dos metais mais utilizados mundialmente, nesse setor.

Dentre os principais países produtores desse metal nos últimos anos destacam-se os Estados Unidos, a China e a Alemanha. Já o Brasil, de acordo com os dados apresentados pelo International Lead Zinc Study Group -ILZSG (2001), apresentou um consumo de chumbo no ano de 2000 em torno de 64.449 toneladas. Porém, a América do Norte e a Europa foram os principais consumidores, seguidos da Ásia.

No que concerne à utilização do chumbo, ela é amplamente diversificada. Sendo assim, o chumbo metálico é utilizado nos seguintes casos: produção de lâminas e canos; revestimento de cabos, como ingrediente na solda e em material de revestimento na indústria automotiva. Adiciona-se a isso, a sua função protetora contra radiações ionizantes, além de está presente numa variedade de ligas usadas em grande escala industrial. Cerca de 40% do chumbo é usado como metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1995).

Já os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos, porém a sua utilização é controlada por alguns países. Nesses países, concentrações acima de 0.06% (Estados Unidos) e 0.5% (Nova Zelândia), não são permitidas em pinturas internas (WHO, 1995). Diferente do que acontece

no Brasil, posto que, não existe uma lei específica para este fim (NEDER, 1999).

Por outro lado, o arseniato de chumbo pode ser usado como inseticida, o acetato de chumbo tem importante uso na indústria química, o sulfato de chumbo é utilizado como composto na borracha. Já o naftaleno de chumbo é um secante extensivamente usado e o chumbo tetraetila é um aditivo antidetonante para a gasolina, ainda utilizado em alguns países, como México e Nigéria (Paoliello, 2001).

Por fim, os óxidos de chumbo são usados nas placas de baterias elétricas e acumuladores (PbO e $2PbO.PbO_2$), como componentes na manufatura de borracha (PbO), nos ingredientes das tintas (Pb_3O) e nos constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros. Estima-se que a manufatura da bateria representa cerca de 70% do consumo mundial desse metal (ATSDR, 1995).

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

Uma vez compreendido as fontes e os meios de utilização desse metal pelo homem, bem como o fato de que todos os organismos vivos estão expostos de alguma forma ao mesmo, faz-se necessária uma abordagem quanto ao meio de exposição, a cinética e a toxicologia geral do chumbo.

1.1.1 Fontes de exposição ao chumbo

Segundo Jacobs (2002), a fonte primária de exposição e de toxicidade ao chumbo em crianças nos Estados Unidos, advém da presença desse metal nas tintas que revestem o interior das casas. Enquanto que nos adultos da

população em geral, o principal meio de exposição não ocupacional a este metal, são provenientes dos alimentos e das bebidas (WHO, 1995). Não obstante, observa-se um decréscimo de chumbo proveniente nestes elementos durante as últimas duas décadas. Isso pode ser relacionado à diminuição da utilização de bebidas e alimentos armazenados em enlatados com solda de chumbo. (WHO, 1989).

Entretanto, diversos compostos de chumbo, em elevadas concentrações são utilizados em alguns medicamentos tradicionais em várias partes do mundo, sendo que, já foram identificadas intoxicações por chumbo, clinicamente evidenciadas devido ao uso de medicamentos e cosméticos. (Romieu *et. al.* 1995) Nesse contexto, destaca-se o *Azarcón* (cromato de chumbo) usado no México e sudoeste dos Estados Unidos, no tratamento das desordens gastrintestinais. Outro exemplo desta prática encontra-se os chineses e europeus, os quais utilizam esse metal na constituição de algumas pomadas para pele e cosméticos (Paoliello, 2001).

Além da contaminação ambiental vale ressaltar as exposições ocupacionais, que resultam em intoxicação, sofridas por trabalhadores que, muitas vezes, podem ser prevenidas a partir de medidas de higiene industrial e equipamentos de proteção coletiva. (Mavropoulos, 1999).

Em um estudo realizado por Paoliello (2001), foram detectadas concentrações elevadas de plumbemia, de até 105 µg/dL, em trabalhadores de fábrica de vidro colorido, de fundição de chumbo secundário, de manufatura de baterias, de companhia de formulação de concentrado de tintas para plástico, e, em atiradores e instrutores de tiro ao alvo, entre outros. Por outro lado, outro fato preocupante apresentado por este autor, é o transporte da poeira de chumbo do local de trabalho dos pais ao retornarem para suas casas, pois constitui uma importante via de exposição para as crianças.

Nos últimos vinte anos, os padrões que definem as concentrações aceitáveis de chumbo em crianças mudaram. Em 1995, o Center for Disease

Control (CDC) adotou, 10 $\mu\text{g/dL}$ no sangue como valor padrão. A partir das normas sugeridas por esse órgão, crianças com valores de chumbo no sangue entre 10-14 $\mu\text{g/dL}$ devem ser reavaliadas com maior frequência. Enquanto as que apresentarem concentrações entre 15-19 $\mu\text{g/dL}$ devem receber intervenção nutricional e educacional. E nas situações em que as concentrações sanguíneas encontrarem-se entre 20-44 $\mu\text{g/dL}$, recomenda-se uma avaliação médica e ambiental. Contudo, quando os níveis de chumbo alcançarem valores entre 45 -69 $\mu\text{g/dL}$, a indicação é a terapia de quelação, e para concentrações $\geq 70 \mu\text{g/dL}$ constituem um quadro de emergência médica.

No Brasil, de acordo com a Norma Regulamentadora n° 7 do Ministério do Trabalho (1988), os valores de referência de normalidade, o qual representa o valor próximo de ser encontrado numa população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo Permitido (a ultrapassagem deste valor significa exposição excessiva) são, respectivamente, de 40 $\mu\text{g/dL}$ e 60 $\mu\text{g/dL}$ para chumbo no sangue.

1.1.2 Cinética do chumbo no organismo humano

A fim de correlacionar a quantidade de chumbo ambiental e sua biodisponibilidade com seus efeitos tóxicos em órgãos e sistemas humanos, é fundamental compreender como se dá a cinética, ou seja, a interação contínua entre a absorção, distribuição, armazenamento e eliminação do chumbo (MOREIRA & MOREIRA, 2004)

1.1.2.1 Absorção

No organismo humano o chumbo inorgânico é absorvido por inalação ou ingestão, enquanto o chumbo orgânico também pode ser absorvido através da pele íntegra (TSALEV & ZAPRIANOV, 1985). Entretanto, a absorção do chumbo no organismo é influenciada pela via de exposição, espécie química formada, tamanho da partícula, solubilidade em água, e variações individuais no âmbito fisiológico e patológico.

A absorção do chumbo no sangue pode ser superior a 50% da dose inalada para gases de exaustão e sais altamente solúveis. Sendo assim, fumantes e/ou pessoas acometidas por doenças das vias respiratórias superiores, que têm a atividade ciliar prejudicada, são mais susceptíveis a maior deposição das partículas desse cátion no trato respiratório (SARYAN & ZENZ, 1994).

Já no trato gastrointestinal, a absorção desse metal, varia de 2% a 16% se ingerido durante a refeição, mas pode chegar a 60-80%, quando administrado em jejum. Contudo, mulheres grávidas e crianças absorvem 45% a 50% do chumbo presente na dieta. Esta absorção ocorre originalmente no duodeno por mecanismos ainda indefinidos, mas, sugere-se que esse processo envolve os meios de transporte ativo e/ou difusão trans ou paracelular (ATSDR, 2005).

1.1.2.2 Distribuição

Uma vez absorvido, o chumbo se distribui por três compartimentos: sangue, tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e para os tecidos mineralizados (ossos e dentes) (RABINOWITZ *et. al.*, 1976; ATSDR, 2005).

A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo. Não obstante, nas células vermelhas, 90% a 99,8% do metal encontra-se ligado a proteínas de baixo peso molecular (GOYER, 1991),

enquanto o restante encontra-se no plasma provavelmente ligado à albumina, à α_2 -globulina ou como íons livres disponíveis para o transporte aos tecidos. É possível que esta última fração tenha maior importância toxicológica, já que nessa condição eles estão mais biodisponíveis para atingir os sítios-alvo da ação toxicológica.

Entretanto, as concentrações plasmáticas de chumbo raramente têm sido medidas devido às dificuldades analíticas e, por isso, sua relação com as manifestações tóxicas ainda não está claramente definida (Bergdahl *et al.*, 1997; Tsaih *et al.*, 1999).

Em contrapartida, o chumbo presente no sangue se distribui entre os órgãos, às expensas do gradiente de concentração e da afinidade pelo tecido específico. A retenção desse metal nos tecidos moles se estabiliza na vida adulta e pode decrescer em alguns órgãos com a idade, contudo continua a se acumular nos ossos e na aorta durante toda a vida (Tsalev & Zaprianov, 1985; Saryan & Zenz, 1994).

Ademais, ele é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, porém sua concentração no cérebro é baixa. Esse metal pode ainda, penetrar na placenta, fato que determina 57,4% da quantidade desse cátion transferido para o feto, no período gestacional (Nashashibi *et al.*, 1999). Em adição, durante a sua distribuição, o chumbo, assim como o cálcio, se acumula nos ossos e dentes. Então, sua entrada e liberação no esqueleto são controladas por mecanismos envolvidos na homeostase do cálcio (GULSON *et al.*, 1999).

Conforme o modelo apresentado Rabinowitz *et al.*, (1976), esse metal apresenta diferentes tempos de meia-vida, os quais são dependentes do compartimento no qual ele se encontra. Sendo assim, estima-se que ele possa estar presente no sangue por 36 dias, nos tecidos moles por 40 dias e nos ossos por 27 anos.

1.1.2.3 Eliminação

O chumbo é excretado por diferentes vias, dentre elas, as que possuem importância prática incluem-se a excreção renal (75-80%) e a gastrointestinal (15%). Todavia, existem outras fontes de excreção, as quais representam menos que 8%, tais como: o suor, a descamação cutânea, o cabelo, as unhas (Tsalev & Zaprianov, 1985) e o leite materno (Gulson *et al.*, 1998). Porém, a quantidade excretada é independente da via, e é afetada pela idade, características da exposição e espécies. (WHO, 1995).

Os mecanismos exatos de excreção do chumbo pela urina não foram totalmente elucidados, devido às dificuldades associadas com a medição do metal ultrafiltrável no plasma, fato que, inviabiliza medir sua taxa de filtração glomerular (ATSDR, 2005). Dessa forma, sugere-se que a excreção renal ocorra por filtração glomerular, e que seja seguida por reabsorção tubular parcial. Todavia, a taxa de excreção urinária desse cátion é alterada pelo fluxo urinário, com um decréscimo durante a noite. Por conseguinte, como a concentração do chumbo na urina reflete exposição atual, a aferição desse parâmetro tem sido um recurso aplicado em saúde ocupacional como teste de exposição (Skerfving, 1993).

Já a excreção gastrointestinal acontece pela secreção de várias glândulas, entre elas a pancreática, e pela excreção biliar, possivelmente na forma de um complexo chumbo-glutationa. Contudo, a maior parte do chumbo encontrado nas fezes é constituída principalmente pelo metal não absorvido, que passa pelo trato gastrointestinal (Saryan & Zenz, 1994).

1.1.3 Toxicologia Geral do chumbo

Sabe-se que o chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo. Como esse metal afeta virtualmente todos os órgãos e sistemas do organismo, os mecanismos de toxicidade propostos envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a habilidade do chumbo de inibir ou imitar a ação do cálcio e de interagir com proteínas (Moreira & Moreira, 2004)

Por conseguinte, a toxicidade do chumbo resulta, principalmente, de sua capacidade de interferir no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos $-SH$, $-H_2PO_3$, $-NH_2$, $-OH$), que funcionam como doadores de elétrons. As interações bioquímicas do chumbo com grupamentos $-SH$ são considerados de grande significado toxicológico, visto que, se tal interação ocorrer em uma enzima, sua atividade pode ser alterada e resultar em efeitos tóxicos. Além disso, esse metal possui alta afinidade pelas aminas e aminoácidos (Saryan & Zen, 1994; ATSDR, 2005).

A habilidade do chumbo de mimetizar o cálcio na ativação da calmodulina envolve ligação com grupos carboxilas, enquanto que os grupos sulfidrilas estão relacionados com a ativação da proteína quinase C. Portanto, os mecanismos de mimetismo do cálcio e de ligação com algumas proteínas algumas vezes se sobrepõem (Tsalev & Zaprianov, 1985; Skerfving, 1993; Saryan & Zen, 1994; ATSDR, 2005).

Esse metal a partir da sua alta toxicidade é capaz de promover efeitos adversos no organismo humano, especialmente sobre o sistema cardiovascular, sendo um dos constituintes envolvidos na causa da hipertensão arterial. Nesse sentido, existem vários estudos que indicam que tanto a exposição ocupacional quanto a ambiental podem promover aumento

na pressão sanguínea (Sharp, *et al.*, 1987; Pocock, *et al.*, 1984; Pirkle, *et al.*, 1985). Corroborando com esses estudos, pesquisas realizadas em animais experimentais demonstraram que baixas exposições de chumbo no organismo são caracterizadas pelo aumento da resistência vascular e reatividade vascular anormal (Bohr & Webb, 1984).

1.2 Hipertensão arterial

A pressão arterial (PA) de um indivíduo ou população é um traço quantitativo altamente variável. Em estudos populacionais a distribuição da PA se assemelha a uma distribuição normal, sendo levemente desviada para a direita. Ainda, existe uma correlação positiva entre os níveis de PA de um indivíduo e a incidência de doenças cardiovasculares, renais e mortalidade, mesmo que este indivíduo tenha sua PA na faixa dita de normalidade. Uma vez que não existe um nível preciso a partir do qual os valores de PA passam a aumentar o risco cardiovascular, a conceituação de hipertensão arterial é arbitrária e definida operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo (Pereira & Krieger, 2005).

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica de etiologia multifatorial, caracterizada por elevação crônica dos níveis basais da pressão arterial, e é considerada como um importante problema de saúde pública por ser uma doença de alto risco e de difícil controle. É também reconhecida como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de eventos cerebrovasculares e infarto cardíaco (Macmahon, 1995). Segundo Kearney (2005), 26.4% da população adulta mundial no ano de 2000 apresentava hipertensão com perspectiva de aumento para 29.2% em 2025.

Por se tratar de um problema que afeta a população mundial, as novas diretrizes para o controle da pressão arterial (PA), determinadas a partir do Sétimo Relatório do Comitê Nacional sobre Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Pressão Arterial (JNC VII, 2003) - EUA, recomenda que em indivíduos adultos, devem ser considerados normais valores de pressão arterial sistólica abaixo de 120 mmHg e de pressão arterial diastólica abaixo de 80 mmHg.

Segundo, Perry et al. (1994) 95% dos pacientes hipertensos são portadores de hipertensão “primária ou essencial”, nos quais não pode ser imediatamente evidenciada uma causa básica renal ou adrenal para elevação da (PA). Basicamente a hipertensão primária é decorrente de inter-relacionamentos entre fatores genéticos e ambientais. Numa minoria de pacientes hipertensos, o processo hipertensivo se deve a uma doença renal ou arterial renal, excesso de hormônios corticais ou medulares adrenais, uso de medicamentos ou arterite sistêmica.

Contudo, a gênese e/ou manutenção da HA, é constituída por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos pode-se citar as alterações nos parâmetros hemodinâmicos os quais promovem modificações no débito cardíaco e na resistência vascular periférica (Folkow, 1982); alterações funcionais tais como: aumento da atividade simpática e do sistema renina-angiotensina; hereditariedade, resistência à insulina (Harrap, 1994) e a raça (Freis, 1973). Concernentes aos fatores extrínsecos ou ambientais incluem-se obesidade, tabagismo, sedentarismo, ingestão de sal (Bakris & Mensah, 2002) aumento nos níveis sanguíneos de colesterol (Shang, 2003) bem como exposição a metais pesados como o chumbo (Staessen, 1994; Schwartz, 1994; Vaziri et al., 1999) e o mercúrio (Carmignani et al. 1992; Vassallo et al. 1994; Cunha, et al. 2000). Todos esses fatores corroboram para instalação e manutenção da HA.

Por outro lado, sabe-se que a PA depende de fatores físicos, como o volume sanguíneo e capacitância da circulação, que são resultantes da

combinação instantânea entre o débito cardíaco ($FC \times VS$), a resistência periférica e a capacitância venosa. A partir da relação $PA = DC \times RVP$, conclui-se que fatores capazes de alterar o DC e/ou a RVP, alteram a PA. Diversos estudos sugerem que o aumento da reatividade vascular por agentes pressóricos, podem ser um dos fatores que contribuem para a hipertensão (Bohr & Webb, 1984). Entretanto, é certo que, o fator principal responsável para a manutenção do quadro hipertensivo é a resistência vascular aumentada (Folkow, 1982; Lund-Johansen, 1983).

A resistência vascular é basicamente controlada por fatores neuro-humorais, estruturais e funcionais, logo alterações nesses componentes refletem em aumento na RVP e conseqüentemente na PA.

Dentre as alterações funcionais e estruturais que modificam a resistência vascular pode-se citar: o aumento da produção e/ou liberação de fatores vasoconstritores, bem como redução na produção e/ou liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio (Lüscher & Vanhoutte, 1986); o aumento intracelular de cálcio, que por sua vez, aumenta a reatividade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, como os agonistas α_1 -adrenérgicos noradrenalina e fenilefrina (Horowitz et al., 1996). Além desses é possível citar, o aumento da atividade simpática, o aumento da sensibilidade das proteínas contráteis, o aumento da permeabilidade da membrana aos íons cálcio e sódio, modificações na atividade da bomba de cálcio sensível ao ATP (Ca^{2+} -ATPase) da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático, modificações da atividade do trocador sódio-cálcio (Na^+/Ca^{2+}), e também na atividade da bomba de sódio e potássio sensível ao ATP ($Na^+ K^+ -ATPase$) (Folkow, 1982; Konishi & SU, 1983; Bohr & Webb, 1984; Marín, 1993).

A partir dos estudos pioneiros realizados por Furchogott e Zawadzki (1980), ficou esclarecido que a célula endotelial além de proporcionar uma barreira física entre o sangue e o tecido subjacente ela é capaz de modular o tônus vascular. Sendo assim, o endotélio vascular é considerado um órgão endócrino, o qual produz substâncias contráteis e relaxantes, capazes de

regular o tônus e o crescimento vascular e com isso, possui papel essencial no controle e manutenção dos níveis adequados de PA.

1.2.1 Papel do endotélio vascular na regulação do tônus vascular

O endotélio é constituído por uma monocamada de epitélio pavimentoso localizada entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular e utiliza essa posição estratégica para manter a homeostase da parede vascular e regulação da circulação (Carvalho, et al, 2005). As células endoteliais têm a capacidade de liberar substâncias metabolicamente ativas, as quais modulam importantes funções no organismo tais como o controle do tônus vasomotor, o calibre vascular, o fluxo sanguíneo e também participa do controle das respostas inflamatórias e imunológicas (Rubanyi, 1993). Essas substâncias produzidas pelo endotélio foram denominadas de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (Furchgott & Vanhoutte, 1989).

Dentre as substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio podemos citar, o óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadski, 1980) a prostaciclina (PGI₂) (Bunting et al, 1976; Moncada et al., 1977; Vanhoutte, 1993) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Taylor & Weston, 1988; Félétou & Vanhoutte, 1988). Quanto às substâncias vasoconstritoras temos a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988), os ânions superóxido (O₂⁻) (Furchgott, 1983; Rubanyi & Vanhoutte, 1986) e os produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A₂ (TXA₂) e as prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PGF_{2α}) (Frolich & Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993).

Em seguida serão descritos sucintamente alguns dos fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, que apresentam maior relevância para a compreensão dos mecanismos envolvidos no presente estudo.

1.2.1.1 Fatores relaxantes derivados do endotélio

1.2.1.1.1. Óxido Nítrico - NO

Em 1980, Furchgott & Zawadiski, foram os primeiros a demonstrar o papel obrigatório das células endoteliais intactas, na vasodilatação induzida pela acetilcolina em anéis de aortas e arteríolas de coelhos. A partir deste estudo, estes autores sugeriram que o endotélio liberava um fator difusível essencial para o relaxamento vascular, o qual eles denominaram de EDRF, porém, ainda era preciso identificar qual seria este fator. Então, a partir dessa descoberta surgiram vários estudos a fim de identificar qual seria essa importante substância vasodilatadora derivada do endotélio.

Os primeiros estudos realizados por Furchgott (1984) reportaram que o EDRF poderia ser um radical livre derivado do metabolismo do ácido araquidônico. Por outro lado, este, poderia ser um fator de natureza lábil que participaria das reações redox em pH fisiológico (Furchgott, 1984; Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

Finalmente, a partir dos estudos realizados em 1987, por três grupos de pesquisadores absolutamente independentes, descobriu-se que o EDRF era o NO (Palmer *et al.*, 1987; Ignaro *et al.*, 1987; Furchgott, *et al.*, 1987).

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris & Billiar, 1994). Trata-se de um radical livre, gasoso inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio, oito de oxigênio e possui um elétron desemparelhado (Beckman & Koppenol, 1996). Sua síntese ocorre a partir da oxidação do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina, o qual é metabolizado em NO e L-citrulina. Esta reação é catalisada por uma família de enzimas, denominadas de óxido nítrico sintase (NOSs) e requer a ação de co-fatores tais como: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida - NADPH); tetrahydrobiopterina (BH₄); flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Palmer *et al.*, 1987;

Angus & Cooks, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Moncada *et al.*, 1991). Existem três isoformas da NOS: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS), (Förstemann *et al.*, 1993; Förstemann *et al.*, 1994). Tanto a eNOS, quanto a nNOS são expressas de maneira constitutiva e sua ativação é dependente da formação do complexo cálcio-calmodulina (Long & Stone, 1985). Já a iNOS se expressa principalmente sob condições patológicas, tais como em processos inflamatórios, e sua ativação é independente do aumento intracelular de cálcio, uma vez que, ela se encontra fortemente ligada à calmodulina (Cho *et al.*, 1992).

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Sob condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos químicos tais como, acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), substância P, agregação plaquetária, fatores que elevam os níveis intracelulares de cálcio, dentre outros. Além desses, existem os fatores físicos, como a força de arraste produzida pelo fluxo sanguíneo pulsátil, a pressão que o sangue exerce sobre a parede dos vasos, bem como o atrito exercido pelo fluxo sanguíneo sobre o endotélio, mecanismo conhecido como estresse de cisalhamento ou *shear stress*. Todos esses fatores corroboram para a produção basal do NO, resultando em vasodilatação e conseqüentemente aumento do fluxo sanguíneo (Palmer *et al.*, 1988, Lüscher & Vanhoutte, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Shesely *et al.*, 1996; Marín & Rodriguez-Martínez, 1997).

Uma vez produzido, o NO se difunde rapidamente para o músculo liso vascular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que essa molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (Moncada *et al.*, 1991). O NO ao penetrar para o interior da célula muscular lisa, interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), acarretando uma alteração conformacional dessa enzima, tornando-a ativa (GCa). Esta por sua vez, hidrolisa moléculas de 5'-trifosfato

de guanosina (GTP) em 3', 5' -monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), aumentando os níveis intracelulares deste último. Por outro lado, o aumento da concentração intracelular de GMPc estimula uma proteína cinase (PKG) dependente de GMPc. A PKG uma vez ativada promove fosforilação de várias proteínas, as quais irão reduzir as concentrações intracelulares de cálcio ocasionando assim, o relaxamento do músculo liso vascular (Rapoport & Murad, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985). A redução nos níveis intracelulares de cálcio ocasionada pela via NO/GMPc/PKG envolvem os seguintes mecanismos: fosforilação da fosfolambam, que por sua vez ativa a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático; estimulação da saída de cálcio intracelular via ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} ; inibição da formação do 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3); inibição de canais de cálcio do tipo L; inibição da liberação de cálcio pelos estoques intracelulares; e ainda promovem a redução da sensibilidade da cadeia leve da miosina (MLCK) ao cálcio (Ralymaekers *et al.*, 1988; Furukawa *et al.*, 1991; Hirata *et al.*, 1990; Tare *et al.*, 1990; Meisherei *et al.*, 1986; Rembold, 1992).

Contudo as ações do NO e do GMPc também envolvem outros eventos que são independentes da ativação de cinases. Sendo assim, o NO ao agir diretamente (via S-nitrosilação dos resíduos de cisteína) ou indiretamente (via GMPc) pode ligar-se aos canais de potássio ativando-os, e assim promove hiperpolarização da membrana da celular muscular lisa (Bolotina *et al.*, 1994). Ademais, o GMPc pode ainda, inibir a fosfodiesterase do monofosfato de 3', 5' – adenosina (AMPc), aumentando a meia-vida do AMPc (Lincoln, 1989) e assim, o relaxamento do músculo liso vascular.

Por fim sabe-se que o NO liberado, possui uma meia-vida menor que dez segundos devido a sua rápida oxidação a nitrito (NO_2^-) e a nitrato (NO_3^-).

Sendo assim, o NO ao se ligar à hemoglobina ou a outras proteínas que contêm o grupo heme, chega ao fim de sua atividade biológica (Snyder & Bredt, 1992). Por outro lado, alguns autores propõem que possivelmente haja interação entre o óxido nítrico e os radicais livres oriundos do oxigênio, como o O_2^- , que por sua vez promove perda da sua atividade biológica e assim,

prejuízo na resposta vasodilatadora derivada do endotélio (Rubanyi & Vanhoutte, 1986). Ademais, a partir dessa interação, também pode haver formação de substâncias citotóxicas, tais como o peroxinitrito (ONOO^-) e radicais hidroxila (OH^-) (Beckman *et al.*, 1990; Huie & Padmaja, 1993). Contudo, a perda da atividade biológica do NO está associada ao desenvolvimento e/ou manutenção de várias doenças como a hipertensão arterial (Grunfeld *et al.*, 1995; Kerr *et al.*, 1999).

1.2.1.1.2 Prostaciclina - PGI_2

A PGI_2 foi a primeira substância vasodilatadora dependente do endotélio descoberta, sendo caracterizada como uma potente substância vasodilatadora, além de exercer forte ação antitrombótica (Bunting *et al.*, 1976). Essa substância é originada a partir das prostaglandinas endoperóxidos da membrana celular de plaquetas e nas células endoteliais, ela é sintetizada a partir da via do ácido araquidônico. Esse por sua vez é liberado pelos fosfolídeos de membrana, principalmente a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, pela ativação da fosfolipase A_2 . Uma vez liberado, o ácido araquidônico sofre ação da enzima ciclooxigenase (COX) e é convertido no primeiro produto formado por essa via, prostaglandina G_2 (PGG_2). Entretanto, a PGG_2 é altamente instável e rapidamente é convertida em PGH_2 a qual é subseqüentemente convertida em PGI_2 , pela ação da sintase da prostaciclina (Gryglewski, 1988).

Uma das enzimas responsáveis pela metabolização do ácido araquidônico é a ciclooxigenase. Sabe-se que existem duas isoformas dessa enzima, a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a ciclooxigenase 2 (COX-2). A COX-1 é encontrada em muitas células como enzima constitutiva, enquanto que a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e hormonais. Entretanto, ambas podem ser inibidas por algumas drogas antiinflamatórias como a indometacina

o ácido acetilsalisílico e os glicocorticóides (Smith, 1992; Rimarachin *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 1992).

A PGI₂ é sem dúvida um dos metabólitos mais importantes da via do ácido araquidônico, porém possui uma meia vida curta de aproximadamente três minutos. Devido a alta labilidade dessa substância, ela é logo hidrolisada em 6-ceto-PGF_{1α} e em outros metabólitos inativos ou menos potentes do que a PGI₂. Sua síntese e liberação, pelas células endoteliais, são estimuladas a partir dos seguintes mecanismos: estiramento da parede vascular, acetilcolina, bradicinina, substância P, fator de crescimento derivado de plaquetas e trombina (Gryglewski, 1988).

Por outro lado, a prostaciclina age sobre os receptores acoplados a proteína G da membrana das células endoteliais, e assim, ativa adenilato ciclase (AC), a qual degrada o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Este por sua vez, estimula a saída de Ca²⁺ do citosol, diminui a sensibilidade da maquinaria contrátil a esse cátion, estimula os canais de potássio sensíveis ao ATP, e promove hiperpolarização da célula. Todos esses eventos resultam em diminuição do cálcio livre no citosol e conseqüentemente causam relaxamento do músculo vascular. Além disso, a PGI₂ estimula a liberação de NO pelas células endoteliais, coadjuvando os efeitos vasodilatadores promovidos pelo NO (Kukovetz *et al.*, 1979; Bukoski *et al.*, 1989; Shimokawa *et al.* 1988).

1.2.1.1.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDRF)

promove por um lado, ativação de proteínas que inibem a Ca²⁺, Mg -ATPase do reticulo sarcoplasmático

Desde a descoberta da PGI₂ e do NO, vários estudos foram realizados a fim de esclarecer outras possíveis substâncias relaxantes produzidas pelas células endoteliais. No entanto, foi a partir dos estudos, realizados por Félétou & Vanhoutte (1988) que foi descoberta a presença de uma terceira substância

produzida pelas células endoteliais capaz de induzir hiperpolarização da membrana das células do músculo liso vascular, a qual foi denominada de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDRF). Mais tarde, em 1996 esses mesmos autores, demonstraram que essa substância é resistente a inibidores da COX e da NOS.

Ainda não há um consenso na literatura científica quanto a identidade do EDRF e nem aos mecanismos exatos, pelos quais esse fator promove relaxamento do músculo liso vascular (Coats, et al.,2000). Contudo, vários trabalhos sustentam a hipótese de que a natureza deste fator possa variar conforme o leito vascular e a espécie animal estudada. Alguns estudos apontam como possíveis candidatos a EDRF, os metabólitos do ácido araquidônico derivados da via do citocromo P-450, os ácidos 11,12 – epoxieicosatrienóicos (11,12 EETs), a anandamida, bem como os íons potássio e o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e musculares lisas através da *gap junctions* (Komori & Vanhoutte, 1990; Chen & Cheung, 1996; Campbell *et al.*, 1996; Edward *et al.*, 1998; Féléton & Vanhoutte, 1999). Por fim, num trabalho realizado em pequenas artérias mesentéricas de camundongo, Moncada *et al.* (2000), propuseram mais um candidato para fazer parte dessa lista, trata-se do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), derivado principalmente da eNOS.

Por outro lado, os mecanismos propostos para explicar o efeito vasodilatador do EDRF envolvem ativação dos canais de potássio e da Na⁺ K⁺ -ATPase (Quignard *et al.*, 1999). Já em 1998, Edward *et al.*, reportaram que os íons potássio liberados pelas células endoteliais e acumuladas no espaço extracelular promovem hiperpolarização das células do músculo liso vascular pela ativação da Na⁺ K⁺ -ATPase. Porém ainda não se sabe ao certo, qual o tipo de canal de potássio é ativado, todavia há fortes indícios que sejam os canais de potássio ativados por cálcio (Féléton & Vanhoutte, 1999).

1.2.1.2 Fatores contráteis derivados do endotélio

1.2.1.2.1 Angiotensina II

A angiotensina II é sem dúvida um dos mais importantes fatores vasoconstritores, produzidos pelas células endoteliais e realiza importante papel na regulação da pressão sangüínea, além de influenciar no crescimento e remodelamento vascular (Timmermans et al., 1993). Inicialmente, o sistema renina-angiotensina foi descrito como um sistema circulatório, porém, a maioria de seus constituintes estão localizados em vários tecidos do organismo sugerindo a existência de um sistema renina-angiotensina local ou tecidual (Dzau, 1989; Danser, 1996).

Sua síntese envolve várias reações bioquímicas, envolvendo diversos órgãos e a circulação (Kifor & Dzau, 1987). A partir de um estímulo como, por exemplo, diminuição da perfusão renal, as células justaglomerulares granulares das arteríolas aferentes renais são estimuladas e sintetizam a renina. Essa por sua vez, é liberada no sistema circulatório, onde age sobre o seu substrato, o angiotensinogênio hepático, convertendo-o em angiotensina I, um decapeptídeo, que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), presente principalmente nas células endoteliais do pulmão, origina a angiotensina II, um octapeptídeo com potente ação vasoconstritora (Costerousse, 1992). Essa enzima pode ser encontrada no plasma, no interstício e no interior das células. A ECA tecidual está presente na maioria dos órgãos tais como, coração, cérebro, vasos sangüíneos, rins, fígado, dentre outros (Hollenberg, 1998).

Os efeitos celulares da angiotensina II se dão através da sua interação com receptores específicos da membrana, principalmente o AT₁ e o AT₂ (De Gasparo *et al.*, 1995). A estimulação da angiotensina II, via receptor AT₁, promove vasoconstrição do músculo liso vascular através da ativação da fosfolipase C (PLC). Essa por sua vez, hidrolisa o fosfatidilinositol -4,5-bifosfato

em 1,4,5-inositoltrifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), os quais elevam as concentrações intracelulares de cálcio que ativam o sistema acoplamento excitação-contração do músculo liso vascular (Khalil et al., 1995; Capponi, 1996). Além disso, a estimulação desses receptores levam a inibição da AC, e conseqüentemente redução nos níveis plasmáticos de AMPc (Ohnishi et al., 1992). Ainda sob ativação dos receptores AT_1 , a angiotensina II é capaz de estimular as células endoteliais a produzir NO e PGI_2 contrapondo os seus efeitos vasoconstritores; endotelina-1; $O_2^{\bullet-}$; vasopressina; liberação de aldosterona pelo córtex supra-renal e ainda promove aumento da liberação e redução da recaptção de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas (Toda, 1984; Zimmerman et al., 1987; Griendling et al., 1997).

Por outro lado, a angiotensina II ao atuar sobre os receptores AT_2 , promove relaxamento do músculo liso vascular, diferenciação e regeneração celular (Unger et al., Carey et al., 2001).

1.2.1.2.2 Prostaglandinas vasoconstritoras

Sabe-se que os prostanóides são derivados do ácido araquidônico, o qual é liberado pelos fosfolipídeos da membrana, sob ação da fosfolipase A_2 (PLA_2). A metabolização do ácido araquidônico resulta na síntese de PGH_2 , e a partir desse precursor são gerados todos os prostanóides incluindo a $PGF_{2\alpha}$ e o TXA_2 (Moncada & Vane, 1979). Esses por sua vez, agem em receptores específicos na membrana do músculo liso vascular, os quais, via PLC, promovem aumento do cálcio citosólico e vasoconstrição (Halushka et al., 1989; Naumiya et al., 1999). Apesar da liberação das prostaglandinas, a PGI_2 é o principal produto do metabolismo do ácido araquidônico via COX (Moncada & Vane, 1979). Por isso, pequenas quantidades desses prostanóides, liberados pelas células endoteliais, têm seus efeitos mascarados pela produção de substâncias vasodilatadoras endoteliais, como o NO, PGI_2 e EDHF.

1.2.1.2.3 Espécies reativas derivadas do oxigênio

O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) é usado para designar radicais livres e intermediários relacionados, como por exemplo, H_2O_2 que, embora não sejam radicais livres *per se*, participam freqüentemente da produção dos mesmos (Laurindo, 2005)

As EROs, são liberadas pelas células endoteliais em resposta ao *shear stress* ou na presença de agonistas endoteliais como a bradicinina (Shimizu et al., 1994). Essas substâncias são formadas a partir de processos redox que liberam o oxigênio da molécula de água, essa reação envolve a redução univalente do oxigênio, na presença de um elétron livre (e^-), produzindo: $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^- (Fridovich, 1997). Esse processo é mediado por diversos sistemas enzimáticos incluindo as oxidases NAD(P)H e xantinas (Taniyama & Griendling, 2003).

Entretanto, o $\text{O}_2^{\bullet-}$, é considerado como uma das mais importantes EROs encontrada na vasculatura (Droge, 2002). Ainda que este ânion exerça efeitos sobre a função vascular, ele também é capaz de gerar outras espécies reativas. Neste sentido, a reação desse ânion com NO produz OONO^- , o qual possui grande capacidade deletéria sobre o sistema vascular (Griendling et al., 2000). Desta forma, o OONO^- é capaz de mascarar a vasodilatação induzida pelo NO e, com alta toxicidade se decompõe em uma outra espécie reativa similar aos OH, os quais, também apresentam atividade citotóxica e estão envolvidos no processo de disfunção endotelial (Rubany & Vanhoutte, 1986).

Por outro lado, o H_2O_2 é produzido pela dismutação do ânion superóxido. Esta reação pode ocorrer espontaneamente ou pode ser catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1997), enzima antioxidante, que possui importante participação na regulação dos níveis estáveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no organismo. Existem três isoformas da SOD: a superóxido dismutase citosólica cobre-zinco (CuZn-SOD ou SOD-1); a mitocondrial ou manganês (Mn-SOD ou SOD-2) e a extracelular cobre-zinco (EC-SOD ou SOD-3). Cada isoforma possui importante função individual, protegendo o sistema vascular contra o

estresse oxidativo (Yan, et al., 2005). Ademais a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD produz mais EROs estáveis, H_2O_2 , o qual é convertido enzimaticamente em água (H_2O) pela ação da catalase e da glutathione peroxidase (GPx). O H_2O_2 pode também, reagir com os metais de transição e ser convertido em radicais altamente reativos, OH^{\bullet} , bem como ser metabolizado pela mieloperoxidase (MPO) e formar o ácido hipoclorídrico (HOCL) (Griendling et al., 2000).

Por fim, as EROs aumentam o tônus vascular, uma vez que elas facilitam a mobilização de cálcio citosólico no músculo liso vascular e promovem aumento na sensibilidade das proteínas contratéis ao cálcio (Suzuki & Ford, 1992; Jin et al., 1991). Além disso, sabe-se que essas substâncias afetam muitas funções endoteliais, prejudicando o efeito vasorelaxante dependente do endotélio, devido a diminuição da biodisponibilidade de NO na parede vascular (Mugge, 1991). Em contrapartida, quando as EROs excedem à capacidade antioxidante do organismo, tem-se o que é denominado de estresse oxidativo, o qual realiza papel fundamental na iniciação e progressão das disfunções cardiovasculares associadas com doenças como, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus, doença cardíaca isquêmica e falência cardíaca. Elas também causam apoptose, aumento da adesão de monócitos e participam do processo de angiogênese (Yoshihiro, 2003).

Uma vez entendido o papel e/ou fatores endoteliais, que justificam a sua participação no controle da resistência vascular periférica, é fundamental compreendermos os fatores envolvidos na contração do músculo liso vascular, pois o funcionamento de ambos está estritamente relacionado.

1.2. Mecanismos envolvidos na contração do músculo liso vascular

Para melhor compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos no controle do fluxo sanguíneo, bem como das condições patológicas oriundas da

perda da homeostase da regulação do tônus vascular, é fundamental o estudo da estrutura e dos mecanismos intracelulares envolvidos na contração do músculo liso vascular.

O músculo liso vascular possui características, dentre as quais pode-se citar a presença de filamentos contráteis de actina e miosina e filamentos intermediários ancorados a corpos densos. Entretanto, não possui sistema de túbulos T e nem troponina. Ademais, a principal fonte de cálcio, necessário para o desencadeamento do processo contrátil, provém principalmente, do meio extracelular. Além desses componentes, faz-se necessário citar a importância de outras duas proteínas, a caldesmon, a qual regula as interações entre os filamentos de actina e miosina e a calponina, que é responsável pela inibição da atividade da enzima quinase Mg^{2+} -ATPase localizada na cadeia leve da miosina (MLCK) (Walsh, 1994; Marin, 1993).

A ativação de receptores localizados na membrana das células do músculo liso vascular, por neurotransmissores ou hormônios dá início a uma série de processos celulares que lideram a contração do músculo liso vascular. Esses processos envolvem vias de transdução de sinais, que regulam o influxo de íons cálcio e/ou liberação de íons cálcio pelos estoques internos (retículo sarcoplasmático), os quais, estão envolvidos no aumento da concentração de cálcio livre no meio intracelular. Em adição, existem os elementos contráteis, tais como, os miofilamentos de actina e miosina, tropomiosina e a proteína citoplasmática calmodulina, acionados pelo cálcio livre no citosol (Stull, *et al.*, 1991).

Como mencionado acima, o influxo de cálcio do meio extracelular representa a principal via de aumento da concentração intracelular de cálcio nas células do músculo liso vascular. Todavia, para que este influxo ocorra, estão envolvidos os seguintes canais: canais de cálcio operados por receptores (ROCC); canais de cálcio operados por voltagem (VOCC); canais de cálcio operados por estoques (SOCC); canais de cálcio ativados por estiramento (SACC) e ainda a bomba de cálcio e o trocador Na^+/Ca^{2+} (Jackson,

2000). Em adição, sabe-se que tanto a $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ quanto o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ realizam importante papel na modulação da contratilidade vascular (Klim et al., 2005). De modo que a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ relaxa o músculo liso vascular por hiperpolarização da membrana (McCarron & Halpern, 1990; Paulson & Newman) enquanto a sua inibição promove acúmulo de sódio no mioplasma, ativação do modo reverso do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aumento do cálcio no citosol e conseqüentemente, contração do músculo liso vascular (Marín et al., 1991; Fernandez-Afonso, et al., 1992)

Dentre os fatores que podem desencadear o fenômeno da contração por influenciar a mobilização de íons cálcio para o meio intracelular, é possível citar a ligação de agonistas, tais como, fenilefrina, angiotensina II, serotonina e endotelinas a receptores específicos na membrana da célula do músculo liso vascular. Esses receptores são constituídos por sete domínios transmembrana, acoplados a um complexo de proteínas G, as quais, são formadas por três subunidades (α , β e γ). Por outro lado, quando as proteínas G, estão no seu estado inativo, elas encontram-se unidas entre si e ligadas ao difosfato de guanosina (GDP). Não obstante, quando um agonista se liga ao seu receptor este complexo protéico é ativado, e a subunidade $G\alpha$ se dissocia da subunidade $G\beta\gamma$ e liga-se ao trifosfato de guanosina (GTP). O complexo $G\alpha$ -GTP, então, ativa a fosfolipase C (PLC) a qual promove hidrólise do fosfatidilinositol 4' 5'-bifosfato (PIP_2) em 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, por meio da ativação dos canais de cálcio sensíveis ao IP_3 , presente nessa organela, e assim promove elevação da concentração desse cátion no citosol. Já o DAG, estimula a proteína cinase C (PKC), que promove aumento da sensibilidade das proteínas contrateis ao íon cálcio, maior mobilização do cálcio através dos canais de cálcio na membrana celular e fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) (Horowitz et al., 1996; Karaki et al., 1997).

Por outro lado, para que o processo de contração do músculo liso seja desencadeado pelo cálcio, é de extrema importância a participação de uma proteína citoplasmática, a calmodulina. Essa proteína é constituída de quatro

sítios de ligação para o íon cálcio, e a sua afinidade por este cátion é dependente da concentração intracelular do mesmo. Então, quando a concentração intracelular de cálcio alcança aproximadamente 10^{-6} M, seja pela entrada de cálcio do meio extracelular via canais de cálcio, ou por sua liberação através das organelas internas ou ainda pela associação de ambos os mecanismos, ocorre o acoplamento do Ca^{2+} à calmodulina. (Means et al., 1991). Uma vez formado o complexo cálcio-calmodulina, ocorre ativação de uma quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que, por conseguinte, ativa a fosforilação da MLC, viabilizando a interação entre os filamentos de actina e miosina, portanto, a contração muscular (Stull, *et al.*, 1991; Horowitz, *et al.*, 1996). Contudo, quando a concentração intracelular de Ca^{2+} é menor que 10^{-6} M, ocorre desativação do complexo cálcio-calmodulina-MLCK, inativando a fosforilação da miosina ou a via da fosfatase miosínica, fato que diminui a afinidade da miosina pela actina, e conseqüentemente induz o relaxamento do músculo liso vascular. Em adição, são fundamentais para esse processo os nucleotídeos cíclicos como o AMPc e o GMPc, que são ativados pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e pela quinase dependente de GMPc, respectivamente. A ativação da PKA promove ativação de proteínas que inibem a Ca^{2+} , Mg -ATPase do retículo sarcoplasmático. Por outro lado, a ativação da PKG ativa a Ca^{2+} , Mg -ATPase sarcolemal inibindo os canais de cálcio nesses locais. Dessa forma, ocorre recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (via PKA) e saída do mesmo pela membrana plasmática (via PKG), diminuindo a sua concentração no citosol. Ademais, a ativação da PKA pode inibir a PKC diminuindo a síntese de IP_3 e DAG, corroborando para o relaxamento do músculo liso vascular (Bomzon & Huang, 2001).

A partir dos mecanismos até aqui discutidos, fica claro que o endotélio e o músculo liso vascular estão intimamente relacionados, e que ambos contribuem fortemente para a regulação e/ou manutenção do tônus vascular. Está claro também que o tônus vascular realiza importante papel na regulação da pressão sangüínea, e na distribuição do sangue entre os tecidos e órgãos do corpo. Sendo assim, torna-se mais fácil compreender como uma disfunção

envolvendo essas estruturas, podem estar relacionadas com a gênese da hipertensão arterial.

1.3 Disfunção endotelial e hipertensão arterial

Desde que o termo disfunção endotelial foi determinado por Furchgott e Zawadzki (1980), diversos trabalhos têm correlacionado a presença desse distúrbio não apenas com a HA e aterosclerose, mas também com outros processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo, angina, falência renal e cardíaca, síndrome coronariana, microalbuminúria, diálise, trombose, coagulação intravascular, diabetes tipo I e II, prejuízo na tolerância a glicose, resistência a insulina, hiperglicemia, obesidade, tabagismo, dentre outros (Félétou & Vanhoutte, 2006). Em termos gerais a disfunção endotelial é caracterizada pela redução dos fatores relaxantes derivados do endotélio, o que acarreta diminuição da biodisponibilidade do NO, diminuição na produção e/ou inativação do mesmo (Mombouli & Vanhoutte, 1999). Soma-se a isso, o aumento na produção dos fatores vasoconstritores, os quais podem ser responsáveis pela redução dos EDRFs (Funder, 2001).

Vários estudos, realizados em humanos e em animais experimentais, documentaram, a existência de disfunção endotelial na hipertensão, a qual é possível de ser detectada a partir das alterações no relaxamento dependente do endotélio induzido por agonistas como a acetilcolina e a bradicinina (Lüscher *et al.*, 1987; Angus & Cocks, 1989; Panza *et al.*, 1990, Taddei *et al.*, 1997; Briones *et al.*, 1999).

É notório que as alterações conseqüentes da disfunção endotelial nos processos hipertensivos são multifatoriais e em muitos casos, estão relacionadas com o tipo de hipertensão desenvolvida, bem como, sua duração

e tipo de leito vascular estudado. Entretanto, há controvérsias na literatura, no que diz respeito ao relaxamento dependente do endotélio na hipertensão. Sendo que, em alguns casos essa resposta está prejudicada, enquanto que, em outros ela permanece inalterada ou aumentada (Lüscher *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987, Panza *et al.*, 1990, Taddei *et al.*, 1997; Briones *et al.*, 1999).

Dentre os mecanismos que explicam a redução na resposta vasodilatadora dependente do endotélio pode-se citar o prejuízo na liberação basal de NO (Dohi *et al.*, 1990). Não obstante, em outras situações, a síntese e liberação de NO não está alterada, mas sua biodisponibilidade está reduzida devido ao aumento da formação de $O_2^{\cdot-}$ na hipertensão (Suzuki, *et al.*, 1995), esses, podem ainda, inibir outras fontes vasodilatadoras dependentes do endotélio, a PGI_2 e o EDHF, coadjuvando para o aumento da RVP e conseqüentemente HA (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Postula-se que as EROs regulam diversas classes de genes, incluindo àqueles que controlam a formação de moléculas de adesão, substâncias quimotáticas, e enzimas antioxidantes. Ademais, elas ativam metaloproteinases e possibilitam inclinação do balanço endotelial para produção de fatores vasoconstritores, os quais possuem relevância particular na patogênese vascular (Griendling & Fitzgerald, 2003). Por outro lado, diversos estudos, demonstraram que a disfunção endotelial presente na hipertensão aumenta a produção de substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II, PGH_2 , TxA_2 , e endotelina-1 (Leite & Salgado, 1992; Shiota *et al.*, 1992; Lüsche & Vanhoutte, 1986; Taddei *et al.*, 1997; Schiffrin & Thibaut, 1991). Todavia, essas substâncias, além do seu potente efeito vasoconstritor, também participam do crescimento e proliferação celular e da agregação plaquetária.

Nesse contexto, vale ressaltar a importância de alguns fatores ambientais na gênese da HA, como é o caso da exposição ao chumbo, já que há fortes correlações positivas no que se refere à presença de altos níveis

desse metal na circulação de indivíduos portadores dessa doença (Shaper, 1985; Staessen, 1994; Schwartz, 1994; Vaziri, 1999; Tsao, 2000; Vaziri, 2001).

1.4 Efeitos do chumbo na pressão arterial

A exposição ao chumbo pode estar associada com aumento da pressão sangüínea (Kopp et al., 1988; Harlan, 1988; Schwartz, 1988; Lal, et al., 1991).

Vários estudos sugerem que a exposição a esse metal, tanto na forma aguda quanto crônica, pode ser associada com alterações significantes sobre a função do sistema cardiovascular. Entretanto os efeitos desse metal sobre esse sistema parece ser diretamente influenciado pela dose, tempo de exposição, via de exposição, idade, temperatura e ingestão de cálcio (Khera, et al., 1980; Harlan, et al., 1982; Pirkle, et al., 1985; Fell, 1984).

Ademais, estudos experimentais sugerem que o chumbo atua em múltiplos sítios do sistema cardiovascular. Neste sentido, esse cátion promove efeitos diretos na excitabilidade e contratilidade cardíaca (Kopp, et al, 1978; Kopp & Bárány, 1980; Pretice & Kopp, 1985), alterações vasculares, as quais refletem sobre a complacência e contratilidade do músculo liso vascular (Roseblum, 1965; Piccinini, et al., 1977; Webb, et al., 1981; Tomera & Harakal, 1986) e ainda, promovem alterações no sistema nervoso central, que afeta a regulação da pressão sangüínea (Stöfen, 1974; Hejtmancik & Williams, 1981).

Outros estudos, também fazem associação entre o aumento dos níveis plasmáticos de chumbo e elevação da pressão sangüínea. Sendo assim, Harlan (1988), em um estudo com alguns fatores controlados (idade, raça e índice de massa corporal), encontrou associação significativa entre plumbemia

e pressão sanguínea em homens, mas não em mulheres. Entretanto Nash, *et al.*, (2003) ao avaliarem os níveis de pressão sanguínea em um grupo de mulheres expostas ao chumbo, observaram uma relação positiva entre os níveis de chumbo no sangue e hipertensão sistólica e diastólica, principalmente entre aquelas que se encontravam no período pós-menopausa.

Em um outro estudo retrospectivo realizado por Hond, *et al.*, (2002), no qual foi utilizado o banco de dados do Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), observaram correlação positiva entre concentração de chumbo e pressão sanguínea aumentada em mulheres e homens negros. Corroborando com esses achados, Vupputuri *et al* (2003), examinaram a concentração de chumbo e a pressão sanguínea de 14.952 indivíduos brancos e negros através de um estudo epidemiológico. Neste estudo observaram-se altos níveis de chumbo no sangue, associados com hipertensão, em homens e mulheres negras.

Além disso, existem diversos estudos, baseados na literatura clínica que apontam o envolvimento natural do envenenamento agudo e crônico por chumbo em outras doenças cardíacas, tais como: miocardites (Read & Williams, 1952; Kline, 1960), alterações eletrocardiográficas (Stöfen, 1974; Myerson & Eisenhauer, 1963; Silver & Torres, 1968); alteração na frequência cardíaca e degeneração vascular (Stöfen, 1974; Kline, 1960); diminuição da sístole ventricular (Stöfen, 1974; Dimitrova, 1972).

Como descrito acima, a relação entre a concentração plasmática de chumbo e a pressão sanguínea, em estudos epidemiológicos populacionais ainda são controversos. Todavia, os dados obtidos em animais demonstram claramente que este metal aumenta a pressão sanguínea. Paralelo a isso, vários mecanismos têm sido propostos a fim de esclarecer esses achados.

Neste sentido, Tsao *et al* (2000), realizaram um estudo com ratos tratados com chumbo por dois meses. Neste estudo, avaliou-se a relação entre os receptores β -adrenérgicos e exposição ao chumbo no coração, aorta e rins. Em adição, eles também avaliaram essa mesma relação com os níveis de

pressão sangüínea, bem como os níveis de AMPc nos órgãos citados. Os resultados mostraram aumento na concentração de norepinefrina plasmática e diminuição da densidade dos receptores β -adrenérgicos aórticos bem como nos níveis de AMPc. Entretanto, foi observado, aumento da densidade dos receptores β -adrenérgicos renais e do AMPc, que por sua vez contribui para elevação da pressão sangüínea. Não obstante, no coração foi observado diminuição dos receptores β -adrenérgicos e do AMPc cardíaco, fato que é responsável pela redução da contratilidade cardíaca nesses animais.

Corroborando com esse último resultado, estudo prévio do nosso laboratório demonstrou um efeito inotrópico negativo, dose-dependente do chumbo (30-100 μ M) na contração isométrica desenvolvida pelas fatias de ventrículo direito de ratos Wistar. Os resultados desse trabalho são sugestivos de que, no miocárdio o chumbo (100 μ M), de alguma maneira, prejudicou o influxo de cálcio sarcolemal. E desta forma, alterou a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, sem prejudicar a atividade do retículo sarcoplasmático (LEBARCH,2006).

Por outro lado, Carmignani *et al.* (1999) expuseram ratos a 60 ppm de chumbo e observaram aumento na pressão sistólica e diastólica, aumento no inotropismo cardíaco e na atividade da ECA. A partir desse resultado, os autores sugeriram que o chumbo induz um aumento dos níveis plasmáticos da angiotensina II e diminuição da bradicinina. Soma-se a isso, outros achados deste mesmo grupo de pesquisadores, os quais registraram que esta concentração de chumbo também é capaz de afetar seletivamente as vias neuroendócrina (ex: catecolaminas), dos autacóides (ex: calicreína-cinina e sistema renina angiotensina) e transducional (ex: AMPcíclico, cálcio) envolvidas na função cardiovascular (CARMIGNANI *et al.*, 2000).

Ademais, Marques *et al* (2001) mostraram que a hipertensão induzida pelo chumbo em ratos está relacionada com um prejuízo do relaxamento vascular endotélio-dependente e não-dependente. Esse fato é acompanhado de aumento da expressão protéica promove por um lado, ativação de proteínas

que inibem a Ca^{2+} , Mg -ATPase do retículo sarcoplasmático da eNOS e “*downregulation*” da sGC. Segundo esses autores, essas respostas parecem envolver as EROs sobre o sistema de relaxamento NO/cGMP na parede vascular dos ratos tratados com chumbo. Num outro estudo, realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, foi confirmado que a exposição ao chumbo reduz a expressão protéica da sGC, e eles correlacionaram este achado com o envolvimento das EROs e da COX-2, que aparecem aumentados nos grupos tratados com o metal. (COURTOIS *et al.*, 2003).

Como apresentado, pode-se observar que a intoxicação por chumbo promove efeitos indesejáveis nos seres vivos, sendo causador de diversas doenças, que podem acometer todos os sistemas do organismo humano e animal. Porém ainda é incerto o meio pelos quais esse cátion age. Diante disso, grandes esforços têm sido realizados no âmbito científico, a fim de desvendar os reais mecanismos pelos quais esse metal atua sobre o organismo.

Entretanto, é notório que os estudos experimentais que investigam a correlação do chumbo com a HA, o fazem mais em relação aos seus efeitos crônicos. Prova disso encontra-se na escassez de publicações científicas que abordam sobre os efeitos agudos desse metal envolvidos na gênese dessa doença. Soma-se a isso, o fato de que ainda não existem estudos que correlacionam a ação aguda desse metal sobre o leito vascular caudal de ratos. Por isso, é de suma importância que estudos visando investigar os efeitos agudos desse elemento sobre o leito vascular caudal sejam realizados, a fim de esclarecer outras possíveis vias de ação do mesmo sobre o organismo contaminado.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo $[(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ sobre a reatividade vascular no leito arterial caudal de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo sobre a resposta pressora a fenilefrina, no leito vascular caudal de ratos.

Avaliar uma possível modulação do endotélio no efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo sobre a resposta pressora a fenilefrina.

Avaliar a participação do óxido nítrico e dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico, no efeito agudo 100 μ M de acetato de chumbo sobre a resposta pressora a fenilefrina.

Avaliar a participação da via da angiotensina II, efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo sobre a resposta pressora a fenilefrina.

Avaliar a participação de agentes antioxidantes, efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo sobre a resposta pressora a fenilefrina.

Avaliar o efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo sobre a atividade funcional da $Na^+ K^+ -ATPase$.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idades aproximadas de três meses, pesando entre 250-300g. Esses animais foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso de água e ração.

Os experimentos foram realizados conforme os as normas da legislação e ética para a prática Didático-Científico da vivisseção de animais de acordo com a Lei n.º.6.638, de 08 de Maio de 1979.

3.2 Metodologia utilizada para estudos da reatividade vascular no leito vascular caudal de rato

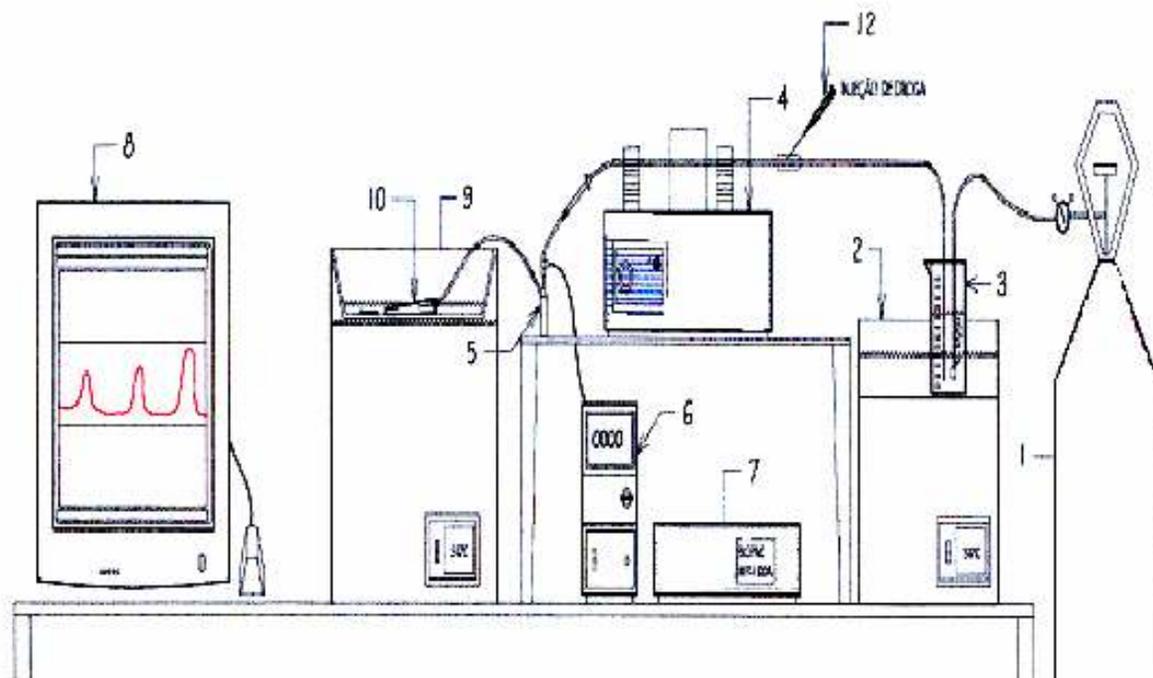
3.2.1 Obtenção do leito vascular caudal – procedimento cirúrgico

Para realização dos estudos *in vitro* foi utilizada a técnica de perfusão do leito vascular caudal, descrita por França *et al.* (1997). Inicialmente os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg, *ip*) e heparinizados (500 UI, *ip*). Após 10 min, o animal foi colocado em posição dorsal sobre a mesa cirúrgica, em seguida foi realizada incisão longitudinal na linha mediana da fáscia caudal, no sentido proximal-distal (3 cm). Após divulsionar a fáscia lateralmente e isolar a artéria caudal dos tecidos conectivos, a artéria foi canulada próximo a sua base com um cateter de acesso periférico (Safelet intracate 24G X 3/4, NIPRO) previamente preenchido com solução nutritora (Anexo 1). Em seguida, a cauda foi seccionada e rapidamente foi colocada em uma cuba de vidro sobre um banho previamente aquecido. (Figura 1). Após 1 min do acoplamento da cauda ao sistema de perfusão, sua extremidade foi seccionada em aproximadamente 2 cm, a fim de que o perfusato não fosse drenado pelo sistema venoso. A artéria caudal foi perfundida continuamente 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; EDTA 0,03. O pH foi ajustado para 7,45 com solução de NaOH 4 M. Esta solução foi mantida à temperatura de 36 °C ± 0,5°C e continuamente aerada com oxigênio. O tampão HEPES foi devidamente escolhido, uma vez que, a utilização de outro tipo de tampão provocaria a precipitação do acetato de chumbo. A perfusão do leito caudal foi mantida sob fluxo constante de 2,5 ml/min por meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, Paraná, Brasil) e o sistema de perfusão foi conectado a um transdutor de pressão TSD104A - Biopac (conectado a um pré-amplificador FUNBEC MP-100) que por sua vez estava ligado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac System, Inc; CA).

Este sistema era conectado a um computador (PC Pentium), para registros contínuos de pressão de perfusão média no leito vascular.

Após esse procedimento, a preparação foi submetida a um período de estabilização por aproximadamente 45 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais. Baseando-se na relação: $\text{Pressão} = \text{Fluxo} \times \text{Resistência}$, e sendo o fluxo constante, as variações de pressão registradas indicaram variações da resistência vascular.

Sistema para perfusão do leito arterial cauda



Legenda:

- 1- Oxigênio
- 2- Banho Maria 1
- 3- Béquero (solução nutritora)
- 4- Bomba dosadora peristáltica
- 5- Transdutor
- 6- Pré-amplificador
- 7- Biopac
- 8- Monitor do computador
- 9- Banho Maria 2
- 10- Cauda do rato

Figura 1: Desenho esquemático da preparação do leito arterial caudal.

3.2.2 Protocolos Experimentais

A integridade funcional do endotélio e do músculo liso foi avaliada em todos os grupos antes e após o início de cada protocolo. Para isso, o leito vascular caudal foi submetido a uma pré-contracção através da infusão contínua de fenilefrina (FE) (10^{-7} M) e depois de estabelecido um platô, 5 μ g/100 μ l de acetilcolina (Ach) foi administrada, *in bolus*. Logo em seguida, a integridade do músculo liso também foi testada, através da administração de 0,1 μ g/100 μ l, de nitroprussiato de sódio (NPS), *in bolus*.

O relaxamento produzido pela Ach traduz a viabilidade do endotélio, enquanto que o relaxamento produzido pelo NPS, reflete a integridade do músculo liso. No primeiro caso, quando o relaxamento produzido pela Ach era superior a 40% o endotélio vascular foi considerado intacto. Entretanto, a integridade do músculo liso, foi considerada, quando o relaxamento ao NPS foi maior ou igual a 50%.

3.2.2.1 Efeito da administração aguda de acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Com a finalidade de observar o efeito agudo do acetato de chumbo sobre a reatividade vascular caudal, foi realizado o seguinte protocolo: após 45 minutos de estabilização, foi realizada administração de FE, agonista α_1 -adrenérgico, (1 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l), a fim de verificar a responsividade vascular, em seguida, doses crescentes de FE (0.001 - 300 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l), foram administradas antes e após uma hora de infusão contínua com acetato de chumbo (100 μ M), em presença do endotélio vascular.

Com o intuito de averiguar a interferência do tempo sobre a estabilidade das preparações, as mesmas doses de FE foram administradas em um outro grupo de animais (CT), antes e após uma hora de infusão contínua com solução de Tyrode modificada.

3.2.2.2 Modulação do endotélio no efeito agudo do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Com o objetivo de avaliar uma possível modulação do endotélio no efeito agudo do acetato de chumbo (100 μ M), sobre a resposta pressora à FE, o endotélio foi lesado através da administração de CHAPS {3-3[(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-l-propanolsulfonato} (8 mg, *in bolus*, em um volume de 80 μ l).

Este procedimento foi realizado da seguinte forma: após o período de estabilização, a integridade do endotélio e do músculo liso foi verificada. Quando a pressão retornou ao seu valor basal, a perfusão do leito caudal foi reduzida a um fluxo constante de 1.25 ml/min e imediatamente foi administrado o CHAPS. Após um período de 10 min, a perfusão do leito caudal retornou a condição inicial com o fluxo constante de 2,5 ml/min. Ao término de 40 min da administração do CHAPS, repetiu-se o teste do endotélio, a fim de confirmar se o endotélio havia sido lesado.

A lesão endotelial foi confirmada pela ausência ou pela presença de relaxamento à Ach (5 μ g, em 100 μ l), $\leq 10\%$ nas preparações pré-contraídas com FE (10^{-7} M). Para descartar uma possível lesão do músculo liso pelo CHAPS, foi realizada a administração de uma dose única de NPS (0,1 μ g/ μ l), um potente vasodilatador independente do endotélio.

Por fim, quando a situação basal era restabelecida, doses crescentes de FE (0.001 – 300 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l), foram administradas antes e após uma hora de infusão contínua com acetato de chumbo (100 μ M).

3.2.2.3 Estudo dos possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

3.2.2.3.1 Influência de 100 μ M de acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico (NO)

Para avaliar uma possível participação do NO em modular os efeitos agudo do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina, foram realizados os seguintes protocolos:

Grupo L-NAME: Foi realizada curvas dose-resposta à FE (0.001 – 300 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l), antes e após uma hora de infusão contínua com L-NAME (10⁻⁴ M), inibidor “não seletivo” da óxido nítrico sintase (NOS).

Grupo L-NAME + Pb²⁺: Foi realizada a mesma curva de fenilefrina, antes e após 30 minutos da infusão contínua com L-NAME e mais 60 min. de infusão contínua com acetato de chumbo (100 μ M) e L-NAME (10⁻⁴ M).

Esses protocolos foram realizados separadamente, para evitar três curvas numa mesma preparação.

3.2.2.4 Envolvimento da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre o efeito agudo de 100 μ M de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Para avaliar uma possível participação de produtos derivados da via do ácido araquidônico, sobre os efeitos agudo do acetato de chumbo (100 μ M) sobre a resposta pressora à fenilefrina, foram realizados os seguintes protocolos:

Grupo Indometacina: Foram realizadas curvas dose-resposta à FE (0.001 – 300 µg, *in bolus*, em um volume de 100 µl), antes e após uma hora de infusão contínua com indometacina (10^{-5} M), um inibidor da enzima cicloxigenase.

Grupo Indometacina + Pb²⁺: Foi realizada a mesma curva de fenilefrina, antes e após 30 minutos da infusão contínua com indometacina e mais 60 min. de infusão contínua com acetato de chumbo (100 µM) e indometacina (10^{-5} M).

Esses protocolos foram realizados separadamente, para evitar três curvas numa mesma preparação.

3.2.2.5 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o efeito agudo de 100 µM de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Para avaliar uma possível participação de da via da angiotensina II local, nos efeitos agudo do acetato de chumbo (100 µM) sobre a resposta pressora à fenilefrina, foram realizados os seguintes protocolos:

Grupo Enalapril: Foram realizadas curvas dose-resposta à FE (0.001 – 300 µg, *in bolus*, em um volume de 100 µl), antes e após uma hora de infusão contínua com enalapril (1µM), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Grupo Enalapril + Pb²⁺: Foi realizada a mesma curva de fenilefrina, antes e após 30 minutos da infusão contínua enalapril e mais 60 min. de infusão contínua com acetato de chumbo (100 µM) e enalapril (1µM).

Grupo Losartan: Foram realizadas curvas dose-resposta à FE (0.001 – 300 µg, *in bolus*, em um volume de 100µl), antes e após 1 hora de infusão contínua com losartan (10 µmol/l), um inibidor de receptores AT₁ para a angiotensina.

Grupo Losartan + Pb²⁺: Foi realizada a mesma curva de fenilefrina, antes e após 30 minutos da infusão contínua com losartan e mais 60 min. de infusão contínua com acetato de chumbo (100 µM) e losartan (10 µmol/l).

Esses protocolos foram realizados separadamente, para evitar três curvas numa mesma preparação.

3.2.2.6 Envolvimento dos radicais livre sobre o efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Para verificar a ação de agentes oxidantes nos efeitos agudo do acetato de chumbo (100 μM) sobre a resposta pressora à fenilefrina, foram realizados os seguintes protocolos:

Grupo Tempol: Foram realizadas curvas dose-resposta à FE (0.001 – 300 μg , *in bolus*, em um volume de 100 μl), antes e após uma hora de infusão contínua com 4-Hidroxi-Tempol (tempol) (1 μM), antioxidante de ação conhecida (Ledenev et al., 1998)

Grupo Tempol + Pb^{2+} : Foi realizada a mesma curva de fenilefrina, antes e após 30 minutos da infusão contínua com tempol e mais 60 min. de infusão contínua com acetato de chumbo (100 μM) e tempol (1 μM).

Esses protocolos foram realizados separadamente, para evitar três curvas numa mesma preparação.

3.2.2.7 Efeito agudo de 100 μM de acetato de chumbo sobre a atividade funcional da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$

Para a realização desse protocolo, foi utilizada a técnica de relaxamento ao potássio, previamente descrito por Webb & Bohr (1979) e modificada por Rossoni et al. (1999). Após 45 minutos de estabilização, em perfusão contínua com solução de Tyrode modificada, a preparação foi perfundida por mais 30 minutos com solução de Krebs sem potássio. Para obtenção da solução livre de potássio o KCl foi retirado. Em seguida, foi realizada uma pré-contração

com fenilefrina (10^{-7} M) em solução livre de potássio, até que fosse atingido um platô. Depois disso, o KCl (1, 2, 4 e 6 mM) foi acrescentado ao meio de perfusão em intervalos de cinco minutos, para obtenção da curva de relaxamento ao potássio. Feito isso, as preparações foram perfundidas continuamente por uma hora com acetato de chumbo (100 μ M) ou em condições controle (sem acetato de chumbo) e a curva de relaxamento foi novamente realizada. A partir desse protocolo, foi possível analisar se os efeitos produzidos por 100 μ M de acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina poderiam ser atribuídos, em parte, à inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Com o intuito de averiguar a interferência do tempo sobre a estabilidade das preparações, o mesmo protocolo foi realizado, em um outro grupo de animais (CT), antes e após uma hora de infusão contínua em solução sem potássio.

3.3 Expressão dos dados e análise estatística

Os resultados estão expressos com média \pm erro padrão da média (EPM).

As respostas vasoconstritoras induzidas pela FE sobre o leito vascular caudal são expressos como mudanças na pressão de perfusão, subtraindo o pico de resposta pressora à FE pela pressão de perfusão basal (Δ PPM).

Os resultados das respostas de relaxamento induzidas pela Ach e NPS, no leito vascular caudal, são expressos como porcentagem de relaxamento da máxima pré-contração induzida pela infusão contínua de fenilefrina (10^{-7} ·M). A resposta de relaxamento ao potássio foi expressa como a porcentagem de contração residual à FE.

Para cada curva-concentração-resposta à FE foram calculados os valores da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e da sensibilidade (pD_2) ($-\log \text{EC}_{50}$). Para

isso, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, EUA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à FE em artérias caudais dos diferentes grupos estudados, alguns resultados estão expressos como diferença da área sob a curva (AUC) de dose-resposta à FE nas situações controle (sem fármacos) e experimental (com inibidores). A AUC foi calculada para cada curva dose-resposta e a diferença está expressa como percentagem da diferença da AUC (%dAUC) da curva controle correspondente, sendo utilizado o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos dados foi realizada por *teste t* de Student, pareado e/ não pareado e análise de variância (ANOVA), uma e/ou duas vias, medidas repetidas, seguida pelo teste post-hoc de Turkey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.3 Fármacos e reagentes utilizados

- Acetato de Chumbo II (Sigma)
- Acetilcolina cloridrato (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de Magnésio Hexahidratado (Merck)
- Cloreto de Potássio (Merck)
- Cloreto de Sódio (Merck)
- Enalapril (Sigma)
- KH_2O_4 (Sigma)
- Glicose (Merck)

- Heparina Sódica (Roche)
- HEPES (Sigma)
- 4-Hidroxi-Tempo (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- N^(w)-nitro-Larginina metil éster (L-NAME), cloridrato (Sigma)
- Nitroprussiato de Sódio, Dihidratado (Sigma)
- Pentobarbital Sódico (Fontover)

Todos os fármacos, exceto a indometacina, foram dissolvidos em água deionizada e mantidos no congelador a -20°C. A indometacina foi diluída em solução tampão Tris 0,1 M.

IV. RESULTADOS

4.1 Efeito da administração aguda de 100 μM de acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

A fim de observar a interferência do tempo sobre a estabilidade das preparações, doses crescentes de FE foram administradas em um grupo de animais, antes e após uma hora de infusão contínua com solução de Tyrode modificada. Esse protocolo mostrou que o tempo não interferiu na resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) (antes: $522,5 \pm 19,6$ e após $505,7 \pm 13,2$) e nem na sensibilidade ($1,6 \pm 0,04$ e após $1,7 \pm 0,03$) à FE.

Por outro lado, o acetato de chumbo ($100 \mu\text{M}$) após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a $R_{\text{máx}}$ e a pD_2 à FE (Figura 2; tabela 1).

A integridade do endotélio foi testada antes e após infusão por uma hora com $100 \mu\text{M}$ acetato de chumbo, sendo observado lesão endotelial e preservação da integridade do músculo liso vascular (Figura 3).

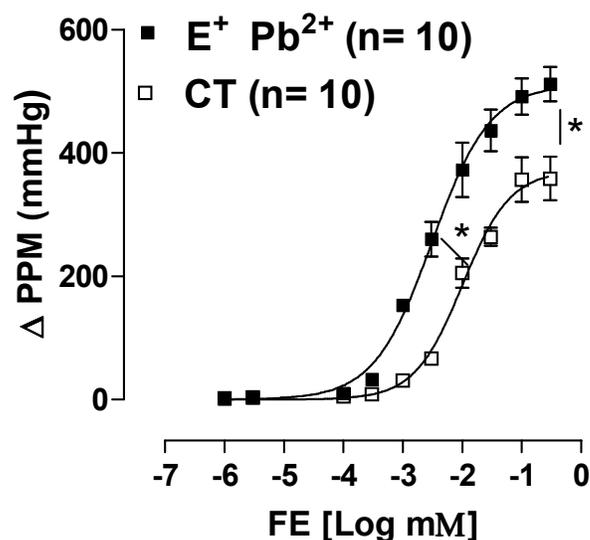


Figura 2: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar antes (E^+ □) e após (E^+Pb^{2+} ■) infusão de $100 \mu\text{M}$ de acetato de chumbo (Pb^{2+}), na presença do endotélio funcional (E^+). Pontos representam a média \pm EPM. Teste t , * $p < 0,05$ E^+Pb^{2+} vs CT (com endotélio funcional e na ausência de acetato de chumbo), para $R_{\text{máx}}$ e pD_2 .

Tabela 1: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar antes e após a infusão com acetato de chumbo, na presença do endotélio funcional (E⁺).

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
CT	364.4 ± 36	1.98 ± 0.07
E ⁺ Pb ²⁺	480.0 ± 27*	2.38 ± 0.14*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05 vs CT (E⁺) (com endotélio funcional e na ausência de acetato de chumbo), para R_{máx} e pD₂.

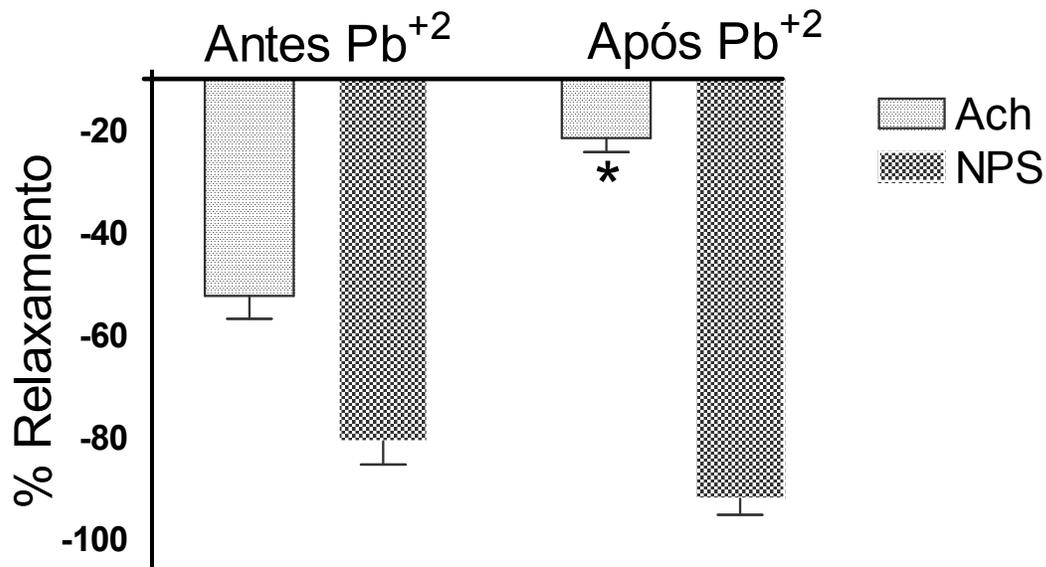


Figura 3: Mudanças no relaxamento à acetilcolina (Ach) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) no leito arterial caudal de ratos Wistar antes e após infusão de 100 µM de acetato de chumbo (Pb²⁺).

As barras representam a porcentagem de relaxamento ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05 vs antes Pb²⁺.

4.2 Modulação do endotélio no efeito acetato de chumbo 100 μ M sobre a resposta pressora à fenilefrina

Após a lesão endotelial provocada pelo CHAPS houve um significativo aumento da pressão de perfusão média basal de $79,5 \pm 2.4$ para 118.10 ± 2.2 ($p < 0.05$; Teste t). No entanto, não houve alteração na $R_{\text{máx}}$ e nem na pD_2 , após perfusão por uma hora com 100 μ M acetato de chumbo (Figura 4; tabela 2).

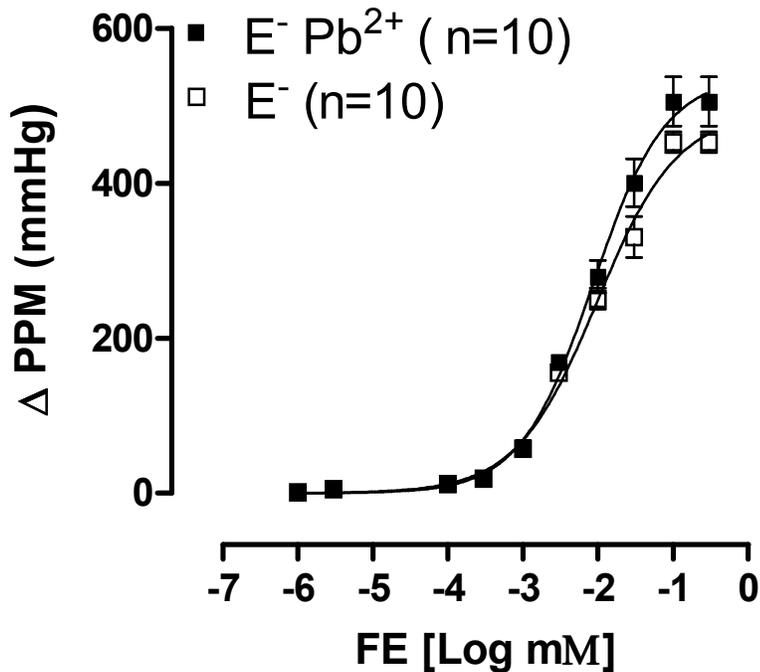


Figura 4: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar antes (E^- □) e após ($E^- Pb^{2+}$ ■) infusão de 100 μ M de acetato de chumbo na ausência do endotélio.

Pontos representam a média \pm EPM.

Tabela 2: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar antes e após a infusão com acetato de chumbo e com endotélio lesado.

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
E ⁻	505.50 ± 32.01	2.05 ± 0.07
E ⁻ Pb ²⁺	453.00 ± 13.52	1.95 ± 0.09

Valores expressos em média ± EPM. E⁻ (sem endotélio funcional), E⁻ Pb²⁺ (sem endotélio funcional e na presença de acetato de chumbo).

Contudo, pode-se observar na figura 5A que a retirada do endotélio e na ausência de acetato de chumbo, foi capaz de aumentar a R_{máx}. Por outro lado, ao compararmos o grupo sem endotélio e na presença de acetato de chumbo com o grupo com o endotélio funcional e na presença de acetato de chumbo, observamos aumento na pD₂ (figura 5B). Entretanto, na figura 5C observa-se que em relação à situação controle, o grupo com endotélio íntegro após uma hora de perfusão com 100 μM de acetato de chumbo, apresentou aumento na R_{máx} e na pD₂. Essas respostas estão melhores representadas na figura 5D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

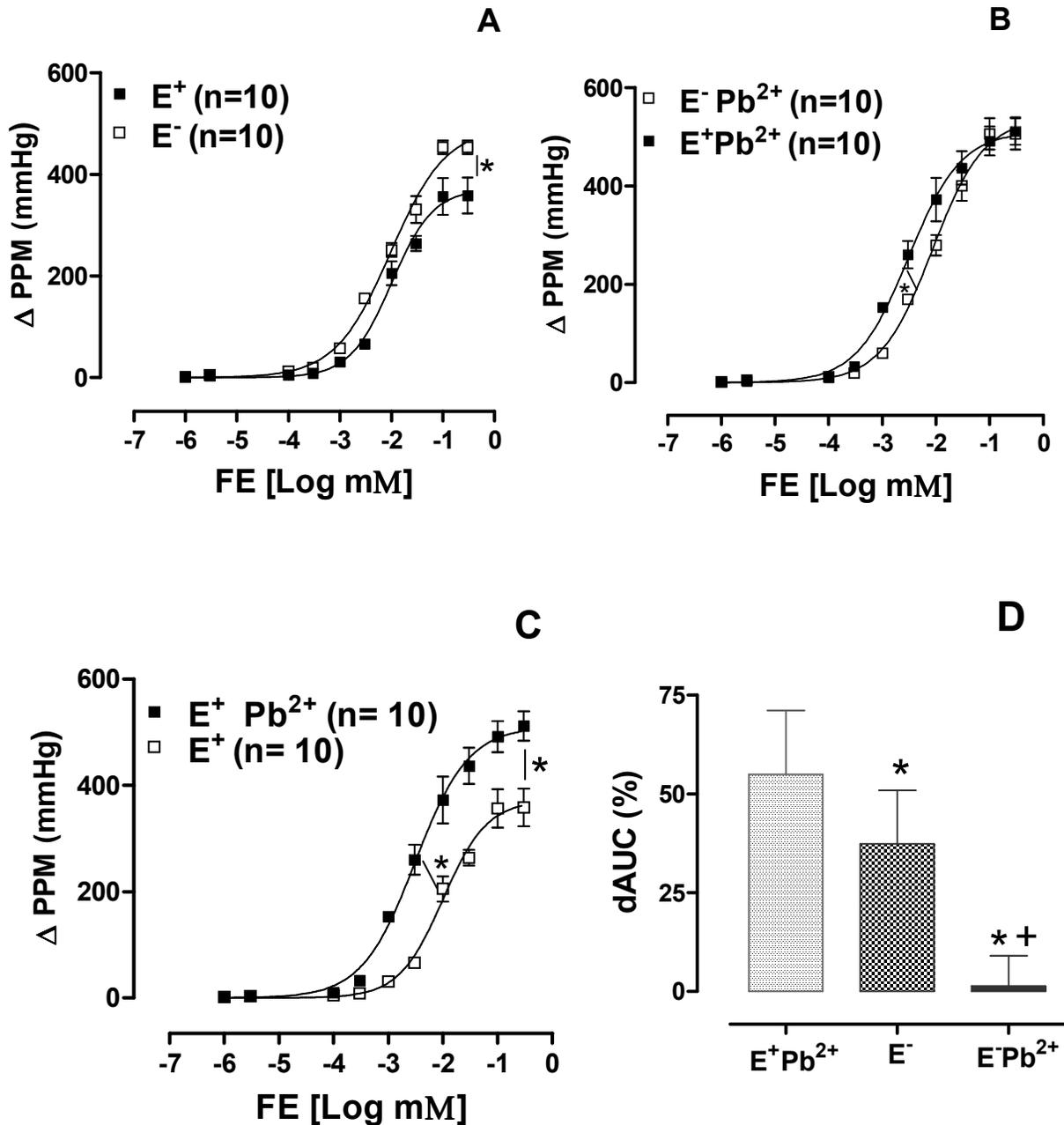


Figura 5 Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar. A: na presença (E^+ ■) e na ausência (E^- □) de endotélio funcional. B: após uma hora de infusão com 100 μ M de acetato de chumbo com (E^+) e sem (E^-) o endotélio funcional ($E^+ Pb^{2+}$ ■ vs $E^- Pb^{2+}$ □). C: antes (E^+ □) e após ($E^+ Pb^{2+}$ ■) uma hora de infusão com 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}) com o endotélio funcional. D: Diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, **p* < 0.05, *R*_{máx}: E^- vs E^+ ; *p*_{D₂} $E^+ Pb^{2+}$ vs $E^- Pb^{2+}$; *R*_{máx} e *p*_{D₂}: $E^+ Pb^{2+}$ vs. E^+ . Figura 4D: ANOVA (1 via), **p* < 0.05 vs $E^+ Pb^{2+}$; +*p* < 0.05 vs E^- .

4.3 Estudo dos possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito de 100 μM acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina

Os resultados até aqui apresentados demonstraram que 100 μM de acetato de chumbo foi capaz de aumentar a $R_{\text{máx}}$ e a pD_2 à FE e que esta resposta é dependente do endotélio funcional. Então, com intuito de avaliar a participação dos fatores endoteliais que poderiam estar participando nessa resposta, foram realizados os protocolos abaixo descritos e com seus respectivos resultados.

4.3.1 Efeito de 100 μM acetato de chumbo na via do Óxido Nítrico

A fim de avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na modulação do efeito do acetato de chumbo (100 μM) sobre a resposta pressora à FE, foi utilizado um inibidor “não seletivo” da síntese do NO, L-NAME (10^{-4} M).

Na figura 6A, observa-se que o acetato de chumbo (100 μM) após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a $R_{\text{máx}}$ e a pD_2 à FE. O mesmo foi observado ao bloquear a via do NO (figura 6B). Contudo, como se pode observar na figura 6C e na tabela 3, a presença do acetato de chumbo foi capaz de aumentar ainda mais essas respostas. Essas diferenças estão melhores apresentadas na figura 6D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

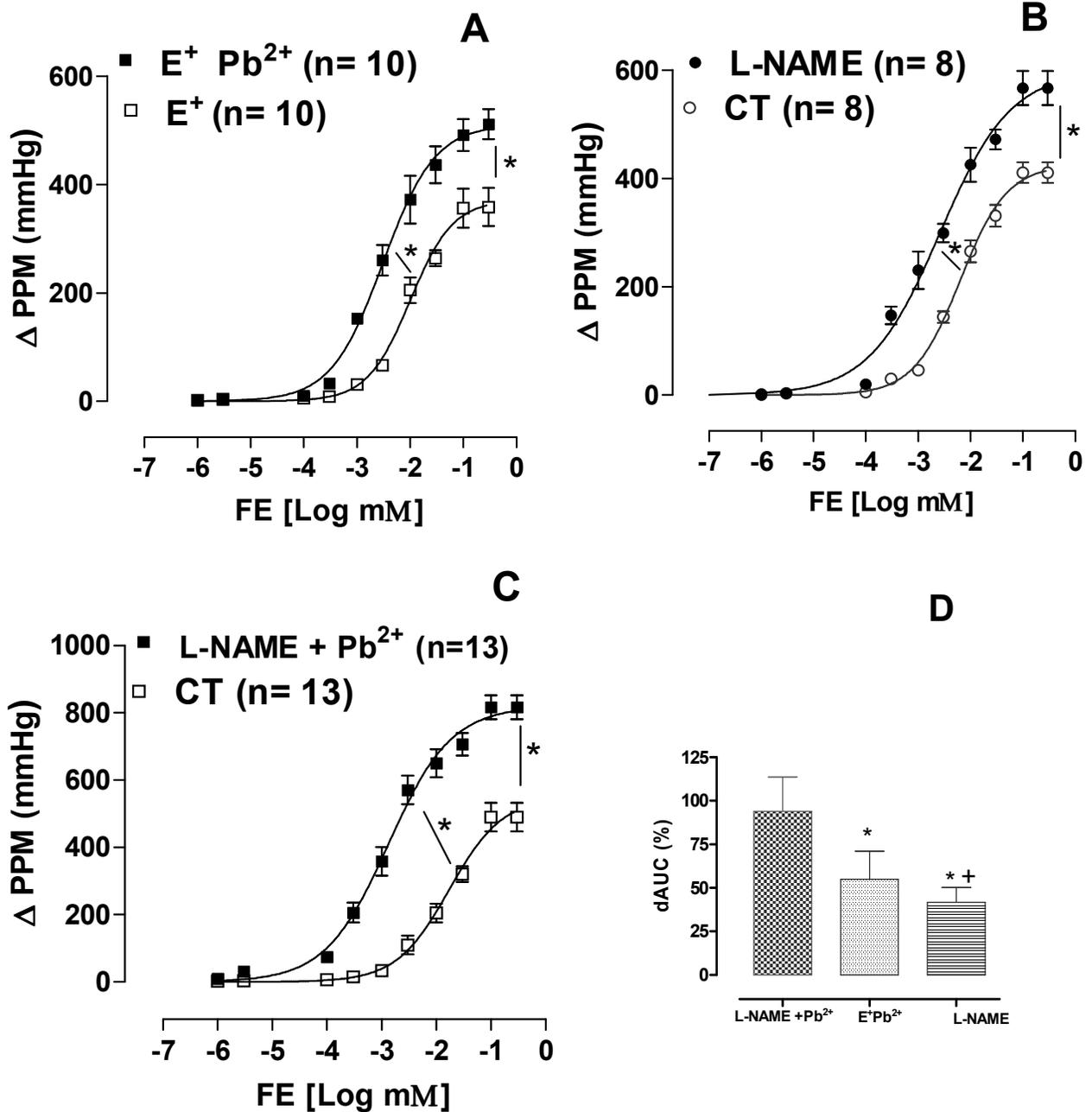


Figura 6: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar. A: antes (E^+ □) e após ($E^+ Pb^{2+}$ ■) uma hora de infusão de 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}). B: antes (CT □) e após (L-NAME ●) uma hora de infusão com L-NAME. C: efeito do acetato de chumbo antes (CT □) e após (L-NAME + Pb^{2+} ■) uma hora de infusão com L-NAME + Pb^{2+} . D: diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, **p* < 0.05, $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 : $E^+ Pb^{2+}$ vs E^+ ; L-NAME vs CT L-NAME+ Pb^{2+} vs CT. Figura 5D: ANOVA (1 via), **p* < 0.05 vs L-NAME+ Pb^{2+} ; +*p* < 0.05 vs $E^+ Pb^{2+}$

Tabela 3: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de L-NAME, com endotélio funcional.

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
CT	410.5 ± 19.22	2.18 ± 0.05
L-NAME	566.6 ± 31.35*	2.82 ± 0.16*
CT	490.38 ± 35.77	1.89 ± 0.10
L-NAME + Pb²⁺	816.69 ± 35.77*	2.81 ± 0.13*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; R_{máx} e pD₂: L-NAME vs CT (antes da perfusão com L-NAME); L-NAME + Pb²⁺ (após perfusão com L-NAME + Pb²⁺) vs CT (antes da perfusão com L-NAME + Pb²⁺).

4.3.2 Efeito de 100 μM acetato de chumbo sobre os prostanóides derivados da Cicloxigenase.

Para analisar a via dos prostanóides derivados da cicloxigenase (COX), foi realizada a infusão contínua de Indometacina (10^{-5} M), um inibidor da enzima cicloxigenase, na ausência e na presença de acetato de chumbo.

Na figura 7A, observa-se que o acetato de chumbo (100 μM) após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e a sensibilidade (pD_2) à FE. Por outro lado, como demonstrado na figura 7B, a infusão com Indometacina foi capaz de aumentar a $R_{\text{máx}}$. No entanto, a presença da Indometacina reduziu o efeito do acetato de chumbo sobre a resposta pressora à FE (Figura 7C, Tabela 4). Essas diferenças estão melhores apresentadas na figura 7D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

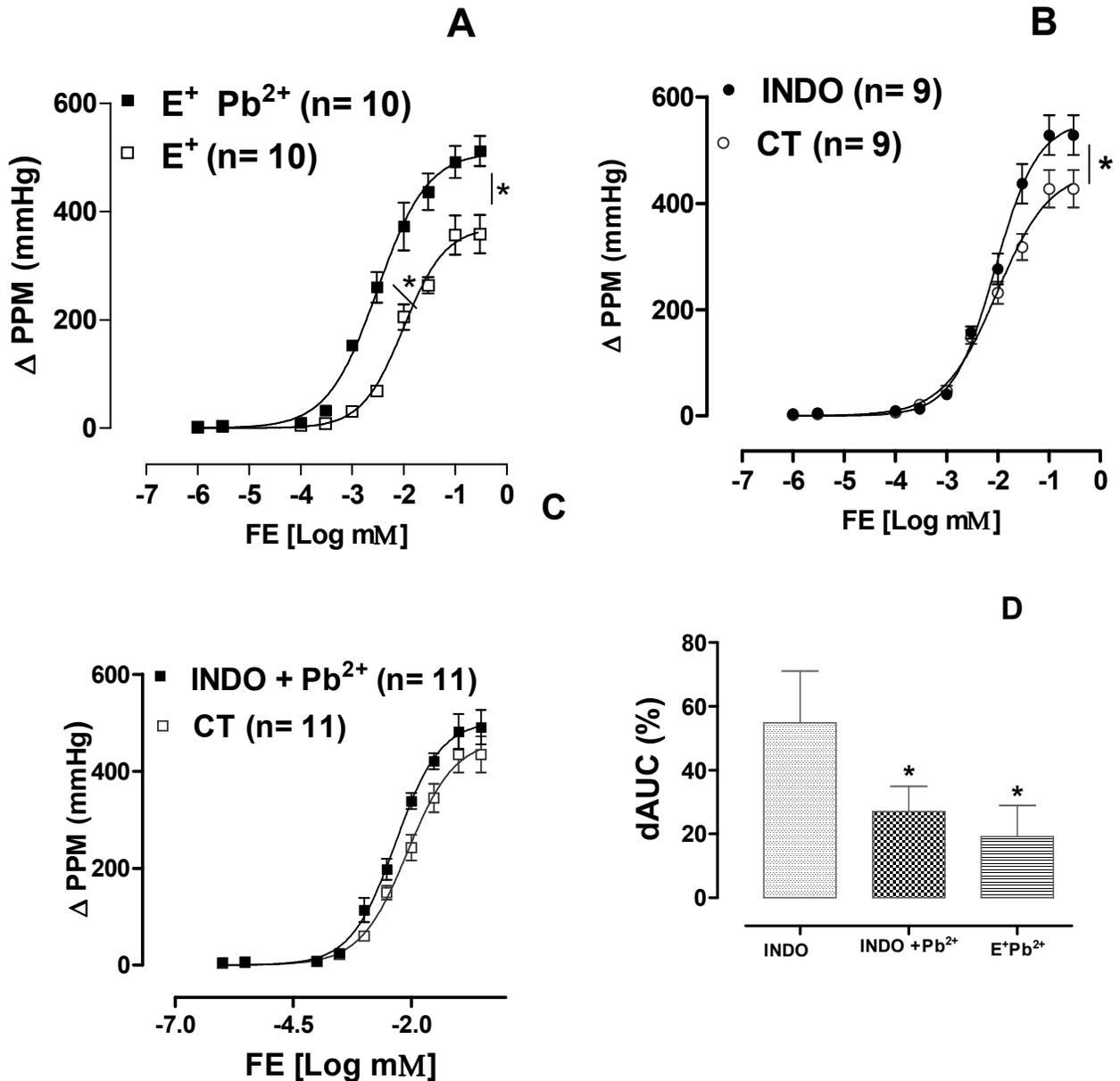


Figura 7: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar. A: antes (E^+ □) e após (E^+Pb^{2+} ■) uma hora de infusão com 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}). B: antes (CT, ○) e após (INDO, ●) uma hora de infusão com Indometacina. C: efeito do acetato de chumbo antes (CT □) e após (INDO + Pb^{2+} ■) uma hora de infusão com Indometacina + Pb^{2+} . D: diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, **p* < 0.05, $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 : E^+Pb^{2+} vs E^+ ; $R_{m\acute{a}x}$: Indometacina. vs CT. Figura 6D: ANOVA (1 via), **p* < 0.05 vs E^+Pb^{2+}

Tabela 4: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar* com e sem acetato de chumbo na presença de Indometacina, com endotélio funcional.

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
CT	427.11 ± 35.1	2.03 ± 0.14
Indometacina	528.22 ± 37.5*	2.02 ± 0.11
CT	437.72 ± 36.9	2.09 ± 0.10
Indometacina + Pb²⁺	491.09 ± 35.4	2.37 ± 0.12

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; R_{máx} e pD₂: Indometacina (após perfusão com indometacina). vs CT (antes da perfusão com indometacina).

4.4 Participação da Angiotensina II local no efeito de 100 μM acetato de chumbo sobre a resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

Com intuito de avaliar uma possível participação da via da Angiotensina II no efeito promovido pelo acetato de chumbo sobre a resposta pressora à FE no leito arterial caudal de ratos *Wistar*, foi realizada a administração do Enalapril (1 μM), um inibidor da enzima conversora de angiotensinogênio, bem como a administração do Losartan (10 $\mu\text{mol/l}$), um inibidor específico de receptores para Angiotensina II, AT_1 .

4.4.1 Avaliação do possível efeito de 100 μM de acetato de chumbo sobre a enzima conversora de angiotensinogênio

Na figura 8A, observa-se que o acetato de chumbo (100 μM) após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e a sensibilidade (pD_2) à FE. Entretanto, os resultados representados na figura 8B demonstram que em condições controle o Enalapril não alterou a resposta pressora à FE. Porém, na presença do Enalapril, o aumento na pD_2 e na $R_{\text{máx}}$ provocado pelo acetato de chumbo foi reduzido (Figura 8C, Tabela 5). Essas diferenças estão melhores apresentadas na figura 8D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

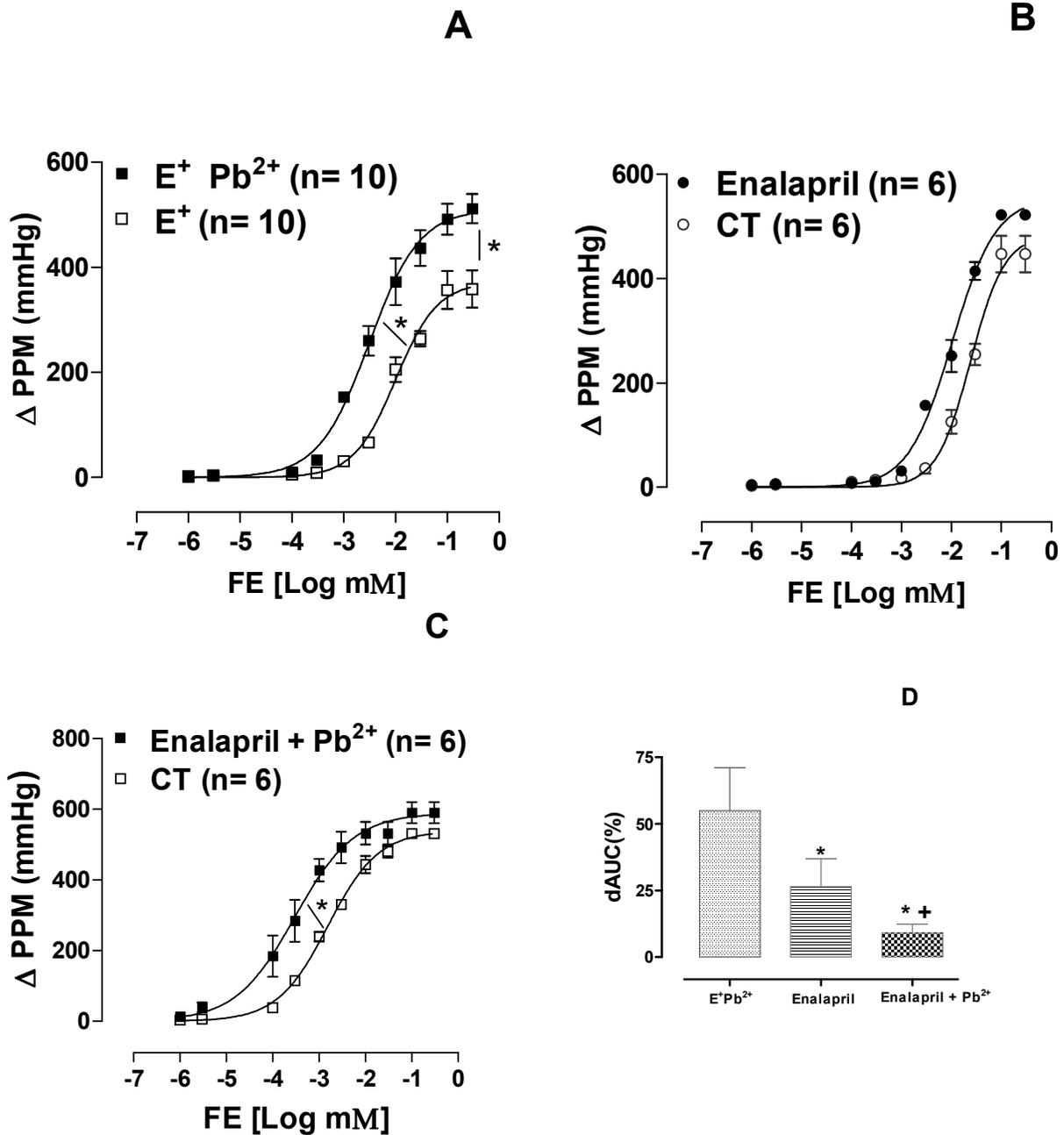


Figura 8: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar A: antes (E^+ □) e após (E^+Pb^{2+} ■) infusão de 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}). B: antes (CT, ○) e após (Enalapril, ●) infusão de Enalapril. C: efeito do acetato de chumbo antes (CT □) e após (Enalapril + Pb^{2+} ■) infusão de Enalapril + Pb^{2+} . D: diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 : E^+Pb^{2+} vs E^+ ; pD_5 : enalapril + Pb^{2+} vs CT. Figura 7D: ANOVA (1 via), **p* < 0.05 vs E^+Pb^{2+} ; +*p* < 0.05 vs Enalapril.

Tabela 5: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Enalapril, com endotélio funcional.

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
CT	447.0 ± 34.9	1.66 ± 0.07
Enalapril	521.6 ± 6.6	1.98 ± 0.07
CT	433.0 ± 44.7	2.78 ± 0.06
Enalapril + Pb²⁺	580.4 ± 27.3	3.57 ± 0.21*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; pD₂: Enalapril + Pb²⁺ (após perfusão com Enalapril + Pb²⁺) vs CT (antes da perfusão com enalapril + Pb²⁺).

4.4.2 Avaliação do possível efeito do acetato de chumbo sobre o receptor da Angiotensina II: AT₁

Como foi demonstrado no resultado acima, possivelmente o acetato de chumbo age via enzima conversora de angiotensinogênio. Então, a fim de investigar se ação do acetato de chumbo na via da angiotensina poderia ser também sobre o receptor AT₁, utilizou-se o inibidor deste receptor, o losartan.

Os resultados apresentados na figura 9A mostram que o acetato de chumbo (100 µM) após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) à FE. Na figura 9B observa-se, que em condições controle o Losartan não modificou a resposta pressora à FE. Contudo, na presença do Losartan, observou-se que o aumento da R_{máx} e pD₂ provocado pelo acetato de chumbo não foi totalmente reduzido (Figura 9C, Tabela 6). Essas diferenças estão melhores apresentadas na figura 9D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

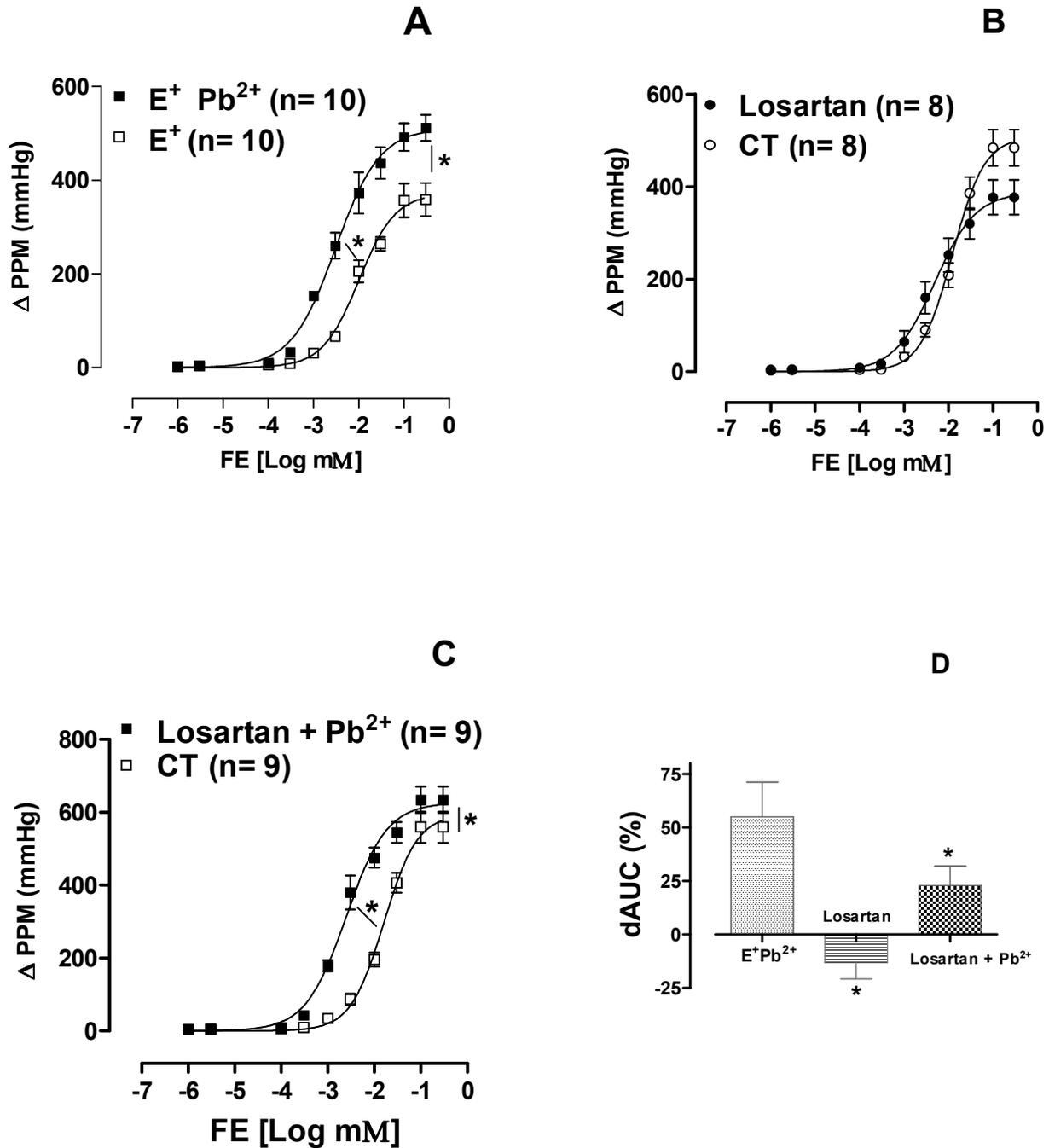


Figura 9: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar. A: antes (E^+ □) e após (E^+Pb^{2+} ■) infusão de 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}). B: antes (CT, ○) e após (Losartan, ●) infusão de Losartan. C: efeito do acetato de chumbo antes (CT □) e após (Losartan + Pb^{2+} ■) infusão de Losartan + Pb^{2+} . D: diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, **p* < 0.05, $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 : E^+Pb^{2+} vs E^+ ; losartan vs CT . Figura 8D: ANOVA (1 via), * *p* < 0.05 vs E^+Pb^{2+} .

Tabela 6: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Losartan, com endotélio funcional.

	R _{máx} (mmHg)	pD ₂ (Log mM)
CT	457.1 ± 32.1	1.63 ± 0.36
Losartan	407.8 ± 44.9	2.40 ± 0.20
CT	523.7 ± 42.0	1.75 ± 0.05
Losartan + Pb²⁺	638.0 ± 30.1*	2.74 ± 0.06*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; R_{máx} e pD₂: Losartan vs CT (antes da perfusão com losartan); Losartan + Pb²⁺ (após perfusão com Losartan + Pb²⁺) vs CT (antes da perfusão com Losartan + Pb²⁺)

4.5 Efeito de agentes antioxidantes sobre o efeito de 100 μM de acetato de chumbo na resposta pressora à fenilefrina no leito arterial caudal

A fim de investigar a participação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), sobre o efeito do acetato de chumbo na resposta pressora à FE foi administrado Tempol, um antioxidante exógeno com ação mimética à enzima Superóxido Dismutase (SOD).

Os resultados apresentados na figura 9A mostram que o acetato de chumbo (100 μM), após perfusão por uma hora, foi capaz de potencializar a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e a sensibilidade (pD_2) à FE. Porém, em condições controle o Tempol não alterou a resposta pressora à FE (Figura 9B). No entanto, na presença do Tempol observou-se que o aumento da $R_{\text{máx}}$ e pD_2 provocado pelo acetato de chumbo não foi abolido (Figura 9C, Tabela 7). Estas respostas estão melhores apresentadas na figura 9D, pela diferença percentual da área sob a curva (%dAUC).

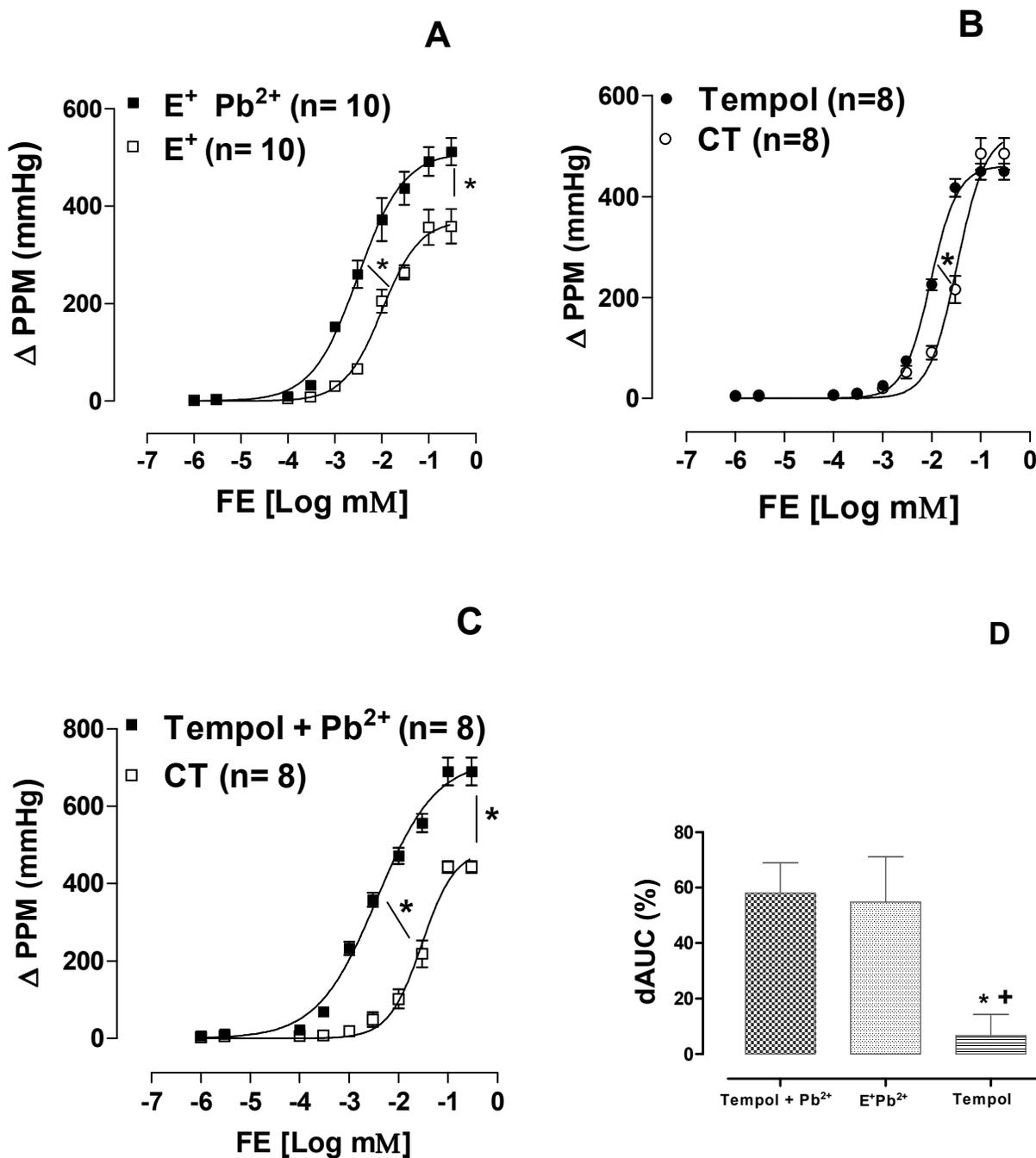


Figura 10: Mudanças na pressão de perfusão média (PPM, mmHg) em resposta a doses crescentes de FE no leito arterial caudal de ratos Wistar. A: antes (E^+ □) e após ($E^+ Pb^{2+}$ ■) infusão de 100 μ M de acetato de chumbo (Pb^{2+}). B: antes (CT, ○) e após (Tempol, ●) infusão de Tempol. C: efeito do acetato de chumbo antes (CT □) e após (Tempol + Pb^{2+} ■) infusão de Tempol + Pb^{2+} . D: diferença percentual da área sob a curva da concentração-resposta à FE em artérias caudais dos três grupos experimentais. Pontos representam a média \pm EPM. Teste *t*, * $p < 0.05$, R_{max} e pD_2 : CT vs Tempol + Pb^{2+} ; Figura 10 D: ANOVA (1via) * $p < 0.05$, vs Tempol + Pb^{2+} ; + $p < 0.05$, vs $E^+ Pb^{2+}$.

Tabela 7: Parâmetros referentes à resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à FE no leito arterial caudal de ratos Wistar com e sem acetato de chumbo na presença de Tempol, com endotélio funcional.

	R_{máx} (mmHg)	pD₂ (Log mM)
CT	484.5 ± 31.23	1.48 ± 0.03
Tempol	449.1 ± 16.02	2.01 ± 0.04*
CT	443.2 ± 15.2	1.58 ± 0.07
Tempol + Pb²⁺	690.1 ± 35.4*	2.42 ± 0.06*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t*, **p* < 0.05; R_{máx} e pD₂: CT (antes da perfusão com tempol) vs Tempol; CT (antes da perfusão com tempol + Pb²⁺) vs Tempol + Pb²⁺ (após perfusão com tempol + Pb²⁺).

4.6 Estudo da atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ antes e após da infusão de $100\ \mu\text{M}$ de acetato de chumbo.

A fim de investigar se $100\ \mu\text{M}$ de acetato de chumbo seria capaz de interferir na atividade funcional da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ foi utilizada a técnica de relaxamento induzido pelo potássio, descrita por Webb & Bohr e modificada por Rossoni *et al.* (1999).

Como pode ser observado na figura 11, após uma hora de infusão com $100\ \mu\text{M}$ de acetato de chumbo, houve redução significativa do relaxamento induzido ao potássio.

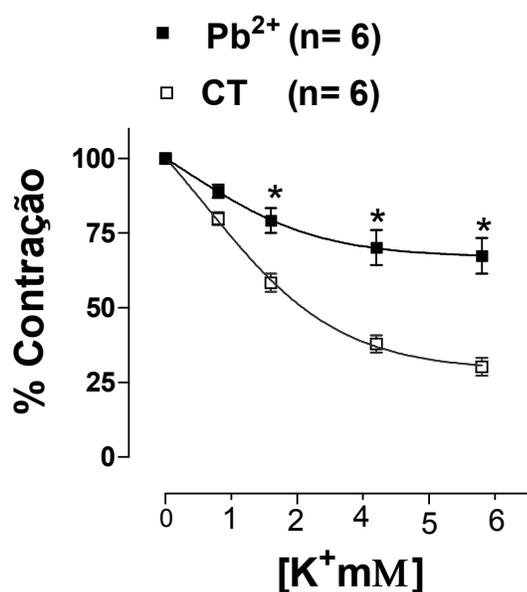


Figura 11: Curvas de relaxamento induzida pelo cloreto de potássio no leito arterial caudal de ratos Wistar, na ausência (CT □) e na presença de $100\ \mu\text{M}$ de acetato de chumbo (■ após Pb^{2+}). Os resultados são expressos como porcentagem de contração residual mantida após a pré-contração com FE ($10^{-7}\ \text{M}$) e adição de potássio. ANOVA duas vias: * $p < 0.05$ vs CT.

V. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo, mostrou que a perfusão isolada com 100 μM de acetato de chumbo, no leito arterial caudal de ratos *Wistar* produziu aumento na reatividade vascular à FE, sendo confirmado pela potencialização da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e da sensibilidade (pD_2). Essa resposta foi claramente modulada pelo endotélio, já que na ausência do mesmo, o efeito promovido pelo acetato de chumbo foi abolido. Ademais, foram encontrados outros resultados interessantes que indicam a ação desse sal sobre a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase, sobre a via de produção e/ou liberação da enzima conversora de angiotensina (ECA), bem como o seu efeito sobre a atividade da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. Com intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo acetato de chumbo, serão discutidos minuciosamente os resultados encontrados em cada protocolo realizado neste trabalho.

5.1 Efeito do acetato de chumbo (100 μM) sobre a resposta pressora à FE no leito arterial caudal

Um dos mecanismos propostos para explicar os efeitos do chumbo e de seus derivados sobre a gênese da hipertensão arterial se justifica no fato de que esse metal promove alteração nas células endoteliais (Khalil-Manesh et al., 1993; Gonick et al., 1997) e nas células do músculo liso vascular (Webb et al., 1981; Chai & Webb, 1988; Kopp et al., 1988; Watts et al., 1995).

Nesse sentido, a administração crônica desse metal induz a produção e liberação de endotelina, um potente vasoconstritor (Khalil-Manesh et al., 1993) e inibe a liberação e/ou ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Oishi et al., 1996), e também do óxido nítrico (Mittal et al., 1995; Vaziri et al., 1997). A combinação desses efeitos promovidos pelo chumbo aumenta o tônus vascular e conseqüentemente a pressão sangüínea. Por outro lado, esse cátion pode atuar diretamente sobre o músculo liso vascular contraindo-o (Tomera & Harakal, 1986; Watts et al., 1995) e ainda pode potencializar a resposta pressora a norepinefrina em artérias isoladas (Skoczynska et al., 1986; Kopp et al., 1988).

No presente estudo, observou-se aumento na resposta pressora à FE no leito vascular caudal com endotélio íntegro, após perfusão por uma hora com 100 μM de acetato de chumbo, a qual foi confirmada pela potencialização da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e da sensibilidade (pD_2). Essa resposta foi mediada pelo endotélio, uma vez que após a lesão endotelial o efeito promovido pelo acetato de chumbo foi abolido.

Diante desse resultado inicial, pode-se hipotetizar a ocorrência de prejuízo na liberação de substâncias vasodilatadoras e/ou aumento na produção de vasoconstritores derivados do endotélio. Corroborando com esse achado, Webb et al., (1981) observaram aumento na geração de força contrátil na presença de agonistas (norepinefrina e metoxamina) no leito vascular caudal de ratos tratados com 100 ppm de acetato de chumbo em relação ao grupo controle. Outros estudos também propõem que esse metal pode atuar agudamente e promover alteração na reatividade vascular (Piccinini et al., 1977; Prentice & Kopp, 1985; Tomera & Harakal, 1986). Prentice & Kopp, por exemplo, demonstraram que os corações de ratos perfundidos com 30 μM de chumbo apresentaram redução do fluxo coronariano em relação ao grupo não tratado. Segundo esses autores, essa resposta pode ser explicada pela ação direta do chumbo sobre a contração das artérias coronarianas e também por esse metal interferir diretamente com os estímulos metabólicos que normalmente promovem vasodilatação. Por outro lado, Shelkovnikov et al., (2001), ao estudar os efeitos do acetato de chumbo

(concentrações 10^{-8} até 10^{-5} mol/l) sobre os anéis de artéria torácica de ratos com e sem o endotélio, não registraram nenhuma mudança na contração evocada pela norepinefrina. Contudo, ao utilizarem 10^{-4} mol/l de acetato de chumbo (dose semelhante à utilizada no nosso estudo) eles documentaram aumento na contração submáxima dos vasos sangüíneos, na presença de baixas concentrações de cálcio. Por fim, é notório que o chumbo é capaz de aumentar a resposta vascular às substâncias endógenas como a norepinefrina devido a hiperatividade dos receptores α_1 -pós-sinápticos (Webb *et al.*, 1981) e ainda promove maior atividade simpática, modifica a sensibilidade barorreflexa e induz alterações no sistema de transdução de sinais presente na membrana celular (Carmignani *et al.*, 2000). Ademais, semelhante aos nossos achados, Heydary *et al.*, (2006) documentaram que o chumbo foi capaz de aumentar $R_{máx}$ e pD_2 na presença de FE em anéis da aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 8 a 12 semanas, sendo que esses valores foram mais expressivos no grupo tratado por oito semanas. Esses dados suportam a hipótese de que chumbo induz hipertensão, por elevar a reatividade vascular aos receptores α_1 -adrenérgicos.

Ademais, outra explicação possível para a resposta vasoconstritora promovida pelo acetato de chumbo, seria a capacidade desse sal em prejudicar o endotélio vascular. Para testar essa hipótese, foi investigada a integridade endotelial e do músculo liso vascular, antes e após o tratamento agudo com acetato de chumbo. Sendo assim, ao término de cada experimento observou-se um prejuízo significativo na resposta vasodilatadora a acetilcolina. No entanto, o relaxamento do músculo liso vascular ao nitroprussiato de sódio não foi prejudicado. Esse resultado mostra claramente uma disfunção endotelial, fato que possivelmente esclarece os efeitos do acetato de chumbo sobre o leito vascular caudal, já que este evento, pode inibir a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio ou estimular a liberação de fatores vasoconstritores endoteliais. Corroborando com esses resultados, Cunha *et al.*, (2000) encontraram a mesma resposta ao avaliar a integridade do endotélio e do

músculo liso vascular após perfusão do leito vascular caudal de ratos, com 5 μM de cloreto de mercúrio. Essa comparação se faz pertinente, uma vez que os efeitos tóxicos desse metal sobre o músculo liso vascular se assemelham aos efeitos do chumbo. Em adição, os nossos achados concordam em parte, com os resultados encontrados por Marques et al., (2001) os quais observaram prejuízo na resposta vasodilatadora a acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio, nos anéis de aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 30 dias. Por fim, os nossos resultados demonstram que os efeitos agudos do acetato de chumbo tiveram efeito apenas pela via endotelial, diferindo de alguns estudos, os quais demonstraram o envolvimento tanto do endotélio como do músculo liso vascular na ação desse metal.

Por conseguinte, os reais mecanismos pelos quais o chumbo altera a reatividade vascular são pouco conhecidos, principalmente no que se refere aos seus efeitos agudos, bem como a modulação endotelial sobre os seus efeitos. Neste sentido, este estudo se propôs a estudar algumas vias que possivelmente poderia esclarecer o efeito desse cátion sobre o leito vascular caudal de ratos.

5.2 Fatores endoteliais envolvidos no efeito do acetato de chumbo (100 μM) sobre a resposta pressora à FE no leito arterial caudal

5.2.1 Via do óxido nítrico

A fim de avaliar os possíveis fatores endoteliais envolvidos na modulação do efeito do acetato de chumbo (100 μM) sobre a resposta pressora à FE, foi utilizado um inibidor “não seletivo” da síntese de óxido nítrico (NO), o L-NAME (10^{-4} M).

Nesse protocolo, notou-se uma elevação significativamente maior, tanto na $R_{\text{máx}}$ quanto na pD_2 promovida pelo acetato de chumbo na presença do L-NAME. Esses resultados sugerem que o efeito desse sal sobre a resposta pressora à FE não deve ser atribuído totalmente a sua ação sobre a via do NO, uma vez que a utilização do L-NAME não foi capaz de abolir a sua resposta. Contudo, não se deve descartar a possibilidade desse metal em diminuir a biodisponibilidade do NO. A exemplo disso, Vaziri et al., (1999) registraram aumento significativo na pressão sanguínea arterial de ratos, oito semanas após exposição ao chumbo. Esse evento foi acompanhado por uma forte redução na excreção urinária dos metabólitos do NO, que segundo os autores, isso se deve a diminuição na produção de NO ou ao aumento no seqüestro do mesmo.

Alguns estudos sugerem que o chumbo é capaz de reduzir a quantidade de NO no sangue, contribuindo para o aumento da resistência arterial e inotropismo cardíaco (Carmignani, et al., 2000). Corroborando com esses achados, Vaziri et al (1999), reportaram que o acetato de chumbo nas concentrações de 10, 30 e 100 ($\mu\text{g}/\text{dL}$) foi capaz de reduzir a atividade da NOS. Soma-se a isso, os dados encontrados por Marques et al., (2001) que reportaram déficit na capacidade vasodilatadora do NO exógeno nos ratos tratados com chumbo. Esses autores justificaram os seus resultados, a existência de uma *dowregulation* nas subunidades α_1 e β_1 da GCs (principal receptor do NO, localizado no músculo liso vascular). Por outro lado, sabe-se que a bradicinina provê o substrato arginina para a síntese de NO endotelial (Volpe, et al., 1996). Entretanto, baixas doses de exposição ao chumbo aumentaram a atividade da cininase II e da ECA em ratos, promovendo degradação da bradicinina, e com isso redução na quantidade desse peptídeo e conseqüentemente diminuição na produção de NO e na vasodilatação (Carmignani, et al., 1999).

Sabe-se que os fatores vasoativos derivados do endotélio estão envolvidos nos efeitos vasculares do chumbo, embora os resultados obtidos por vários pesquisadores ainda sejam ambíguos. Khalil-Manesh et al., (1994), por exemplo, documentaram o aumento nos níveis plasmáticos de endotelina, já Skocznska et

al., (2003) reportaram diminuição desse peptídeo. Os registros de Vaziri *et al.*, também são conflitantes, de modo que em um de seus estudos eles reportaram diminuição (1997), em outro estudo eles observaram aumento (2001) na concentração urinária de NO bem como uma superexpressão da eNOS.

Seguindo o propósito de elucidar os mecanismos de ação do acetato de chumbo, o próximo passo do presente estudo foi avaliar a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase.

5.2.1 Via dos prostanóides

Para analisar a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX), foi realizada a infusão contínua de Indometacina (10^{-5} M), um inibidor da enzima ciclooxigenase, na ausência e na presença de acetato de chumbo (100 μ M).

Nesse protocolo observou-se que o efeito vasoconstritor do acetato de chumbo (100 μ M) sobre o leito arterial caudal foi abolido pela Indometacina. Esses resultados indicam que esse sal pode estimular a liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX. Corroborando com esses achados, Courtois *et al.*, (2003) registraram aumento na expressão da isoforma da COX-2 em anéis de aorta perfundidos com chumbo, essa resposta foi associada a uma *dowregulation* da subunidade β_1 da GCs. Segundo esses autores, a explicação para esse fato, se dá pela participação das espécies reativas de oxigênio sobre o efeito chumbo. Cunha *et al.*, (2000), também documentaram aumento de vasoconstritores derivados da COX no leito vascular caudal, após administração aguda de cloreto de mercúrio. Em contrapartida, no estudo realizado por Peçanha (2004) não foi observado a participação dessa via na resposta aguda induzida pelo mercúrio.

Por outro lado, além da via dos prostanóides, outras vias responsáveis pelo aumento da resposta vasoconstritora, poderiam está envolvidas no efeito

pressor do acetato de chumbo sobre a artéria caudal. Nesse sentido, a próxima substância a ser investigada foi a angiotensina II.

5.2.3 Via da angiotensina II local

Para investigar essa via foi realizada a administração do Enalapril ($1 \mu\text{M}$), um inibidor da enzima conversora de angiotensinogênio (ECA), bem como a administração do Losartan ($10 \mu\text{mol/l}$), um inibidor específico de receptores para Angiotensina II, o AT_1 .

No presente estudo observamos que na presença do Enalapril, o aumento na pD_2 e na Rmáx provocado pelo acetato de chumbo foi abolido. Esse achado sugere que o acetato de chumbo pode estimular a via de produção e/ou liberação da ECA no leito arterial caudal de ratos *Wistar*. De acordo com esse resultado, Sharifi et al., (2004) reportaram aumento na atividade sérica da ECA na fase inicial de exposição ao chumbo. Porém, na fase crônica de exposição a esse metal, houve supressão da atividade sérica e tecidual dessa enzima. Desta forma, esses achados provêm fortes evidências acerca do envolvimento da ECA durante as fases iniciais da hipertensão induzida pelo chumbo.

Contudo, ao administrarmos o Losartan, observamos que o aumento da Rmáx e da pD_2 provocado pelo acetato de chumbo não foi totalmente abolido. Sendo assim, sugere-se que a ação desse sal sobre o leito vascular caudal não é somente via receptor AT_1 , existindo um outro componente constritor envolvido nessa resposta. Em adição, o presente trabalho mostra que $100 \mu\text{M}$ de acetato de chumbo é capaz de estimular a liberação de constritores derivados da ciclooxigenase, fato que pode em parte, pode explicar essa resposta.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a hipertensão induzida pelo chumbo incluindo o aumento da resistência periférica total (Iannaccone et al., 1981). Soma-se a isso, alguns trabalhos nos quais propõem que a vasoconstrição resultante da exposição ao chumbo pode ser associada a

superexpressão dos mecanismos vasoativos, tais como o sistema renina-angiotensina (Boscolo & Carmignani, 1988; Tsao *et al.*, 2000).

Sabe-se que o sistema renina-angiotensina realiza papel fundamental na regulação da pressão sangüínea e no fluido homeostático (Sealy & Laragh, 1995). Nesse contexto, diversos estudos reportaram que nos animais com hipertensão induzida pelo chumbo, esse sistema encontra-se alterado. Entretanto, os dados concernentes aos efeitos desse metal sobre essa via são conflitantes. A exemplo disso, várias pesquisas demonstraram que a exposição crônica ao chumbo aumenta a atividade plasmática da renina, por estimular a síntese ou a liberação da mesma pelo aparato justaglomerular (Boscolo & Carmignani, 1988; Carmignani *et al.*, 1999), bem como, estimula a produção de angiotensina I (Campbell *et al.*, 1985). Adicionalmente, outros estudos documentaram marcante alteração na atividade sérica da ECA (Keiser *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1985). Todavia, outros pesquisadores encontraram redução na atividade da renina plasmática (Victery *et al.*, 1982; Skoczynska, 1995) bem como, diminuição nos níveis de angiotensina II nos animais tratados com chumbo e que apresentavam hipertensão persistente (Victery *et al.*, 1982).

É notório que a angiotensina II promove vasoconstrição por estimular a liberação de aldosterona e produção de EROs, além de atuar sobre outras ações fisiológicas envolvidas no aumento da pressão sangüínea (Touyz & Schiffrin, 2001). Em adição, Griendling (2000), documentou que baixos níveis de angiotensina II foram capazes de aumentar as EROs derivadas da NAD(P)H. Sendo assim, diante de uma maior oferta de angiotensina II, espera-se maior responsividade da enzima NAD(P)H a esse peptídeo. Essa enzima atua reduzindo o oxigênio em $O_2^{\bullet-}$ e oxida a tetrahidrobiopterina (BH_4). Essa última, uma vez oxidada, propicia o desacoplamento da NOS elevando a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Luz, *et al.*, 2003), os quais podem causar degradação do NO (White *et al.*, 2003) e conseqüentemente potencialização das respostas vasoconstritoras (Cunha *et al.*, 2000).

Com base em diversas pesquisas que correlacionaram os efeitos hipertensivos do chumbo às EROs, nos propomos a investigar essa via.

5.2.4 Via dos radicais livres

A fim de investigar a participação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) sobre o efeito do acetato de chumbo na resposta pressora à FE foi administrado Tempol, um antioxidante exógeno com ação mimética à enzima Superóxido Dismutase (SOD).

Neste estudo, observou-se que o aumento na $R_{m\acute{a}x}$ e na pD_2 provocado pelo acetato de chumbo não foi abolido na presença do Tempol. A partir desse achado, sugere-se que o acetato de chumbo (100 μM) não está agindo sobre a via de produção e/ou liberação do $O_2^{\bullet-}$, porém isso não descarta a possibilidade desse sal está atuando sobre outras fontes de radicais livres, tais como os radicais hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa hipótese deverá ser investigada com melhor detalhamento, em nossos futuros estudos.

Em desacordo com resultados acima, Courtois et al., (2003) documentaram maior produção de EROs nos segmentos de aorta expostos ao chumbo. Soma-se a isso, trabalhos prévios realizados por Vaziri et al., (1997) e Ding et al., (2000) que registraram aumento na peroxidação lipídica e maior produção de OH^{\bullet} em culturas de células endoteliais após exposição ao chumbo. Em adição, Peçanha (2004), reportou que o efeito do mercúrio em aumentar a reatividade vascular caudal foi modulado pelas EROs, já que nesse estudo a presença de antioxidantes (Tempol e deferoxamina) aboliu a resposta pressora desse metal. Em adição a esses dados, trabalhos realizados em humanos observaram envolvimento das EROs sobre os efeitos do chumbo. Shenmin Ni *et al.*, (2004), por exemplo, demonstraram que o chumbo foi capaz gerar $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em culturas de células endoteliais e do músculo liso de artérias coronárias de humanos.

Como podemos observar, os reais mecanismos pelos quais o chumbo atua, ainda são uma incógnita no meio científico, e os estudos que se

propuseram a explicá-los são conflitantes. Nesse contexto, alguns pesquisadores têm concentrado suas investigações no fato de que esse metal interfere na atividade e no metabolismo do cálcio, bem como o substitui nos processos fisiológicos (Piccinini *et al.*, 1977; Favalli *et al.*, 1977; Webb *et al.*, 1981; Goldstein, 1993; Watts *et al.*, 1995).

Sendo assim, aventamos a possibilidade desse metal esta inibindo a bomba Na^+K^+ -ATPase no leito vascular caudal, pois caso isso acontecesse, isso poderia ser explorado mais profundamente, após a defesa dos resultados encontrados até o momento.

5.3 Efeito do acetato de chumbo (100 μM) sobre a atividade funcional da Na^+K^+ -ATPase.

Sabe-se que a regulação da resistência vascular e da homeostasia do sódio é fundamental para o controle da pressão arterial. Neste sentido, diversos estudos correlacionaram a função da Na^+K^+ -ATPase na manutenção do tônus vascular (Webb & Bohr, 1978; Vassalle, 1987). Já está bem descrito que o papel principal dessa proteína transmembrana é ativar o transporte dos íons Na^+ e K^+ , mas esse sistema enzimático também participa da homeostase da H_2O e dos sais (Nechay, 1977), do transporte não eletrolítico e estimula a secreção de íons K^+ e H^+ nos túbulos renais (Jorgensen, 1980).

Por outro lado a atividade enzimática dessa bomba é afetada por vários hormônios incluindo os mineraloglicocorticóides (Westenfelder *et al.*, 1981; Mujais *et al.*, 1984), os hormônios tireoideos (Katz *et al.*, 1973), a insulina (Rogus *et al.*, 1969; Garvick *et al.*, 1975) as catecolaminas (Herrera *et al.*, 1963) e o hormônio natriuretico (Haddy *et al.*, 1979; Buckalew *et al.*, 1974). Ademais, postula-se que, o chumbo, bem como outros metais pesados (vanádio, mercúrio, cádmio, urânio, prata) é um potente inibidor da atividade da Na^+K^+ -ATPase (Nechay & Saunders,

1978; Kramer *et al.*, 1986). Sendo assim, a inibição da mesma, pode promover aumento na contração do músculo liso vascular por despolarização, levando ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem e influxo de cálcio para o meio intracelular (Fleming, 1980; Vassalle, 1987). Esse evento, promove acúmulo de íons sódio no mioplasma resultando em inibição do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, aumento intracelular de Ca^{2+} , e conseqüentemente elevação do tônus vascular (Paulson & Newman, 1987; McCarron & Halpern, 1990).

Diante do exposto, o próximo objetivo desse estudo foi investigar se $100 \mu\text{M}$ de acetato de chumbo seria capaz de interferir na atividade funcional da $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ no leito vascular caudal. Nesse protocolo observou-se que esse sal foi capaz de diminuir significativamente o relaxamento induzido pelo cloreto de potássio. A priori, este resultado sugere que o acetato de chumbo na dose utilizada, foi capaz de inibir a bomba $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$. Corroborando com os nossos achados, Weiler, (1990) reportou que o chumbo pode contribuir na patogênese da hipertensão essencial via inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$ no músculo liso vascular. Nesse trabalho foi evidenciado que esse metal age sobre esse sistema de forma competitiva (houve competição desse metal com os íons Na^+ e com Mg^{2+}) e não competitiva. Esses achados confirmam os dados encontrados por Siegel & Fogt (1977), os quais revelaram que o cloreto de chumbo inibiu fortemente a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$.

Todavia, são escassos os estudos acerca dos efeitos do chumbo sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$. Em contrapartida, diante do que foi encontrado no nosso estudo, essa via representa uma fonte em potencial a ser explorada, visto que a partir dela, possivelmente poderemos responder algumas perguntas concernentes aos mecanismos de ação do chumbo no organismo.

VI. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a administração aguda de 100 μ M de acetato de chumbo, foi capaz de aumentar a reatividade vascular à FE, na presença do endotélio funcional. Essas respostas foram confirmadas pelo aumento da $R_{m\acute{a}x}$ e da pD_2 . Em adição, o efeito da administração aguda de 100 μ M de acetato de chumbo no leito vascular caudal, foi modulado pelo endotélio através da liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase; da liberação de angiotensina II, via aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina. Ademais, 100 μ M de acetato de chumbo, foi capaz de inibir a atividade funcional da $Na^+ K^+$ -ATPase. Esses eventos, certamente, contribuem para o aumento na $R_{m\acute{a}x}$ e na pD_2 à FE, observada no leito vascular caudal desses animais.

Por fim, o presente estudo propõe mais um mecanismo de ação do chumbo, mecanismo local envolvendo a Angiotensina II e a ciclooxigenase que pode explicar o seu efeito hipertensor.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angus, JA; Cooks, TM. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacological Therapy**. 1989; 41: 303-351.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological profile for lead**. 307p. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1993. **Annual report-1995**. 307p.

Disponível em:<<http://www.atsdr.cdc.gov>>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological profile for lead**. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: US- Department of Health and Human Services, Public Health Service. **Annual report-1995** 2005. 204 p.

Disponível em:<<http://www.atsdr.cdc.gov>>

Bakris, GL; Mesah, GA. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. **Cardiological Clinical**. 2002; 20: 195-206.

Beckman, JS; Beckman,TW; Chen, J; Marshall, PA Freeman, BA. Aparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 1990; 87 (4): 1620-1624.

Beckman, IS & Koppenol, WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxinitrite : the good, the bad, and the ugly. **American Journal Physiology**. 1996; 271:1424-1437.

Bergdahl IA, Schutz A, Gerhardsson L, Jensen A & Skerfving S. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health**. 1997; 23 (5): 359-363.

Bolotina, VM; Najbi, S; Palacino, JJ; Pagano, PJ; Cohen, RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**. 1994; 368: 850-853.

Bohr, DF; Webb, RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **American Journal of Medicine**. 1984; 77 (suppl. 4A): 3-16

Boscolo, P; Carmignani, M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. **Environ, Health Perspect**. 1988; 78: 101-106.

Bomzon, A. & Huang, YT. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. **Pharmacol. Ther**. 2001; 89:255-272.

Bredt, DS & Snyder, SH. Nitric oxide synthetase, a calmodulina-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 1990; 87:682-685.

Briones, AM; Alonso, MJ; Marín, J. Salaces, M. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**. 1999; 126: 111-120.

Buckalew, VM & Nelson, DB. Natriuretic and sodium transport inhibitory activity in plasma of volume expanded dogs. **Kidney Int**. 1974; 5: 12-22.

Bukoski, RD; Bergman, C; Gairard, A; Stoclet, JC. Intracellular Ca^{2+} and force determined simultaneously in isolated resistance arteries. 1989; 257: H1728-H1735.

Bunting, S; Gryglewski, R; Moncada, S; Vane, JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and celiac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins**. 1978; 12:897-913.

Carmignani, M; Boscolo, P. Cardiovascular homeostasis in rats chronically exposed to mercury chloride. **Arch Toxicology**. 1984; 7: 383-386.

Carmignani, M.; Boscollo, 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; Boscollo, 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 Science**. 2000; 68: 401-415.

Campbell, WB; Gebremedhin, D; Pratt, PF, *et al* Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research*. 1996; 78: 415-423.

Carey, RM; Jin, XH; Seragy, HM> Role of the angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors. **Blood Pressure Supplement**. 2001; 14: 985-1025.

Carvalho, MHC; Fortes, ZB; Passaglia RCAT; Nigro, D. Funções Normais do Endotélio- Uma visão Geral. In: Endotélio: doenças cardiovasculares. 2005; 1ed. Atheneu, São Paulo

Capponi, AM. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors. **Blood Pressure Supplement**. 1996; 2: 41-46.

Centers for Disease Control (CDC). **Preventing lead poisoning in young children** – United states and selected states, 1996-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000; 49: 1133-1137.

Chai, S. & Webb, RC. Effects of lead on vascular reactivity. **Environmental Health Perspectives.** 1988; 78: 85-89.

Chen, G & Cheung, DW. Modulation of endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation to acetylcholine en rat mesenteric artery by cytochrome P450 enzyme activity. **Circulation Research.** 1996; 79: 827-833.

Cho, HJ; Xie, QW; Calaycay, J *et al.* Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J Exp Med.** 1992; 176: 599-604.

Chobanian AV; Bakris GL, Black HR *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: JNC- VII report. **JAMA.** 2003; 289: 2560-2572.

Coats, P; Johnston, F; MacDonald, J; McMurray, JJV; Hillier, C. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Identification and Mechanisms of actions in human subcutaneous resistance arteries. **Circulation.** 2001; 1702-1708.

Courtois, E; Marques, M; Barrientos, A; Casado, S; López-Farré , A. Lead-Induced Downregulation of Soluble Guanylate Cyclase in Isolated Rat Aortic Segments Mediated by Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2. **Journal Americam Society Nephrology.** 2003; 14: 1464–1470.

Costerousse, O; Jaspard, E; Allegrini, J; Wei, L; Alhenc-Gelas, F. Angiotensin I converting enzyme (Kinase II). Molecular organization and regulation of its expression in humans. **Journal Cardiovascular Pharmacology.** 1992; 20: (supl 9): S10-S-15.

Cunha, V; Souza, HP; Rossoni, LV; França, AS; Vassallo, DV. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2000; 39:124-130.

Danser, AH. Local rennin-angiotensin systems. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 1996; 157: 211-216.

De Gasparo, M; Husain, A; Alexander, W. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. **Hypertension**. 1995; 25: 924-927.

Dimitrova, M. Modifications de la fonction contractile du myocarde dans le saturnisme chronique. **Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secllr. Soc.** 1972; 33: 383-387.

Ding, Y; Gonick, HC;; Vaziri, ND. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am. J. Hypertens*. 2000; 13: 552-555.

Dohi, Y; Thiel, MA; Buhier, FR; Lüscher, TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: effect of age and hypertension. **Hypertension**. 1990; 16: 170-179.

Droge, W. Free radicals in the physiology control of cell function. **Physiology Review**. 2002; 82: 47-95.

Dzau, VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. **Journal of Hypertension**. 1989; 7:933-936.

Edwards, G. Dora, KA; Gardner, MJ et al. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998; 396: 269-272.

Folkow, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Review**. 1982; 62: 347-504.

Félétou, M. & Vanhoutte, PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**. 1988; 93: 515-524.

Félétou, M. & Vanhoutte, PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**. 1996; 23 (12): 1082-1090.

Félétou, M. & Vanhoutte, PM. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **Journal of Physiology and Pharmacology**. 1999; 50 (4): 525-534.

Félétou, M. & Vanhoutte, PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **American Journal Physiology**. 2006; 291: H985-H1002.

Fleming, WW. The electrogenic Na^+K^+ pump in smooth muscle: physiology and pharmacology significance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 1980; 62: 347-504.

Fridovich, L. Superoxide anion radical, superoxide dismutase and related matters. **Journal of Biological Chemistry**. 1997; 272: 18515-18517.

Förstermann, U. Nakane, M; Tracey, WR; Pollock, JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. **European Heart Journal**. 1993;14 (1): 10-15.

Förstermann, U; Closs, EL; Pollock, JS. Nakane, M; Schwarz, P; Gath, I; Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**. 1994; 23 (6 Pt 2): 1121-1131.

França, AS; Rossoni, LV; Amaral, SMC; Vassallo, DV. Reactivity of the isolated perfused rat tail vascular bed. **Braz J Med Biol Res.** 1997; 30: 891-895.

Freis, ED. Age, race and sex and other indices of risk in hypertension. *American Journal of Medicine.* 1973; 55: 275-280.

Haraap, SB. Hypertension: genes versus environment. **Lancet.** 1994; 344: 169-171.

Fell, GS. Lead toxicity: Problems of definition and laboratory evaluation. **Ann. Clin. Biochem.** 1984; 21: 453-460.

Figueiredo, J; Portella, P; Portella, E; Fernandes, EG. Lei nº 6.638 (1979), estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Publicada no Diário Oficial da União de 10.05.1979, Brasília.

Frolich, JC & Förstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advanced Prostaglandin Thromboxane and Leukotriene Research.** 1989; 19: 211-215.

Funder, JW. Non genomic actions of aldosterone: role in hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2001; 10:227-230.

Furchgott, RF; Zawadzki, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 1980; 288: 373-376.

Furchgott, RF. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. **Circulation Research.** 1983; 53:557-572.

Furchgott, RF. The role of the endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. **Annual reviews Pharmacology and Toxicology**. 1984; 24: 175-197.

Furchgott,RF; Carvalho MHC; Khan MT. Evidence for endothelium-dependent vasodilatation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood Vessels**. 1987; 24: 145-149.

Furchgott, RF; Vanhoutte, PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J**. 1989, 3: 2007-2017.

Furukawa, RJ; Ohshima, N; Tawada-Iwada, Y; Shigekawa, M. Cyclic GMP stimulates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in VSMCs in primary cultures. **Journal of Biological Chemistry**. 1991; 226: 12337-12341.

Garvyck, WA; Moore, RD; Thompson, RC. Effect of insulin upon membrane bound (Na-K)-ATPaseextracted from frog skeletal muscle. **Journal of Physiology**. 1975; 252: 43-58.

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.

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.

Griendling, KK & FitzGerald, GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I. Basic mechanisms and vivo monitoring of ROS. **Circulation**. 2003; 108: 1912-1916.

Grunfeld, S; Hamilton, CA; Mesaros, S; McClain, SW; Dominiczack, AF; Bohr, DF; Malinski, T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. **Hypertension**.1995; 26: 54-857.

Griendling, KK; Ushio-Fukai, M; Lassegue, B; Alexander, RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. **Hypertension**. 1997; 29:366-373.

Griendling, KK; Sorescu, D; Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**. 2000; 82: 494-501.

Gryglewski, RJ; Botting, RM; Vane, JR. Mediators produced by the endothelium cell. **Hypertension**. 1988; 12: 530-548.

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

Haddy, JF; Pamnani, MB; Clough, DH. Humoral factors and the sodium-potassium pump in volume expanded hypertension. **Life Sciences**. 1979; 24: 2105-2118.

Harlan, WR; Landis, JR; Schmouder, RL; Goldstein, NG; Harlan, LC. Blood lead and blood pressure. Relationship in the adolescent and adult US population. **JAMA**. 1985; 253: 530-534.

Harlan, WR.The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. **Environ. Health Perspective**.1988; 78: 9-13.

Halushka, PV; Mais, DE; Mayeuc, PR; Morinelli, TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 1989; 29: 213-239.

Hejtmancik, MR & Williams, BJ. Effects of chronic lead exposure on the direct and indirect components of the cardiac response to norepinephrine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1979; 51: 239-245.

Herrera, FC; Whitemburry, G; Planchart, A. Effect of insulin on short-circuit current across isolated frog skin in the presence of calcium and magnesium. **Biochem. Biophys. Acta.** 1963; 170-172.

Hirata, M; Kohse, KP; Chang, CH; Ikebe, T; Murad, F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry.** 1990; 265: 1268-1273.

Hollenberg, NK; Fisher, ND; Price, DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the rennin system. **Hypertension.** 1998; 32:387-392.

Hond, ED; Nawrot, T; Staessen, JA. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. **Journal of Human Hypertension.** 2002; 16: 563-568.

Horowitz, A; Menice, CB; Laporte, R; Morgan, RG. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews.** 1996; 76(4): 967-1003.

Huie, RE & Padmaja, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Radical Research and Communications.** 1993; 18 (4): 195-199.

Ignarro, LJ & Kadowitz, PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** 1985; 25: 171-191.

Ignarro, LJ; Buga, GM; Wood, KS *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 1987; 84: 9265-9269.

Iannaccone, A; Carmignani M; Boscolo, P. Neurogenic and humoral mechanisms in arterial hypertension of chronically lead-exposed rats. **Med. Lav.** 1981; 72 (1): 13-21.

International Lead Zinc Study Group (ILZSG). **2001 Statistics**. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/intro.htm>>.

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

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.

Jackson, FW. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**. 2000; 35 (2): 173-178.

Jacobs, DE; Clickner, RP; Zhou, JY, et al., The prevalence of lead-based paint hazards in US housing. **Environ Health Perspect**. 2002; 110: A599-A606.

Jin, N; Packer, CS; Rhoades, RA. Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 1991; 69: 383-388.

Kaplan, N.M. **Clinical Hypertension**. 7.ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins. 1998, 444p.

Jorgensen, PL. Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. **Physiology of Review**. 1980; 60: 864-916.

Karaki, H; Ozaki, H; Hori, M; Mitsiu-Saito, M; Amano, K; Horada, K; Miyamoto, S; Nakazawa, H; Won, K; Sato, K. Calcium movement, distribution and function in smooth muscle. **Pharmacological Review**. 1997; 49 (2): 157-225.

Katz, AI & Lindheimer, MD. Renal sodium and potassium activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat. **Journal Clinic of Investigation**. 1973; 52: 796-804.

Kearney PM; Welton M; Reynolds K; Muntner P; Whelton PK; He J: Global burden of hypertension: analysis of world-wide data. **Lancet**. 2005; 365: 217-223.

Kerr, S; Brosnan, MJ; Intyre, M; Reid JL; Dominiczak, AF; Hamilton, CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: the role of the endothelium. **Hypertension**. 1999; 33: 1353-1358.

Khalil, R; Menice, CB; Wang, CLA; Morgan, KG. Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein Kinase in differentiated contractile vascular cells. **Circulation Research**. 1995; 76: 1101-1108.

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

Khera, AK; Wibberley, DG; Edwards, KW; Waldron, HA. Cadmium and lead in blood and urine in a series of cardiovascular and normotensive patients. **Inter. J. Environ. Studies**. 1980; 14: 309-312.

Kifor, I & Dzau, VJ. Endothelial rennin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. **Circulation Research**.1987; 60: 422-428.

Kline, TS. Myocardial changes in lead poisoning. **Am. J. Dis. Child**. 1960; 99: 48-54

Komori, K; Vanhoutte, PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Blood Vessels**. 1990; 27:238-245.

Konishi, M & SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**. 1983; 5: 881-886.

Kopp, SJ; Baker, JC; D'Agrosa, LS; Hawley, PL. Simultaneous recording of his bundle eletrogram, electrocardiogram, and sistolic tension from intact modified Langendorff rat heart preparations, I: Effects of perfusion time, cadmium, and lead. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 1978; 46: 475-487

Kopp, SJ; Báváry, M. Influence of isoproterenol and calcium on cadmium or lead-induced negative inotropy related to cardiac myofibrillar protein phosphorylations in perfused rat heart. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 1980; 55: 8-17.

Kopp, JS; Barron, JT; Tow, JP. Cardiovascular Actions of Lead and Relationship to Hypertension: A Review. **Environmental Health Perspectives**.1988; 78: 91-99.

Keiser, JA; Vander, AJ; Germain, CL; Clearance of rennin in unanesthetized rats: effects of chronic lead exposure. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 1983; 69: 127-137.

Kukovetz, WR; Holtzmann, S; Wurm, A; Pöch, G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *Journal of Cyclic Nucleotide Research*. 1979; 5: 469-476.

Laurindo, FRM. Desequilíbrio Redox, Resposta Vascular `Lesão e Aterosclerose. Endotélio & Doenças Cardiovasculares. 2005; 1ed. Atheneu, São Paulo, p.115-132.

Lebarch, E. **Efeito do íon chumbo na contração isométrica do ventrículo direito de ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

Ledenev, NA; Konstantinov, AA; Popova, E.; Ruuge, EK. A simple assay of the superoxide generation rate with iron as ESP-visible radical scavenger. **Biochem Int.** 1998; 13: 391-396.

Lee, TJ; Shirasaki, Y; Nickols, GA. Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. **Blood Vessels.** 1987; 24 (3): 132-136.

Leite,R & Salgado,MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. **Hypertension.** 1992; 19: 575-581.

Lincoln, TM; Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. **Pharmacology and Therapeutics.** 1989; 41: 479-502.

Long, CJ & Stone, TW. The release of endothelium-dependent relaxing factor is calcium dependent. **Blood Vessels.** 1985; 205-208.

Lüscher, TF; Vanhoutte, PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** 1986; 8: 344-348

Lüscher, TF; Raij, L; Vanhoutte, PM. Effect of hypertension and its reversal on endothelium-dependent relaxations in the aorta. **Journal of Hypertension**. 1987; 5:5153-5155.

Lüscher, TF & Vanhoutte, PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. **Boca Raton: CRC Press**. 1990; 1-228.

Lund-Johansen, P. Haemodynamics in early essential hypertension-still an area of controversy. **Journal of Hypertension**. 1983; 1: 209-213.

MacMahon S; Peto R; Cutler J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: effects of prolonged differences in blood pressure-evidence from nine prospective observational studies corrected for dilution bias. **Lancet** 1995; 335:765-774.

McCarron JG & Halpern W. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. **American Journal of Physiology**. 1990; 259: H902-H908.

Marín J, Fernandez-Alfonso MS; Sanchez-Ferrer CF. Sodium pump activity and contractile effect of ouabain in human placental veins. **European Journal of Pharmacology**. 1991; 201: 75-82.

Marín, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. **Journal of Autonomic Pharmacology**. 1993; 13: 127-176.

Marín, J & Rodríguez-Martínez, MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology and therapeutics**. 1997; 75 (2): 111-134.

Marques, M; Millás, I; Jiménez, A; García-Colis, E; Rodriguez-Feo, J; Velasco, S; Barrientos, A; Casado, S; López-Farré, A. Alteration of the Soluble Guanylate Cyclase System in the Vascular Wall of Lead-Induced Hypertension in Rats. **Journal American Society Nephrology**. 2001; 12: 2594–2600.

Masferrer, JL; Seibert, K; Zweifel, B; Needleman, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**. 1992; 89: 3917-3921.

Mavropoulos, E. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais**. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 1999, p.105.

Means, AT; Vanberkum, FA; Bagchi, I; Lu, KP; Rasmussen, CD. Regulatory functions of calmodulina. **Pharmacology and Therapeutisc**. 1991; 50: 255-270.

Meisherei, KD; Taylor, CJ; Saneii, H. Synthetic atrial peptide inhibits intracellular calcium release in smooth muscle. *American Journal Physiology*. 1986; 250: C171-C174.

Mittal, CK; Harrell, WB; Mehta, CS. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide sintase. **Mol. Cell. Biochem**. 1995. 149/150: 263-265.

Mombouli, JV; Vanhoutte, PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J. Mol Cell Cardiol**. 1999; 31: 61-74.

Moncada, S; Herman, AG; Higgs, EA Vane , JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endotheliu. **Thrombosis Research**. 1977; 11: 323-344.

Moncada, S & Vane, JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxidase, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**. 1979; 30: 293-331.

Moncada, S; Palmer, RMJ; Higgs, EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. 1991; 43: 109-142.

Moncada, T et al., Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 2000; 106: 1521-1530.

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

Morris, SM & Billiar, TR. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthase. **American Journal Physiology**. 1994; 266: 829-839.

Mugge, A; Elwell, JH; Peterson, TE; Hofmeyer, TG; Heistad, DD; Harrison, DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. **Circulation Research**. 1991; 69: 1293-1300.

Mujais, SK; Chekai, MA; Jones, WJ; Hayslett, JP; Katz, AI. Regulation of renal Na-K-ATPase in the rat. **Journal of Clinical Investigation**. 1984; 73: 13-19.

Myerson, RM & Eisenhauer, JH. Atrioventricular conduction defects in lead poisoning. **American Journal Cardiology**. 1963; 11: 409-412.

Nash, D; Magder, L; Lustberg, M; Sherwin, RW; Rubin, RJ; Kaujmann, RB; Silbergeld, EK. Blood lead, blood pressure, and hypertension in perimenopausal and postmenopausal women. **JAMA**. 2003; 289 (12): 1523-1532.

Nashashibi N.; Cardamakis E.; Bolbos G.; Tzingounis V. Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation. **Gynecologic and Obstetric Investigation**. 1999; 48 (3): 158-162.

Naumiya, S; Sugimoto, Y; Ushikubi, F. Prostanoid receptor: structure, properties and finction. **Physiology Review**. 1999; 70 (4): 1193-1226.

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

Nechay, BR. Biochemical basis of diuretic action. **Journal Clinic of Pharmacology**. 1977; 17: 626-641.

Oishi, H; Nakashima, M; Totoki, T; Tomokuni, K. Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. **Journal Cardiovascular Pharmacology**. 1996; 28: 558-563.

Ohnishi, J; Ishido, M; Shibata, T; Inagami, T; Murakami, K; Miyazaki, H. The rat angiotensin II AT_{1A} receptor couples with three different signal transduction pathway. **Biochemical Biophysical Research Communication**. 1992; 186 (2): 1094-1100.

Paoliello, MMB.; Chasin, AAM. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**. Centro de Recursos Ambientais-CREA, 2001; vol.3. Salvador.

Panza, JA; Quyyumi, AA; Brush, JE. Abdormal endothelium-dependent vascular relaxation in patient with essential hypertension. **New England Journal of Medicine**. 1990; 323 (1): 22-27.

Palmer, RMJ; Ferrige, AG; Moncada, S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**.1987; 327: 524-526.

Palmer RMJ; Ashton, DS & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**. 1988; 333: 664-666.

Paoliello, MMB; Chasin, AAM. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, v.3. Salvador: Centro De Recursos Ambientais-CREA, 2001.

Paulson OB & Newman EA. /Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? **Science**. 1987; 896-898.

Peçanha, GAW. Efeito de baixa concentração (6nM) de cloreto de mercúrio sobre a reatividade à fenilefrina no leito arterial caudal de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.

Pereira, CA & Krieger, JE. Dos fatores de risco clássicos ao perfil de risco individualizado. **Hipertensão**. 2005; 8 (4): 131-137.

Perry IJ, Whincup PH, Shapter AG. Environmental factors in the development of essential hypertension. **Br Med Bull**. 1994; 50:246-59.

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

Pirkle, JL; Schwartz, J; Landis, JR; Harlan, WR. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. **American Journal Epidemiology**. 1985; 121: 246-258.

Prentice, RC & Koop, SJ. Cardiotoxicity of lead at various perfusable calcium concentrations: Functional and metabolic responses of the perfused rat heart. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1985; 81: 491-501.

Quignard, JF; Félétou, M; Thollon, C; Vilaine, JP; Duhault, J; Vanhoutte, PM. Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig and porcine coronary arteries. **British Journal of Pharmacology**. 1999; 127: 27-34.

Rabinowitz MB; Wetherill GW; Kopple JD. 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. **The Journal of Clinical Investigation**. 1976; 58 (2): 260-270.

Ralymaekers, L. Holfmann, F; Casteels, R. Cyclic GMP-dependent protein Kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle cells. **Biochemistry Journal**. 1988; 252 (1): 269-273.

Rapoport, RM & Murad, F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circulation Research**. 1983; 52: 342-357.

Read, JL & Williams, JP. Lead myocarditis: Report of a case. **American Journal Heart**. 1952; 44: 797-802.

Rembold, CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**. 1992; 20: 129-137.

Rimarachin, JA; Jacobson, JA; Szabo, P; MacLouf, J; Creminon, C; Weksler, BB. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic muscle cells. **Arteriosclerosis & Thrombosis**. 1994; 14 (7): 1021- 1031

Rogus, E; Price, T; Zierler, KL. Sodium plus potassium activated ouabain-inhibited adenosine triphosphatase from a fraction of rat skeletal muscle, and lack of insulin effect on it. **J. Gen. Physiol**. 1969; 54: 188-202.

Romieu, I; Aprea, C; Bocalun, P; Orsi, D; Porcelli, B. Fuentes de exposición a plomo em la ciudad de México. In: AVILA, M.H.; RENDÓN, E.P. **Intoxicación por plomo en México: prevención y control**. Morelos: Instituto Nacioanl de Salud Publica, 1995.

Rosenblum, WI. Effects of lead and other cations on pial arteries of the mouse. **Acta Neuropathol**. 1965; 5: 54-60.

Rossoni, LV; Cunha, V; França, A; Vassallo, DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses in modulated by the endothelium. **Journal Cardiovascular Phrmacology**. 1999; 34 (6): 887-892.

Rubanyi,GM; Vanhoutte, PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology**. 1986; 250 (19):H815-H821.

Rubanyi,GM. The role endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 1993; 22 (4): 1-14.

Saryan, LA & Zenc, C. Lead and its compounds. In: Zenz, C; Dickerson, OB; Horvath. Occupational Medicine. Ed. Mosby-Year Cook, EUA. 1994, p. 506-541

Sealy, JE; Laragh, JH. The rennin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium homeostasis. In: Laragh, JH; Brenner, BM. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. 1995, 2^a Ed., Raven Press. New York, NY, p. 1763-1796.

Schiffrin, EL & Thibaut, G. Plasma endothelin in human essential hypertension. **American Journal of Hypertension**. 1991; 4: 303-308.

Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men. **Arch Environ Health**. 1995; 50: 31-37.

Sharp, DS; Becker, CE; Smith, AH. Chronic low-level lead exposure. Its role in the pathogenesis of hypertension. **Med. Toxicol**. 1987; 2:210-232.

Shaper, AG; Pocock, SJ. Blood lead and blood pressure. **Br. Med. J**. 1985; 291: 1147-1149.

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

Shelkovnikov, SA & Gonick, HC. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. **American Journal of Hypertension**. 2001; 14: 873-878.

Shesely EG; Maeda, N; Kim HS *et al.* .Elevated blood pressure in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. . **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 1996; 93: 13176-13181.

Shimokawa, H; Flavahan, NA; Lorenz, RR; Vanhoutte, PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its actions in coronary arteries of the pig. **British Journal of Pharmacology**. 1988; 95 (4): 1197-1203.

Shimizu, S; Ishii, M; Yamamoto, T; Kawanishi, T; Momose, K. Kuroiwa, Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. **Research Communications of Chemical Pathology and Pharmacology**. 1994; 84: 301-314.

Shiota, N; Miyazaki, M; Okunishi, H. Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. **Hypertension**. 1992; 20: 168-174.

Silver, W & Rodriguez-Torres, R. Electrocardiographic studies in children with lead poisoning. **Pediatrics**. 1968; 41: 1124-1127.

Siegel, GJ & Fogt, S. Inhibition by lead ion of electrophorus electroplax (Na^{++} K^{+}) –Adenosine Triphosphatase and K^{+} -p-Nitrophenylphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**. 1977; 252 (15): 5201-5205.

Skerfving, S; Nilsson, U; Schutz, A; et al. Biological monitoring of inorganic lead. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health International**. 1993; 19: 59-64.

Skoczynska, A; Juzwa, W; Smolik, R; Szechinski, J; Behal, FJ. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. **Toxicology**. 1986; 39: 275-289.

Skoczynska, A. Renin-angiotensin-aldosterone system in chronic poisoning of rats with lead and cadmium. **Med. Pr**. 1995; 46: 239-246.

Smith, WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology**. 1992; 263: F181-F191.

Snyder, SH & Bredt, DS. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**. 1992; 28-35.

Staessen JA e cols. Hypertension caused by low-level lead exposure: myth or fact? **Journal Cardiovascular Risk**. 1994; 1: 87-97.

Stöfen, D. Environmental lead and the heart. **J. Mol. Cell. Cardiol**. 1974; 6: 285-290.

Stull, TJ; Gallagher, PJ; Herring, BP; Kamm, KE. Vascular smooth muscle contractile elements: Cellular regulation. **Hypertension**. 1991; 17: 723-732.

Suzuki, YJ; & Ford, GD. Superoxide stimulates IP₃-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology**. 1992; 262: H114-H116

Suzuki, H; Swei, A; Zweifach, BW; Schmid-Schonbein, GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. 1995; 25: 1083-1089.

Taddei, S; Viridis, A; Ghiadoni, L; Magagna, A; Salvetti, A. A cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. **Hypertension**. 1997; 20(Pt 2): 274-279.

Tare, M; Parkington, HC; Coleman, HA; Neild, TO; Dusting, GT. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**. 1990; 346: 69-71.

Taylor, SG & Weston, AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in Pharmacological Sciences** 1988; 9: 272-274.

Timmermans, PB; Wong, PC; Chiu, AT; Herblin, WF; Benfield, P; Carini, DJ; Lee, RJ; Wexler, RR, Saye, JA; Smith, RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol Review**. 1993;45: 205-251.

Tsalev DL; Zaprianov ZK. Lead. In *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. **CRC Press**, Florida. 1985; p. 137-150.

Toda, N. Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II histamine in isolated arteries of dog. **British Journal of Pharmacology**. 1984; 81 (2): 301-307.

Tomera, JF & Harakal, C. Mercury and lead-induced contraction of aortic smooth muscle in vitro. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther**. 1986; 283: 295-302.

Touyz, RM; Schiffrin, EL. Increased generation of super-oxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **Hypertension**. 2001; 19 (7): 1245-1254.

Tsao, D-A, Yu, H-S; Cheng, J-T; Ho, C-K; Chang, H-R. The change of β -adrenergic system in lead-induced hypertension. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2000; 163:127-133.

Tsaih, SW; Schartz, J; Lee, ML, et al. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. **Environmental Health Perspectives**. 1999; 107 (5): 391-396.

Unger, T; Chung, O; Csikos, T; Wilman, J; Gallinat, S; Gohlke, P; Hphle, S; Meffert, S; Stoll, M; Stroth, U; Zhu, YZ. Angiotensin receptors. **Journal Hypertension Supplement**. 1996; 14 (5): S95-S103.

Vanhoutte, PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. **Circulation**. 1993; 87 (suppl V): V9-V17.

Vassalle, M. Contribution of the Na⁺K⁺ pump to the membrane potential. **Experiential**. 1987; 43: 1135-1140.

Vassallo, DV; Varner K; Vassallo PF; Massaroni L. Vasopressor effects produced by mercury on the perfused rat tail artery. **Annals of the IX Annual Meeting of the Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)**. 1994. Abstract: 2.115, p.119.

Vaziri, ND; Ding, Y; Gonick, HC. Altered nitric oxide metabolism and increased oxigens free radical activity in lead-induced hypertension: effects of lazoroid therapy. **Kidney Int**. 1997; 52: 1042-1046.

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

Vaziri, ND; Ding, Y; Ni, Z. Compensatory up-regulation of nitric-oxide sintase isoformas in lead-induced hypertension: reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. 2001;298: 679-685.

Victory, W; Vander, AJ; Shulak, JM; Schoeps, P; Julius, S. Lead hypertension, and rennin-angiotensin system in rats. **Lab. Clin. Med**. 1982; 99: 354-362.

Volpe, AR; Giardina, B; Preziosi, P; Carmignani, M. Biosynthesis of endothelium-derived nitric oxide by bradykinin as endogenous precursor. **Immunopharmacology**. 1996; 33: 287-290.

Vupputuri, S.; He, J.; Muntner, P.; Bazzano, L.A.; Whelton, P.K.; Batuman, V. Blood lead level is associated with elevated blood pressure in blacks. **Hypertension**. 2003; 41: 463-468.

Walsh,MP. Regulation of vascular smooth muscle tone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 1994; 72: 919-936.

Watts, SW; Chai, S; Webb, RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. **Toxicology**. 1995; 99:55-65.

Webb, RC; Bohr, DF. Potassium relation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. **Blood Vessels**. 1979; 16: 71-79.

Webb, RC; Winqvist, RJ; Victory, W; Vander, AJ. In vivo and in vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. **American Journal Physiology**. 1981; 241: H211-H216.

Weiler, E; Khalil-Manesh, F; Gonick, H. Effects of lead and natriurético hormone on kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase: Possible relevance to hypertension. **Environmental Health Perspectives**. 1988; 78:113-115.

Westenfelder, CGJ; Averalo, RL; Baranowski, NA; Kurtzman, NA; Katz, AI. Relationship between mineralocorticoids and renal Na-K-ATPase: Sodium reabsorption. **American Journal of Physiology**. 1981; 233: F593-F599.

World Health Organization (WHO), IPCS. Environmental health criteria 85: lead-environmental aspects. Geneva, 1989. 106 p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment Program, the International Labour Organization, and the World Health Organization.

World Health Organization (WHO). Environmental health criteria 165: inorganic lead. Ed: IPCS (International Program on Chemical Safety). Geneva: WHO, 1995.

Xie, Y; Chiba, M; Shinohara, A; Watanabe, H & Inaba, Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Industrial Health*. 1998; 36: 234-239.

Yan, C; Huang, A; Wu, Z; Kaminski, PM; Wolin, SM; Hintze, HT; Kaley, G; Sun, D. Increased superoxide leads to decreased flow-induced dilation in resistance arteries of Mn-SOD-deficient mice. ***American Journal of Physiology***. 2005; 288: H225-H2331.

Yanagisawa, M; Kurihara, S; Kimura, S; Tomobe, Y; Kobayashi, M; Mitsui, Y; Yazaki, Y; Goto, K; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. ***Nature***. 1988; 322: 411-415.

Yoshihiro, T; Kathy, K; Griendling. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanism. ***Hypertension***. 2003; 42: 1075-1081.

Zhang X; Patel A; Horibe H; Wu Z; Barzi F; Rodgers A; MacMahon S; Woodward M. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. ***International Journal of Epidemiology***. 2003; 32: 563-572.

Zimmerman, JB; Robertson, D; Jackson, EK. Angiotensin II noradrenergic interactions in renovascular hypertensive dogs. **Journal Clinical Investigation**. 1987; 80 (2): 43-45.

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](#)