
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

Exposição perinatal ao chumbo e desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação: efeitos cardiovasculares em ratos recém-desmamados

Nathália Pereira de Souza

Orientadora: Dra. Sandra Cordellini

Monografia realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

Exposição perinatal ao chumbo e desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação: efeitos cardiovasculares em ratos recém-desmamados

Nathália Pereira de Souza

Orientadora: Dra. Sandra Cordellini

Monografia realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Bociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Souza, Nathália Pereira.

Exposição perinatal ao chumbo e desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação : efeitos cardiovasculares em ratos recém-desmamados / Nathália Pereira de Souza. - Botucatu, 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sandra Cordellini

Capes: 20303025

1. Desnutrição fetal. 2. Chumbo. 3. Sistema cardiovascular – Efeito fisiológico.

Palavras-chave: Desnutrição *in utero*; Exposição perinatal ao chumbo; Ratos recém-desmamados; Reatividade vascular.

Dedicatória

*“Se um dia, já homem realizado,
sentires que a terra cede a teus pés,
que tuas obras se desmoronam,
que não há ninguém à tua volta
para te estender a mão,
esquece a maturidade,
passa pela mocidade,
volta à tua infância
e balbucia entre lágrimas e esperanças
as últimas palavras que te restarão na alma:
minha Mãe;
meu Pai”*

(Rui Barbosa)

*Aos meus pais, Magda e Joel e à minha
irmã Andréia, pelo esforço e compreensão
dispensados à minha formação.
E a todos que
de alguma forma, contribuíram para
que eu chegasse até aqui.*

Agradecimentos

À Deus, pela realização deste trabalho.

Aos meus pais, que investiram nesse sonho e possibilitaram sua realização.

À minha orientadora Dr^a Sandra Cordellini, o meu mais sincero agradecimento por ter cuidadosamente me seguido, passo a passo, no processo de elaboração da investigação científica e pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao Dr. Alaor Aparecido Almeida, pelos auxílios prestados durante a execução do projeto.

Às amigadas que fiz no laboratório: Rafaela, Priscila e Thiago, pelo conhecimento compartilhado, além das conversas e risadas.

Ao Departamento de Farmacologia e ao Instituto de Biociência da UNESP-Botucatu pela oportunidade concedida para a execução do presente trabalho.

Ao Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX-IB-UNESP-Botucatu, onde foram realizadas as dosagens de Pb.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia: Cristina, Janete, Paulo e Luís pela atenção e auxílio dispensados a mim.

Às amizades que fiz dentro da faculdade e que levarei pelo resto da vida. Em especial às amigas Nathália Laszkiewicz, Roberta Andreassa, Mariana Fernandes e Grazielle Manin, que foram como irmãs e fizeram meus dias mais felizes.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Proc. 10/09865-6)

Sumário

Introdução	1
Objetivos	6
Material e Métodos	8
1. Animais	9
2. Acasalamento	9
3. Regime de Exposição	10
4. Restrição Alimentar – Desnutrição <i>in útero</i>	10
5. Procedimentos Pós-Natal e Peso Corpóreo e dos Órgãos	11
6. Protocolos Experimentais	11
6.1. Análise quantitativa de chumbo	11
6.2. Reatividade Vascular	12
6.2.1. Curvas concentração-efeito ao cálcio	13
6.2.2. Curvas concentração-efeito a noradrenalina	13
7. Análise Estatística	14
8. Drogas e Soluções	14
Resultados	15
Discussão	24
Conclusões	30
Referências Bibliográficas	32
Resumo	39
Abstract	42

Introdução

Alguns metais como o zinco, ferro e magnésio, em pequenas doses, são essenciais para a vida, enquanto outros, como o chumbo (Pb), mercúrio, cádmio e arsênio não tem utilidade biológica. Entretanto, a utilização destes metais pelo homem é potencialmente perigosa à saúde dos organismos vivos.

O chumbo adquire maior importância a cada ano como risco industrial e ambiental. A exposição ocupacional é a principal fonte de contaminação e está relacionada às indústrias: extrativa, petrolífera, de baterias, de tintas e corantes, de cerâmicas, cabos, tubulações e munições (Cordeiro 1996; Poręba, 2011;).

A ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, USA) e a ABHO (Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais, Brasil) recomendam o valor de referência de normalidade até 40 µg/dl e o valor de exposição ocupacional até 60 µg/dl (Índice Biológico de Exposição) de Pb no sangue total. Mulheres em idade fértil, cujo Pb no sangue exceda 10 µg/dl, estão em risco de gerar uma criança com taxa de Pb no sangue acima de 10 µg/dl que é guia estabelecido pelo Centro de Controle de Doenças (CDC-USA). Se a taxa de Pb permanecer elevada, ela pode afetar o desenvolvimento do feto (Cordeiro 1996).

Alguns dados epidemiológicos são compatíveis com a idéia de que a exposição ao Pb desempenha importante papel no desenvolvimento da hipertensão arterial em indivíduos expostos (Glenn et al., 2003; Vaziri, 2008; Stojek and Skoczyńska, 2003), bem como na população em geral (Bost et al., 1999; Vaziri, 2008). Isto leva à preocupação sobre o impacto do aumento da carga corpórea de Pb sobre a pressão arterial e doenças cardiovasculares (Alissa and Ferns, 2011; Vassallo et.al., 2011).

Em ratos adultos, a hipertensão arterial induzida pela exposição ao Pb durante a vida pós-natal é caracterizada por um aumento na reatividade vascular às catecolaminas (Skoczynska et al., 1986), um aumento no nível plasmático de noradrenalina (NA) bem como uma diminuição de beta-adrenoceptores (Tsao et al., 2000), e uma redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina e nitroprussiato (Marques et al., 2001). Contrariamente, Purdy et al. (1997) não observaram qualquer alteração de reatividade da

aorta a vasoconstritores (NA e fenilefrina) ou vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) associada à hipertensão arterial induzida pelo Pb em ratos. A maioria dos estudos foca no conceito de que este metal tóxico interage com: 1) processos regulatórios que envolvem íons cálcio, GMP cíclico como segundo mensageiro, e proteína quinase C (Khalil-Manesh et al., 1993; Watts et al, 1995; Courtois et. al, 2003; Vaziri, 2008), 2) sistemas renina-angiotensina-aldosterona, calicreína-cininas e outros autacóides (por exemplo: endotelina), 3) sistemas de transdução (por exemplo: óxido nítrico - NO) (Khalil-Manesh et al., 1993; Vaziri, 2008), 4) proliferação de células endoteliais e de músculo liso (Fujiwara et al., 1995; Kaji et al., 1995), e 5) estresse oxidativo (Flora et al., 2008).

Alterações da função da célula endotelial estão envolvidas em uma variedade de estádios hipertensivos, um fenômeno que provavelmente não está relacionado à diminuição da produção e/ou liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio, mas à liberação simultânea de fatores de contração derivados do endotélio, por exemplo, produtos da via da ciclooxygenase (Cordellini, 1999; Cordellini e Vassilieff, 1988; Grizzo e Cordellini, 2008). Na célula normal a produção relativa dos metabólitos da via ciclooxygenase favorece substâncias vasodilatadoras, entretanto esta relação pode diferir em processos fisiopatológicos, como por exemplo, estádios hipertensivos (Cordellini et al., 1990) e exposição ao Pb (Grizzo e Cordellini, 2008).

Uma importante consideração é o fato de que várias doenças desenvolvidas durante a idade adulta são provavelmente determinadas durante os primeiros estágios da vida, sob o efeito da exposição ou dieta preferencial da mãe durante a gravidez. Neste contexto, embora haja inúmeros estudos sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e outras induzidas pela exposição ao Pb nas fases pré-natal e/ou de amamentação (Lasley and Lane, 1988; Mello CF et.al., 1998; Rodrigues et al., 1996; Widzowski et al., 1994; Dearth et al., 2002), a literatura ainda é falha sobre as alterações cardiovasculares nestas condições.

Deve-se considerar ainda que muitos contaminantes ambientais, em concentrações não nocivas, podem determinar processos fisiopatológicos quando da presença simultânea de fatores diversos, como por exemplo: estressores físicos ou químicos, condições fisiopatológicas (desnutrição, estresse psicológico, obesidade) e condição sócio-cultural.

Nos países em desenvolvimento, a desnutrição materna representa importante problema de saúde pública. Esta condição pode afetar diversas funções fisiológicas no recém-nascido (Barker et al., 1993). Ainda, foram identificadas correlações entre a restrição de crescimento fetal em humanos e a susceptibilidade para doenças crônicas, como doenças coronarianas, acidente vascular cerebral e hipertensão, na idade adulta (Hoy et al., 1999). Tais distúrbios derivam da adaptação fetal *in útero* à restrição materna que altera permanentemente as características de crescimento, e metabolismo e fisiologia pós-natal (Barker et al., 1993).

As doenças vasculares ligadas à desnutrição intra-uterina estão relacionadas à disfunção endotelial, com prejuízo das respostas vasculares dependentes do endotélio (Franco et al., 2002; 2003). Neste contexto, a perda da função moduladora do endotélio pode ser um fator crítico e inicial no desenvolvimento de processos fisiopatológicos, como a hipertensão arterial associada à desnutrição materna (Nakazono et al., 1991; Franco et al., 2003; Franco et al., 2007).

A desnutrição, pode alterar o funcionamento da barreira placentária, e consequentemente modificar a farmacocinética de distribuição do Pb, influenciando diretamente na toxicidade deste para o feto. Ainda, uma quantidade significativa da mão de obra exposta ocupacionalmente ao Pb é de mulheres e, destas, uma proporção significativa é de gestantes desnutridas em risco associado de exposição (CDC, 2007). Assim, co-ocorrência de sobrecarga de Pb e desnutrição durante o desenvolvimento fetal aumenta a possibilidade de interações entre os fatores de risco e, embora haja alguns relatos sobre alterações cardiovascular em condições de desnutrição intra-uterina (Franco et al., 2002) e de exposição perinatal ao Pb (Grizzo and Cordellini 2008), isoladamente, torna-se imprescindível o conhecimento da adaptação circulatória nestas condições em associação.

O presente estudo pretende contribuir para a avaliação do impacto da exposição perinatal ao Pb sobre a saúde de indivíduos provenientes de mães desnutridas ou não, auxiliando os gestores em saúde pública na tomada de decisões para o estabelecimento e normatização de índices biológicos de exposição e limites de exposição em gestantes, especialmente aquelas desnutridas.

Objetivos

1 Objetivo geral

Examinar a hipótese de que a desnutrição materna e a exposição perinatal ao Pb, os quais co-ocorrem como fator de risco cardiovascular na vida pós-natal, poderiam interagir de modo que os efeitos dos fatores individuais sobre a modulação de ambos tono vascular e pressão arterial pudessem diferir quando na presença do outro.

2 Objetivos específicos

Investigar as alterações de pressão arterial e de reatividade à noradrenalina e ao cálcio da aorta torácica, com e sem endotélio, isolada de ratos machos recém-desmamados submetidos à desnutrição intra-uterina e expostos perinatalmente ao Pb, isoladamente ou em associação e seus respectivos controles. Serão ainda avaliados o peso da ninhada, a evolução do peso corporal de mães e filhotes, a distância anogenital dos filhotes ao nascimento, número e gênero de filhotes por ninhada, bem como o peso da aorta, rins, fígado, ventrículo esquerdo e a concentração plasmática de Pb em ratos recém-desmamados.

Material e Métodos

1 Animais

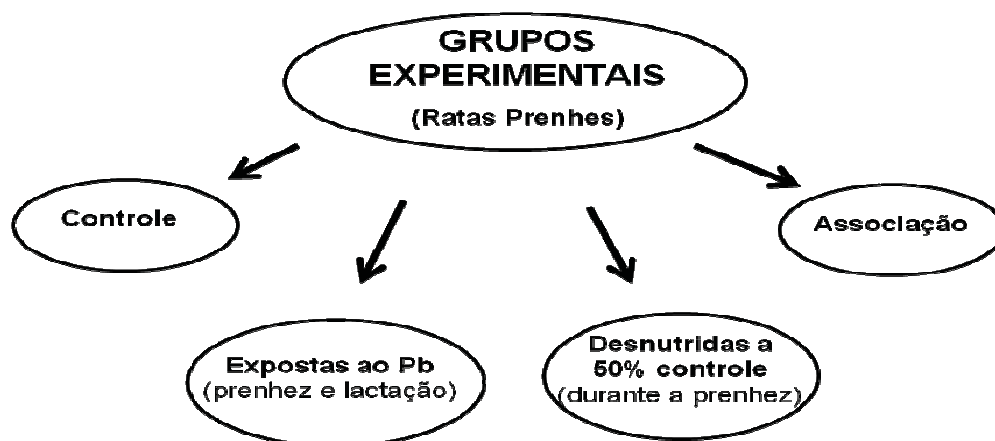
Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos do Biotério Central Campus de Botucatu - UNESP e usados para o acasalamento. Somente filhotes machos com 23 – 25 dias (recém-desmamados) de idade foram utilizados. Como a ninhada é considerada a unidade experimental, irmãos não foram usados dentro de um mesmo grupo.

Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, com ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Os animais tiveram livre acesso à ração e também à água filtrada, com exceção das fêmeas em exposição.

Os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu e aprovados (protocolo nº 234-CEEA).

2 Acasalamento

Para o acasalamento, foi colocado um macho dentro de cada gaiola contendo duas fêmeas, no final da tarde. As ratas foram diariamente observadas e o dia em que se detectou a presença de espermatozóides e a fase estro do ciclo estral no esfregaço vaginal foi nomeado dia zero de prenhez. Neste dia, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e separadas em quatro grupos: controle (CTRL), exposto ao acetato de Pb (Pb), exposto à desnutrição *in utero* (RA) e exposto à associação dos dois últimos procedimentos (AS).



De modo a prevenir qualquer variação no crescimento dos neonatos devida à disponibilidade de leite durante a amamentação, o tamanho da ninhada ao nascimento foi padronizado em 8 filhotes, mantendo-se o maior número possível de filhotes machos. Filhotes fêmeas foram mantidas somente para se completar a ninhada. Ninhadas com número de filhotes inferior a oito foram descartadas.

3 Regime de Exposição

Após confirmação da prenhez, ratas dos grupos Pb e AS começaram a receber na água de beber, 500 ppm de Pb na forma de acetato de Pb. A exposição foi realizada durante toda a prenhez e a amamentação.

Dados anteriores do laboratório, usando concentração de acetato de sódio calculada de modo a fornecer para as ratas controles o mesmo número de moléculas de acetato, não determinaram qualquer alteração de pressão arterial ou de reatividade vascular na descendência. Assim, no presente estudo ratas controles receberam água filtrada pelo mesmo período de exposição.

4 Restrição Alimentar – Desnutrição *in utero*

Com o objetivo de estabelecer o protocolo de desnutrição, avaliou-se o consumo diário de ração em ratas durante todo o período de prenhez, estabelecendo-se assim a quantidade de ração a qual mães desnutridas seriam submetidas a cada dia. Este protocolo é conhecido como *pair feeding* que considera o fornecimento ao animal desnutrido de uma porcentagem da ração diária ingerida pelo animal controle com livre acesso à ração (Russell et al., 2008).

Assim, após a confirmação da prenhez, as ratas fêmeas dos grupos RA e AS passaram a receber a mesma dieta a 50% do consumo do grupo CRTL, estabelecido no regime de *pair feeding* do 1º dia de prenhez até o parto, segundo protocolo de Franco et al. (2002). Após o nascimento, os filhotes de ambos os grupos receberam ração e água *ad libitum*.

5 Procedimentos Pós-Natal e Evolução do Peso Corpóreo e Peso dos Órgãos

O peso materno foi avaliado semanalmente. Procedeu-se à identificação de filhotes machos e fêmeas. Verificou-se, assim, o número total de filhotes, machos e fêmeas, por ninhada, bem como a distância anogenital dos filhotes.

Cada ninhada foi pesada ao nascimento e cada filhote macho foi pesado no 23º dia de vida pós-natal.

Foram também avaliados o peso de anéis de aorta e os pesos relativos do fígado e rins e o grau de hipertrofia ventricular avaliado através da seguinte variável: VE/PCF = relação entre o peso do ventrículo esquerdo (VE) e o peso corporal final (PCF).

6 Protocolos experimentais

Filhotes com 23-25 dias de idade foram anestesiados com uretano (1,25 g/kg, i.p.), e após toracotomia, amostras de sangue foram recolhidas do ventrículo esquerdo para posterior dosagem de Pb. Posteriormente, os animais seguiram para os protocolos experimentais:

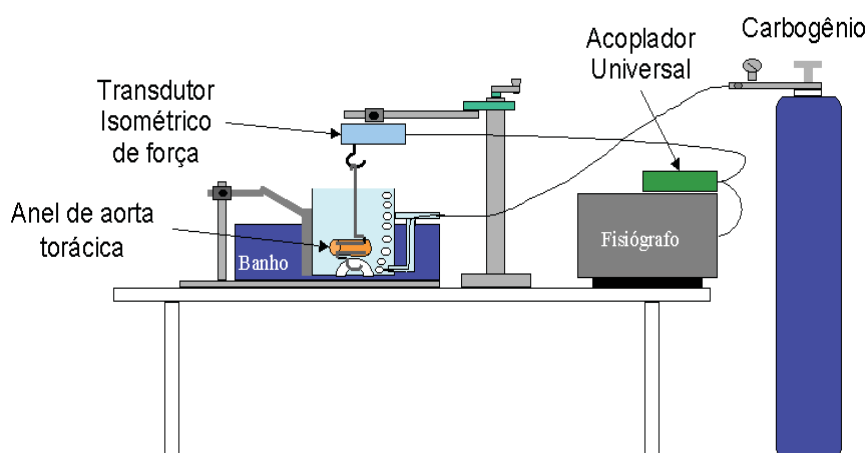
6.1 Análise Quantitativa de Pb

Os níveis de Pb no sangue foram quantificados em mães e seus filhotes machos com 23 - 25 dias de idade. Para a quali-quantificação do Pb, as amostras de sangue foram mineralizadas em forno de microondas (DGT-100 Plus, Provecto, Brasil) seguindo o seguinte protocolo: 1,0 - 2,0 g de sangue + 3 ml de ácido nítrico 65%. As amostras foram levadas ao microondas a 400 W por 5 min, a 790 W por 5 min, a 790 W por 2 min e 0 W por mais 5 min para resfriar a amostra. O material mineralizado foi diluído com água ultrapura (Mili Q) para um volume final de 10 ml.

A concentração de Pb foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica GBC AA 932 (EEA-Chama) nos laboratórios do Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX-IB-UNESP-Botucatu. A calibração foi averiguada empregando-se uma solução do padrão cobre na concentração de 5 µg/mL, conforme recomendação do fabricante. Para a determinação foi usada a metodologia de adição de padrão para a construção da curva de calibração, a fim de se minimizar o efeito-matriz. O limite de detecção foi 5,0 µg/dl. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

6.2. Reatividade Vascular

Após a coleta de sangue, procedeu-se, então, o isolamento da aorta torácica que, livre de tecido conectivo, gordura e sangue, foi dividida em dois anéis de aproximadamente 4 mm. Indistintamente, um dos anéis teve o seu endotélio removido mecanicamente. Os anéis foram suspensos, em cubas para órgão isolado, contendo solução de Krebs-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0 e ácido ascórbico 0,1). A solução nutriente foi mantida a 37,0 ± 0,5°C e saturada com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométrica (F-60 Narco Bio-Systems), acoplados a um fisiógrafo (Narco Bio-Systems) e uma tensão inicial de 1,0 g foi aplicada aos anéis de aorta e mantida ao longo de todo o experimento. Para estudar o papel do endotélio, as respostas aos agentes vasoconstritores foram obtidas em anéis de aorta com (+E) e sem (-E) endotélio, estudados em paralelo.



6.2.1. Curvas concentração-efeito ao cálcio

Após um período de estabilização de 30 minutos, anéis de aortas isoladas de ratos dos diferentes grupos experimentais foram pré-contraídos com noradrenalina (3×10^{-7} M) e em seguida concentração única de acetilcolina (10^{-6} M) foi usada para testar a integridade da célula endotelial. Ao se completar o período de estabilização de 60 minutos, a solução nutriente foi substituída por solução de Krebs-Henseleit sem cálcio contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 0,026 mM, um agente quelante de cálcio). Ao se completarem 20 minutos nesta condição, a solução foi substituída por solução de Krebs-Henseleit sem cálcio e sem EDTA. Após 15 minutos nesta condição, as preparações foram desafiadas com KCL (60 mM) por 5 minutos e em seguida curvas concentração-efeito (CCEs) cumulativas ao CaCl_2 foram obtidas. Ao final das CCEs ao CaCl_2 , concentração única de nitroprussiato de sódio (10^{-4} M) foi adicionada para testar a integridade do músculo liso vascular.

6.2.2. Curvas concentração-efeito à noradrenalina

Após um período de estabilização de 30 minutos, anéis de aortas dos diferentes grupos experimentais foram desafiadas com KCl (60 mM) por 5 min após o que foram lavadas com solução de Krebs-Henseleit. Decoridos 25 min, CCEs cumulativas à noradrenalina foram obtidas. Ao final das CCEs, concentrações únicas de acetilcolina (10^{-6} M) e nitroprussiato de sódio (10^{-4} M) foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e do músculo liso vascular, respectivamente.

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações de reatividade vascular, a saber, resposta máxima (g de tensão/100mg de tecido) e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido ao agente vasoativo, em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50s foram obtidas por análise de regressão não linear no GraphPad Prism 5.

7 Análise Estatística

A análise estatística utilizada foi a seguinte:

- Análise de variância multifatorial, com teste *a posteriori* de Tukey. Os fatores considerados foram: desnutrição *in utero* e exposição ao Pb.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou intervalo de confiança de 95%. Em todos os experimentos, $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

8 Drogas e Soluções

As seguintes drogas foram utilizadas: acetato de chumbo (Vetec Química Fina Ltda.); cloridrato de acetilcolina (Sigma Chemical Co.); nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Co.); bitartarato de noradrenalina (Sigma Chemical Co.); uretano (Sigma Chemical Co.)

O acetato de Pb foi diluído em água filtrada. Para prevenir a precipitação do Pb foi adicionado 0,5 ml de ácido acético em cada litro de solução de acetato de Pb. As demais soluções foram preparadas utilizando-se solução Krebs-Henseleit e as concentrações foram expressas em mM.

Resultados

1 Características gerais dos animais

A evolução do peso materno está apresentada na Tabela 1. O peso corpóreo materno aumentou em função da idade. A exposição ao Pb durante a prenhez não determinou qualquer alteração do peso corpóreo materno. Entretanto a restrição alimentar isoladamente e em associação à exposição ao Pb durante a prenhez induziu perda do peso corpóreo que mostrou significância apenas no 20º dia de prenhez.

Tabela 1. Valores médios do peso corpóreo materno durante a prenhez.

Prenhez	Controle	RA	Pb	Associação	Nível de significância
Dia 0	242,4 ± 9,8	283,2 ± 19,6	271,8 ± 4,7	270,9 ± 5,7	P > 0,5
Dia 6	257,8 ± 9,3	258,5 ± 14,6	280,1 ± 4,7	252,7 ± 3,6	P > 0,05
Dia 11	273,9 ± 11,7	261,4 ± 16,1	298,4 ± 14,3	248,1 ± 6,2	P > 0,05
Dia 20	337,7 ± 16,4	279,0 ± 12,7*	341,3 ± 21,9	266,8 ± 5,7*	*P < 0,05

Pb = ratas que receberam 500 ppm de Pb na água de beber, na forma de acetato a partir da confirmação de prenhez. RA = ratas que receberam 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle. Dados expressos como média ± EPM. *P < 0,05 em relação aos grupos controle. Número de animais = 4-9.

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração no número de filhotes por ninhada e na distância anogenital de machos ou fêmeas (Tabela 2). Da mesma maneira, a exposição ao Pb *in utero* não determinou qualquer alteração no peso dos filhotes machos e fêmeas ao nascimento e de machos no 23º dia de vida pós-natal, bem como no peso da ninhada/número de filhotes (Tabela 2). Entretanto a restrição alimentar *in utero* isoladamente e em associação à exposição perinatal ao Pb induziu perda do peso corpóreo dos filhotes machos e fêmeas ao nascimento e de machos no 23º dia de vida pós-natal, bem como no peso da ninhada/número de filhotes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do número de filhotes por ninhada, da distância anogenital e do peso ao nascimento de filhotes de mães expostas perinatalmente ao Pb e à restrição alimentar durante a prenhez, isoladamente ou em associação.

Parâmetros		Controle	Pb	RA	As	Nível de significância
Número de Filhotes por Ninhada (n= 7-10)	Total	9,3 ± 1,0	9,5 ± 1,6	12,3 ± 1,1	12,0 ± 1,2	P > 0,05
	Machos	4,3 ± 0,9	4,3 ± 0,9	3,8 ± 0,1	4,7 ± 0,3	P > 0,05
	Fêmeas	5,0 ± 0,7	5,3 ± 1,0	7,5 ± 1,8	7,0 ± 1,0	P > 0,05
Distância anogenital (n= 14-44)	Machos	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	P > 0,05
	Fêmeas	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	P > 0,05
Peso filhotes nascimento (n= 14-44)	Machos	7,4 ± 0,2	7,1 ± 0,2	5,9 ± 0,5*	5,8 ± 0,2*	P < 0,05
	Fêmeas	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,3	4,8 ± 0,2*	5,5 ± 0,2*	P < 0,05
Peso da ninhada/ nº de filhotes (n= 7-10)		6,9 ± 0,4	7,2 ± 0,7	5,5 ± 0,8*	5,4 ± 0,5*	P < 0,05
Peso filhotes ao 23º dia de vida pós natal (n= 9-20)	Machos	68,1 ± 2,6	65,9 ± 2,0	55,0 ± 2,8*	52,7 ± 4,6*	P < 0,05

Pb: ratas que receberam 500ppm de Pb na água de beber, na forma de acetato de Pb, a partir da confirmação de prenhez. RA: ratas que receberam 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle. Dados expressos como média ± EPM. *P < 0,05 em relação ao grupo controle. N = Número de animais. Distância anogenital = distância anogenital/3√peso corpóreo (mm)

2 Avaliação dos rins, fígado e hipertrofia cardíaca

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na pressão arterial sistólica caudal. Semelhantemente, nenhuma alteração no peso relativo do fígado e ventrículo esquerdo e dos rins no protocolo de restrição alimentar foi observada após os diferentes protocolos. Entretanto, a exposição ao Pb isoladamente e em associação à restrição alimentar induziu aumento significativo do peso relativo dos rins (Tabela 3).

3 Pressão arterial

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na pressão arterial sistólica caudal de filhotes ao 22º dia de vida pós-natal (Tabela 3).

4 Dosagem de chumbo

A exposição perinatal ao Pb, isoladamente ou em associação à desnutrição durante a prenhez determinou aumento significativo deste metal no sangue de filhotes com 23-25 dias de idade. Ainda, os valores aumentados mostraram-se equivalentes, independentemente do protocolo experimental [nível de Pb no sangue ($\mu\text{g/dl}$): controle < 5,00 ; RA < 5,00; Pb $46,35 \pm 5,53$ e As $71,70 \pm 13,36$, n = 9-11].

Tabela 3. Valores médios da relação peso do ventrículo esquerdo/peso corpóreo, relação do peso dos rins esquerdos/peso corpóreo e peso dos rins direitos/peso corpóreo, relação do peso do fígado/peso corpóreo e da pressão arterial sistólica caudal de filhotes com 23 - 25 dias de idade, provenientes de mães controles, expostas ao chumbo durante a prenhez e a lactação e submetidas ou não à restrição alimentar durante a prenhez.

Parâmetros	Controle	RA	Pb	Associação	Nível de significância
Ventrículo Esquerdo/ Peso corpóreo (x10 ⁻³)	3,11 ± 0,15	3,45 ± 0,084	3,06 ± 0,47	3,50 ± 0,11	P > 0,05
Rim direito/ Peso corpóreo (x10 ⁻³)	5,59 ± 0,068	5,11 ± 0,2	6,13 ± 0,12*	5,96 ± 0,12*	P < 0,05
Rim esquerdo/ Peso corpóreo (x10 ⁻³)	5,82 ± 0,12	5,13 ± 0,14	6,95 ± 0,43*	6,62 ± 0,26 *	P < 0,05
Fígado/ Peso corpóreo (x10 ⁻³)	43,51 ± 0,61	41,85 ± 1,13	45,7 ± 1,14	44,07 ± 1,10	P > 0,05
Anéis de aorta +E (mg)	3,28 ± 0,12	3,21 ± 0,25	2,88 ± 0,17	2,98 ± 0,12	P > 0,05
Anéis de aorta -E (mg)	2,94 ± 0,22	3,18 ± 0,34	2,67 ± 0,24	2,8 ± 0,25	P > 0,05
Pressão arterial (mmHg)	89,41 ± 2,25	97,14 ± 2,22	88,80 ± 3,35	84,56 ± 2,75	P > 0,05

Pb: ratas que receberam 500 ppm de Pb na água de beber, na forma de acetato a partir da confirmação de prenhez. RA: ratas que receberam 50% da quantidade de ração ingerida pelo grupo controle. Dados expressos como média ± EPM. *P < 0,05 em relação aos grupos controle. Número de animais = 7-10.

5 Reatividade Vascular

5.1 Curvas concentração-efeito ao CaCl_2

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração de resposta máxima ao CaCl_2 em aortas sem endotélio, a qual mostrou valor semelhante àquele obtido em aorta com endotélio do grupo controle. Entretanto, um decréscimo significativo na reatividade ao CaCl_2 foi observado em aortas com endotélio de ratos machos expostos perinatalmente ao chumbo e à restrição alimentar, isoladamente ou em associação (Figura 1, Tabela 4). Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração nos valores de CE50 ao CaCl_2 em aorta com e sem endotélio de ratos recém-desmamados (Figura 1, Tabela 4).

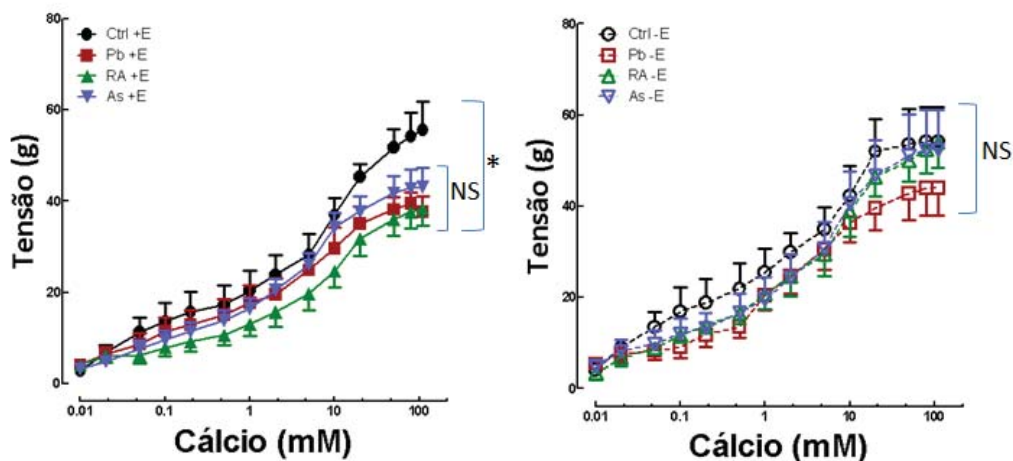


Figura 1. Curvas concentração-efeito cumulativas ao cloreto de cálcio obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles, expostos ao chumbo (Pb 500 ppm) durante a gestação e lactação e submetidos à desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação. Dados expressos como média \pm EPM. Número de animais 7-10. * $P < 0,05$.

Tabela 4. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% ao cálcio em curvas concentração-efeito consecutivas, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos de 23 - 25 dias de idade, provenientes de mães controles, expostas ao chumbo durante a prenhez e a lactação e submetidas ou não à restrição alimentar durante a prenhez.

Ratos recém-desmamados	¹ Resposta máxima tensão (g/100mg tecido)		² CE50 (mM)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
23 - 25 dias de idade				
Controle	56.08 ± 14.74 ^c	54.21±16.67 ^a	4.03 (2.25-7.23)	1.93 (0.76-4.94)
Pb	39.87 ± 7.00 ^b	43.04 ± 17.63	1.40 (0.30-6.47)	1.44 (0.75-2.77)
RA	38.30 ± 11.29 ^b	53.95 ± 13.30	3.61 (1.27-10.28)	2.00 (0.41-9.69)
Associação	43.10 ± 12.72 ^b	52.38 ± 19.47	2.20 (1.10-4.37)	2.22 (0.79-6.25)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os valores representam a média, entre parênteses estão os intervalos de confiança 95%. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 50% do controle de ração por dia durante a prenhez. Pb: ratas que receberam 500 ppm de acetato de chumbo na água de beber durante prenhez e lactação. Associação dos protocolos anteriormente descritos. Letras iguais não são estatisticamente significantes (P > 0,05). Número de animais = 8-10

5.2 Curvas concentração-efeito a Noradrenalina

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração de reatividade (resposta máxima e CE50) à noradrenalina em aortas com e sem endotélio de ratos recém-desmamados (Figura 2, Tabela 5). Independentemente do protocolo experimental, a remoção do endotélio determinou desvio à esquerda das CCEs à noradrenalina (Figura 2, Tabela 5).

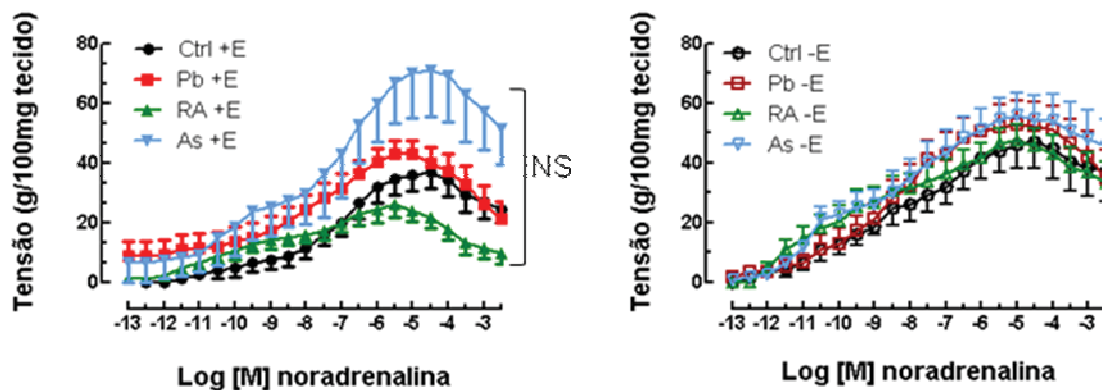


Figura 2. Curvas concentração-efeito cumulativas à noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos recém-desmamados (23-25 dias de idade) submetidos à exposição ao chumbo (Pb, 500 ppm na água de beber) durante a gestação e a lactação e à desnutrição *in utero* (RA=50% do consumo do controle) isoladamente ou em associação (As). Valores expressos como média \pm EPM. Número de animais 7-10. NS=não significante. *P<0,05.

Tabela 5. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% a noradrenalina em curvas concentração-efeito consecutivas, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos de 23 - 25 dias de idade, provenientes de mães controles, expostas ao chumbo durante a prenhez e a lactação e submetidas ou não à restrição alimentar durante a prenhez

Ratos recém-desmamados	¹ Resposta máxima tensão (g/100mg tecido)		² CE50	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio (x10 ⁻⁷ M)	Sem endotélio (x10 ⁻⁷ M)
23 - 25 dias de idade				
Controle	44,47 ± 4,13	48,96 ± 9,23	0,17 (0,01 – 3,51)	1,76* (0,05 – 5,58)
Pb	46,21 ± 5,44	54,78 ± 7,23	0,08 (0,01 – 1,32)	0,37* (0,06 – 2,29)
RA	30,27 ± 5,08	48,03 ± 5,44	0,02 (0,001 – 0,44)	0,13* (0,01 – 1,57)
Associação	60,30 ± 14,49	57,08 ± 7,73	0,18 (0,001 – 7,95)	0,13* (0,01 – 1,57)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 50% do controle de ração por dia durante a prenhez Pb: ratas que receberam 500 ppm de acetato de chumbo na água de beber durante prenhez e lactação. Associação dos protocolos anteriormente descritos. *P < 0,05 em relação à respectiva preparação com endotélio. Número de animais = 7-10.

Em muitos países, as autoridades públicas usam níveis elevados para definir o valor de referência de normalidade, a saber, 40 µg/dl para adultos, incluindo mulheres não grávidas, e de aproximadamente 10 µg/dl para mulheres grávidas (ABHO 2010). Entretanto, deve-se ter em consideração que uma proporção significativa de mulheres em idade fértil com níveis de Pb no sangue ≥ 40 µg/dl irão engravidar e expor seus descendentes aos riscos adversos à saúde impostos por este metal, antes que sintomas de toxicidade as afastem da fonte de exposição. No presente estudo, investigaram-se as alterações das condições gerais, da pressão arterial e da resposta vascular de ratos recém-desmamados expostos perinatalmente a 500 ppm de Pb, cujo nível do metal no sangue das mães alcança valores maiores 50 µg/d e de filhotes entre 30 e 40 µg/d, como demonstrado em estudos anteriores em nosso laboratório (Fresneda and Cordellini, 2005). Curiosamente, a associação mostrou uma tendência, embora não significativa, de aumento nos níveis de Pb no sangue. Isto poderia ser uma consequência de possíveis alterações na farmacocinética de absorção do Pb frente à desnutrição materna. Ainda, os resultados do presente estudo indicam que a exposição ao Pb não induziu toxicidade materna e dos filhotes. De fato, o peso corpóreo materno durante a prenhez e o peso dos filhotes ao nascimento e desmame, bem como, o número de filhotes machos e fêmeas por ninhada foram semelhantes em ambos os grupos controles e expostos ao Pb. Embora nenhuma alteração no peso relativo dos órgãos como o fígado, a aorta e o ventrículo tenha sido observada em ratos expostos perinatalmente ao Pb, este procedimento determinou, à semelhança do relatado na literatura (Sivaprasad et al., 2004), um aumento significativo do peso relativo dos rins, fato que pode ser justificado uma vez que este órgão constitui-se em alvo para metais tóxicos como o Pb, o que leva à nefrotoxicidade associada ao plumbismo. Os dados sugerem que a par dos órgãos alvos diretos para o Pb, os demais órgãos parecem mais resistentes e/ou mais protegidos dos efeitos deletérios deste metal em exposição perinatal.

À semelhança do observado na literatura, a restrição alimentar 50% determinou redução do peso materno no 20º dia de prenhez, do peso da ninhada, do peso dos filhotes ao nascimento e do peso dos filhotes ao 23º dia de vida pós-natal sem, contudo,

comprometer o número de filhotes (Carney et al., 2004). Ainda, a desnutrição *in utero* não afetou de modo significativo o peso relativo do fígado, rins, ventrículo esquerdo e aorta torácica sugerindo que estes órgãos estão relativamente protegidos da restrição de nutrientes durante o desenvolvimento fetal.

Atualmente os órgãos públicos e o meio científico reconhecem o importante papel dos metais tóxicos e outros compostos químicos como desreguladores endócrinos (Guimarães 2005). De fato, o Pb apresenta potencial tóxico sobre o sistema reprodutor, p.ex. redução da testosterona sérica e concentração de espermatozoides, entre outros (Iavicoli et al., 2009). No que diz respeito à desnutrição materna, esta determina graves consequências no desenvolvimento das gônadas e alterações sexuais, em longo prazo, podem também ser esperadas (Léonhardt et al., 2003; Teixeira et al., 2007). Dessa maneira, a distância anogenital, um marcador da diferenciação sexual, foi investigada em filhotes machos e fêmeas dos diferentes grupos experimentais ao nascimento. Diferentemente do observado na literatura, no presente estudo ambas as exposições perinatais ao chumbo e desnutrição *in utero*, não comprometeram de modo significativo o desenvolvimento sexual de filhotes machos e fêmeas, o que pode ser observado pela não alteração da distância anogenital. Diferenças nos protocolos de exposição e de desnutrição poderiam justificar a contradição destes resultados.

A possibilidade de que deficiências nutricionais possam exacerbar os efeitos adversos de exposições ambientais a agentes tóxicos, como os metais tóxicos, não foi ainda suficientemente investigada.

No presente estudo, a associação entre desnutrição *in utero* e a exposição perinatal ao Pb não se constituiu em fator de risco adicional para os parâmetros: peso corpóreo de mães e filhote, número de filhotes machos e fêmeas, peso relativo dos órgãos, peso da ninhada e distância anogenital.

Sabe-se que uma quantidade significativa da mão de obra exposta ocupacionalmente ao Pb é de mulheres e, destas, uma proporção significativa de gestantes desnutridas em risco associado de exposição (CDC, 2007). A co-ocorrência de sobrecarga

de Pb e desnutrição durante o desenvolvimento fetal aumenta a possibilidade de interações entre os fatores de risco. Sendo assim, embora haja alguns relatos sobre alterações cardiovascular em condições de desnutrição intra-uterina e de exposição perinatal ao Pb, isoladamente, torna-se imprescindível o conhecimento da adaptação circulatória nestas condições em associação. Deve-se considerar ainda que várias doenças desenvolvidas durante a idade adulta são provavelmente determinadas durante os primeiros estágios da vida, sob o efeito da exposição ou dieta preferencial da mãe durante a gravidez.

Dados epidemiológicos são compatíveis com a idéia de que a exposição ao Pb desempenha papel fundamental no desenvolvimento de hipertensão arterial em indivíduos ocupacionalmente expostos a este agente (Cooper and Gaffey, 1975), bem como na população em geral (Bost et al., 1999). Nowack et al. (1993) relataram efeito bifásico do Pb na pressão arterial de ratos. Em ratos adultos, a hipertensão arterial induzida pela exposição ao Pb durante a vida pós-natal é caracterizada por um aumento na reatividade vascular às catecolaminas (Skoczynska et al., 1986), um aumento no nível plasmático de noradrenalina bem como uma diminuição de beta-adrenoceptores (Tsao et al., 2000), e uma redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina e nitroprussiato (Marques et al., 2001). Contrariamente, Purdy et al. (1997) não observaram qualquer alteração de reatividade da aorta a vasoconstritores (noradrenalina e fenilefrina) ou vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) associada à hipertensão arterial induzida pelo Pb em ratos.

Assim como a exposição ao Pb, a desnutrição representa um importante problema de saúde pública, sendo que a desnutrição materna pode afetar diversas funções fisiológicas do recém-nascido, aumentando a suscetibilidade do indivíduo a doenças na vida adulta, por exe., doença coronariana, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (Barker et al., 1993; Hoy et al., 1999).

No presente estudo, a exposição perinatal a 500 ppm de Pb e a desnutrição *in utero*, isoladamente ou em associação, não determinaram qualquer alteração de pressão arterial e reatividade vascular à noradrenalina em ratos recém-desmamados.

Ausência de alterações de reatividade à noradrenalina em aorta de ratos perinatalmente expostos ao Pb corrobora estudos anteriores em nosso laboratório utilizando o mesmo protocolo de exposição, os quais sugerem que as alterações de reatividade vascular à noradrenalina são dependentes da fase de desenvolvimento do indivíduo (Fresneda and Cordellini, 2005). De modo que, nestes estudos uma hiperreatividade à noradrenalina foi observada a partir do 52º dia de vida pós-natal (Fresneda and Cordellini, 2005; Fresneda and Cordellini, 2009).

Por sua vez, uma hiporreatividade ao cálcio, caracterizada por um decréscimo de resposta máxima dependente da integridade da célula foi observada em ratos recém-desmamados, expostos ao Pb e à desnutrição *in utero*, isoladamente ou em associação. Estes dados sugerem um comprometimento no influxo de cálcio extracelular através dos canais de cálcio voltagem-dependentes nestas condições. Pode-se ainda argumentar que a hiporreatividade ao cálcio representaria uma alteração vascular benéfica para contrabalançar o desenvolvimento de ambos, hipertensão arterial e hiperreatividade à noradrenalina, frequentemente relatados após exposição ao Pb e desnutrição *in utero*, na vida adulta (Fresneda and Cordellini, 2005; Fresneda and Cordellini, 2009; Glenn et al., 2003; Vaziri, 2008; Stojek and Skoczyńska, 2003). Muitos estudos focam no conceito de que o Pb interage e regula processos envolvendo o íon cálcio, o GMP-cíclico e a proteína quinase dependente de cálcio (Khalil-Manesh et al., 1993; Watts et al., 1995). Metais tóxicos como Pb, mercúrio e cobalto inibem a produção de óxido nítrico em macrófagos *in vitro* (Tian & Lawrence, 1995; 1996). Contrariamente, em diferentes regiões do cérebro, como córtex frontal, e vasos, como a aorta, a intoxicação pelo Pb aumenta a produção de óxido nítrico (Chen et al., 2000; Skoczynska et al., 2003; Fiorim et al., 2011). Doenças vasculares ligadas à desnutrição intra-uterina estão também relacionadas à disfunção endotelial, com prejuízo das respostas vasculares dependentes do endotélio (Franco et al., 2002; 2003). Contrariamente, Chou et al., (2010) relataram que a restrição calórica aumenta a expressão da óxido nítrico sintase endotelial. Dessa maneira, a alteração da função moduladora do endotélio pode representar um fator crítico e inicial no desenvolvimento de diferentes

processos fisiopatológicos. Sabe-se que os canais de cálcio voltagem-dependente representam a maior via de entrada de cálcio nos vasos e sua inibição por agentes que estimulam a produção de óxido nítrico e/ou GMP-cíclico intracelular contribui para a vasodilatação (Quignard et al., 1997). A abertura dos canais pode ainda ser modulada por hormônios, transmissores e segundos mensageiros. Dessa maneira, (Quignard et al. (1997) mostraram que agentes que estimulam a geração de óxido nítrico e GMP-cíclico podem diminuir o influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependente. Este efeito envolve a ativação dos canais K^+ diretamente ou por mediação através da proteína quinase dependente de GMP (Quignard et al., 1997).

Neste contexto, o aumento da função da célula endotelial observado em aorta de ratos expostos perinatalmente ao Pb e submetidos à desnutrição *in utero*, isoladamente ou em combinação, poderia envolver um aumento na produção e/ou liberação de óxido nítrico. O aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico poderia, nestas condições, exercer um efeito negativo sobre a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente resultando na hiporreatividade da aorta ao cloreto de cálcio. Entretanto, este ponto merece investigação futura.

Pelo exposto, podemos sugerir o aumento da função endotelial como adaptação benéfica para contrabalançar as conseqüências cardiovasculares deletérias da exposição perinatal ao Pb e da desnutrição *in utero*, isoladamente ou em associação, principalmente no que diz respeito à hipertensão arterial. Ainda, a ausência de efeito adverso sinérgico entre desnutrição *in utero* e exposição perinatal ao Pb em ratos recém-desmamados sobre a resposta cardiovascular sugere haver uma razoável segurança na exposição perinatal ao Pb em associação à deficiência nutricional materna como fator de risco adicional, no que diz respeito ao sistema cardiovascular e considerando-se os primeiros estádios da vida pós-natal.

Conclusões

-
- Aumento da função endotelial em ratos recém-desmamados expostos perinatal ao Pb e à desnutrição *in utero*, isoladamente ou em associação, surge como adaptação benéfica provavelmente para contrabalançar conseqüências cardiovasculares deletérias frequentemente associadas a estas condições.
 - No que diz respeito aos primeiros estádios da vida pós-natal, não se observou efeito adverso sinérgico entre desnutrição *in utero* e exposição perinatal ao Pb sobre a resposta cardiovascular.

Referências Bibliográficas

Alissa EM and Ferns GA. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. **J Toxicol.** 2011, 2011:870125.

ACGIH-American Conference of Governmental Industrial Hygienist. TLVs e BELs: Limites de Exposição para Substâncias Químicas e Agentes Físicos e Índices Biológicos de Exposição. Trad. Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Campinas: ABHO, p.87 e 94, 2002.

Barker DJP et. al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet** 1993, 391:939-941.

Bost L et. al. Blood lead and blood pressure: Evidence from the Health Survey for England. **J. Hum. Hyperten.** 1999, 13(2):123-8.

Carney EW et. al. The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats, **Toxicol Sci.** , 2004, 82(1):237-49.

CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Lead exposure among females of childbearing age – United States, 2004. **MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.** 56, 397-400, 2007.

Chen SM et al. Lead induced alterations in nitrite and nitrate levels in different regions of the rat brain. **Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol.** 2000, 125(3):315-23.

Chou SH et al. Gender-specific effects of caloric restriction on the balance of vascular nitric oxide and superoxide radical. **Cardiovasc Res.** 2010, 1;87(4):751-9.

Cooper WC and Gaffey WR. Mortality of lead workers. **J. Occupe. Med.** 1975, 17, 100-107.

Cordeiro R, Lima Filho EC and Salgado PE. Readjustment of the biological exposure limit applied to blood lead levels in Brazil. **Cad Saude Publica.** 1996, 12(4):455-463.

Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. **Gen Pharmacol.** 1999, 32(3):315-20.

Cordellini S et. al. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **J Hypertens.** 1990, 8(1):53-60.

Cordellini S and Vassilieff VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. **Gen Pharmacol.** 1988, 30(1):79-83.

Courtois E et. al. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **J Am Soc Nephrol.** 2003, 14(6):1464-70.

Dearth RK et. al. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. **Reprod Toxicol.** 2002, 16(4):343-52.

Fiorim J et. al. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. **PLoS One.** 2011, 25;6(2):e17117.

Flora SJ, Mittal M and Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **Indian J Med Res.** 2008, 128(4):501-23.

Franco MC et. al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc Res.** 2002, 56(1):145-53.

Franco MC et. al. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. **Cardiovasc Res.** 2003, 1;59(3):767-75.

Franco MC et. al. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. **Life Sci.** 2007, 30;80(8):709-15.

Fresneda A and Cordellini S. Avaliação da reatividade vascular e da pressão arterial de ratos recém-desmamados e adultos, expostos ao chumbo nos períodos pré e pós-natal. Botucatu, SP, 2005. 62 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas com área de concentração em farmacologia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

Fresneda A and Cordellini S. Efeitos da exposição perinatal ao chumbo sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de ratos recém-desmamados e adultos tratados ou não com DMSA. L-arginina e/ou enalapril. Botucatu, SP, 2009. 102 f. Tese de doutorado.

Fujiwara Y et.al. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. **Toxicology**, 1995, 12;98(1-3):105-10.

Glenn et. al. The longitudinal association of lead with blood pressure. **Epidemiology**. 2003, 14(1):30-6.

Grizzo LT and Cordellini S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. **Toxicol Sci**. 2008, 103(1):207-14.

Guimarães JRPF. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional. Março 2005. Disponível em www.acpo.org.br/disruptores_endocrinos.pdf. Acessado em 07 dezembro 2011.

Hoy et. al. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. **Kidney Int**. 1999, 56(3):1072-7.

Iavicoli I, Fontana L and Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**. 2009, 12(3):206-23.

Kaji T et. al. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. **Toxicology**. 1995, 6;95(1-3):87-92.

Khalil-Manesh et. al. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. **Am J Hypertens**. 1993, 6(9):723-9.

Lasley SM and Lane JD. Diminished regulation of mesolimbic dopaminergic activity in rat after chronic inorganic lead exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1988, 30;95(3):474-83.

Léonhardt M et.al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. **Biol Reprod.** 2003, 68(2):390-400.

Marques M et. al .Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. **J Am Soc Nephrol.** 2001, 12(12):2594-600.

Mello CF et. al. Effect of lead acetate on neurobehavioral development of rats. **Braz J Med Biol Res.** 1998, 31(7):943-50.

Molero L et. al. Involvement of endothelium and endothelin-1 in lead-induced smooth muscle cell dysfunction in rats. **Kidney Int.** 2006, 69(4):685-90.

Nakazono K et. al. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? **Proc Natl Acad Sci USA.** 1991, 15;88(22):10045-8.

Nowack R et. al. Chronic lead exposure in rats: effects on blood pressure. **Eur J Clin Invest.** 1993,23(7):433-43.

Poręba R et. al. Environmental and occupational exposure to lead as a potential risk factor for cardiovascular disease. **Environ Toxicol Pharmacol.** 2011, 31(2):267-77.

Purdy et. al. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. **Am J Hypertens.** 1997, 10(9 Pt 1):997-1003

Quignard J, et. al. Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. **J Clin Invest.** 1997, 15;99(2):185-93.

Rodrigues AL et. al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.** 1996, 79(3):150-6.

Russell JC et. al. Pair feeding-mediated changes in metabolism: stress response and pathophysiology in insulin-resistant, atherosclerosis-prone JCR:LA-cp rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2008,294(6):E1078-87.

Sivaprasad TR, Malarkodi SP and Varalakshmi P. Therapeutic efficacy of lipoic acid in combination with dimercaptosuccinic acid against lead-induced renal tubular defects and on isolated brush-border enzyme activities. **Chem Biol Interact.** 2004, 15;147(3):259-71.

Skoczyńska A et.al. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. **Toxicology.** 1986, 39(3):275-89.

Skoczyńska A et. al. Serum vasoactive agents in lead-treated rats. **Int J Occup Med Environ Health.** 2003, 16(2):169-77.

Stojek E and Skoczyńska A. Lead effect on vascular endothelium. **Med Pr.** 2003, 54(1):87-93.

Teixeira CV et. al. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **J Endocrinol.** 2007, 192(2):301-11.

Tian L and Lawrence DA. Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1995, 132(1):156-63.

Tian L and Lawrence DA. Metal-induced modulation of nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1996, 141(2):540-7.

Tsao et. al. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2000, 15;164(2):127-33.

Vassallo DV et. al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Braz J Med Biol Res.** 2011, 44(9):939-46.

Vaziri ND. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008, 295(2):H454-65.

Watts SW, Chai S and Webb RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. **Toxicology.** 1995, 5;99(1-2):55-65.

Widzowski DV and Cory-Slechta DA. Homogeneity of regional brain lead concentrations. **Neurotoxicology.** 1994, 15(2):295-307.

O saturnismo é considerado a doença ocupacional mais antiga. Dentre os efeitos fisiopatológicos associados ao chumbo (Pb) estão as alterações cardiovasculares. Muitas doenças que se desenvolvem na vida adulta são determinadas durante os primeiros estágios da vida, sob o efeito de exposição e dieta preferencial da mãe. Ainda, deve-se considerar que muitos contaminantes ambientais, em concentrações não nocivas, podem determinar processos fisiopatológicos se estressores físicos ou químicos e/ou condições patológicas estiverem presentes. Neste contexto, a desnutrição intra-uterina pode representar um fator de risco adicional na exposição ao Pb durante a prenhez e a lactação. Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o risco cardiovascular de ratos recém-desmamados que sofreram exposição perinatal ao Pb e desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação.

Após o acasalamento, ratas Wistar foram separadas em: controle (ctrl, ração *ad libitum*), restrição alimentar (RA, mesma dieta a 50% do consumo do grupo controle durante a prenhez), exposto ao Pb (Pb 500 ppm na água de beber durante a prenhez e lactação) e associação (As, receberam os dois últimos procedimentos em associação). Curvas concentração-efeito (CCEs) cumulativas à noradrenalina e ao CaCl₂ foram obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aortas torácicas provenientes de ratos machos recém-desmamados (23–25 dias de idade). Peso materno, peso da ninhada, peso e número de filhotes ao nascimento, distância anogenital, pressão arterial (PA) e peso dos tecidos (rins, fígado, aorta ventrículo esquerdo) foram avaliados. Alterações da reatividade vascular foram avaliadas pela resposta máxima (RM) e concentração eficaz 50% (CE50). Os dados foram apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi realizada através da análise de variância multifatorial e teste *a posteriori* de TuKey.

O peso corpóreo materno não diferiu entre os grupos experimentais, exceto no 20º dia de prenhez onde o peso materno de mães submetidas à desnutrição associada ou não à exposição ao Pb mostrou-se reduzido em relação ao grupo controle [peso corpóreo (g): ctrl 337,7 ± 16,4; Pb 341,3 ± 21,9; RA 279,0 ± 12,7*; associação 266,8 ± 5,7*; *P < 0,05; n=7-10]. O número total de filhotes, bem como o número de filhotes machos e fêmeas por

ninhada não diferiu entre os grupos experimentais (dados não mostrados). O mesmo foi observado para a distância anogenital de filhotes machos e fêmeas (dados não mostrados). Entretanto, ao nascimento, tanto o peso de filhotes machos e fêmeas quanto o peso da ninhada mostraram-se reduzidos em ratos desnutridos em útero expostos ou não ao Pb quando comparados ao grupo controle [peso médio dos filhotes (g) machos ctrl $7,4 \pm 0,2$; Pb $7,1 \pm 0,2$; RA $5,9 \pm 0,5^*$; As $5,8 \pm 0,2^*$; fêmeas ctrl $6,6 \pm 0,2$; Pb $6,7 \pm 0,3$; RA $4,8 \pm 0,2^*$; As $5,5 \pm 0,2^*$; peso da ninhada (g) ctrl $6,9 \pm 0,4$; Pb $7,2 \pm 0,7$; RA $5,5 \pm 0,8^*$; As $5,4 \pm 0,5^*$; 8-10, $*P < 0,05$, $n=7-10$]. A PA ao desmame não foi diferente entre os grupos experimentais (mmHg ctrl $89,2 \pm 3,6$; Pb $88,8 \pm 3,3$; RA $96,7 \pm 2,8$; As $84,5 \pm 2,7$; $P > 0,05$; $n=10-14$). Nenhuma alteração de reatividade à NA, em aorta com e sem endotélio, bem como ao CaCl_2 , em aorta sem endotélio, foi observada nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, a exposição perinatal ao Pb e a desnutrição *in utero*, isoladamente ou em associação determinaram um decréscimo da RM, sem alteração da CE50 ao cálcio em aorta com endotélio de ratos recém-desmamados [RM tensão (g/100 mg tecido): ctrl $56,1 \pm 14,7$; Pb $39,9 \pm 7,0^*$; RA $38,3 \pm 11,3^*$; As $43,1 \pm 12,7^+$; $*P < 0,05$ vs ctrl; $^+P > 0,05$ vs Pb ou RA; $n=5-10$]. O regime de exposição ao Pb utilizado no presente estudo não resultou em toxicidade de mães e filhotes como pode ser visto pela ausência de alterações no peso corpóreo, número de filhotes por ninhada, peso da ninhada e distância anogenital dos filhotes.

O presente estudo mostrou alterações na homeostase vascular ao cálcio em ratos recém-desmamados como consequência da exposição perinatal ao Pb e da desnutrição *in utero*, sugerindo maior vulnerabilidade a doenças cardiovasculares nestes animais. Ainda, a associação de ambos protocolos não se constituiu em fator de risco cardiovascular adicional.

Abstract

Plumbism is considered the oldest occupational disease. Among the pathophysiological effects associated with lead (Pb) are cardiovascular disorders. Many diseases that develop later in life are determined during the early stages of life, under the influence of exposure and preferred diet of the mother. Still, one should consider that many environmental contaminants at levels not harmful can determine pathophysiological processes if physical or chemical stressors and/or pathological conditions are present. In this context, the intrauterine malnutrition may represent an additional risk factor in exposure to Pb during pregnancy and lactation. For these reasons, the objective of this study was to evaluate the cardiovascular risk of weaned rats that have suffered perinatal exposure to Pb and intrauterine malnutrition, alone or in combination.

After mating, female rats were divided into control (ctrl, ad libitum), food restriction (RA, the same diet 50% of consumption in the control group during pregnancy), exposed to Pb (500 ppm Pb in drinking water during pregnancy and lactation) and association (As, received the last two procedures in combination). Cumulative concentration-effect curves (CECs) to CaCl₂ and noradrenaline (NA) were obtained in rings with and without endothelium of the same thoracic aorta from male weaned rats (23-25 days old). Maternal weight, litter weight, weight and number of pups at birth, anogenital distance, arterial blood pressure (ABP) and weight of tissues (kidney, liver, aorta, left ventricle) were evaluated. Changes in vascular reactivity were assessed by the maximum response (MR) and 50% effective concentration (EC₅₀). Data were presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by multifactorial analysis of variance and Tukey's post test.

Body weight of dams did not differ between the experimental groups, except on the 20th day of pregnancy when the maternal weight of dams subjected to malnutrition associated or not to Pb exposure was shown to be reduced compared to controls [body weight (g): ctrl 337.7 \pm 16.4; Pb 341.3 \pm 21.9; RA 279.0 \pm 12.7*; As 266.8 \pm 5.7*. *P < 0.05, n = 7-10]. The total number of offspring, as well as the number of males and females pups per litter did not differ among experimental groups (data not shown). The same was observed for the anogenital distance of male and female offspring (data not shown).

However, at birth, the weight of male and female pups and the weight of litters were reduced in rats malnourished *in utero* exposed or not to Pb when compared to the control group [weight of pups (g): males ctrl 7.4 ± 0.2 ; Pb 7.1 ± 0.2 ; RA $5.9 \pm 0.5^*$; As $5.8 \pm 0.2^*$; females ctrl 6.6 ± 0.2 ; Pb 6.7 ± 0.3 ; RA $4.8 \pm 0.2^*$; As $5.5 \pm 0.2^*$; and weight of litters (g) ctrl 6.9 ± 0.4 ; Pb 7.2 ± 0.7 ; RA $5.5 \pm 0.8^*$; As $5.4 \pm 0.5^*$. *P < 0.05, n = 7-10]. ABP at weaning was not different among experimental groups (ctrl 89.2 ± 3.6 mmHg; Pb 88.8 ± 3.3 ; RA 96.7 ± 2.8 ; As 84.5 ± 2.7 ; P > 0.05; n = 10-14). No change in the reactivity to NA in aortas with and without endothelium, as well as the reactivity to CaCl₂ in aortas without endothelium was observed among the different experimental groups. However, perinatal exposure to Pb and malnutrition *in utero*, alone or in combination, caused a decrease in MR, without changing the EC50 to CaCl₂ in the aorta with endothelium of weaned rats [MR tension (g/100 mg tissue): ctrl 56.1 ± 14.7 ; Pb $39.9 \pm 7.0^*$; RA $38.3 \pm 11.3^*$; As $43.1 \pm 12.7^+$; *P < 0.05 vs. ctrl, +P < 0.05 vs Pb ou RA; n=5-10]. The protocol of Pb exposure used in this study did not result in toxicity to dams and pups as seen by the absence of changes in body weight, number of pups per litter, litter weight and anogenital distance of pups.

The present study showed changes in vascular calcium homeostasis in weaned rats as a consequence of perinatal exposure to Pb and malnutrition *in utero*, suggesting increased vulnerability to cardiovascular disease in these animals. Still, the combination of both protocols did not increase the cardiovascular risk.