

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais, não incluídas pela autora no arquivo original.

O ser humano sempre esteve exposto aos metais tóxicos através de concentrações naturais no solo e na água. Em áreas com elevadas concentrações, a contaminação metálica dos alimentos e da água provavelmente deu origem aos primeiros casos de envenenamento. Os metais oriundos dos utensílios empregados para a preparação e consumo de alimentos aumentaram este risco. O surgimento da era industrial e da mineração em grande escala criou doenças profissionais causadas por vários metais tóxicos.

Os metais pesados, que obviamente não podem ser biotransformados, permanecem no organismo e exercem seus efeitos tóxicos através de sua combinação com um ou mais grupos reativos essenciais para as funções fisiológicas normais (ligantes).

Alguns metais como o ferro, o zinco, o magnésio, e o cobalto, em doses pequenas são essenciais para a vida, enquanto outros, como o chumbo (Pb), o mercúrio, o cádmio, o cromo e o arsênio podem estar presentes nos organismos, mas não têm utilidade biológica. Os metais tóxicos presentes no ambiente e, principalmente, a utilização destes pelos humanos são potencialmente perigosos à saúde dos organismos vivos. Os principais usos que condicionam as fontes de exposição estão relacionados às indústrias: extrativa, petrolífera, de baterias, de tintas e corantes, de cerâmica, cabos, tubulações e munições.

Mesmo com o reconhecimento atual dos perigos dos metais tóxicos, a incidência de intoxicações permanece significativa, havendo grande necessidade de tratamento eficaz.

O Pb é o principal metal encontrado na natureza como contaminante ambiental e as suas concentrações no meio ambiente foram amplamente aumentadas com a industrialização. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o Pb como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (Vanz *et al.*, 2003). No setor industrial, além do Pb metálico, são comuns os compostos de acetato, cloreto, cromato, nitrato, fosfato, sulfato e óxido de chumbo. Em muitos países, o chumbo tetraetila e o tetrametila são usados como aditivos de combustíveis.

O principal minério de chumbo é a galena, porém uma importante fonte de obtenção é a recuperação de sucatas do metal.

As utilizações industriais do Pb, em razão principalmente de suas propriedades físicas e químicas, determinam exposições a médio ou em longo prazo e, excepcionalmente, em curto prazo.

Em 1987, foram relacionadas 113 atividades industriais que expunham seus trabalhadores ao Pb e que podiam servir como fonte de contaminação ambiental. Entre estas atividades, destacamos: fundição (sulfeto de chumbo), fabricação de tintas e vernizes (cromato de chumbo), esmaltação e raspagem (monóxido e tetróxido de chumbo), solda e polimento (liga chumbo e estanho), óleos lubrificantes (naftelato de chumbo) (Silva & Moraes, 1987). Embora a exposição aguda a altas concentrações de Pb tenha diminuído nos últimos 20 anos, a exposição crônica a baixas concentrações de chumbo contaminando o ambiente ainda é um problema de saúde pública em muitos países, inclusive nos desenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (Bulletin of the World

Health Organization, 2000), tem-se conseguido uma diminuição no uso de chumbo principalmente no petróleo, em países desenvolvidos nos últimos anos. Já nos países em desenvolvimento o chumbo continua a ser um importante problema de saúde pública, com várias formas de exposição. Na América Latina, a exposição é pequena através de tintas, mas é grande através de cerâmicas. A exposição por diversas fontes parece ser até mais importante do que pelo petróleo, especialmente na população pobre – mineração, fábricas de baterias, artesanato, fundições. Países como Jamaica e Albânia tiveram suas populações expostas (residentes de áreas perto de fábricas) estudadas tendo sido demonstrado uma concentração sangüínea duas vezes maior do que as pessoas não expostas. A China também contribui com dados parecidos, sendo que houve grande número de crianças com taxas sangüíneas altas mesmo morando longe de fábricas, o que sugere ser devido à exposição ao petróleo (combustíveis) que tem grande quantidade de chumbo naquele país. No México, o risco de exposição ao chumbo esteve relacionado com o tipo de cerâmica utilizada para o preparo da alimentação, concentração de chumbo do ar devido à emissão por veículos e na sujeira e poeira com as quais as crianças têm contato. A África tem um petróleo com as maiores concentrações de chumbo do planeta. O nível de chumbo no solo também é grande. A exposição às crianças é um problema sério de saúde pública, que está relacionado com o nível cultural dos pais e a situação sócio-econômica. Na Tailândia, após a retirada do chumbo dos combustíveis, houve uma melhora importante nas concentrações atmosféricas locais.

Apesar da falta de dados sistematizados sobre as intoxicações ocupacionais pelo chumbo no Brasil, as informações disponíveis apontam para uma prevalência relativamente alta desses casos. Estudos realizados em Bauru, SP, entre 1985 e 1987, identificaram seiscentos casos de saturnismo entre trabalhadores de fábricas de baterias (Cordeiro, 1988), e em 2002 a existência de 314 crianças com taxas de plumbemia superiores às aceitáveis pela Organização Mundial de Saúde ($10\mu\text{g Pb/dl}$ sangue), devido contaminação ambiental por chumbo em uma área residencial (Tomita, *et al.*, 2005). Em Belo Horizonte, MG, em 1987 de um total de 154 trabalhadores de fábricas e reformadoras de baterias estudados, 52% apresentaram sintomas de intoxicação profissional pelo Pb (Rocha & Horta, 1987). Em 1989 encontrou-se uma prevalência de intoxicação pelo Pb de 38% na maior fábrica de acumuladores elétricos da cidade de Campinas (Prefeitura Municipal de Campinas, 1989).

A ACGIH-2002 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, USA) e a ABHO-2002 (Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais, Brasil) recomendam o valor de $30\mu\text{g/dl}$ de Pb no plasma como Índice Biológico de Exposição, i.e, valor de referência tido como guia para avaliação do risco potencial à saúde na prática da Higiene Industrial (ACGIH, 2002). Mulheres em idade fértil, cujo Pb no sangue exceda $10\mu\text{g/dl}$, estão em risco de gerar uma criança com uma taxa de Pb no sangue acima de $10\mu\text{g/dl}$ que é guia estabelecido pelo Centro de Controle de Doenças (CDC-USA).

As principais vias de absorção do chumbo são a gastrointestinal e o sistema respiratório (Klaassen, 2001; Sadao, 2002). No local de trabalho a absorção

gastrintestinal pode ser significativa e é estimada em 10%. As crianças e as mulheres grávidas exigem observações adicionais, pois, em relação aos adultos, as crianças são mais susceptíveis ao Pb, ingerem mais Pb nos alimentos por quilo de peso corpóreo (fator de 2 a 3) e absorvem mais Pb através do trato gastrointestinal, e o metal atravessando a barreira placentária pode afetar o desenvolvimento fetal (Salgado, 2003).

Alguns compostos de Pb são absorvidos percutaneamente, como os sais de Pb de ácidos orgânicos, por exemplo, naftenato de chumbo, chumbo metálico finamente dividido e solução de nitrato de chumbo. Os compostos orgânicos, como o chumbo tetrametila, são absorvidos através da pele intacta, por serem lipossolúveis (Salgado, 1996; Sadao, 2002; Vaziri, 2008).

No sangue, o Pb liga-se aos eritrócitos na proporção de 90 a 95%. Após a absorção, nas primeiras 24 horas, estabelece-se equilíbrio entre o Pb plasmático e o eritrócitário. Cerca de 5 % ou até menos do metal encontram-se no plasma livre ou ligado à albumina e à alfa2- globulina (Salgado, 1996).

Depois da absorção, o Pb inorgânico é distribuído inicialmente pelos tecidos moles, principalmente no epitélio tubular do rim (Sadao, 2002) e no fígado. Com o tempo, o chumbo é redistribuído e depositado nos ossos, dentes e cabelo (Klaassen, 2001; Kosnett, 2003; Sadao, 2002).

Estudos cinéticos indicam três compartimentos para o Pb corpóreo. O primeiro representado pelo sangue e alguns órgãos parenquimais de troca rápida, com meia-vida da cerca de 35 dias; o segundo compartimento representado pelos tecidos moles, com meia-vida de 40 dias; e o terceiro representado pelos ossos,

com meia-vida de 20 anos (Salgado, 1996; Kosnett, 2003). Nos órgãos é encontrado em diferentes gradientes, em função da afinidade com os tecidos.

Além dos ossos, os níveis mais elevados são observados na aorta, fígado, rins, adrenal, tireóide e jejuno. O total de Pb presente no organismo de indivíduos não expostos é de 100 a 400 mg, e mais de 90% estão depositados nos ossos (Salgado, 1996; Sadao, 2002).

Cerca de 76% do Pb absorvido são excretados na urina, 16 % pelo trato gastrintestinal, e menos de 8% por outras vias como cabelo, unhas e suor. No homem a excreção pelo leite é da ordem de 12 µg/l (Salgado, 1996).

Em animais de laboratório, o Pb é excretado para a bile, e muito mais Pb é excretado nas fezes do que na urina (Gregus & Klaassen, 1986). Em seres humanos, a excreção urinária é a via mais importante (Kehoe, 1987), e a concentração de Pb na urina é diretamente proporcional à do plasma (Zielhuis, 1971; Moreira & Moreira, 2004). Entretanto, como a maior parte do Pb no sangue se encontra nos eritrócitos, muito pouco é filtrado.

A ingestão diária normal de Pb é de aproximadamente 0,3 mg, ao passo que o equilíbrio positivo do Pb começa com uma ingestão diária de aproximadamente 0,6 mg. Esta quantidade geralmente não produz toxicidade manifesta durante toda a vida. Entretanto, o tempo de acúmulo de quantidades tóxicas diminui desproporcionalmente à medida que aumenta a quantidade ingerida; enquanto que uma ingestão diária de 2,5 mg de Pb exige quase 4 anos para acumular uma carga tóxica, uma ingestão diária de 3,5 mg exige poucos

meses, já que a deposição nos ossos é lenta demais para proteger os tecidos moles durante o acúmulo rápido (Klaassen, 2001).

Acredita-se que o ambiente intra-uterino exerce um papel importante na origem de muitas doenças no indivíduo adulto. Tais doenças incluem: hipertensão, diabetes, doenças cardíacas, coronarianas e derrame. Atuando na predisposição genética, os processos intra-uterinos parecem programar o metabolismo do indivíduo e sistema endócrino e, após o nascimento, estes fatores de risco são então amplificados ou minimizados por influências ambientais (Newnham, 2001).

Os fetos, os neonatos e as crianças são muito susceptíveis à intoxicação pelo Pb porque o sistema nervoso central em desenvolvimento apresenta alta taxa de mitose e migração celular (Burdette & Goldstein, 1986), que são processos bastante sensíveis a distúrbios causados por substâncias tóxicas. A exposição de fetos e neonatos ao Pb pode ocorrer não somente quando a mãe se expõe ao Pb durante a gestação, mas também pela transferência de Pb proveniente do armazenamento ósseo. Tem sido relatado que, durante a gestação, o Pb que se acumulou nos ossos da mãe, pode ser mobilizado e atingir os fetos e neonatos pela placenta e leite, respectivamente (Silbergeld, 1991; Dorea & Donangelo, 2006).

Além do desenvolvimento incompleto do sistema nervoso central, as crianças lactentes são mais susceptíveis à intoxicação por Pb devido à pouca massa corporal, à maior absorção intestinal e menor taxa de eliminação, e por não apresentarem uma barreira hematoencefálica completamente funcional (Goyer, 1990; Lockitch, 1993; Vega *et al.*, 1999).

Numerosas evidências demonstram que o desenvolvimento neural se estende do período embrionário até o período pós-natal. Os roedores têm um desenvolvimento mais considerável do sistema nervoso no período pós-natal, enquanto que os humanos têm considerável maturação do seu sistema nervoso no período pré-natal. Em outras palavras, o desenvolvimento cerebral de ratos neonatos corresponde aos estágios fetais em humanos (Seidler *et al.*, 1995; Rice & Barone, 2000).

Em ratos, os neurônios catecolaminérgicos desenvolvem-se nos estágios iniciais da ontogênese (Oliff & Gallardo, 1999). Em 1992, Wakatsuki *et al.*, mostraram uma correlação positiva entre a idade gestacional e a porcentagem de decréscimo da frequência cardíaca basal de ovinos, sugerindo um importante papel do sistema nervoso autônomo sobre o desenvolvimento cardiovascular. Posteriormente, demonstrou-se que o SNA desempenha importante papel sobre a adaptação circulatória e metabólica de fetos ovinos a alterações no seu meio intra-uterino e após o nascimento (Segar *et al.*, 1994).

Os efeitos do Pb constituem provavelmente a doença ocupacional mais antiga. Este metal é capaz de formar complexos com vários compostos e interferir na atividade de enzimas, causando anormalidades estruturais e funcionais de múltiplos sistemas do organismo. São efeitos atribuídos ao saturnismo: anorexia, constipação, paralisia, nefropatia, hipertensão ou hipotensão, distúrbio do sistema nervoso central, reprodutor, hematológico e imunológico (Karmakar & Anand 1989; Kempinas *et al.*, 1991; Nowack *et al.*, 1993; Moser *et al.*, 1995; Taylor 1996; Klaassen 1996, Malvezzi & Cordellini 2001; Anis *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

A hipertensão é provavelmente o efeito crítico na intoxicação pelo Pb no indivíduo adulto. Se uma relação causal entre exposição ao Pb e hipertensão existe, os mecanismos propostos devem incluir a interferência do Pb sobre o transporte iônico através das membranas, as interações dos processos mediados pelo cálcio, as ações vasomotoras diretas e/ou potencialização da estimulação simpática, entre outros (Piccinini *et al.*, 1977; Watts *et al.*, 1995; Heydari *et al.*, 2006; Prozialeck *et al.*, 2008; Vaziri, 2008).

A severidade na extensão dos efeitos do Pb sobre o sistema cardiovascular parece ser diretamente influenciada pela dose e pela duração da exposição do organismo a este metal (Nowack *et al.*, 1993; Heydari *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2007; Vaziri & Gonick, 2008).

As alterações de pressão arterial causadas pelo Pb são devidas, principalmente, à ação desse metal no coração, nos vasos, nos rins e no sistema renina-angiotensina-aldosterona (Kopp *et al.*, 1988; Zerbino *et al.*, 1990; Novak *et al.*, 1995; Taylor, 1996; Carmignani *et al.*, 1999; Vaziri, 2008; Prozialeck *et al.*, 2008; Vaziri & Gonick, 2008).

Em ratos adultos, a hipertensão induzida pela exposição ao Pb durante a vida pós-natal é caracterizada por um aumento da reatividade vascular às catecolaminas (Skoczynska *et al.*, 1986; Heydari *et al.*, 2006), um aumento dos níveis de noradrenalina no plasma, e uma diminuição dos receptores beta-adrenérgicos (Tsao *et al.*, 2000; Vaziri, 2008). Contrariamente, Purdy *et al.* (1997) não observaram alterações de reatividade a agentes vasoconstritores (fenilefrina e noradrenalina) ou vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) associadas com a hipertensão arterial em ratos expostos ao Pb. A discrepância de

resultados para os agentes vasoativos demonstra que as alterações de reatividade vascular relacionadas ao saturnismo é ainda uma questão em aberto, merecendo maiores investigações.

Sabe-se que as alterações de reatividade vascular podem ser determinadas por uma disfunção tanto do músculo liso vascular quanto da célula endotelial ou ainda uma associação de ambas.

A literatura tem mostrado que o Pb, e outros metais como mercúrio e cobalto inibem a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos *in vitro* (Tian & Lawrence, 1995). A inibição da NO-sintase pelo Pb foi também descrita em células endoteliais cerebrais (Blazka *et al.*, 1994, Mittal *et al.*, 1995) e neurônios (Selvin-Testa *et al.*, 1997). Ainda, o Pb pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio que, além da atividade vasoconstritora, participam na degradação do NO (Gonick *et al.*, 1997, Ding *et al.*, 1998, Vaziri *et al.*, 1999; Flora *et al.*, 2008; Vaziri & Gonick, 2008). Ao lado do NO, a célula endotelial produz e libera o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A exposição crônica ao Pb inibe a hiperpolarização dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (ACh) em artéria mesentérica de ratos, sugerindo que esse metal é um inibidor do EDHF (Oishi *et al.*, 1996). O Pb pode ainda determinar anomalias na síntese de prostaciclina (Stojek & Skoczynska, 2003). Estes dados corroboram as observações de Khalil-Manesh *et al.* (1993), que mostraram o envolvimento dos fatores endoteliais na hipertensão induzida pelo Pb.

Os efeitos do Pb sobre a reatividade vascular podem ser devidos, ainda, a uma ação direta deste metal sobre o músculo liso vascular. Sabe-se que o Pb interfere em processos regulatórios que envolvem o íon cálcio (Favalli *et al.*, 1977;

Piccinini *et al.*, 1977; Webb *et al.*, 1981; Vaziri & Gonik, 2008). O Pb pode bloquear correntes de Ca^{+2} sensíveis à voltagem que determina um aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular (Kopp *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1995; Carmignani *et al.*, 2000); interagir com a proteína quinase C (Novak & Banks, 1995; Vaziri & Gonik, 2008); e substituir o Ca^{+2} na ativação da calmodulina (Habermann *et al.*, 1983; Richardt *et al.*, 1986; Vaziri & Gonik, 2008). Ainda, este metal pode inibir o transporte enzimático $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, que contém grupo sulfidril o qual se liga facilmente ao Pb, prejudicando o transporte de sódio e, secundariamente, a saída de cálcio da célula muscular lisa (Hart & Titus, 1973, Weiler *et al.*, 1990; Prozialeck, *et al.*, 2008).

Dados anteriores em nosso laboratório mostraram que as alterações de reatividade vascular induzidas pelo saturnismo, no indivíduo adulto, envolvem disfunção tanto do músculo liso vascular quanto da célula endotelial ou ainda uma associação de ambas, dependendo do grau de intoxicação (Malvezzi & Cordellini, 1998).

Ao lado das alterações funcionais acima descritas, o Pb é responsável ainda por várias alterações morfológicas nos vasos. Assim, a exposição ao Pb produz um efeito estimulante sobre a proliferação de células musculares lisas (Fujiwara *et al.*, 1995), e um efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais em cultura (Kaji *et al.*, 1995). A aterosclerose em artérias de pequeno e médio calibre foi também descrita no processo patológico da intoxicação pelo Pb (Zerbino & Pospishiliu, 1990; Vaziri & Gonick, 2008).

O tratamento usual na intoxicação pelos metais pesados é a administração de agentes quelantes. Estes compostos formam ligações covalentes com o átomo

do metal, formando assim um complexo (quelato) que é excretado pelo organismo. Os agentes quelantes mais utilizados nas intoxicações pelo Pb são o ácido etilenodiamina-tetracético (EDTA) e o ácido dimercaptossuccínico (DMSA).

O DMSA é um agente quelante efetivo em animais e humanos (Cory-Slechta, 1988; Counter *et al.*, 2003; Rademacher *et al.*, 2003; Kalia & Flora, 2005), e parece mobilizar primariamente o Pb do tecido líquido como o sangue, e tecidos moles como o fígado, os rins e o cérebro (Cory-Slechta 1988; Kalia & Flora, 2005; Flora *et al.*, 2008). Além disso, o DMSA não causa a redistribuição de Pb dos ossos para o sistema nervoso central no início do tratamento (Cory-Slechta, 1988), que parece ser a maior desvantagem da terapia com o EDTA (Cory-Slechta *et al.*, 1987; Flora *et al.*, 1995). Diferentemente do EDTA, o DMSA pode ser administrado via oral sem facilitar a absorção do Pb pelo trato gastrointestinal (Kapoor *et al.*, 1989; Kalia & Flora, 2005). Ainda, o DMSA é mais seletivo para o Pb do que o EDTA, resultando em menor perda de metais essenciais, como o zinco, e outros íons durante o tratamento (Freidheim *et al.*, 1978; Graziano *et al.*, 1985, 1988; Flora *et al.*, 2008).

Ao lado das propriedades quelantes, o DMSA é um seqüestrador de ROS (Khalil-Manesh *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1998; Flora *et al.*, 2008; Vaziri *et al.*, 2008). Dessa forma, o DMSA poderia contrabalançar o aumento das ROS produzido pelo Pb. Ainda, a literatura relata que o efeito do DMSA sobre as ROS reduz a pressão arterial média de ratos espontaneamente hipertensos e com hipertensão induzida pelo Pb (Khalil-Manesh *et al.*, 1994; Gonick *et al.*, 1996; Vaziri *et al.*, 2008).

Dados da literatura mostram que, um aumento nas ROS e uma diminuição do agente vasodilatador NO participam na hipertensão induzida pelo

Pb (Gonick *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998; Malvezzi *et al.*, 2001; Vaziri & Gonick, 2008). Dessa forma, um tratamento alternativo para a hipertensão induzida pelo Pb seria a administração do precursor do NO, L-arginina. Visto que o NO age como um seqüestrador de ROS (Kanner *et al.*, 1991; Vaziri & Gonick, 2008), este tratamento, além de aumentar o vasodilatador NO, poderia resultar na diminuição das ROS, bem como da hipertensão induzida por este metal. Assim, Ding *et al.* (1998) mostraram que a administração *in bolus* de L-arginina seguida da infusão contínua por 30 min foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos intoxicados pelo Pb. Trabalhos anteriores em nosso laboratório têm confirmado o potencial terapêutico de ambos DMSA e L-arginina na reversão das alterações de pressão arterial induzidas pelo saturnismo (Malvezzi *et al.*, 2001). Ainda, o tratamento com a associação DMSA/L-arginina mostrou-se mais efetivo do que os tratamentos isolados em mobilizar Pb dos tecidos e em reduzir a pressão arterial aumentada de ratos intoxicados pelo Pb (Malvezzi *et al.*, 2001).

O Pb parece ainda aumentar a atividade simpática por mecanismos centrais, aumentando conseqüentemente os níveis plasmáticos de NA e adrenalina (Carmignani *et al.*, 2000). Ainda, a exposição crônica ao Pb aumenta drasticamente as atividades da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e cininase II e os níveis de aldosterona e renina (Carmignani *et al.*, 1999; Vaziri, 2002). Dessa maneira, poder-se-ia aventar um benefício da terapia com enalapril, inibidor da ECA, na prevenção das alterações cardiovasculares induzidas pela exposição ao Pb.

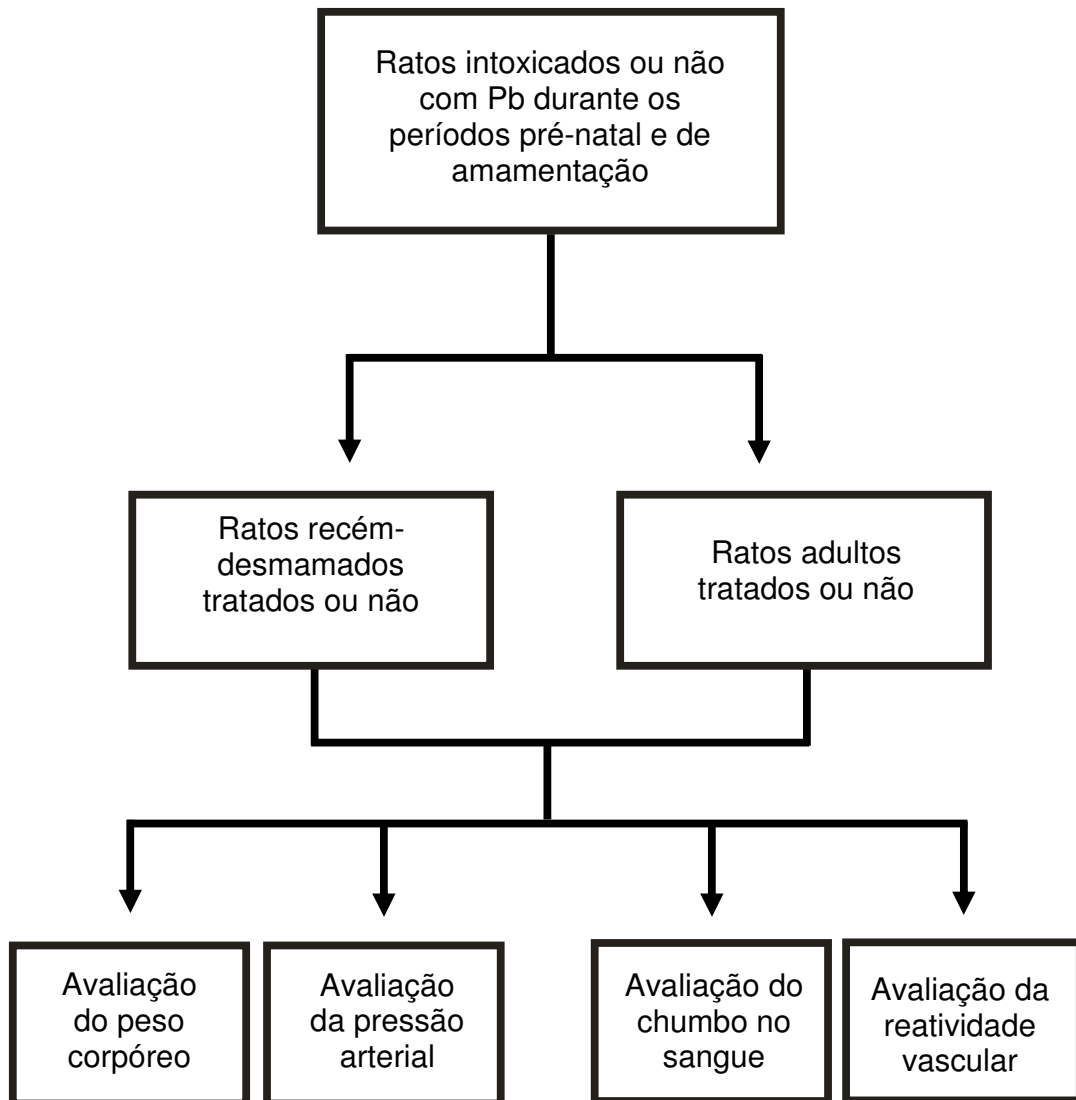
Embora haja inúmeros estudos sobre as alterações comportamentais, neuroquímicas e outras induzidas pela exposição ao Pb nas fases pré-natal e/ou

de amamentação (Dearth *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2007; Lamadrid *et al.*, 2007; Szczerbak *et al.*, 2007), a literatura ainda é falha sobre as alterações cardiovasculares e de reatividade vascular nestas condições.

OBJETIVOS

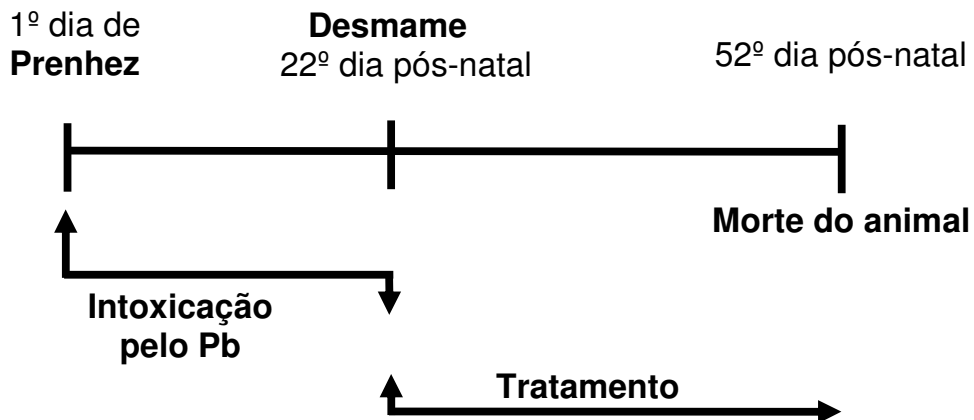
Os objetivos do presente trabalho foram investigar (1) as alterações de pressão arterial e de reatividade vascular de ratos recém-desmamados e adultos, expostos ou não ao Pb nos períodos pré-natal e de amamentação, com enfoque sobre a célula endotelial; e (2) o potencial terapêutico do DMSA, da L-arginina, do enalapril, administrados de forma isolada ou em associação, sobre as alterações de pressão arterial e de reatividade vascular após exposição perinatal ao chumbo.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

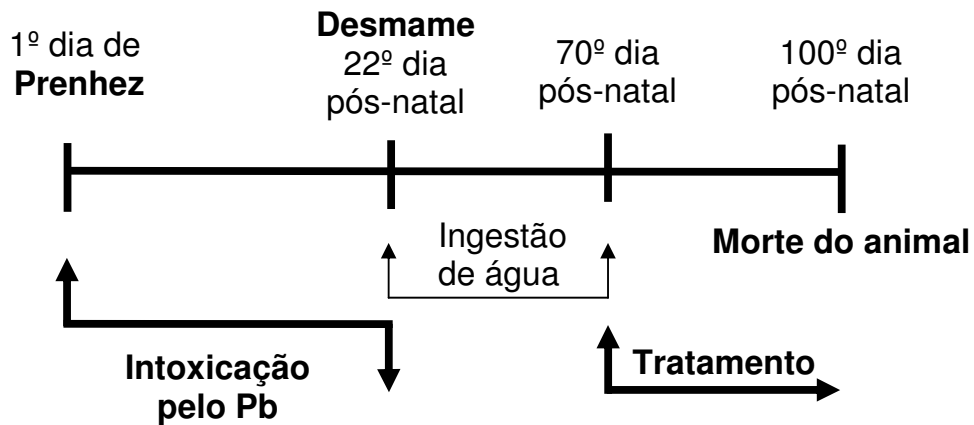


DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ratos jovens (52 dias de idade)



Ratos adultos (100 dias de idade)



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACGIH-American Conference Of Governmental Industrial Hygienist. TLVs e BELs: Limites de Exposição para Substâncias Químicas e Agentes Físicos e Índices Biológicos de Exposição (BEIs). In: Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Campinas: ABHO; 2002. p.87 e 94.
- Anis TH, ElKaraksy A, Mostafa T, Gadalla A, Imam H, Hamdy L, Abu el-Alla O. Chronic lead exposure may be associated with erectile dysfunction. J Sex Med. 2008;5(1):252.
- Babu MS, Gopal KP. Post natal antioxidant enzyme activity of rat brain regions during developmental lead exposure. J Environ Biol. 2007;28(1):21-7.
- Blazka ME, Harry GJ, Luster MI. Effect of lead acetate on nitrite production by murine brain endothelial cell cultures. Toxicol Appl Pharmacol. 1994;126(1) 191-4.
- Boasaude.uol.com.br[homepage on the Internet]. Genebra: Bulletin of The World Health Organization Vol. 78, No. 8; 2000 from: <http://www.boasaude.uol.com.br>
- Bulletin of the World Health Organization: Exposição Ambiental ao Chumbo – um Problema Global
- Burdette LJ, Goldstein R. Long-term behavioral and electrophysiological changes associated with lead exposure at different of brain development in rat. Brain Res. 1986;394(1):101-110.
- Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. Immunopharmacology. 1999;44(1-2)105-10.
- Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, et al. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. Life Sci. 2000;68(4):401-15.
- Cordeiro R. O saturnismo em Bauru. In: Pimenta AL, Costa FDC. Saúde do trabalhador. São Paulo: Hucitec; 1988. p. 47-83.

- Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Mobilization and distribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;293(3):804-13.
- Cory-Slechta DA. Mobilization of lead over the course of DMSA chelation therapy and long term efficacy. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;246(1):84-91.
- Counter SA, Ortega F, Shannon MW, Buchanan LH. Succimer (meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) treatment of Andean children with environmental lead exposure. *Int J Occup Environ Health*. 2003;9(2):164-8.
- Dearth RK, Hiney JK, Srivastava V, Burdick SB, Bratton G, Dees WI. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in rat. *Reprod Toxicol*. 2002;16(4):343-52.
- Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced hypertension II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res*. 1998;76(2):107-13.
- Dorea JG, Donangelo CM. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin Nutr*. 2006;25(3):369-76.
- Favalli L, Chiari MC, Piccinini F, Rozza A. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1977;41(2):412-20.
- Flora SJ, Bhattacharya R, Vijayaraghavan R. Combined therapeutic potential of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and calcium disodium edetate on the mobilization and distribution of lead in experimental lead intoxication in rats. *Fundam Appl Toxicol*. 1995;25(2):233-40.
- Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):501-23.
- Freidheim E, Graziano JH, Popovac D, Dragovic D, Kaul B. Treatment of lead poisoning by 2,3-dimercaptosuccinic acid. *Lancet*. 1978;2(8102):1234-6.
- Fujiwara Y, Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology*. 1995;98(1-3):105-10.

- Gonick HC, Cohen AH, Ren Q, Saldanha SF, Khalil-Manesh F, Anzalone J, et al. Effect of 2,3-dimercaptosuccinic acid on nephrosclerosis in the Dahl rat. I. Role of reactive oxygen species. *Kidney Int.* 1996;50(5):1572-81.
- Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND. Lead-induced hypertension I. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension.* 1997;30(6):1487-92.
- Goyer RA. Transplacental transport of lead. *Environ Health Perspect.* 1990;89:101-5.
- Graziano JH, Lolocono LJ, Meyer P. Dose-response study of oral 2,3-dimercaptosuccinic acid in children with elevated blood lead concentration. *J Pediatr.* 1988;113(4):751-7.
- Graziano JH, Siris E, Lolocono N, Silverberg SJ, Turgeon L. 2,3-Dimercaptosuccinic acid as an antidote for lead intoxication. *Clin Pharmacol Ther.* 1985;37(4):431-8.
- Gregus Z, Klaassen CD. Disposition of metals in rats: a comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986;85(1):24-38.
- Habermann E, Crowell K, Janicki P. Lead and other metals can substitute for Ca^{2+} in calmodulin. *Arch Toxicol.* 1993;54(1):61-70.
- Hart WM, Titus EO. Sulfhydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem.* 1973;248(13):4674-81.
- Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, et al. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett.* 2006;166(1):88-94.
- Kaji T, Fujiwara Y, Hoshino M, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H.. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology.* 1995;95(1-3):87-92.
- Kalia K, Flora SJ. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health.* 2005;47(1):1-21.
- Kanner J, Harel S, Granit HC. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 1991;289(1):130-6.

- Kapoor SC, Wielopolski L, Graziano JH, Lolocono NJ. Influence of 2,3-dimercaptosuccinic acid on gastrointestinal lead absorption and whole-body lead retention. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989;97(3):525-9.
- Karmakar N, Anand S. Study of the inhibitory effect of lead acetate on duodenal contractility in rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1989;16(9):745-50.
- Kehoe RA. Studies of lead administration and elimination in adult volunteers under natural and experimentally induced conditions over extended periods of time. *Food Chem Toxicol.* 1987; 25(6):425-53.
- Kempinas WG, Melo VR, Lamano Carvalho TL. Pharmacological reactivity of rat vas deferens in chronic and subacute lead intoxication. *Vet Hum Toxicol.* 1991; 33(5):461-3.
- Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens.* 1993;6(9):723-9.
- Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA, Purdy RE, et al. Effects of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. *Environ Res.* 1994;65(1):86-99.
- Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill; 1996. p.1111.
- Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (Eds). Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. United States of America: The McGraw-Hill Companies; 2001. p.1852-1853.
- Kopp SJ, Barron JT, Tow JP. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: A review. *Environ Health Perspect.* 1988;78:91-9.
- Kosnett MJ. Intoxicação por Metais Pesados & Quelantes. In: Katzung, BG, editores. Farmacologia Básica & Clínica. 8ªEd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 867-870.
- Lamadrini-Figueroa H, Téllez-Rojo MM, Hernández-Avila M, Trejo-Valdivia B, Solano-González M, Mercado-García A, et al. Association between the

- plasma/whole blood lead ratio and history of spontaneous abortion: a nested cross sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2007;27:7-22.
- Lockitch G. Perspectives on lead toxicity. *Clin Biochem*. 1993;26(5):371-81.
- Malvezzi CK, Cordellini S. Efeitos da intoxicação subaguda e subcrônica pelo chumbo na reatividade à noradrenalina de aorta isolada de ratos: participação da célula endotelial. [Monografia]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 1998.
- Malvezzi CK, Moreira EG, Vassilieff I, Vassilieff VS, Cordellini S. Effects of L-arginine, DMSA and blood pressure level in plumbism. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(10):1341-6.
- Malvezzi, C.K., Cordellini, S. Potencial da terapia combinada do ácido dimercaptossuccínico e da L-arginina sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de ratos intoxicados pelo chumbo. [Dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.
- Mittal CK, Harrell WB, Mehta CS. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem*. 1995;149-150:263-265.
- Moreira FR, Moreira JC. A cinética do chumbo no organismo e sua importância para a saúde. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2004;9(1):167-181.
- Moser R, Oberley TD, Daggett DA, Friedman AL. Effects of lead administration on developing rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;131(1):85-93.
- Newnham JP. Is prenatal glucocorticoid administration another original of adult disease?. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(11):957-61.
- Novak J, Banks RO. Lead and nickel alter the cardirenal actions of endothelin in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995;208(2):191-8.
- Nowack R, Wiecek A, Exner B, Gretz N, Ritz E. Chronic lead exposure in rats: effects on blood pressure. *Eur J Clin Invest*. 1993;23(7):433-43.
- Oishi H, Nakashima M, Totoki T, Tomokuni K. Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28(4):558-563.
- Oliff HS, Gallardo KA. The effect of nicotine on developing brain catecholamine system. *Front Biosc*. 1999;4:D883-97.

- Piccinini F, Favalli L, Chiari MC. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology*. 1977;8(1):43-5.
- Prefeitura Municipal de Campinas. Relatório de Investigação Clínico-Epidemiológica Realizada nos Bairros Real Parque, Jardim São Gonçalo e Parque Ceasa para Verificação de Ocorrência de Exposição Não Habitual de Moradores ao Chumbo. Campinas: SMS. (Mimeo.); 1989.
- Prozialech WC, Edwards JR, Nebert DW, Woods JM, Barchowsky A, Atchison, WD. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sc*. 2008;102(2):207-18.
- Purdy RE, Smith Y, Ding F, Vaziri ND, Gonick HC. Lead- induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am J Hypertension*. 1997;10(9):997-1003.
- Rademacher DJ, Steinpreis RE, Weber DN. Effects of dietary lead and/or dimercaptosuccinic acid exposure on regional serotonin and serotonin metabolite content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neurosci Lett*. 2003;339(2):156-60.
- Rice D, Barone SJ. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000;108(3):511-33.
- Richardt G, Federolf G, Gabermann E. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca^{+2} binding proteins. *Biochem Pharmacol*. 1986;35(8):1331-5.
- Robles HV, Romo E, Sanchez-Mendoza A, Rios A, Soto V, Avila-Casado MC, et al. Lead exposure effect on angiotensin II renal vasoconstriction. *Hum Exp Toxicol*. 2007;26(6):499-507.
- Rocha LAR, Horta GO. Avaliação da intoxicação profissional por chumbo em indústrias de acumuladores elétricos na Grande Belo Horizonte. *Rev Bras Saúde Ocup*. 1987;15(80):6-12.
- Sadao M. Intoxicação por chumbo. *Rev Oxidologia*. 2002;jan/fev/mar:37-42.
- Salgado PET. Toxicologia dos alimentos, Metais em alimentos. In: OGA S, Editor. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 413.

- Salgado PET. Toxicologia dos metais. In: OGA S, Editor. Zanini. Oga: Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p.161 e 446.
- Segar JL, Mcrill DC, Smith BA, Robillard JE. Role of sympathetic activity in the generation of heart rate and arterial pressure variability in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1994;35(2):250-4.
- Seidler FJ, Temple SW, Mccook EC, Slotkin TA. Cocaine inhibits central noradrenergic and dopaminergic activity during the critical developmental period in wich catecholamines influence cell development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995;85(1):48-53.
- Selvin Testa A, Capani F, Loidl CF, Pecci Saavedra J. The nitric oxide synthase expression of rat cortical and hippocampal neurons changes after early lead exposure. *Neurosci Lett.* 1997;236(2):75-8.
- Silbergeld EK. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ Health Perspect.* 1991;91:63-70.
- Silva Nr, Moraes, ECF. Papel dos indicadores biológicos na avaliação da exposição ocupacional ao chumbo. *Rev Bras Saúde Ocup.* 1987;15(58):7-15.
- Skoczynska A, Juzwa W, Smolik R, Szechinski J, Begal FJ. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology.* 1986;39(3):275-89.
- Stojek E, Skoczynska A. Lead effect on vascular endothelium. *Med Pr.* 2003;54(1):87-93.
- Szczerbak G, Nowak P, Kostrzewa RM, Brus R. Maternal lead exposure produces long-term enhancement of dopaminergic reactivity in rat offspring. *Neurochem Res.* 2007;32(10):1791-8.
- Taylor AE. Cardiovascular effects of environmental chemicals. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;114(2):209-11.
- Tian L, Lawrence DA. Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;132(1):156-63.
- Tomita NE, Padula NAMR. Intoxicação por chumbo em crianças e o discurso da imprensa. *Ciênc saúde coletiva.* 2005;10(0):111-19.

- Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164(2):127-33.
- Vanz A, Mirlean N, Daisch P. Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: uma abordagem geoquímica. *Quím Nova.* 2003;26(1)25-29.
- Vaziri ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *Indian J Med Res.* 2008;128(4):426-35.
- Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead – induced hypertension. *Kidney Int.* 1999;56(4):1492-8.
- Vaziri ND. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H454-H65.
- Vaziri ND. Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *J. Hypertens.* 2002;3:15-20.
- Vega J, Frenz P, Marchetti N, Torres J, Kopplin E, Delgado I, Veja F. Chronic exposure to environmental lead in Chilean infants. II: Effects on the psychomotor development. *Rev Med Chil.* 1999;127(1):28-37.
- Wakatsuki A, Murata Y, Ninomya Y, Masaoka N, Tyner JG, Kutty KK. Autonomic nervous system regulation of baseline heart rate in the fetal lamb. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(2):519-23.
- Wang J, WU J, ZHANG Z. Oxidative Stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg.* 2006;50(4):405-9.
- Watts, SW, Chai S, Webb RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology.* 1995;99(1-2):55-65.
- Webb RC, Winquist RJ, Victory W, Vander AJ. In vivo and vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. *Am J Physiol.* 1981;241(2):H211-16.
- Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick H. Effects of lead and low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci (Lond).* 1990;79(2):185-92.

- Zerbino DD, Pospishiliu I. The chronic action of lead on the vascular system: the problem of ecological pathology. *Arkh Patol.* 1990;52(7):70-3.
- Zhang LF, Peng SQ, Wang S, Li BL, Han G, Dong YS. Direct effects of lead (Pb^{2+}) on relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. *Toxicol Lett.* 2007;170(2):104-10.
- Zielhuis RL. Interrelationship of biochemical responses to the absorption of inorganic lead. *Arch Environ Health.* 1971;23(4):299-311.

COMBINATION THERAPY ON THE CARDIOVASCULAR EFFECTS OF PERINATAL LEAD EXPOSURE IN YOUNG AND ADULT RATS

Pb, combination therapy and vascular reactivity

Andréia Fresneda da Silva¹ and Sandra Cordellini²

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina; ²Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências - São Paulo State University - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

Part of a thesis submitted by Andréia Fresneda da Silva to the Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil in partial fulfillment of the requirements for the Doctoral's Degree.

Address for correspondence: Dr. Sandra Cordellini. Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, 18618-000, Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brasil, Fax. +55-14-3815 3744, Tel. +55-14-3811 6253. E-mail cordelli@ibb.unesp.br

Research area: Systems Toxicology

ABSTRACT

The combined therapy could play a significant role in abating the number of toxic effects of Pb and recovery cardiovascular alterations. To investigate this, Wistar rat dams received 500 ppm of Pb or sodium acetate in the drinking water during pregnancy and lactation. Pups with 22 and 70 days-old intoxicated or not with Pb during pregnancy and lactation received DMSA, L-arginine, enalapril and the combination of these compounds for 30 additional days. Curves to noradrenaline were obtained in intact and denuded aortas, from pups with 23, 52, 70 and 100 days-old, exposed or not to Pb, treated or not. Systolic blood pressure (SBP) were higher in intoxicated than control pups [SBP (mmHg) 23, 52, 70 and 100 day-old, respectively: control 107.1 ± 1.8 , 118.8 ± 2.1 , 126.1 ± 1.1 , 120.5 ± 2.2 ; Pb $117.8 \pm 3.9^*$, $135.2 \pm 1.3^*$, $139.6 \pm 1.6^*$, $131.7 \pm 2.8^*$; $*P < 0.05$, $n = 5-20$]. Increased reactivity to noradrenaline was observed in intact, but not denuded, aortas from 52, 70 and 100 days-old intoxicated rats related to control groups. Maximum response (g of tension) 52 day-old: Pb $3.43 \pm 0.16^*$, control 2.38 ± 0.33 ; 70 day-old: Pb $4.32 \pm 0.18^*$, control 3.37 ± 0.13 ; 100 day-old: Pb $4.21 \pm 0.23^*$, control 3.22 ± 0.21 , $*P < 0.05$ relate to the respective control, $n = 10-13$. All treatments restored the vascular reactivity alterations to NA in rats perinatally exposed to Pb. Independently of age, the combined therapy induced an earlier restoration in blood pressure of Pb-exposed rats compared to the isolated treatments. These findings represent a new approach to the development of therapeutic protocols for the treatment of lead intoxication.

Key words: lead, cardiovascular system, perinatal intoxication, combination therapy, weaned and adult rats

INTRODUCTION

Lead (Pb) acquires greater importance every year as both an industrial and environmental hazard. This has led to concern about the impact of increased Pb burden on blood pressure and cardiovascular diseases.

Some epidemiological data are compatible with the idea that Pb exposure plays a role in the development of the arterial hypertension in persons occupationally exposed to Pb (Glenn *et al.*, 2003; Vaziri, 2008) as well as in the general population (Bost *et al.*, 1999; Vaziri, 2008).

In adult rats, the arterial hypertension induced by Pb exposure during postnatal life is characterized by an increase in vascular reactivity to catecholamines (Skoczynska *et al.*, 1986), an increase in plasma noradrenaline (NA) level as well as a decrease in beta-adrenergic receptors (Tsao *et al.*, 2000), and a reduction in vasodilatory response to both acetylcholine and nitroprusside (Marques *et al.*, 2001). Contrarily, Purdy *et al.* (1997) reported no aorta reactivity alteration to either vasoconstrictors (noradrenaline and phenylephrine) or vasodilators (acetylcholine and sodium nitroprusside) associated with Pb-induced hypertension in rats.

Several diseases developing during adulthood were probably determined during early stages of life, under the effect of exposure or preferential maternal diet during pregnancy. Although a great deal of progress has been made with regard to neurochemical, behavioral and other alterations induced by perinatal

exposure to Pb (Dearth *et al.*, 2002; Lasley *et al.*, 1988; Moreira *et al.*, 2001a,b), the effects of Pb exposure during pregnancy and lactation on cardiovascular system remain to be completely clarified.

Most studies have focused on the concept that this heavy metal interacts with: 1) regulatory processes involving calcium ion, cyclic GMP as second messengers, and protein kinase C (Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Watts *et al.*, 1995; Vaziri, 2008); 2) renin-angiotensin-aldosterone, kallikrein-kinin and other autacoidal (e.g., endothelin) and transductional systems (e.g., nitric oxide, NO) (Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Vaziri, 2008); 3) endothelial cell and smooth muscle proliferation (Fujiwara *et al.*, 1995; Kaji *et al.*, 1995); 4) and oxidative stress (Flora *et al.*, 2008).

Despite many years of research we are still far way from effective treatment against toxicity caused due to exposure to toxic metals. The combined therapy is a new and a better approach to treat cases of metal poisoning. As only few experimental evidences are available and there is a need for in depth investigation in this area. It is thus proposed to investigate combination therapy against cardiovascular Pb.

Based on the above reports, it was investigated the effects of lead exposure during pregnancy and lactation on blood Pb levels, blood pressure and rat aorta reactivity to noradrenaline focusing on the endothelial and smooth muscle cells. In another series of experiments, it was evaluated the beneficial effects of the treatments with *meso-dimercaptosuccinic acid* (DMSA), L-arginine, and enalapril, either individually or in combination, on the cardiovascular adverse effects of lead poisoning. These studies advance understanding of the cardiovascular effects of

perinatal Pb exposure and could aid in the development of proper therapies for cardiovascular diseases caused by plumbism.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Pb exposure

Wistar rats were obtained from University of São Paulo facilities and used as the parent generation. The animals were mated at the age of 90 days (two females and one male per cage). On pregnancy day 0 (determined by the presence of sperm in vaginal smears), the dams were divided into non-intoxicated or Pb-exposed groups and were housed singly. The drinking water of dams was altered with 500 ppm Pb (as Pb acetate) or sodium acetate (Na^+) to equalize acetate exposure for the groups. The Pb exposure regimen was chosen based on previous studies (Victory *et al.*, 1982; Moreira *et al.*, 2001a,b; Wang *et al.*, 2006). To prevent the formation of Pb precipitate, 0.5 ml of glacial acetic acid was added while stirring to prepare 1000 ml of both solutions (sodium acetate and Pb). The Pb exposure lasted throughout pregnancy and lactation. At birth, the number of pups per litter was recorded and after which all litters were culled to eight pups. Whenever possible, only male rats were kept within the litter and females were kept just to maintain equal litter sizes. Pups were weaned at 22 days of age on tap water and evaluated at 23 and 70 days of age. Aged matched-controls received Na^+ acetate during the same periods of Pb exposure. Maternal body weights were measured on pregnancy day 0, the day before delivery, after delivery and at weaning. Pup weights were recorded at birth and weekly until the 100^o day of age.

Lights in the animal room were set on 12:12-h cycle with temperature maintained at $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The animals were fed with regular lab chow. Animal procedures were in accordance with the principles and guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation.

Measurement of Blood Pressure

Beginning at 22 days of life, systolic blood pressure was weekly determined by using the tail-cuff plethysmographic method (Narco Bio-Systems, Inc., Houston, TX) in conscious rats. The rats were prewarmed for 10 to 15 min and placed into a restrainer for blood pressure measurement. Three consecutive recordings (~1 min apart) were performed, and the mean of these three measurements was recorded.

Determination of Lead in Blood

Whole blood was collected from the heart of anesthetized (urethane 1.25 g/kg) dams at weaning and pups at 23, 52, 70 and 100 days of age.

Blood was prepared for Pb analysis by microwave dissolution procedure utilizing a DGT-100 plus microwave digestion apparatus (Provecto, Brazil). Nitric acid was added to the digestion vessels containing 1 ml of blood.

Lead content of whole blood was determined using an atomic absorption spectrophotometer GBC AA 932 (EEA-flame) (Athanasopoulos, 1994). The recovery of Pb that had been added externally to control samples was found to be consistently greater than 96%. A standard additional method was applied for the

determination to eliminate possible matrix interference. Whole-blood lead values were expressed as micrograms per deciliter. The detection limit was 5 µg/dl.

Therapy

A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received DMSA, L-arginine, enalapril and the combination of these compounds for 30 additional days. When administered, the 60 mg/kg dose of DMSA was given, orally by gastric gavage, twice a day (30 mg/kg) for 5 days per week. L-arginine (1.0%) as given in drinking water *ad libitum*. Enalapril was given in drinking water 5 mg/day/rat. Aged matched-controls received tap water.

Experimental Protocols

Immediately after the blood had been collected, the descending thoracic aorta was excised and trimmed free of adhering fat and connective tissue. Two transverse rings of the same artery, each about 4 mm in length, were cut and mounted at the optimal length for recording isometric tension in organ chambers. One ring served as control, while the endothelium was mechanically removed from the other by gently rubbing the luminal surface, intact and denuded aortas respectively. The preparations were mounted in organ baths containing 7 ml of Krebs-Henseleit solution, with composition in mM: NaCl 113.0, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25.0, MgSO₄ 1.1, KH₂PO₄ 1.2, ascorbic acid 0.11, and glucose 11.1. The bathing fluid, kept at 37°C, was saturated with a gas mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. The preparations were allowed to equilibrate for at least 1 h under a

resting tension of 1.5 g, which is optimal for inducing the maximum contraction.

Tension was recorded by an F-60 microdisplacement myograph (Narco Bio-Systems Inc., Houston, Texas, USA), and displayed on a physiograph.

Preparations with and without endothelium isolated from rats exposed or not to Pb were studied in parallel.

Cumulative concentration-effect curves were constructed from the response of the tissue to NA. Following completion of the determination of the concentration-effect curves, acetylcholine (10^{-4} M) and sodium nitroprusside (10^{-4} M) were used to test the integrity of endothelial and smooth muscle layers, respectively.

Drugs and Solutions

The following drugs were used: acetylcholine bromide, DMSA, enalapril maleate, L-arginine, lead acetate, noradrenaline bitartrate, sodium nitroprusside, urethane (all obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA). All drugs were dissolved in Krebs-Henseleit solution and the concentrations were expressed in molarity. Lead and sodium acetate were dissolved in acidified tap water as described above. L-arginine and enalapril was dissolved in tap water. The DMSA solution was freshly prepared by dissolving the compound in 5% NaHCO_3 (sodium bicarbonate).

Data Analysis and Statistics

The litter was considered to be the experimental unit in all statistical analyses performed. The concentration of vasoactive agent producing a response that was 50% of the maximum (EC50) was calculated in each experiment. Mean EC50s are

presented as means with 95% confidence intervals. The maximal responses, expressed as mean $\pm$ SEM, and the EC50 values were compared by two-way analysis of variance (SigmaStat 2.0). Lead and treatments were factors in the analysis. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. In order to test differences among means, Tukey-Kramer's multiple comparisons test was used. The other parameters (blood pressure, body weight, number of pups and lead determination) were compared by Mann-Whitney test (InStat 4.0).

RESULTS

Body Weight, Number of Pups, Blood Lead Concentration, and Blood Pressure

The Pb regimen employed in the present study did not affect body weight of dams and pups (Table 1). Similarly, the number of pups per litter was not altered by Pb exposure (control: 11.3 ± 0.4 , Pb: 10.5 ± 0.5 , $P > 0.05$; $n = 10-20$).

The levels of blood Pb in dams and 23, 52, 70 and 100-day old pups were significantly higher related to control groups (Table 2). After Pb discontinuation, the blood levels of Pb in the intoxicated pups decreased, but remained higher than the levels observed in controls. The different protocols of treatment determined a significant decrease in the Pb blood levels in 52 and 100-day old rats (Table 2). This decrease in the levels of Pb reached values similar to those observed in control rats of the same age, except for treatment with L-arginine where these levels have remained high related to control (Table 2).

Table 1. Body weights of dams and pups exposed or not to lead during pregnancy and lactation. treated or not with DMSA. L-arginine. enalapril or combination therapy

		Body weight (g)							
		Pregnancy				Lactation			
		0 day	21 day	1 day	21 day	1 day	21 day	52 day	Post- weaning age 70 day 100 day
Dams	Control	272.2 ± 6.2	378.8 ± 9.0	304.6 ± 7.0	276.9 ± 5.6	-	-	-	-
	Lead	269.0 ± 4.9	360.3 ± 8.1	293.1 ± 5.0	275.44 ± 5.3	-	-	-	-
Pups	Control	-	-	6.2 ± 0.2	39.1 ± 0.5	208.3 ± 0.2	323.1 ± 5.3	357.0 ± 2.7	
	Lead	-	-	5.8 ± 1.7	40.0 ± 1.2	198.6 ± 4.1	327.9 ± 8.6	357.1 ± 3.2	
	Lead/DMSA	-	-	-	41.2 ± 2.2	195.0 ± 2.2	326.8 ± 6.1	365.7 ± 1.7	
	Lead/L-arginine	-	-	-	43.0 ± 2.3	205.5 ± 2.3	325.4 ± 2.5	369.9 ± 2.2	
	Lead/enalapril	-	-	-	42.4 ± 1.8	194.8 ± 4.2	301.7 ± 2.4	351.1 ± 1.8	
	Combination therapy	-	-	-	43.0 ± 5.5	206.0 ± 8.5	314.7 ± 2.6	360.6 ± 1.2	

Values represent means ± SE. Number of animals = 20. P > 0.05.

Table 2. Blood lead concentration ($\mu\text{g/dl}$) of dams and pups, treated or not with DMSA, L-arginine, enalapril, and combination therapy

	Pb blood				
	Dams	23 day	52 day	Pups 70 day	100 day
Control	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0	< 5.0
Pb	53.39 $\pm$ 5.88*	35.61 $\pm$ 7.43*	-	-	-
Pb/water	-	-	19.98 $\pm$ 6.31*	13,15 $\pm$ 0,97**	11.17 $\pm$ 2.11**
Pb/DMSA	-	-	< 5.0 ^{\$}	-	< 5.0 ^{\$}
Pb/L-arginine	-	-	10.65 $\pm$ 2.12*	-	6.55 $\pm$ 3.29*
Pb/enalapril	-	-	< 5.0 ^{\$}	-	< 5.0 ^{\$}
Combination therapy	-	-	< 5.0 ^{\$}	-	< 5.0 ^{\$}

Values represent means $\pm$ SE. * P < 0.05 related to the respective control group. ** P < related to Pb 23 day group. ^{\$} P < 0.05 related to the respective Pb/water group. Number of animals = 5-6. Pb: 500 ppm lead acetate during pregnancy and lactation. The experimental animals have controls receiving sodium acetate by the same periods of intoxication. A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received DMSA, L-arginine, enalapril, or the combination of these compounds for 30 additional days. When administered, the 60 mg/kg dose of DMSA was given, orally by gastric gavage, twice a day (30 mg/kg) for 5 days per week. L-arginine (1.0%) was given in drinking water *ad libitum*. Enalapril was given in drinking water 5 mg/day/rat. Aged matched-controls received tap water.

The systolic blood pressure of pups showed gradual increase during postnatal development (Fig. 1 and 2). The values observed in Pb exposed rats were significantly higher when compared to control (Fig. 1 and 2).

In young rats, all treatments decreased the Pb-induced increase in blood pressure to near that of non intoxicated rats. This reversion in blood pressure took place at the age of 49, 35, 28 and 28 days, respectively for L-arginine, DMSA, enalapril and combination therapy (Fig. 1). Related to Pb-exposed adult rats, similar reversals in blood pressure were observed for L-arginine, enalapril, and the combination therapy at the age of 84, 84 and 77 days, respectively (Fig. 2). However, DMSA treatment decreased the Pb-induced increase in blood pressure to near that of non intoxicated rats, but not statistically different from values observed in intoxicated untreated rats (Fig. 2).

Young pups

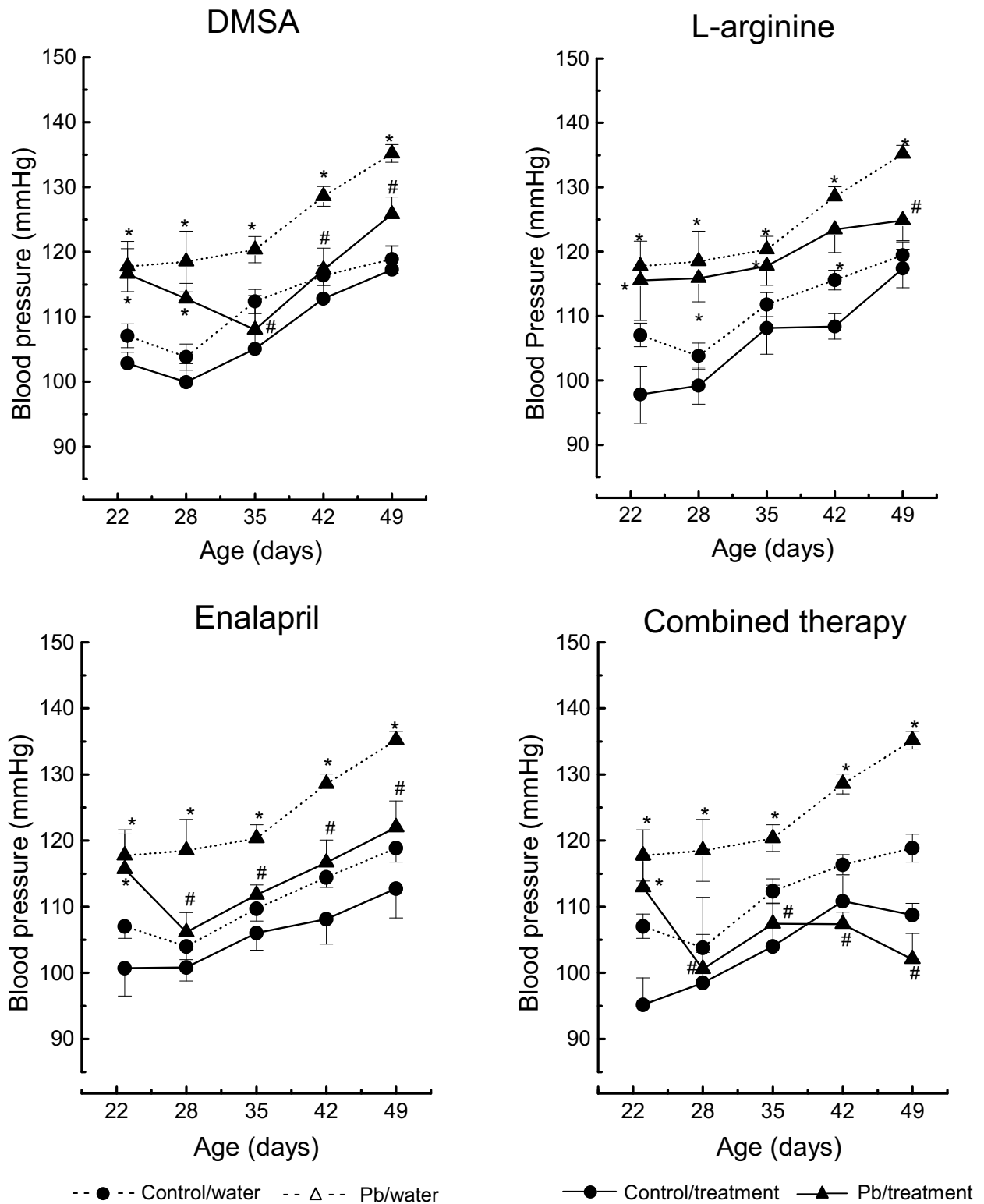


Figure 1. Temporal evolution of arterial blood pressure (mmHg) of pups with 52 days of age exposed or not to lead during pregnancy and lactation, treated or not with DMSA, L-arginine, enalapril or combination therapy. Values are mean $\pm$ SEM. *P < 0.05 related to control. #P < 0.05 related to Pb/water. Animal number range 5-20.

Adult pups

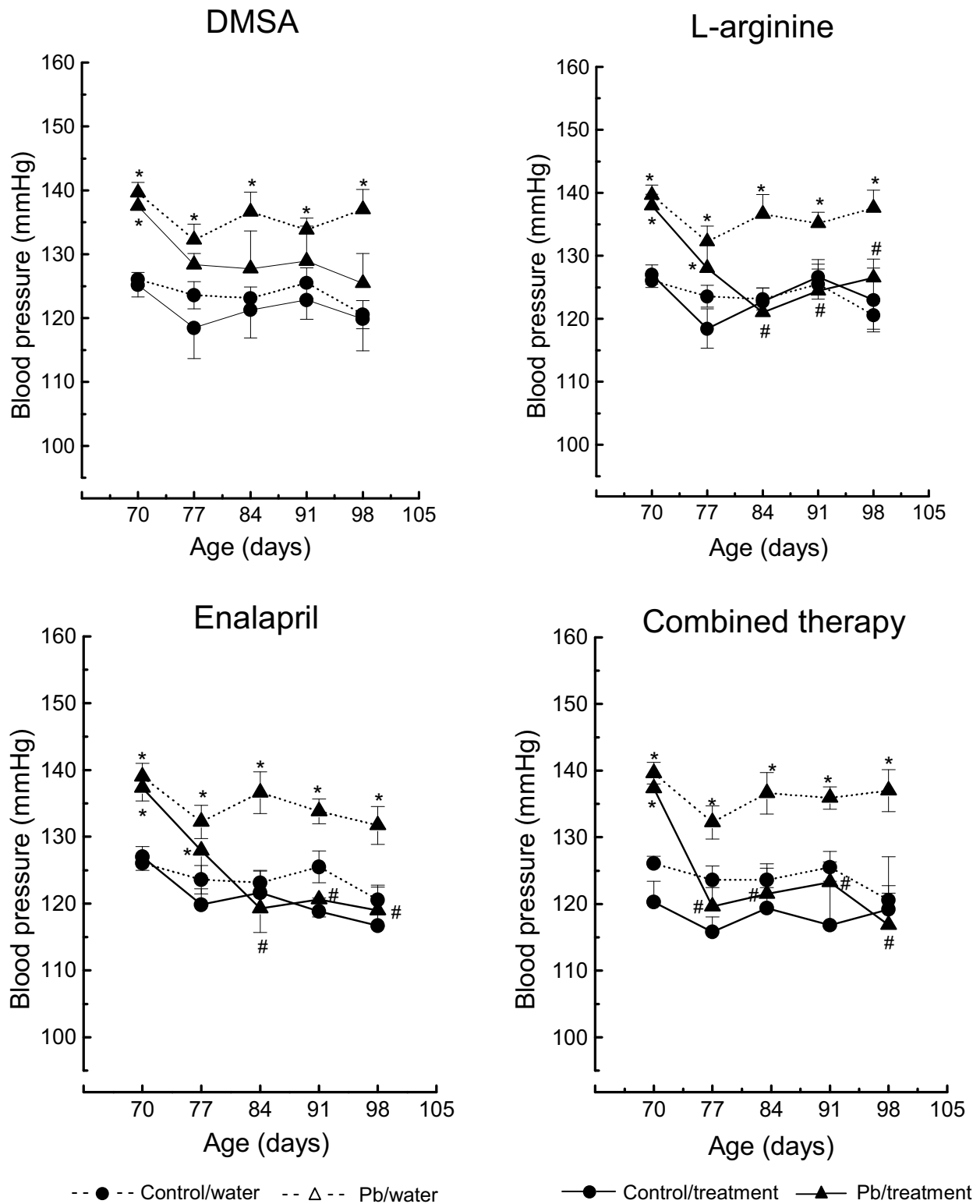


Figure 2. Temporal evolution of arterial blood pressure (mmHg) of pups with 100 days of age exposed or not to lead during pregnancy and lactation, treated or not with DMSA, L-arginine, enalapril or combination therapy. Values are mean $\pm$ SEM. *P < 0.05 related to control. #P < 0.05 related to Pb/water. Animal number range 5-27.

Vascular Reactivity

The reactivity of intact and denuded aorta was not altered by sodium acetate administration compared to rats that received tap water (data not shown). Gavage did not cause any change in vascular reactivity (data not shown). The different treatments and Pb exposure did not alter the reactivity to noradrenaline of denuded aortas (Figs. 3-7 and Tables 3-6).

The removal of the endothelium caused a leftward shift of the curve to noradrenaline that was similar in aortas from both controls and Pb-exposed rats, treated or not. This procedure also determined an increased maximum response to noradrenaline in aortas from the different experimental groups. After endothelium removal, the maximum response to NA was similar in aorta from all experimental groups (Figs 3-7 and Tables 3 and 5).

With regard to intact aortas, no change in the maximum response to noradrenaline was observed in 23 day-old pups exposed to Pb during pregnancy and lactation (Fig. 3 and Table 3). In contrast, an increase in the reactivity of intact aorta was observed in 52, 70 and 100 day-old rats perinatally exposed to Pb (Fig 3-7, and Table 3). Independently of the protocol, the sensitivity to noradrenaline did not differ in the aorta with endothelium (Figs 3-7 and Table 4 and 6).

The different treatments did not alter the reactivity to noradrenaline of intact aortas from non intoxicated rats (Figs. 4-7 and Tables 3-6). However, the data also demonstrated that L-arginine, DMSA, enalapril and combination therapy were effective in restoring Pb-induced increase in vascular reactivity to near that of the respective controls.

23 - day old pups

70 - day old pups

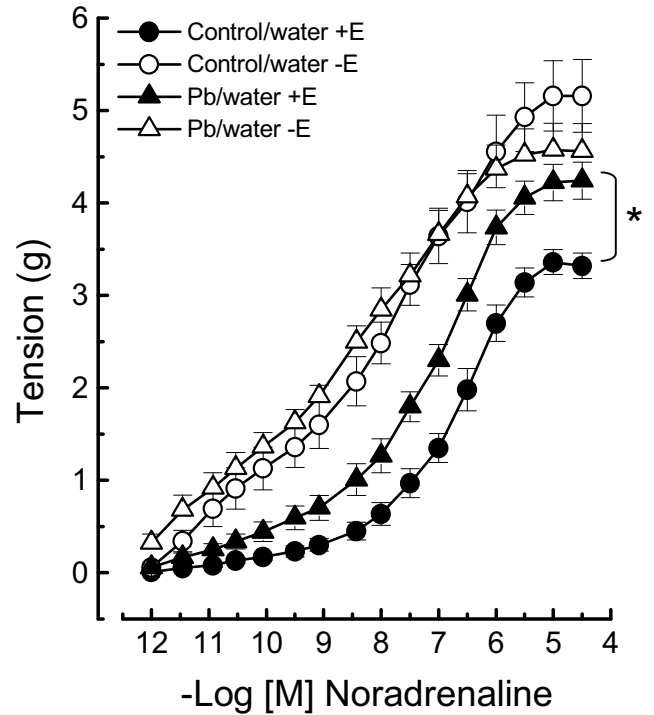
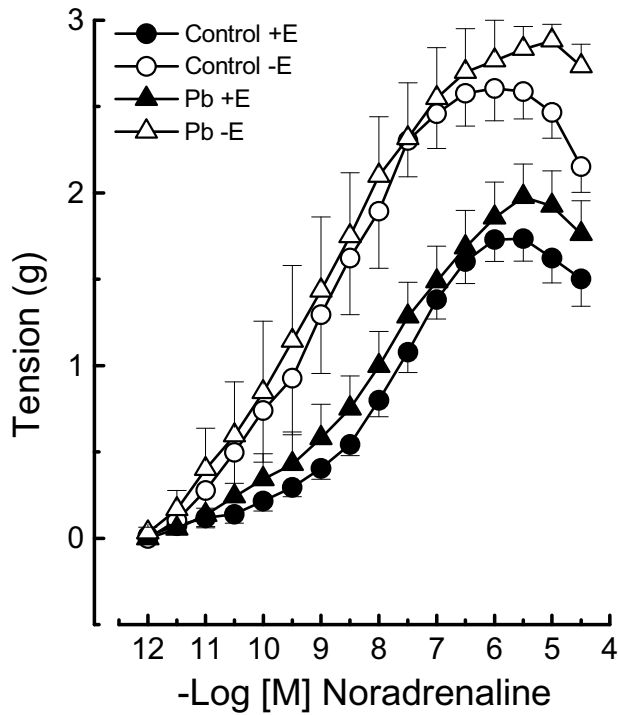
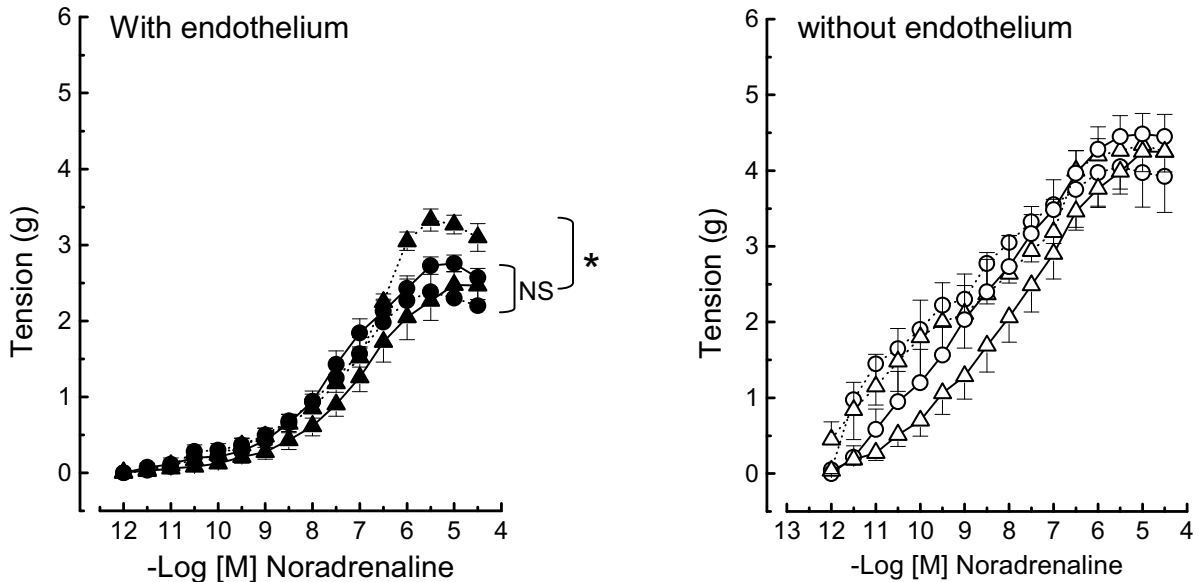


Figure 3. Curves to noradrenaline obtained in two rings, one with (full symbol) and the other without (empty symbol) endothelium, of the same thoracic aorta from rats exposed or not to lead during pregnancy and lactation. Values are mean $\pm$ SEM. Animal number range was 6-15. * $P < 0.05$ significant related to control.

Young pups

L-arginine



Enalapril

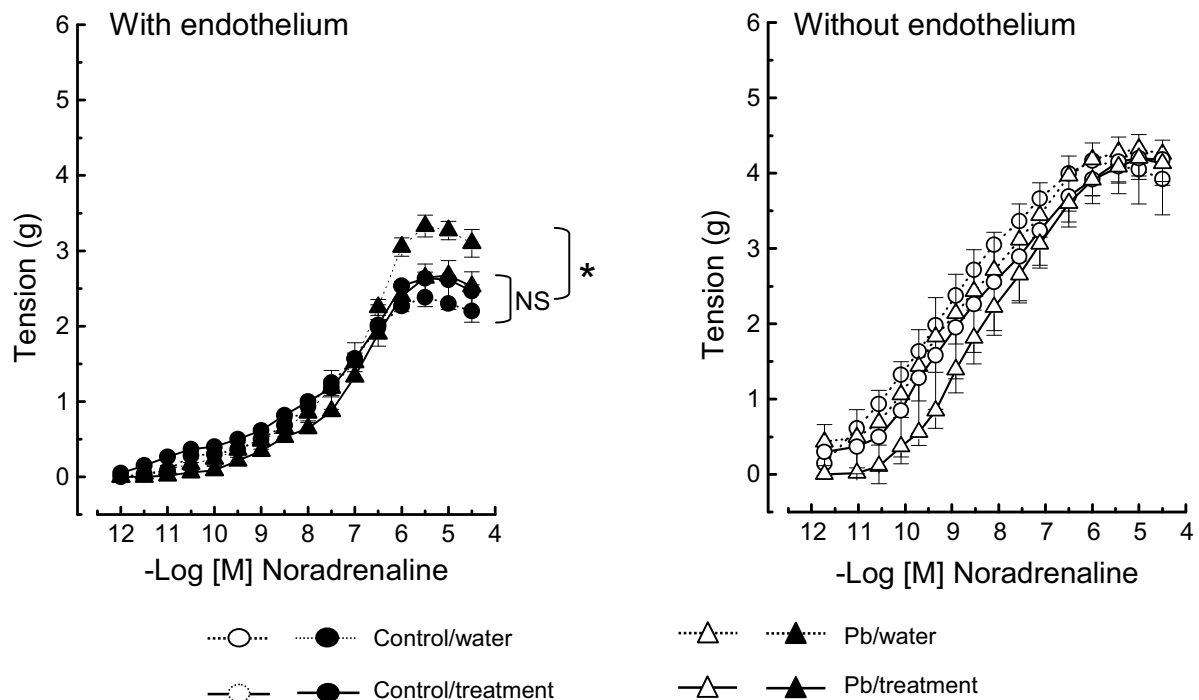
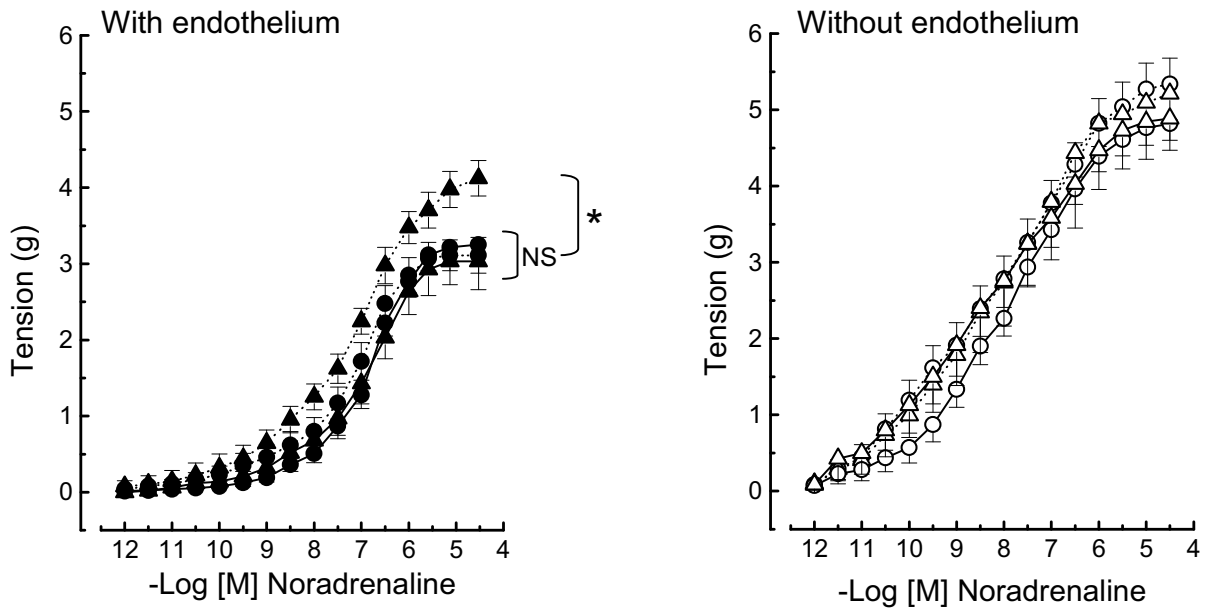


Figure 4. Curves to noradrenaline obtained in two rings, one with (full symbol) and the other without (empty symbol) endothelium, of the same thoracic aorta from rats exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with L-arginine or enalapril. Values are mean $\pm$ SEM. Animal number range was 5-12. * $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Adult pups

L-arginine



Enalapril

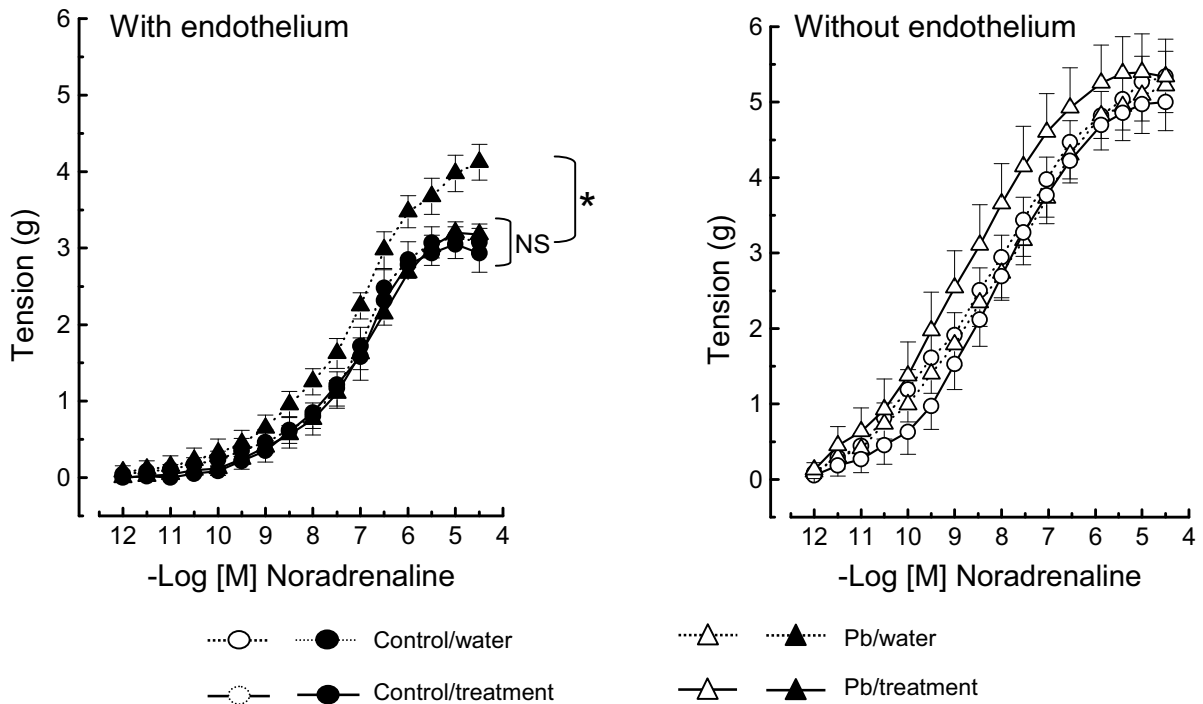
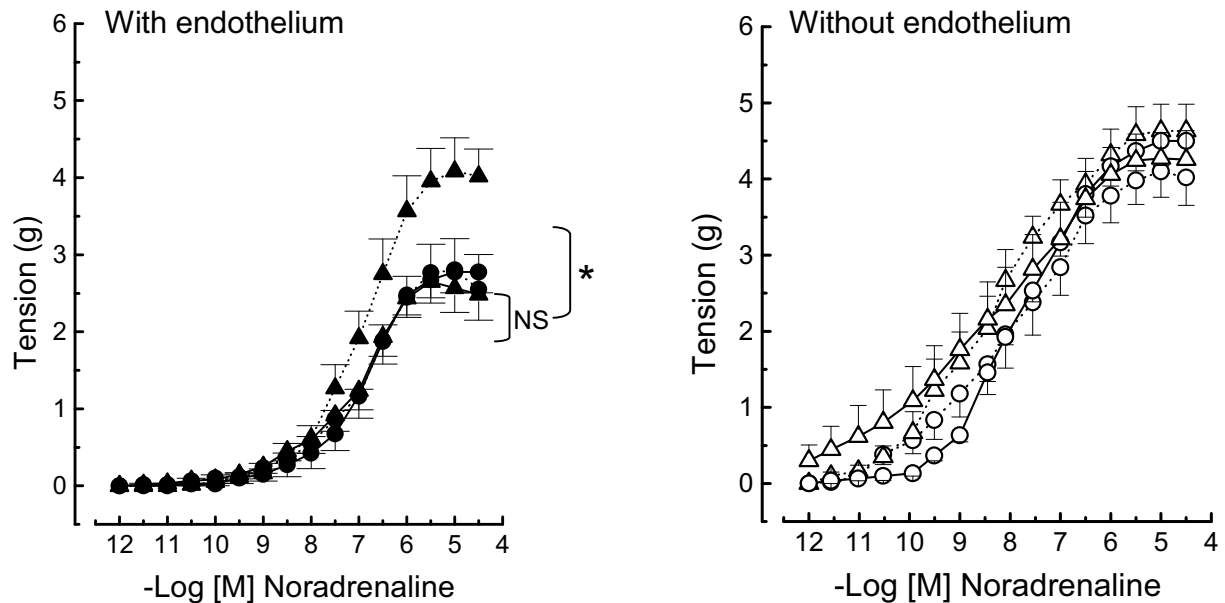


Figure 5. Curves to noradrenaline obtained in two rings, one with (full symbol) and the other without (empty symbol) endothelium, of the same thoracic aorta from rats exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with L-arginine or enalapril. Values are mean $\pm$ SEM. Animal number range was 5-14. * $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Young pups

DMSA



Combined therapy

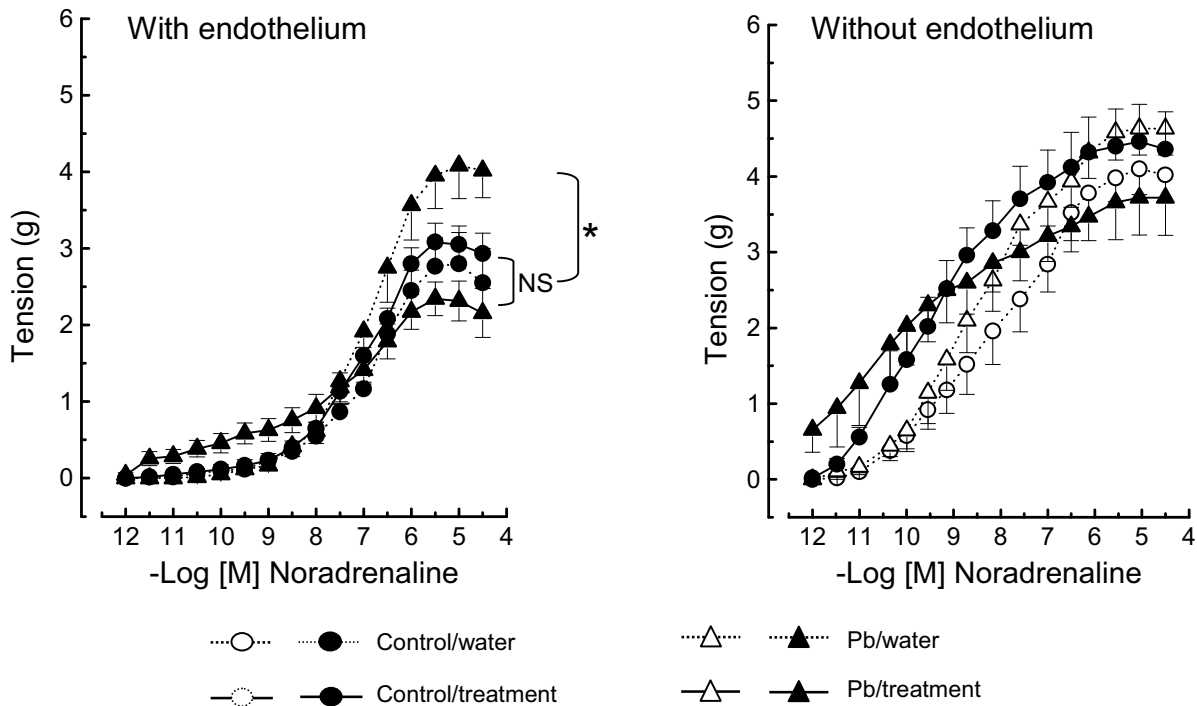
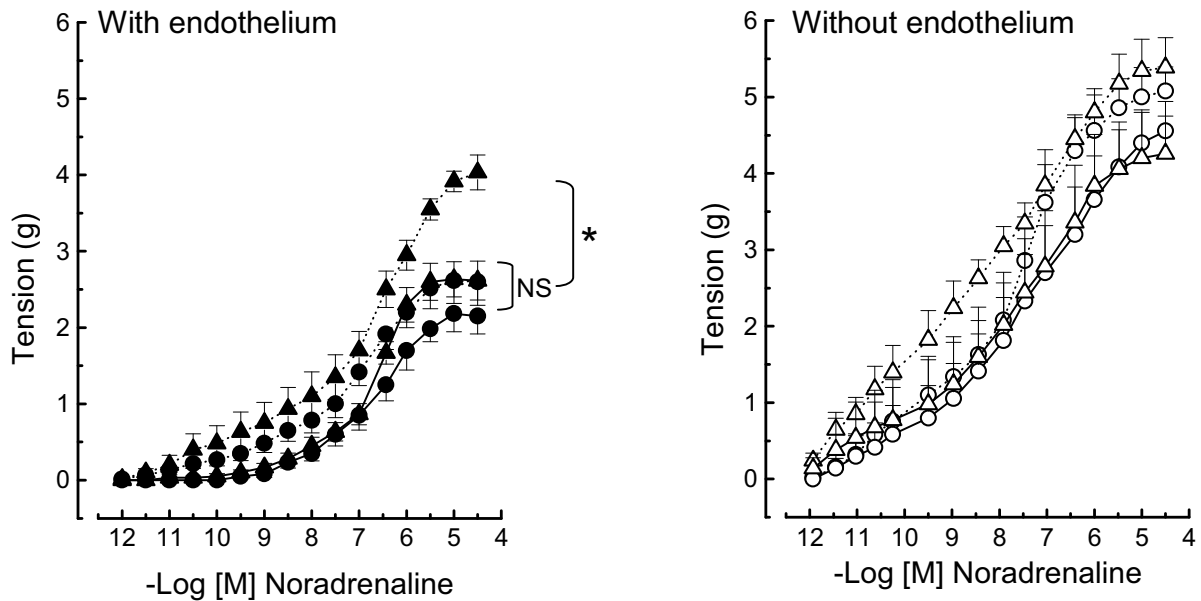


Figure 6. Curves to noradrenaline obtained in two rings, one with (full symbol) and the other without (empty symbol) endothelium, of the same thoracic aorta from rats exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with DMSA or combined therapy. Values are mean $\pm$ SEM. Animal number range was 5-7. * $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Adult pups

DMSA



Combined therapy

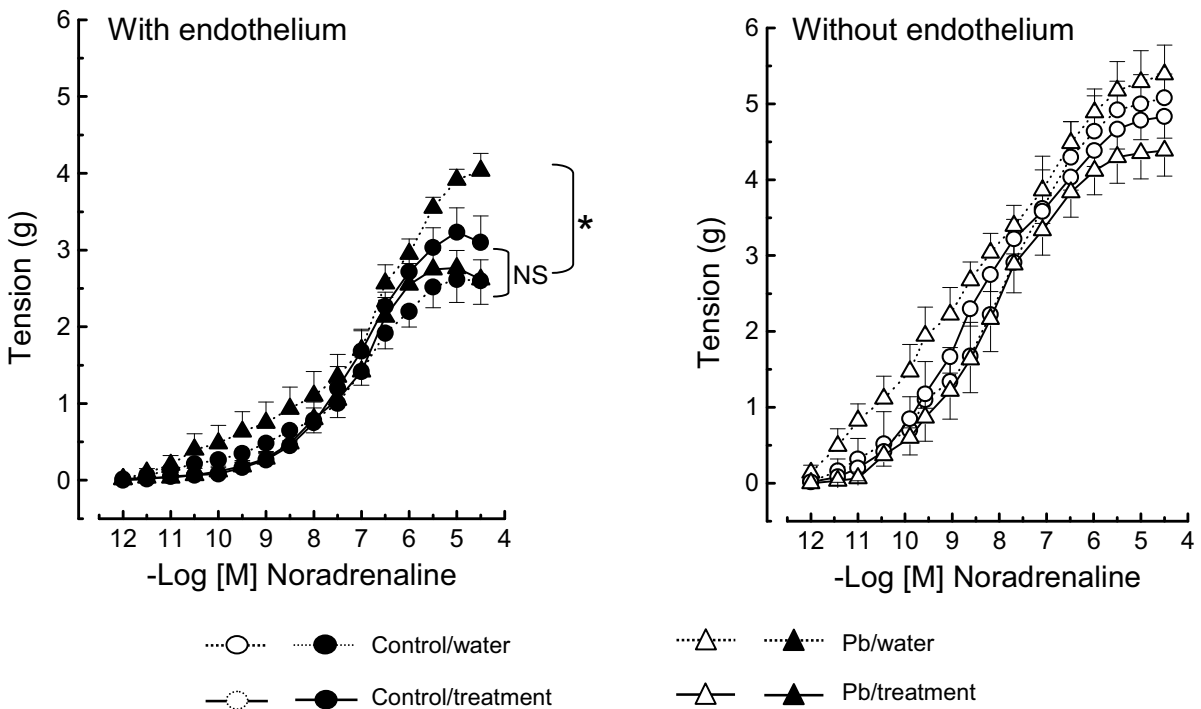


Figure 7. Curves to noradrenaline obtained in two rings, one with (full symbol) and the other without (empty symbol) endothelium, of the same thoracic aorta from rats exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with DMSA or combined therapy. Values are mean $\pm$ SEM. Animal number range was 5-8. * $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Table 3. Maximal responses to noradrenaline obtained in aortas with and without endothelium isolated from weaned and adult pups, exposed or not to lead during pregnancy and lactation, treated or not with L-arginine or enalapril

Groups		Maximum response (tension g)	
		With endothelium	Without endothelium
Not treated			
23 day	Control	1.79 ± 0.12	2.65 ± 0.17 ⁺
	Pb	2.06 ± 0.20	3.00 ± 0.11 ⁺
52 day	Control	2.38 ± 0.33	4.10 ± 0.41 ⁺
	Pb	3.43 ± 0.16*	4.50 ± 0.24 ⁺
70 day	Control	3.37 ± 0.13	5.19 ± 0.40 ⁺
	Pb	4.32 ± 0.18*	4.99 ± 0.29 ⁺
100 day	Control	3.22 ± 0.21	5.33 ± 0.34 ⁺
	Pb	4.21 ± 0.23*	5.21 ± 0.35 ⁺
Treated			
L-arginine			
52 day	Control	2.79 ± 0.10	4.52 ± 0.28 ⁺
	Pb	2.69 ± 0.13	4.31 ± 0.28 ⁺
100 day	Control	3.30 ± 0.23	4.82 ± 0.22 ⁺
	Pb	3.19 ± 0.40	4.94 ± 0.47 ⁺
enalapril			
52 day	Control	2.72 ± 0.36	4.23 ± 0.27 ⁺
	Pb	2.73 ± 0.19	4.25 ± 0.23 ⁺
100 day	Control	3.07 ± 0.19	5.00 ± 0.38 ⁺
	Pb	3.20 ± 0.08	5.60 ± 0.58 ⁺

Values are means ± SE. **P* < 0.05 related to the respective control group. ⁺*P* < 0.05 related to the respective aorta with endothelium. Number of animals = 5-14. Pb: 500 ppm lead acetate during pregnancy and lactation. The experimental animals have controls receiving sodium acetate by the same periods of intoxication. A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received L-arginine or enalapril for 30 additional days. L-arginine (1.0%) was given in drinking water *ad libitum*. Enalapril was given in drinking water 5 mg/day/rat. Aged matched-controls received tap water.

Table 4. EC50 values to noradrenaline obtained in aorta with and without endothelium isolated from weaned and adult pups, exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with L-arginine or enalapril

Groups		¹ C50 x 10 ⁻⁸ M	
		With endothelium	Without endothelium
Not treated			
23 day	Control	1.33 (0.52 – 3.41)	0.14 [*] (0.03 – 0.64)
	Pb	1.46 (0.44 – 4.86)	0.11 [*] (0.01 – 3.75)
52 day	Control	1.95 (0.35 – 10.84)	0.01 [*] (6.35 – 2.75)
	Pb	10.95 (5.91 – 20.28)	0.01 [*] (4.16 – 0.34)
70 day	Control	15.90 (7.14 – 35.40)	0.50 [*] (0.07 – 3.64)
	Pb	4.76 (1.70 – 13.30)	0.13 [*] (0.04 – 0.42)
100 day	Control	8.48 (4.61 – 15.59)	0.56 [*] (0.14 – 2.19)
	Pb	4.29 (0.89 – 20.74)	0.38 [*] (0.07 – 1.97)
Treated			
L-arginine			
52 day	Control	3.31 (1.50 – 7.34)	0.16 [*] (0.01 – 2.90)
	Pb	10.05 (4.14 – 37.27)	0.85 [*] (0.10 – 7.52)
100 day	Control	8.89 (5.46 – 14.49)	0.92 [*] (0.32 – 2.63)
	Pb	8.56 (2.34 – 31.40)	0.09 [*] (0.02 – 0.43)
enalapril			
52 day	Control	3.04 (0.40 – 23.39)	0.04 [*] (1.84 – 8.70)
	Pb	6.15 (1.31 – 28.91)	0.62 [*] (0.10 – 3.80)
100 day	Control	5.36 (1.04 – 27.54)	0.41 [*] (0.06 – 2.59)
	Pb	9.41 (2.95 – 30.06)	0.12 [*] (0.02 – 0.93)

¹EC50: concentration producing half-maximum response. Values represent means with 95% confidence intervals. *P< related to the respective aorta with endothelium. Number of animals = 5-14. Pb: 500 ppm lead acetate during pregnancy and lactation. The experimental animals have controls receiving sodium acetate by the same periods of intoxication. A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received L-arginine or enalapril for 30 additional days. L-arginine (1.0%) was given in drinking water *ad libitum*. Enalapril (5 mg/day/rat) was given in drinking water. Aged matched-controls received tap water.

Table 5. Maximal responses to noradrenaline obtained in aortas with and without endothelium isolated from weaned and adult pups, exposed or not to lead during pregnancy and lactation, treated or not with DMSA or combined therapy DMSA/L-arginine/enalapril

Groups		Maximum response (tension g)	
		With endothelium	Without endothelium
Not treated			
52 day	Control	2.82 ± 0.40	4.10 ± 0.41 ⁺
	Pb	4.25 ± 0.40*	4.70 ± 0.34
100 day	Control	2.68 ± 0.27	5.12 ± 0.35 ⁺
	Pb	4.10 ± 0.18*	5.39 ± 0.39 ⁺
Treated			
DMSA			
52 day	Control	2.78 ± 0.27	4.50 ± 0.32 ⁺
	Pb	2.67 ± 0.28	4.31 ± 0.36 ⁺
100 day	Control	2.27 ± 0.22	4.55 ± 0.38 ⁺
	Pb	2.80 ± 0.22	4.28 ± 0.48 ⁺
combined therapy			
52 day	Control	3.08 ± 0.25	4.90 ± 0.28 ⁺
	Pb	2.40 ± 0.26	3.90 ± 0.56 ⁺
100 day	Control	3.23 ± 0.32	4.83 ± 0.29 ⁺
	Pb	2.78 ± 0.23	4.40 ± 0.34 ⁺

Values are means ± SE. **P* < 0.05 related to the respective control group. ⁺*P* < 0.05 related to the respective aorta with endothelium. Number of animals = 5-8. Pb: 500 ppm lead acetate during pregnancy and lactation. The experimental animals have controls receiving sodium acetate by the same periods of intoxication. A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received DMSA or combined therapy for 30 additional days. Combined therapy: L-arginine (1.0%, in drinking water) + Enalapril (5 mg/day/rat, in drinking water) + DMSA (60 mg/kg/day). DMSA was given, orally by gastric gavage, twice a day (30 mg/kg). Aged matched-controls received tap water.

Tabela 6. EC50 values to noradrenaline obtained in aorta with and without endothelium isolated from weaned and adult pups, exposed or not to lead during pregnancy and lactation treated or not with DMSA or combined therapy DMSA/L-arginine/enalapril

Groups		¹ C50 x 10 ⁻⁸ M	
		With endothelium	Without endothelium
Not treated			
52 days	Control	9.04 (3.58 – 22.86)	1.28* (0.13 – 12.33)
	Pb	11.51 (5.29 – 25.06)	0.27* (0.04 – 2.02)
100 days	Control	7.86 (2.20 – 28.05)	1.05* (0.03 – 34.91)
	Pb	15.41 (2.79 – 31.47)	6.52* (0.04 – 0.96)
Treated			
DMSA			
52 days	Control	13.68 (5.73 – 32.66)	1.39* (0.24 – 8.10)
	Pb	9.12 (3.82 – 21.78)	0.17* (0.01 – 6.71)
100 days	Control	18.06 (4.42 – 73.79)	3.51* (0.36 – 34.12)
	Pb	27.58 (11.61 – 65.61)	1.18* (0.01 – 154.17)
Associação			
52 days	Control	7.09 (3.71 – 13.52)	0.03* (0.01 – 0.78)
	Pb	5.05 (2.81 – 9.09)	0.01* (1.01 – 2.33)
100 days	Control	7.04 (2.20 – 22.54)	0.47* (0.12 – 1.80)
	Pb	9.72 (1.57 – 30.26)	0.62* (0.01 – 3.97)

¹EC50: concentration producing half-maximum response. Values represent means with 95% confidence intervals. *P< related to the respective aorta with endothelium. Number of animals = 5-14. Pb: 500 ppm lead acetate during pregnancy and lactation. The experimental animals have controls receiving sodium acetate by the same periods of intoxication. A group of pups with 22 and 70 days of age intoxicated or not with Pb during perinatal life received DMSA or combined therapy for 30 additional days. Combined therapy: L-arginine (1.0%, in drinking water) + Enalapril (5 mg/day/rat, in drinking water) + DMSA (60 mg/kg/day). DMSA was given, orally by gastric gavage, twice a day (30 mg/kg). Aged matched-controls received tap water.

DISCUSSION

Public health authorities use high levels to define blood lead levels of concern in nonpregnant females (40 µg/dl, adult reference value in many countries).

In humans, the CDC's Adult Blood Lead Epidemiology and Surveillance program - United States, 2004 reported that 0.08 per 100,000 occupationally exposed females aged 16-44 years had blood lead levels ≥ 40 µg/dl (CDC, 2007). If a policy of universal screening were employed, the number of reported cases would be substantially higher.

We must recognize that a significant proportion of nonpregnant females with blood lead levels ≥ 40 µg/dl will become pregnant and potentially expose their infants to a risk of adverse health effects from lead. Maternal and fetal blood lead levels are nearly identical because lead crosses the placenta unencumbered. This has provoked concern about elevated blood lead levels among all females of childbearing age because a great proportion of pregnancies are unplanned. Finally, pregnant women without symptoms frequently remain in contact with the source of exposure during pregnancy and lactation, especially in developing countries.

In 2002, a total of 10,658 adults with blood lead levels of ≥ 25 µg/dl were reported to the CDC (CDC 2007). Of these, 1,854 had levels of ≥ 40 µg/dl. These numbers are likely to underestimate the true magnitude of the problem because many workers who should be in employer-sponsored surveillance programs to follow their blood lead concentrations are not well monitored.

The severity of effects and the extent to which the cardiovascular system is affected by Pb appear to be influenced most directly by Pb concentration and the duration of Pb exposure in addition to factors including route of exposure, individual life phase, temperature, and dietary calcium intake level (Kopp *et al.*, 1988; Vaziri and Gonick, 2008). In the present work we investigated the vascular alterations in rats exposed to Pb during pregnancy and lactation from dams with blood Pb levels around 50 µg/dl. The Pb exposure regimen employed in the present study caused no effect on the weight of dams and pups at birth, weaning and postnatal life or on the number of pups per litter. All animals appeared healthy and none of them showed signs of toxicity.

However, the same protocol of Pb exposure determined an increase in systolic blood pressure associated with vascular reactivity alterations. These results confirm previous reports showing a positive association between blood lead levels and arterial hypertension (Malvezzi *et al.*, 2001; Prozialeck *et al.*, 2008; Vaziri and Gonick, 2008). Behavioral and neurochemical alterations have also been reported in rats presenting similar blood Pb levels (Deng and Poretz, 2001; Devoto *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001).

Vascular endothelial and smooth muscle cells are principal components of blood vessels and the way as Pb affects these structures was the goal of the present study. The literature reports that alterations in the balance of the endothelial contracting and relaxing factors contribute to the hypertension associated with plumbism. A decrease in the vasodilator component, NO, and an increase in the vasoconstrictor components, endothelin-3 and natriuretic hormone

as responsible for arterial hypertension in low-level lead exposed rats have been reported (Kalil-Manesh *et al.*, 1993; Heydari *et al.*, 2006; Patrick, 2006a; Grizzo and Cordellini, 2008). The present findings corroborate these reports since the hypertension induced by perinatal Pb exposure was shown to be associated with an increase in the vascular reactivity to noradrenaline. Moreover, this hyperactivity was a consequence of an endothelial cell dysfunction, since the endothelium removal abolished this effect.

Vascular smooth muscle alterations in lead-induced hypertension have also been reported in the literature, and were shown to be associated with: 1) alteration in calcium exchangeability or distribution, leading to an elevation of intracellular calcium (Piccinini *et al.*, 1977; Kopp *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1995); 2) interaction with protein Kinase C (Watts *et al.*, 1995); 3) an inhibitory effect of Pb on the transport enzyme, sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase (Na,K-ATPase) (Weiler *et al.*, 1990) (which contains SH-groups to which lead binds avidly) (Hart and Titus, 1973), leading to impaired transport of sodium, and secondarily of calcium, out of vascular smooth muscle cells; and 4) an inhibitory or stimulatory effect on various blood pressure-related humoral factors (Kalil-Manesh *et al.*, 1993). However, in the present study no vascular smooth muscle alteration was observed after perinatal Pb-exposure. This controversy could be due to differences in the Pb-exposure protocols related to doses and/or period of exposure.

Another interesting observation was the time-dependent expression of the vascular reactivity alterations induced by perinatal Pb exposure during the postnatal life since 52, 70 and 100 day-old rats but not 23-day old pups presented

these alterations. Probably, at this age, the hypertensive state induced by the perinatal Pb exposure has been due to the presence of circulating factor (s) and hemodynamic changes.

The ongoing and widespread problem of Pb intoxication is treated first by removing the individual from the Pb-contaminated environment and thereafter by administering a Pb^{2+} chelating agent. A new trend in toxic metals therapy has also emerged recently, which is to use combination therapy instead of monotherapy with chelating agents (Kalia and Flora, 2005; Patrick, 2006a; Flora *et al.*, 2008). Vitamins, essential metals or aminoacid supplementation during chelation therapy has been found to be beneficial in increasing metal mobilization and providing recovery in a number of altered physiological variables (Kalia and Flora, 2005). Combination therapy is a new and novel strategy.

Similarly to previous data from our laboratory (Malvezzi *et al.*, 2001), the body Pb burden was significantly reduced simply by removing the Pb source although these levels have not reached the values observed in rats not exposed to Pb. In addition, this procedure was ineffective to recover the vascular reactivity and blood pressure alterations induced by perinatal Pb exposure. Taking into consideration these results, we evaluated the therapeutic potential of DMSA (chelating agent), L-arginine (the NO precursor) (Mayer and Hemmes, 1997) enalapril (angiotensin converting enzyme), either individually or in combination, on both Pb mobilization and cardiovascular adverse effects of perinatal Pb intoxication.

DMSA, enalapril and the combined therapy but not L-arginine were more effective than the cessation of Pb administration in decreasing significantly blood Pb levels. These data confirm previous reports from our laboratory demonstrating

that L-arginine treatment is ineffective in decreasing blood Pb levels (Malvezzi *et al.*, 2001). The mobilization of Pb from tissues can provoke an undesirable redistribution (Cory-Slechta *et al.*, 1987). This may explain the maintenance of high levels of Pb in blood after the L-arginine treatment which was capable of mobilizing Pb from tissues like femur, liver and kidney (Malvezzi *et al.*, 2001).

DMSA is a water-soluble compound that forms a strong complex with Pb^{2+} in blood, which is thereafter secreted via the kidney (Hamidinia *et al.*, 2006). The literature has also shown that sulfur amino acids such as methionine and cysteine, and amino acids metabolically related to them, increase the bioavailability of glutathione, which is useful in chelating Pb, counteracting the toxic effects of the metal and may be used as supportive therapy (Kachru *et al.*, 1989; Quig 1998). Moreover, in metalloregulatory proteins, metals are often conveniently located at binding sites and bound to cysteine residues. Several lines of evidences indicate that cysteine-rich metal-binding proteins, as well as redox-sensitive metal clusters of metalloproteins, are natural sensors of bioradicals like NO (Drapier and Bouton, 1996). In fact, Misra *et al.* (1996) showed that NO mediates cadmium release from metallothionein. Thus, an increase in NO levels by L-arginine treatment might displace Pb from its cell binding sites.

An interesting observation was that treatment with enalapril was capable of reducing blood Pb levels that reached values of those observed in nonintoxicated rats. These results could be explained by an increase in Pb excretion, as a result of increased glomerular filtration rate related to the inhibition of the angiotensin converting enzyme.

Related to the cardiovascular effects, all treatments, individually or in combination, were able to restore the vascular reactivity alterations induced by perinatal Pb exposure, independently of postnatal age. We speculate that lead-induced vascular reactivity alterations may be caused by diminished NO and by one species of ROS, and that provision of additional NO, through administration of the substrate L-arginine, acts to scavenge the ROS and/or acts directly as a vasodilator. In addition, besides the chelating action, DMSA also presents a scavenger action of ROS that may contribute to improve the vascular reactivity alterations induced by Pb-exposure (Khalil-Manesh *et al.*, 1994; Patrick, 2006b). Some other reported mechanisms by which Pb could contribute to the development of arterial hypertension are the increase in the activity of angiotensin converting enzyme and the increase in the levels of plasma renin, angiotensin II, aldosterone and kininase I and II (Prozialeck *et al.*, 2008, Vaziri, 2008). In the present study, the renin-angiotensin system inhibitor, enalapril, normalized the functional changes in vascular reactivity induced by perinatal Pb exposure. This result corroborates previous studies showing that strategies that interrupt the renin-angiotensin system have also been shown to reduce the cardiovascular alterations in a variety of hypertensive states (Baluchnejadmojarad *et al.*, 2004; Ceravolo *et al.*, 2007).

The sustained increase in systolic blood pressure observed in weaned, young and adult rats perinatally exposed to Pb confirms previous reports in the literature showing that arterial hypertension is associated with plumbism (Patrick, 2006a; Prozialeck *et al.*, 2008; Vaziri, 2008; Vaziri and Gonick, 2008).

Related to temporal evolution, L-arginine showed an increased latency for the expression of beneficial effects on blood pressure in young rats related to adult ones. Despite of that L-arginine treatment was shown to be more effective in reverse the blood pressure of adult rats than DMSA treatment. Moreover, enalapril treatment showed a lower latency than L-arginine for the expression of beneficial effects on blood pressure in young rats. Finally, the combined therapy employed in the present study induced an earlier restoration in blood pressure of Pb-exposed rats compared to the isolated treatments, independently of age. One possible explanation would be the additional effect of L-arginine, the NO precursor, the effects of DMSA, a chelating agent and scavenger of ROS, and enalapril, a renin-angiotensin system inhibitor, on blood pressure. However, differently from the other therapies, the isolated treatment with DMSA was not effective in completely normalizing the blood pressure of adult Pb-exposed rats. This result corroborates previous data from our laboratory showing that 30-day DMSA treatment is unable to completely abolish the sustained increase in systolic blood pressure observed in rats exposed to Pb during adult life (Malvezzi *et al.*, 2001). Contrarily, reports from the literature have shown that DMSA treatment is capable of abolishing Pb-induced hypertension (Khalil-Manesh *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1998). This discrepancy may be due to differences in the protocols related to the doses and duration of the treatment, since these parameters are important in reversing Pb-induced hypertension (Pappas *et al.*, 1995).

Most of the conventional chelators are compromised with many side effects particularly their binding to essential metals within the system which reduce their efficacy and there is no safe and effective treatment available for Pb poisoning

(Khalia and Flora, 2005; Flora *et al.*, 2008). Thus, the combined therapy used could play a significant and important role in abating the number of toxic effects of Pb compared to isolated treatments beside their impressive effects in terms of recovery in reduction of blood pressure.

Finally, results of this study represent a new approach to the development of a new therapeutic protocol for the treatment of lead intoxication.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Mr. Alaor Aparecido Almeida for his technical assistance in lead blood determination, and the assistance of the CEATOX-IB-UNESP for the determination of Pb in the plasma. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process numbers: 03/06760-5 and 04/00640-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROAP).

REFERENCES

- Athanasopoulos, N. Flame Methods Manual GBC for Atomic Absorption (1994), Victoria, Australia, p1-11.
- Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., and Imani, A. (2004). Protective effect of enalapril on vascular reactivity of the rat aorta. *Vasc. Pharmacol.* **40**, 301-307.
- Bost, L., Primatesta, P., Dong, W., and Poulter, N. (1999). Blood lead and blood pressure: evidence from the Health Survey for England. *J. Hum. Hypertens.* **13**, 123-128.

CDC. Center for Disease Control and Prevention (2007). Lead exposure among females of childbearing age – United States, 2004. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **56**, 397-400.

Ceravolo, G. S., Franco, M. C., Carneiro-Ramos, M. S., Barreto-Chaves, M. L., Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B., and Carvalho, M. H. (2007). Enalapril and losartan restored blood pressure and vascular reactivity in intrauterine undernourished rats. *Life Sci.* **80**, 782-787.

Cory-Slechta, D. A., Weiss, B., and Cox, C. (1987). Mobilization and distribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 804-813.

Dearth, R. K., Hiney, J. K., Srivastava, V., Burdick, S. B., Bratton, G. R., and Dees, W. L. (2002). Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reprod. Toxicol.* **16**, 343-352.

Deng, W., and Poretz, R. D. (2001). Lead exposure affects levels of galactolipid metabolic enzymes in the developing rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 98-107.

Devoto, P., Flore, G., Ibba, A., Fratta, W., and Pani, L. (2001). Lead intoxication during intrauterine life and lactation but not during adulthood reduces nucleus accumbens dopamine release as studied by brain microdialysis. *Toxicol. Lett.* **19**, 199-206.

Ding, Y., Vaziri, N. D., and Gonick, H. C. (1998). Lead-induced hypertension II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res.* **76**, 107-113.

Drapier, J. C., and Bouton, C. (1996). Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. *Bioessays*. **18**, 549-556.

Flora, S. J., Mittal, M., and Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*. **128**, 501-523.

Fujiwara, Y., Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M., and Kozuka, H. (1995).

Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* **98**, 105-110.

Glenn, B. S., Stewart, W. F., Links, J. M., Todd, A. C., and Schwartz, B. S. (2003).

The longitudinal association of lead with blood pressure. *Epidemiology* **14**, 30-36.

Grizzo, L.T., and Cordellini, S. (2008). Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol. Sci*. **103**, 207-214.

Hamidinia, S. A., Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Steinbaugh, G. E., Taylor, R. W., and Pfeiffer, D. R. (2006). Monensin improves the effectiveness of meso-dimercaptosuccinate when used to treat lead intoxication in rats. *Environ. Health Perspect.* **114**, 484-493.

Hart, W. M., and Titus, E. O. (1973). Sulfhydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*. **248**, 4674-4681.

Heydari, A., Norouzzadeh, A., Khoshbaten, A., Asgari, A., Ghasemi, A., Najafi, S., and Badalzadeh, R. (2006). Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol. Lett.* **166**, 88-94.

Kachru, D. N., Khandelwal, S., and Tandon, S., K. (1989). Influence of methionine supplementation in chelation of lead in rats. *Biomedical and Environmental Sciences* **2**, 265-270.

Kaji, T., Fujiwara, Y., Hoshino, M., Yamamoto, C., Sakamoto, M., and Kozuka, H. (1995). Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* **95**, 87-92.

Kalia, K., and Flora, S. J. (2005). Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health*. **47**, 1-21.

Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Weiler, E. W. J., Prins, B., Weber, M. A., Purdy, R. and Ren, Q. (1994). Effects of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. *Environmental Research* **65**, 86-99.

Khalil-Manesh, F., Gonick, H. C., Weiler, E. W., Prins, B., Weber, M. A., and Purdy, R.E. (1993). Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am. J. Hypertens*. **6**, 723-729.

Kopp, S. J., Barron, J. T., and Tow, J. P. (1988). Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ. Health Perspect.* **78**, 91-99.

Lasley, S. M., and Lane, J. D. (1988). Diminished regulation of mesolimbic dopaminergic activity in rat after chronic inorganic lead exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **95**, 474-483.

Malvezzi, C. K., Moreira, E. G., Vassilieff, I., Vassilieff, V. S., and Cordellini, S. (2001). Effect of L-arginine, dimercaptosuccinic acid (DMSA) and the association of L-arginine and DMSA on tissue lead mobilization and blood pressure level in plumbism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1341-1346.

Marques, M., Millás, I., Jiménez, A., García-Colis, C., Rodríguez-Feo, J. A., Velasco, S., Barrientos, A., Casado, S., and López-Farré, A. Alteration of the

soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead – induced hypertension in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2594-2600.

Mayer, B., and Hemmes, B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences* **22**, 477-481.

Misra, R. R., Hochadel, J. F., Smith, G. T., Cook, J. C., Waalkes, M. P. and Wink, D. A. (1996). Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chemical Research in Toxicology* **9**, 326-332.

Moreira, E. G., Rosa, G. J., Barros, S. B., Vassillieff, V. S., and Vassilieff, I. (2001a). Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*. **169**, 145-151.

Moreira, E. G., Vassilieff, I., and Vassillieff, V. S. (2001b). Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol. Teratol.* **23**, 489-495.

Pappas, J.B., Ahlquist, J.T., Allen, E.M., and Banner Jr. W. (1995). Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 121-129.

Patrick, L. (2006a). Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* **11**, 2-22.

Patrick, L. (2006b). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* **11**, 114-127.

Piccinini, F., Favalli, L., and Chiari, M. C. (1977). Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology*. **8**, 43-45.

- Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Nebert, D. W., Woods, J. M., Barchowsky, A., and Atchison, W. D. (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sc.* **102**, 207-218.
- Purdy, R. E., Smith, J. R., Ding, Y., Oveisi, F., Vaziri, N. D., and Gonick, H. C. (1997). Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am. J. Hypertens.* **10**, 997-1003.
- Quig, D. (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alternative Medicine Review* **3**, 262-270.
- Skoczynska, A., Juzwa, W., Smolik, R., Szechinski, J., and Behal, F. J. (1986). Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology* **39**, 275-289.
- Tsao, D. A., Yu, H. S., Cheng, J. T., Ho, C. K., and Chang, H. R. (2000). The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**, 127-133.
- Vaziri, N. D. (2008). Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H454-H465.
- Vaziri, N. D., and Gonick, H. C. (2008). Cardiovascular effects of lead exposure. *Indian J Med Res.* **128**, 426-35.
- Victory, W., Vander, A. J., Shulak, J. M., Schoeps, P., and Julius, S. (1982). Lead, hypertension, and the renin-angiotensin system in rats. *J. Lab. Clin. Med.* **99**, 354-362.
- Wang, J., Wu, J., and Zhang, Z. (2006). Oxidative Stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg.* **50**, 405-409.

Watts, S. W., Chai, S., and Webb, R. C. (1995). Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C.

Toxicology **99**, 55-65.

Weiler, E., Khalil-Manesh, F., and Gonick, H. (1990). Effects of lead and low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci (Lond)*. **79**, 185-192.

**Hipertensão Induzida por Exposição Perinatal ao Chumbo: Papel das
Vias NO/GMPc, AMPc e atividade da Na⁺-K⁺ ATPase**

**Hypertension induced by perinatal lead exposure: role of NO/GMPc
and AMPc pathways and Na⁺-K⁺ ATPase activity**

Pb-exposure, NO/GMPc, AMPc e Na⁺-K⁺ ATPase

Fresneda da Silva¹, Andréia; Cordellini*, Sandra²

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina; ²Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências - São Paulo State University - UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

Parte da Tese “*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*”, submetida por Andréia Fresneda da Silva ao Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2009, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

***Endereço para correspondência:** Dr. Sandra Cordellini. Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, 18618-000, Rubião Júnior s/n, Botucatu, São Paulo, Brasil, Fax. +55-14-3815-3744, Tel. +55-14-3811-6253. E-mail cordelli@ibb.unesp.br

RESUMO

A exposição ao chumbo (Pb) exerce papel relevante no desenvolvimento da hipertensão arterial. Sabe-se que as vias NO/GMPc e AMPc e a Na⁺-K⁺ ATPase participam na modulação do tono e da contratilidade do músculo liso vascular. Investigou-se as alterações de pressão arterial (PA) e de reatividade vascular à acetilcolina, ao nitroprussiato e ao isoproterenol, bem como a atividade funcional da Na⁺/K⁺ ATPase vascular de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao Pb nos períodos pré-natal e de amamentação, com enfoque sobre a célula endotelial. Para tanto, curvas concentração-efeito à acetilcolina, nitroprussiato, isoproterenol e potássio foram obtidas em anéis de aorta torácica com e sem endotélio de ratos recém-desmamados e adultos expostos ao chumbo durante a prenhez e amamentação. A exposição perinatal ao Pb determinou hipertensão arterial em proles recém-desmamadas [PA (mmHg): controle 107,1 ± 1,8; Pb 117,8* ± 3,9] e proles adultas [PA (mmHg): controle 126,1 ± 1,1; Pb 139,6* ± 1,6], associada a uma diminuição de sensibilidade ao K⁺ [CE50 (M): controle 1,93 (1,67 – 2,22); Pb 2,58*(2,14 – 3,11)]. *P < 0,05, n= 6-20. Contudo, nenhuma alteração do relaxamento induzido pelos demais agentes vasodilatadores foi observada. Esses dados sugerem que a hipertensão arterial induzida pela exposição perinatal ao Pb acontece independentemente de alterações nas vias de transdução para a vasodilatação NO/GMPc e β-adrenoceptor/AMPc. Ainda, uma diminuição na modulação endotelial positiva sobre a bomba Na⁺-K⁺ ATPase parece contribuir para o estágio hipertensivo de ratos recém-desmamados, mas não adultos, expostos ao Pb durante a prenhez e a amamentação. Estes achados podem

ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na etiologia e manutenção do estágio hipertensivo após intoxicação pelo Pb, conduzindo a vantagens terapêuticas contra doenças cardiovasculares no saturnismo.

ABSTRACT

Exposure to lead (Pb) has a role in the development of hypertension. It is known that the NO/cGMP and cAMP pathways and Na⁺-K⁺ ATPase are involved in the modulation of tone and contractility of vascular smooth muscle. It was investigated the changes in blood pressure (BP) and vascular reactivity to acetylcholine, nitroprusside and isoproterenol, as well as the functional activity of vascular Na⁺/K⁺ ATPase of weaned and adult rats exposed or not to Pb during pregnancy and lactation, focusing on the endothelial cell. Concentration-effect curves to acetylcholine, nitroprusside, isoproterenol and potassium were obtained in rings of thoracic aorta with and without endothelium of weaned and adult rats exposed to Pb during pregnancy and lactation. The perinatal exposure to Pb determined arterial hypertension in weaned offsprings [BP (mmHg): control 107,1 ± 1,8; Pb 117,8* ± 3,9] and adult rats [BP (mmHg): control 126,1 ± 1,1; Pb 139,6* ± 1,6], associated with a decreased sensitivity to K⁺ [EC50 (M): control 1,93 (1,67 – 2,22); Pb 2,58*(2,14 – 3,11)]. *P < 0.05, n= 6-20. However, no change in relaxation induced by other vasodilator agents was observed. These data suggest that the hypertension induced by perinatal Pb-exposure occurs independently of changes in the transduction pathways for NO/cGMP and β-adrenoceptor/AMPC vasodilation. Moreover, a decrease in the positive endothelial modulation of the Na⁺-K⁺ ATPase pump seems to contribute to the hypertensive state of weaned rats, but not adult

ones, exposed to Pb during pregnancy and lactation. These findings may help in understanding the mechanisms involved in the etiology and maintenance of the hypertensive state after Pb-exposure, leading to therapeutic benefits against cardiovascular diseases in plumbism.

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos são compatíveis com a idéia de que a exposição ao Pb exerce papel relevante no desenvolvimento da hipertensão arterial em pessoas ocupacionalmente exposta ao Pb bem como na população em geral.²⁷

Sabe-se que o ambiente intra-uterino, sob o efeito da exposição ou da dieta preferencial da mãe durante a gravidez, exerce papel fundamental na origem de muitas doenças no indivíduo adulto.¹⁶

Em exposição pós-natal, o Pb pode determinar aumento da reatividade vascular às catecolaminas, aumento dos níveis de noradrenalina no plasma, bem como diminuição da densidade de receptores beta-adrenérgicos e da produção de AMPcíclico estimulada pelo isoproterenol (ISO).^{3,9,22,25,27} Em 2001, Marques et al¹⁴ relataram uma redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato (NP). Contrariamente, Purdy et al¹⁹ (1997) não observaram alterações de reatividade a agentes vasoconstritores (fenilefrina e noradrenalina) ou vasodilatadores (ACh e NP) associadas com a hipertensão arterial em ratos expostos ao Pb. A discrepância de resultados para os agentes vasoativos demonstra que as alterações de reatividade vascular relacionadas ao saturnismo é ainda uma questão em aberto, merecendo maiores investigações.

Muitos estudos têm focalizado no conceito que este metal pesado interage com (1) processos regulatórios envolvendo o íon cálcio, guanosina monofostato

cíclica como segundos mensageiros, e proteína Kinase C;^{11,27,29} (2) renina-angiotensina aldosterona, calicreína-cinina, e outros autacóides (ex: endotelina) e sistema transducional (ex: NO, EDHF, prostaciclina);^{11,17,23,27} e (3) proliferação do músculo liso e célula endotelial;^{8,10} e (4) estresse oxidativo.⁷ Ainda, este metal pode inibir o transporte enzimático Na^+/K^+ ATPase, que contém grupo sulfidril o qual se liga facilmente ao Pb, prejudicando o transporte de sódio e, secundariamente, a saída de cálcio da célula muscular lisa.^{18,31}

Embora haja alguns estudos sobre as alterações comportamentais, neuroquímicas e outras induzidas pela exposição perinatal ao Pb,^{5,24,28} os efeitos cardiovasculares da exposição ao Pb durante a prenhez e a lactação permanecem por ser completamente elucidados.

Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar as alterações de pressão arterial e de reatividade vascular à acetilcolina, ao nitroprussiato e ao isoproterenol, bem como a atividade funcional da Na^+/K^+ ATPase vascular de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao Pb nos períodos pré-natal e de amamentação, com enfoque sobre a célula endotelial. Este estudo vem contribuir para a avaliação de risco cardiovascular, ampliando o conhecimento da adaptação circulatória e de seus mecanismos à exposição perinatal ao Pb.

MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos do Biotério do ICB-USP/SP e usados para o acasalamento. Somente filhotes machos com 23 dias (recém-desmamados) e 70 dias (adultos) 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 ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais tiveram livre acesso à ração e também à água filtrada, com exceção das fêmeas em tratamento.

Procedimentos Experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu e aprovados (processo nº 25/05), por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Acasalamento, Regime de Exposição e Peso Corpóreo

Para o acasalamento, foram colocadas duas fêmeas dentro de cada gaiola contendo um macho, 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 colocadas em gaiolas individuais e separadas em dois grupos: o exposto ao acetato de sódio e o exposto ao Pb.

As ratas começaram então, a receber, na água de beber, 500 ppm de Pb na forma de acetato, ou acetato de sódio. A concentração de acetato de sódio foi calculada de modo a fornecer para as ratas controles o mesmo número de moléculas de acetato presente na solução de acetato de Pb. A exposição foi

realizada durante toda a prenhez e a amamentação. Após o desmame, dia pós-natal 22, os animais foram separados em 2 grandes grupos: um grupo foi morto ao 23º dia pós-natal o outro passou a receber água filtrada até o 70º dia pós-natal, quando foi morto.

Cada ninhada foi pesada ao nascimento e cada filhote foi pesado semanalmente do nascimento até a morte do animal. O número de filhotes em cada ninhada foi reduzido para oito, mantendo-se o maior número possível de filhotes machos. Filhotes fêmeas foram mantidas somente para se completar a ninhada.

Análise de Pb

Os níveis de Pb no sangue foram quantificados nas mães no dia do desmame da sua ninhada e nos filhotes com 23 e 70 dias de idade.

Os animais foram anestesiados com uretano (1,25 g/kg, ip) e, após toracotomia, amostras de sangue foram recolhidas diretamente do ventrículo esquerdo para dosagem de Pb. Após a coleta de sangue os animais seguiram para os estudos de reatividade vascular.

Para a quali-quantificação do Pb, a amostra foi mineralizada em forno de microondas (DGT-100 Plus, Provecto, Brasil) e 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 recuperação de Pb que foi adicionado externamente às amostras controles mostrou-se consistentemente superior a 96%. Método padrão adicional foi aplicado para a determinação, de modo a minimizar o efeito-matriz. O limite de detecção foi 5,0 µg/dl. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Determinação da Pressão Arterial

A pressão arterial (PA) sistólica caudal do animal não anestesiado foi verificada, através de um eletroesfigmomanômetro (Narco Bio-Systems) semanalmente a partir do 22º dia. O valor da PA foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 1 minuto.

Protocolos Experimentais

Reatividade Vascular

Após a coleta de sangue, procedeu-se o isolamento da aorta torácica que, livre do tecido conectivo, gordura e sangue, foi dividida em dois anéis de aproximadamente de 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, ácido ascórbico 0,1. A solução nutriente foi mantida a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e saturada com carbogênio (95% O₂ 5% CO₂). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométrica (F-60), acoplados a um fisiógrafo (Narco Bio-System). O tempo de estabilização das preparações foi de 1 h, sob uma tensão inicial de 1,5 g mantida ao longo de todo o experimento. Anéis de aorta com e sem endotélio foram estudados em paralelo.

Curvas concentração-efeito (CCE) cumulativas e consecutivas à ACh (vasodilatador dependente do endotélio), e NP (vasodilatador independente do endotélio) foram obtidas em anéis de aorta, com e sem endotélio de ratos jovens (23 dias) e adultos (70 dias) expostos ou não ao Pb no período perinatal, com

intervalo de 45 min. O relaxamento induzido pelo agente vasodilatador foi expresso como porcentagem de resposta em relação à contração induzida pela fenilefrina (PHE). A tensão (g) induzida pela PHE nos anéis controles e experimentais, +E e -E, foi a mesma e corresponderá a 60 – 80% da tensão máxima a este agonista.

Em outra série de experimentos, CCEs ao isoproterenol (ISO, agente vasodilatador parcialmente dependente da célula endotelial) foram obtidas em anéis de aorta, com e sem endotélio de ratos jovens (23 dias) e adultos (70 dias) expostos ou não ao Pb no período perinatal. Ao final das CCEs, a integridade do endotélio e do músculo liso foram verificados pelo relaxamento à ACh (10^{-6} M) e ao NP (10^{-4} M), respectivamente, em aortas pré-contraídas com PHE.

Avaliação da Atividade Funcional da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase

A atividade funcional da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase foi avaliada usando o relaxamento induzido pelo K^+ como descrito por Webb & Bohr (1978).³⁰ Após um período de estabilização de 30 min, a integridade da célula endotelial foi verificada pelo relaxamento induzido pela ACh 10^{-6} M em aortas pré-contraídas com PHE. Transcorridos 45 min em solução de Krebs-Henseleit normal, a solução nutriente foi substituída por uma solução livre de potássio. Após 30 min nesta última condição, as preparações foram pré-contraídas com PHE. Uma vez atingido o platô, a concentração de KCl foi aumentada gradativamente (1, 2, 5 e 10 M), cada uma com cinco minutos de duração e o relaxamento induzido por cada concentração foi mensurado. Ao final das CCEs ao K^+ , NP (10^{-4} M) foi adicionado para se testar a integridade do músculo liso. A resposta de relaxamento ao KCl foi

expressa como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção com PHE.

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima (g de tensão) e/ou 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 medidas por determinação gráfica e as médias apresentadas como antilogarítmo da média aritmética dos log CE50 de cada experimento, com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Análise Estatística

As análises estatísticas utilizadas foram as seguintes:

- Teste de Mann Whitney ou Kruskal-Wallis: utilizado para a análise do nível de Pb no sangue e pressão arterial (INSTAT 4.1).

- Análise de variância multifatorial com teste a *posteriori* de Tukey-Kramer: para a análise da resposta máxima e CE50 aos agentes vasoativos (SIGMASTAT 2.0). Idade e intoxicação foram fatores na análise.

Os resultados foram expressos com média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou intervalo de confiança, ainda que os dados referentes ao nível de Pb e pressão arterial tenham sido analisados através de um teste não-paramétrico.

Em todos os experimentos, $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

Drogas e Soluções

As seguintes drogas foram utilizadas: acetato de chumbo, acetato de sódio, cloridrato de acetilcolina, hidrocloreidrato de isoproterenol, nitroprussiato de sódio, uretano (Todas obtidas da 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 e também na de sódio. As demais soluções foram preparadas utilizando-se solução de Krebs-Henseleit, e as concentrações foram expressas em molar ou mg/kg.

RESULTADOS

Peso corpóreo

Em ambas as idades, o peso corpóreo das proles não diferiu entre os ratos controles e aqueles expostos perinatalmente ao Pb (Tabela 1).

Determinação dos níveis de chumbo no sangue

A concentração de Pb mostrou-se significativamente aumentada em mães e proles de 23 e 70 dias de idade intoxicadas durante a prenhez e a amamentação em relação aos respectivos controles (Tabela 2).

A interrupção da ingestão de Pb após o desmame (Pb/água) determinou, em animais de 70 dias de idade, diminuição dos níveis de Pb no sangue que se mantiveram significativamente aumentados em relação aos respectivos grupos controles (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios do peso corpóreo de ratos machos intoxicados ou não pelo chumbo durante a prenhez e a amamentação

Grupos / Idade	Peso corpóreo (g)	
	23 dias	70 dias
Controle	39,3 ± 0,5	-
Na ⁺ /água	-	327,9 ± 4,4
Pb	41,0 ± 0,8	-
Pb/água	-	325,2 ± 8,8

Pb: 500 ppm de chumbo durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, grupos de animais controles e intoxicados passaram a receber água filtrada (grupos: Na⁺/água, Pb/água). Os valores representam a média ± EPM. Número de animais = 6-20.

Tabela 2. Concentração sangüínea ($\mu\text{g/dl}$) de chumbo nas mães e seus filhotes

	Grupos Experimentais		
	Mães	Filhotes 23 dias de idade	Filhotes 70 dias de idade
Controle	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Na ⁺ /água	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Pb	52,63 $\pm$ 7,14*	38,7 $\pm$ 8,27*	-
Pb/água	-	-	12,38 $\pm$ 0,72*

Pb: 500 ppm de chumbo durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, grupos de animais controles e intoxicados passaram a receber água filtrada até 70º dia de idade (grupos: Na⁺/água, Pb/água). Os valores representam a média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação aos respectivos controles. Número de animais = 5-6. Limite de detecção = 5,0 $\mu\text{g/dl}$.

Pressão arterial

A pressão arterial sistólica caudal de ratos recém-desmamados e adultos expostos perinatalmente ao Pb mostrou-se significativamente aumentada quando comparada aos respectivos grupos controles (Figura 1).

Reatividade vascular

As respostas vasodilatadoras à ACh, ao NP, e ao ISO, avaliadas tanto pela resposta máxima quanto pela CE50, não se mostraram significativamente alteradas em aortas, com e sem endotélio, de ratos recém-desmamados e adultos intoxicados pelo Pb no período perinatal, quando comparadas as respostas observadas em aortas de ratos não intoxicados da mesma idade (Figuras 2-7; Tabelas 3-8). Ainda, a resposta vasodilatadora ao KCl, avaliada pela resposta máxima, não se mostrou significativamente alterada em ratos de 23 e 70 dias intoxicados pelo Pb no período perinatal quando comparada a de proles não intoxicadas na mesma idade (Figuras 8 e 9, Tabelas 9). Entretanto, em ratos de 23 dias, a intoxicação pelo Pb no período perinatal determinou diminuição significativa de sensibilidade ao KCl em anéis de aorta com endotélio quando comparados aos ratos não intoxicados na mesma idade (Figura 8, Tabelas 10).

A administração de acetato de sódio não determinou qualquer alteração na mobilização de Pb, na pressão arterial ou na reatividade da aorta quando comparada ao observado em ratos que apenas ingeriram água filtrada (dados não apresentados). A remoção do endotélio abole a resposta à ACh.

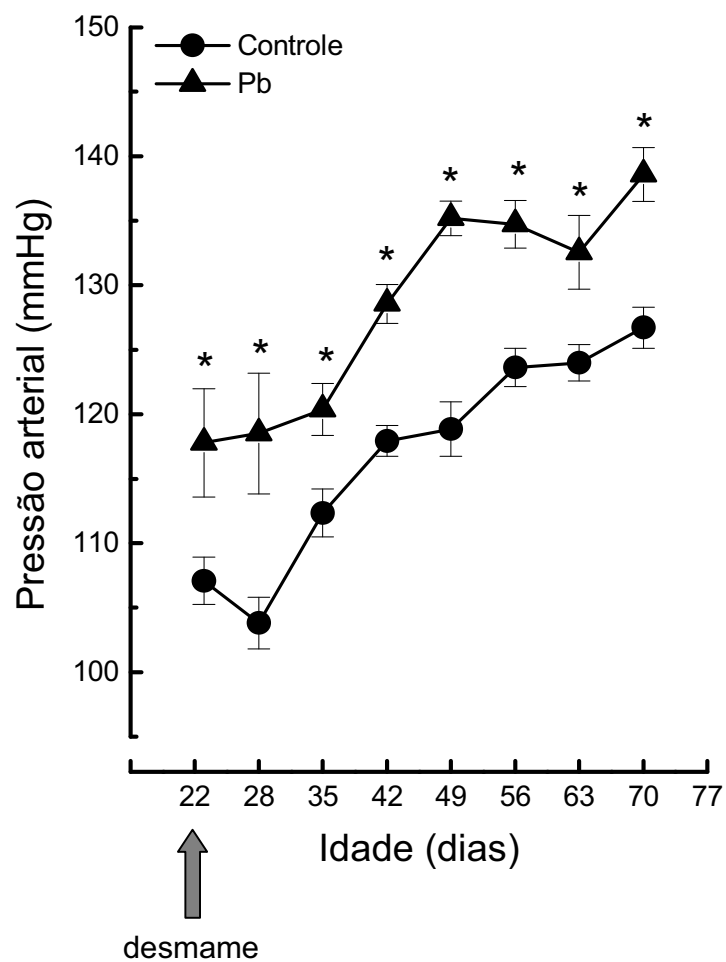


Figura 1. Evolução temporal da pressão arterial sistólica caudal (mmHg) de proles controles e intoxicadas com 500 ppm de chumbo (Pb) durante a prenhez e amamentação. Após o desmame passaram a receber água filtrada. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação aos grupos controles. Número de animais = 20.

**Ratos Recém-desmamados
(23 dias de idade)**

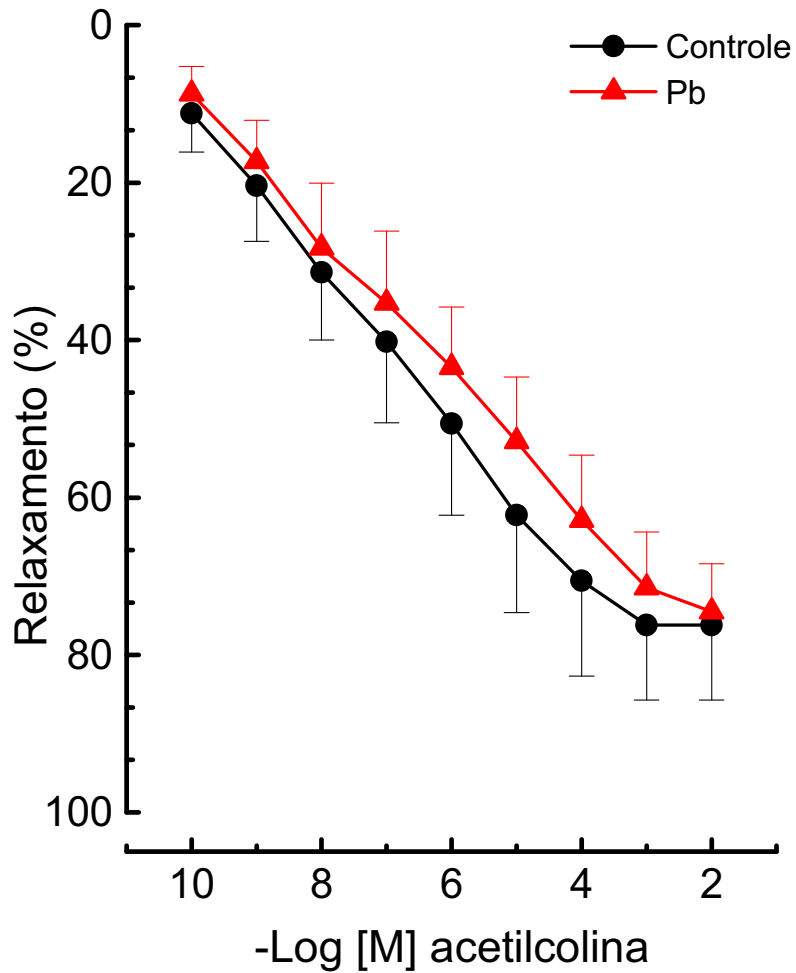


Figura 2. Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta torácica, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém-desmamados (23 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e a amamentação. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 5-7. A remoção do endotélio abole o relaxamento à acetilcolina.

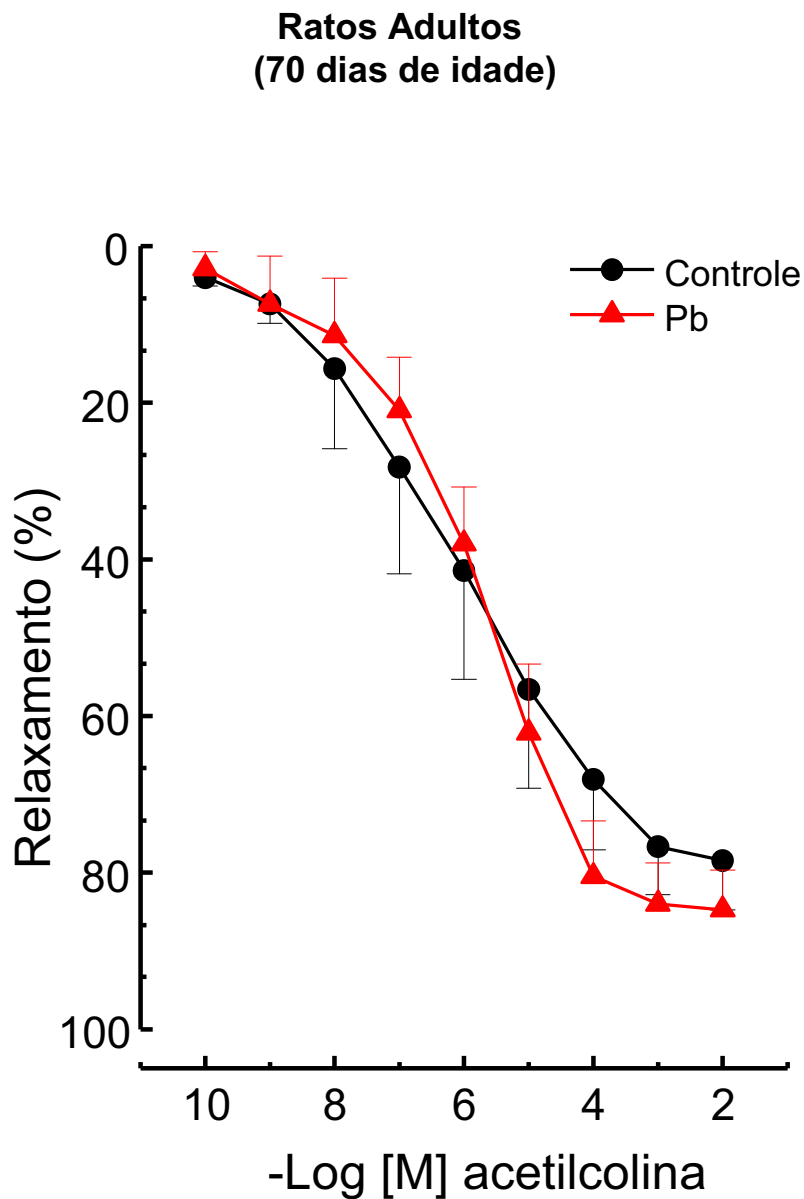


Figura 3. Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta torácica, pré-contráídos com fenilefrina, e isolados de ratos adultos (70 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e amamentação. Após o desmame passaram a receber água filtrada até o 70º dia de idade. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 5-8. A remoção do endotélio abole o relaxamento à acetilcolina.

**Ratos Recém-desmamados
(23 dias de idade)**

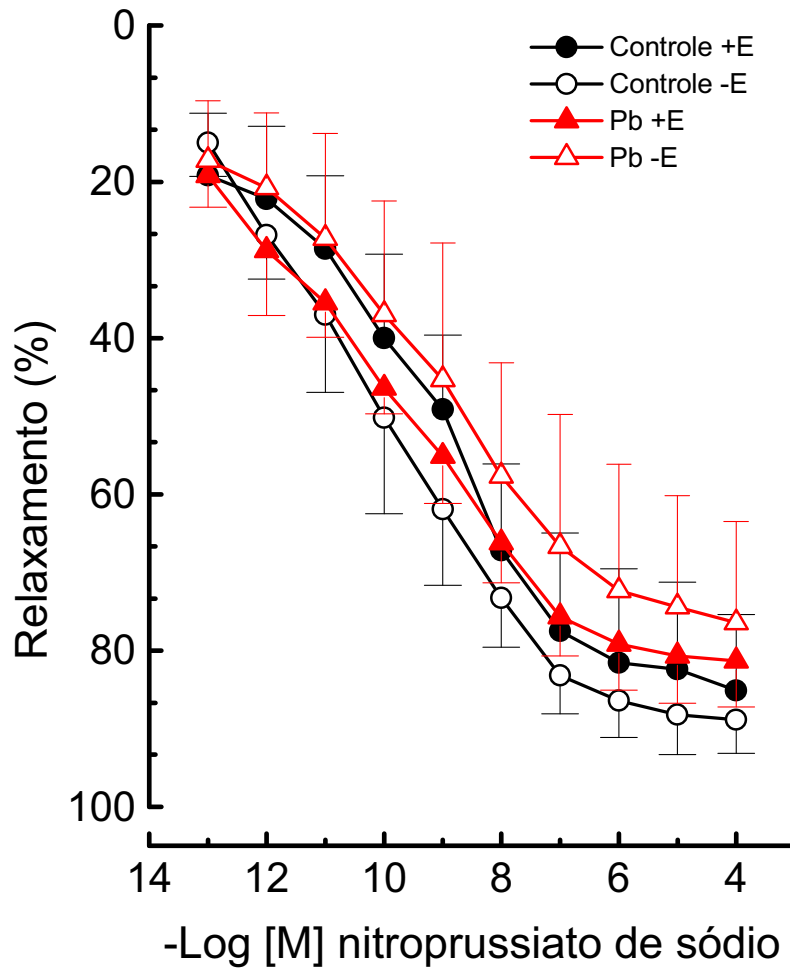


Figura 4. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem (-E) endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos recém-desmamados (23 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e a amamentação. Número de animais = 5-7. Os valores representam a média $\pm$ EPM.

Ratos Adultos (70 dias de idade)

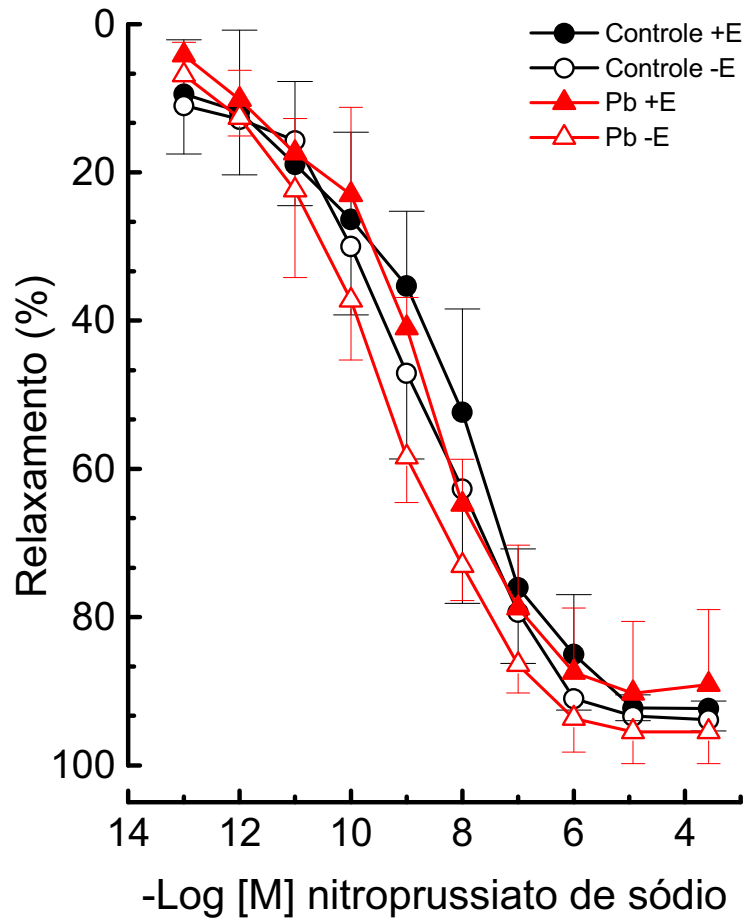


Figura 5. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem (-E) endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos adultos (70 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e amamentação. Após o desmame passaram a receber água filtrada até o 70º dia de idade. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 5-8.

**Ratos recém-desmamados
(23 dias de idade)**

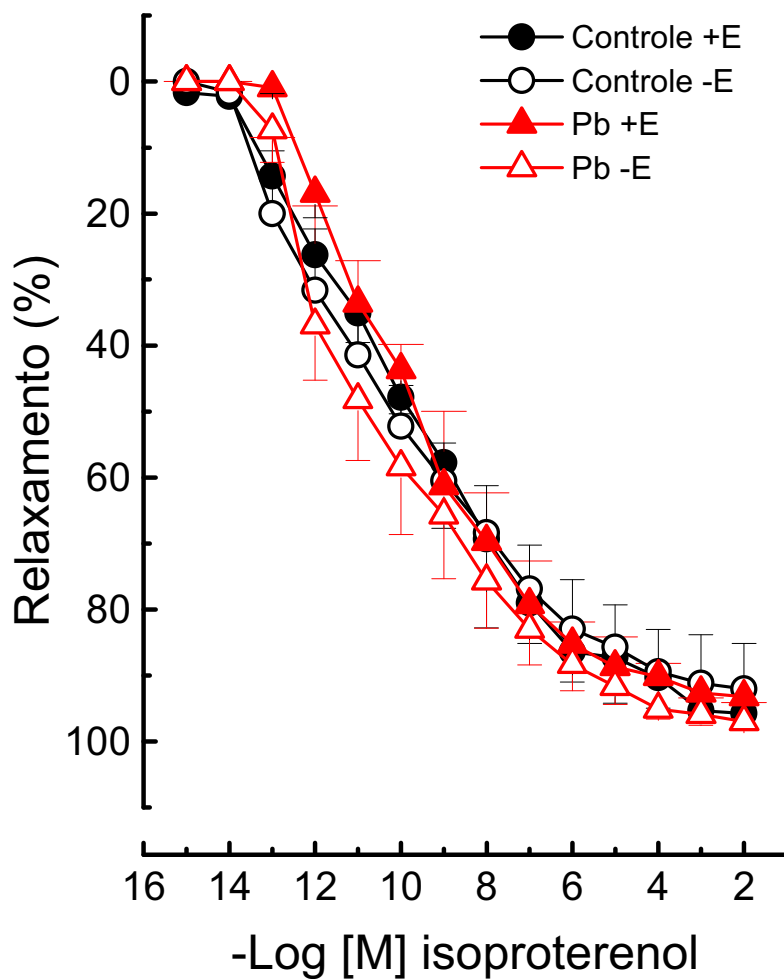


Figura 6. Curvas concentração-efeito ao isoproterenol obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem endotélio (-E), pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos recém-desmamados (23 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e a amamentação. Número de animais = 7-12. Os valores representam a média $\pm$ EPM.

**Ratos adultos
(70 dias de idade)**

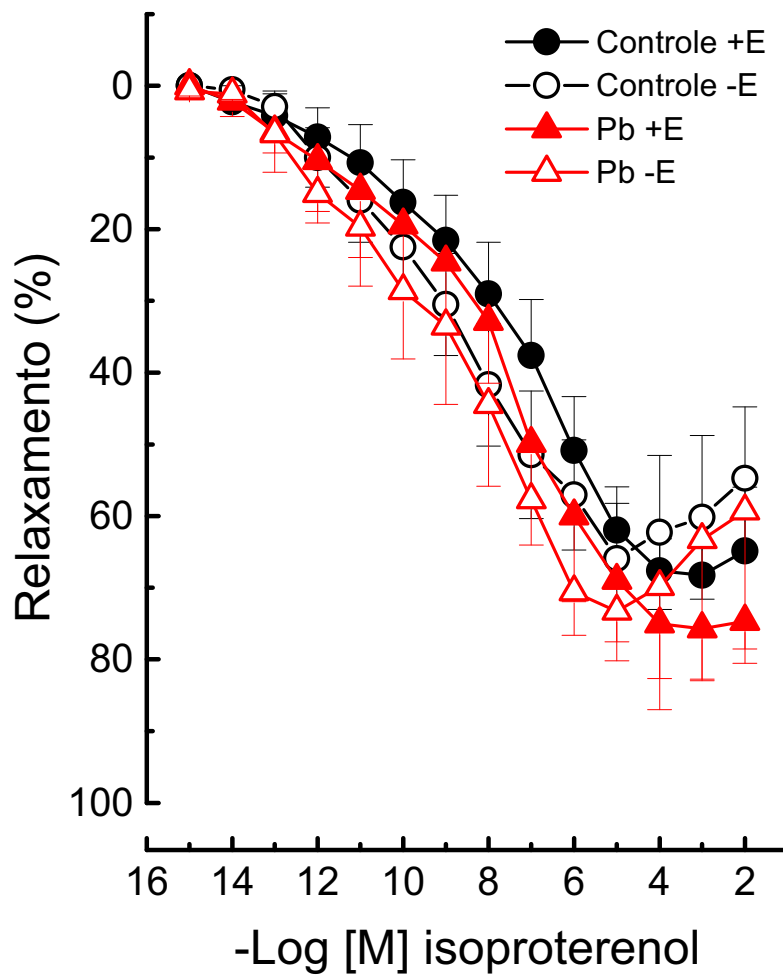


Figura 7. Curvas concentração-efeito ao isoproterenol obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem endotélio (-E), pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos adultos (70 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e a amamentação. Após o desmame passaram a receber água filtrada até o 70º dia de idade. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 7-12.

**Ratos recém-desmamados
(23 dias de idade)**

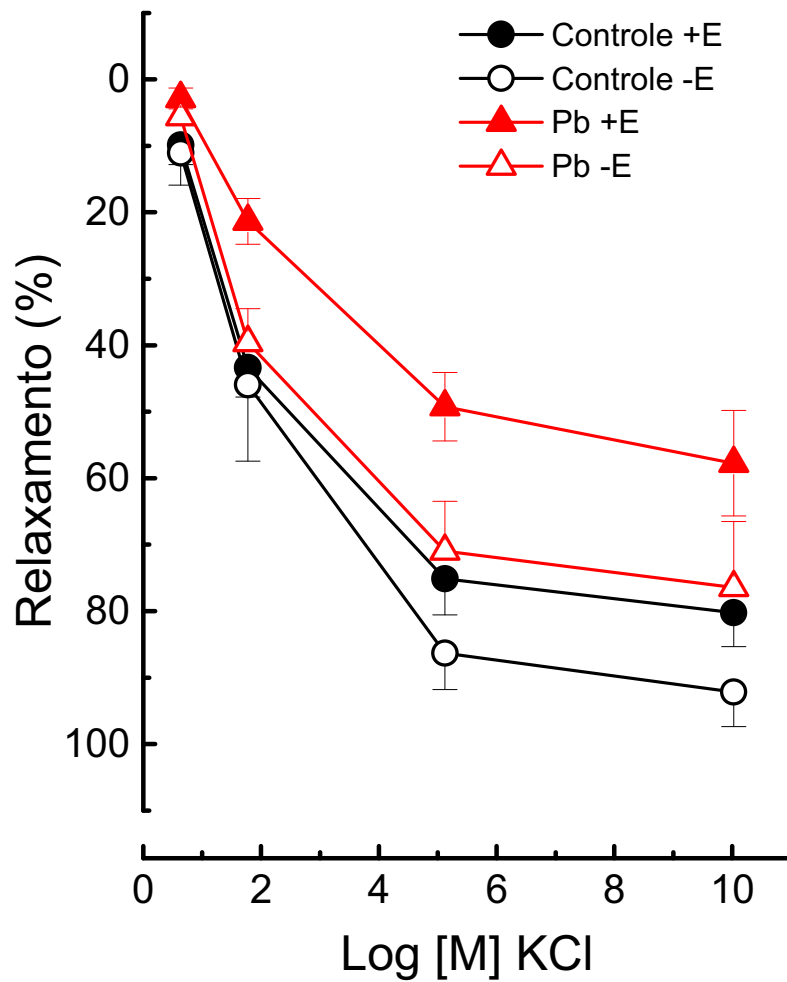


Figura 8. Curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem (-E) endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos recém-desmamados (23 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e amamentação. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 6-8.

**Ratos adultos
(70 dias de idade)**

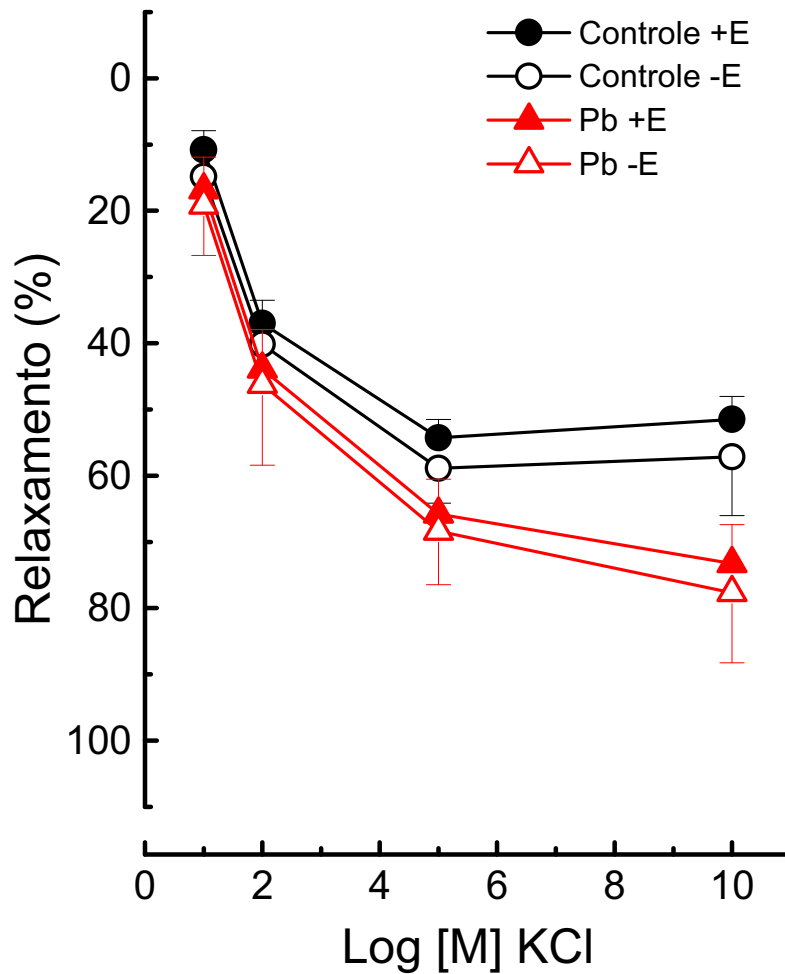


Figura 9. Curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em anéis da mesma aorta torácica, com (+E) e sem endotélio (-E), pré-contraídos com fenilefrina e isoladas de ratos adultos (70 dias de idade) controles e expostos ao chumbo (Pb: 500 ppm) durante a prenhez e a amamentação. Após o desmame passaram a receber água filtrada até o 70º dia de idade. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 6-8.

Tabela 3. Valores médios de resposta máxima à acetilcolina obtidos em anéis da mesma aorta torácica, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ Resposta Máxima (% relaxamento)
23 dias	Controle	73,60 ± 9,03
	Pb	76,71 ± 4,67
70 dias	Controle	72,12 ± 4,67
	Pb	85,12 ± 5,15

¹Resposta máxima: % de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação (grupo Pb). Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média ± EPM. Número de animais = 5-9. A remoção do endotélio abole o relaxamento induzido pela acetilcolina.

Tabela 4. Valores médios de sensibilidade à acetilcolina obtidos em anéis da mesma aorta torácica, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ CE50 x 10 ⁻⁸ M
23 dias	Controle	4,68 (0,60– 36,44)
	Pb	8,26 (0,10 – 48,77)
70 dias	Controle	58,09 (5,25 – 142,69)
	Pb	41,43 (6,18 – 108,44)

¹CE50 = concentração eficaz 50%. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média com intervalo de confiança de 95%. Número de animais = 5-9. A remoção do endotélio abole o relaxamento induzido pela acetilcolina.

Tabela 5. Valores médios de resposta máxima ao nitroprussiato de sódio obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, pré-contráídos com fenilefrina e isolados de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ Resposta Máxima (% relaxamento)	
		Com endotélio	Sem endotélio
23 dias	Controle	76,8 ± 9,75	93,00 ± 4,29
	Pb	83,5 ± 5,84	72,6 ± 10,52
70 dias	Controle	99,25 ± 0,75	98,00 ± 1,22
	Pb	84,50 ± 7,07	98,17 ± 1,83

¹Resposta máxima: % de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação (grupo Pb). Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média ± EPM. Número de animais = 4 -5.

Tabela 6. Valores médios de sensibilidade ao nitroprussiato de sódio obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ CE50 x 10 ⁻⁸ M	
		Com endotélio	Sem endotélio
23 dias	Controle	4,37 (0,98 – 31,44)	2,18 (0,99 – 29,29)
	Pb	3,01 (0,60 – 44,83)	5,04 (1,04 – 13,39)
70 dias	Controle	5,49 (1,07 – 33,19)	4,37 (1,02 – 23,95)
	Pb	4,93 (0,64 – 28,76)	6,22 (1,13 – 30,04)

¹CE50 = concentração eficaz 50%. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média com intervalo de confiança de 95%. Número de animais = 4-5.

Tabela 7. Valores médios de resposta máxima ao isoproterenol obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém- desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ Resposta Máxima (% relaxamento)	
		Com endotélio	Sem endotélio
23 dias	Controle	95,82 ± 1,51	92,29 ± 4,12
	Pb	97,50 ± 1,72	98,33 ± 1,11
70 dias	Controle	72,42 ± 4,72	74,33 ± 4,68
	Pb	81,83 ± 5,53	72,75 ± 7,12

¹Resposta máxima: % de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação (grupo Pb). Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média ± EPM. Número de animais = 7-12.

Tabela 8. Valores médios de sensibilidade ao isoproterenol obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém- desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ CE50 (M)	
		Com endotélio	Sem endotélio
23dias	Controle	1,21 x10 ⁻¹⁰ (0,30 – 45,29)	1,49 x10 ⁻¹⁰ (0,20 – 19,86)
	Pb	1,34 x10 ⁻¹⁰ (0,40 – 11,23)	1,18 x10 ⁻¹⁰ (0,04 – 13,36)
70 dias	Controle	6,64 x10 ⁻⁷ (0,98 – 14,25)	5,46 x10 ⁻⁷ (0,66 – 29,18)
	Pb	5,93 x10 ⁻⁷ (1,47 – 17,21)	4,63 x10 ⁻⁷ (0,24 – 21,45)

¹CE50 = concentração eficaz 50%. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média com intervalo de confiança de 95%. Número de animais = 7-12.

Tabela 9. Valores médios de resposta máxima ao KCl obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, isolada de ratos recém desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ Resposta Máxima (% relaxamento)	
		Com endotélio	Sem endotélio
23 dias	Controle	80,25 ± 5,06	92,17 ± 5,23
	Pb	59,00 ± 7,27	80,88 ± 7,18
70 dias	Controle	55,75 ± 3,06	64,62 ± 6,29
	Pb	75,38 ± 5,88	79,33 ± 9,46

¹Resposta máxima: % de relaxamento em relação à pré-contracção com fenilefrina. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação (grupo Pb). Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média ± EPM. Número de animais = 6-8.

Tabela 10. Valores médios de sensibilidade ao KCl obtidos em anéis da mesma aorta torácica, com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e isolados de ratos recém- desmamados e adultos expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e a amamentação

Idade		¹ CE50 x 10 ⁻⁸ M	
		Com endotélio	Sem endotélio
23dias	Controle	1,93 (1,67 – 2,22)	2,07 (1,43 – 3,02)
	Pb	2,58* (2,14 – 3,11)	2,34 (1,76 – 3,12)
70 dias	Controle	1,68 (1,40 – 2,01)	1,62 (1,41 – 1,86)
	Pb	1,97 (1,54 – 2,52)	2,30 (1,20 – 3,67)

¹CE50 = concentração eficaz 50%. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo (Pb) durante a prenhez e a amamentação. Os animais experimentais tiveram controles recebendo acetato de sódio pelos mesmos períodos de intoxicação. Após o desmame, um grupo de animais controles e intoxicados passou a receber água filtrada até o 70º dia de idade, quando foram mortos. Outro grupo de animais controles e intoxicados foi morto ao desmame. Os valores representam a média com intervalo de confiança de 95%. *P < 0.05 em relação ao respectivo controle. Número de animais = 6-8.

DISCUSSÃO

As autoridades de saúde pública utilizam-se de níveis elevados para definir os níveis de referência de Pb no sangue de mulheres não gestantes (40 µg/dl, valor de referência em muitos países).

Em humanos, o *Center for Disease Control and Prevention's (CDC's) Adult Blood Lead Epidemiology and Surveillance program-United States, 2004* relata que 0,08 por 100.000 mulheres expostas ocupacionalmente em idade de 16 a 44 anos têm níveis sangüíneos de Pb $\geq$ 40 µg/dl.² Se uma política universal de avaliação fosse empregada o número de casos relatados poderia ser substancialmente maior.

Devemos reconhecer que uma significativa proporção de mulheres não gestantes com níveis sangüíneos de Pb $\geq$ 40 µg/dl tornar-se-ão gestantes e estarão expondo seus filhos aos riscos dos efeitos adversos do Pb à saúde. Os níveis sangüíneos de Pb materno e fetal são praticamente idênticos, uma vez que esse metal atravessa livremente a barreira placentária. Isso tem provocado preocupação com relação à elevada plumbemia entre as mulheres em idade fértil, já que uma grande proporção de gestações não é planejada.

A severidade dos efeitos e a extensão pela qual o sistema cardiovascular é afetado pelo Pb parece ser influenciado mais diretamente pelas concentrações de Pb e a duração da exposição ao metal juntamente com outros fatores incluindo via de exposição, fase da vida do indivíduo, temperatura, e nível de ingestão de cálcio na dieta.¹² No presente estudo, investigou-se as alterações vasculares em proles

expostas ao Pb durante a prenhez e a lactação de mães com níveis sangüíneos próximos à 40 µg/dl.

O regime de exposição utilizado no presente estudo não afetou o peso corpóreo das mães e dos filhotes ou o número de filhotes por ninhada (dado não mostrado). Todos os animais mostraram-se saudáveis e nenhum deles mostrou sinais de toxicidade.

Entretanto, o mesmo protocolo de exposição perinatal ao Pb determinou um aumento na pressão arterial sistólica de ratos recém-desmamados que se prolongou até a vida adulta. O aumento sustentado na pressão arterial de ratos intoxicados confirmou relatos anteriores da literatura que mostraram uma correlação positiva entre níveis sangüíneos de Pb e hipertensão arterial associada ao saturnismo.^{18,26} Ainda, alterações comportamentais e neuroquímicas foram também relatadas em ratos apresentando níveis sangüíneos semelhantes.^{15,28}

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que a hipertensão arterial em proles expostas perinatalmente ao Pb é acompanhada de hiperreatividade ao agente vasoconstritor noradrenalina (dados não publicados), corroborando achados da literatura para condições de intoxicação pós-natal.^{9,22} Entretanto, embora a literatura relate que as propriedades vasodilatadoras, dependentes ou não da integridade da célula endotelial, estão alteradas em uma variedade de modelos de hipertensão arterial,^{4,13,21} o presente estudo mostrou que a hipertensão arterial induzida pela exposição perinatal ao Pb não foi acompanhado de alterações de reatividade a agentes vasodilatadores, dependentes ou não da célula endotelial. Esses achados corroboram relatos de

Purdy et al (1997)¹⁹ que não observaram qualquer alteração de reatividade da aorta à ACh e ao NP em ratos expostos ao Pb durante a vida pós-natal.

Uma vez que a reatividade vascular intrínseca à ACh - agente vasodilatador dependente do endotélio via óxido nítrico/GMPc, ao NP - agente vasodilatador independente do endotélio e responsável pelo acúmulo de GMPc no músculo liso vascular, e ao ISO - agente vasodilatador parcialmente dependente do endotélio e responsável pelo acúmulo de AMPc no músculo liso vascular, não está alterada na hipertensão arterial induzida pela exposição perinatal ao Pb, sugere-se que ambas as vias de transdução para a vasodilatação, NO/GMPc e β -adrenoceptor/AMPc, não foram susceptíveis à intoxicação pelo Pb no período perinatal. Entretanto, a literatura relata redução na densidade de adrenoceptores beta e diminuição no acúmulo de AMPc em aorta de ratos expostos à mesma dose de Pb, 500 ppm/60 dias, na vida adulta.^{3,9} Provavelmente a divergência de resultado seja devida a diferenças entre os períodos de exposição ao metal utilizados nos diferentes estudos, a saber, período perinatal e vida adulta.

Sabe-se que a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase participa na modulação do tono e da contratilidade do músculo liso vascular.^{1,6,30} Alterações da atividade funcional da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase vascular ou sua regulação podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão ou ser um mecanismo compensatório contra a elevação da pressão arterial.²⁰ A vasodilatação que ocorre em resposta ao K^+ é devida a um aumento da atividade da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, resultando num aumento do transporte eletrogênico destes íons, consequentemente, hiperpolarização e relaxamento. A literatura sugere que fatores endoteliais podem

estimular a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase e uma modulação endotelial positiva sobre a bomba de Na^+ em aorta de ratos foi confirmada por Rossini et al²⁰ (2002). No presente estudo observou-se uma diminuição na modulação endotelial da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase em aorta intacta de ratos recém-desmamados expostos perinatalmente ao Pb, uma vez que o valor da EC50 ao K^+ foi significativamente aumentado em aorta de ratos intoxicados quando comparado aos controles. Este efeito mostrou-se reversível com a idade uma vez que nenhuma alteração do relaxamento induzido pelo K^+ foi observada em ratos intoxicados adultos. Ainda, independentemente da idade, nenhuma alteração no relaxamento induzido pelo K^+ foi observada em aorta sem endotélio de ratos intoxicados, sugerindo que a hipertensão arterial induzida pela exposição perinatal ao Pb não envolve alterações na atividade funcional da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase presente no músculo liso vascular.

Concluindo, o presente estudo mostrou que a exposição perinatal ao Pb determina hipertensão arterial em proles recém-desmamadas e adultas sem, contudo, alterar as vias de transdução para a vasodilatação NO/GMPc e β -adrenoceptor/AMPc. Ainda, uma diminuição na modulação endotelial positiva sobre a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase parece contribuir para o estágio hipertensivo de ratos recém-desmamados, mas não adultos, expostos ao Pb durante a prenhez e a amamentação. Estes achados podem ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na etiologia e manutenção do estágio hipertensivo na intoxicação pelo Pb, conduzindo a vantagens terapêuticas contra doenças cardiovasculares no saturnismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol.* 1993; 264(6 Pt 1):C1367-87.
2. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Lead exposure among females of childbearing age – United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007; 56(16):397-400.
3. Chang HR, Chen SS, Tsao DA, Cheng JT, Ho CK, Yu HS. Reduced vascular β -adrenergic receptors and catecholamine response in rats with lead hypertension. *Arch Toxicol.* 1997;71(12):778-81.
4. Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol.* 1999;32(3): 315-20.
5. Dearth RK, Hiney JK, Srivastava V, Burdick SB, Bratton G, Dees WI. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in rat. *Reprod Toxicol.* 2002;16(4):343-52.
6. dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na^+ , K^+ -ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sci.* 2003;74(5):613-27.
7. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008;128(4):501-23
8. Fujiwara Y, Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* . 1995;98(1-3):105-10.
9. Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, et al. Effects of short-term and sub-chronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett.* 2006;166(1):88-94.

10. Kaji T, Fujiwara Y, Hoshino M, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H.. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*. 1995;95(1-3):87-92.
11. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EWJ, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens*. 1993;6(9):723-9.
12. Kopp SJ, Barron JT, Tow JP. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: A review. *Environ Health Perspect*. 1988;78:91-99.
13. Mallem Y, Holopherne D, Reculeau O, Le Coz O, Desfontis JC, Gogny M. Beta-adrenoceptor-mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Auton Neurosci*. 2005;118(1-2):61-7.
14. Marques M, Millás I, Jiménez A, García-Colis C, Rodríguez-Feo JA, Velasco S, 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.
15. Moreira EG, Vassilieff I, Vassillieff VS.. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(5):489-95.
16. Newnham JP. Is prenatal glucocorticoid administration another original of adult disease?. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(11):957-61.
17. Oishi H, Nakashima M, Totoki T, Tomokuni K. Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. *J Cardiovasc. Pharmacol*. 1996;28(4):558-563.
18. Prozialech WC, Edwards JR, Nebert DW, Woods JM, Barchowsky A, Atchison WD. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sc*. 2008;102 (2):207-18.
19. Purdy RE, Smith Y, Ding F, Vaziri ND, Gonick HC. Lead- induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am J Hypertension*. 1997;10(9):997-1003.

20. Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 2002;135(3):771-81.
21. Shirasaki Y, Kolm P, Nickols GA, Lee TJ. Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular response in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;245(1):53-8.
22. Skoczynska A, Juzwa W, Smolik R, Szechinski J, Begal FJ. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology*. 1986;39(3):275-89.
23. Stojek E, Skoczynska A. Lead effect on vascular endothelium. *Med Pr*. 2003; 54(1):87-93.
24. Szczerbak G, Nowak P, Kostrzewa RM, Brus R. Maternal lead exposure produces long-term enhancement of dopaminergic reactivity in rat offspring. *Neurochem Res*. 2007;32(10):1791-8.
25. Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;164(2): 127-33.
26. Vaziri ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):426-35.
27. Vaziri ND. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(2):H454-H65.
28. Wang J, WU J, ZHANG Z. Oxidative Stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg*. 2006;50(4):405-9.
29. Watts, SW, Chai S, Webb RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology*. 1995;99(1-2):55-65.
30. Webb RC, Bohr DF. Potassium-induced relaxation as an indicator of Na⁺ -K ATPase activity in vascular smooth muscle. *Blood Vessels*. 1978,15(1-3):198-207.

31. Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick H. Effects of lead and low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci (Lond)*. 1990;79(2):185-92.