

**EFEITOS DA DOXICICLINA NA HIPERTENSÃO
ARTERIAL INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO
CHUMBO: QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS
VASOATIVOS**

REGINA APARECIDA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título
de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas,
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias junior*

Botucatu - SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio De Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA DOXICICLINA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO:
QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS VASOATIVOS

REGINA APARECIDA DO NASCIMENTO
PROF. DR. CARLOS ALAN CANDIDO DIAS JUNIOR (ORIENTADOR)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título
de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas,
Área de concentração: Farmacologia

Botucatu - SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nascimento, Regina Aparecida do.

Efeitos da doxiciclina na hipertensão arterial induzida pela exposição ao chumbo : quantificação de peptídeos vasoativos / Regina Aparecida do Nascimento. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carlos Alan Candido Dias Junior

Capes: 21000000

1. Peptídeos. 2. Hipertensão. 3. Chumbo no organismo. 4. Agentes antibacterianos. 5. Agentes anti-infecciosos.

Palavras-chave: Chumbo; Doxiciclina; Hipertensão; Peptídeos vasoativos.

***Dedico este trabalho ao único Deus
verdadeiro que transformou este sonho em
realidade. A ELE Serei grata enquanto viver e
louvarei por suas maravilhas enquanto existir!!!***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. **Carlos Alan Candido Dias Junior** que acreditou em mim quando tudo estava praticamente perdido! Também, pela compreensão, paciência e principalmente por poder contar com sua amizade!!!

Aos companheiros de laboratório **Jomar Bena Galves Jr, Gabryella Mendes, Carla Akemi Ishikawa, Tamiris Uracs Sales Graça, Thalita Rocha e João Leandro Chaguri** pela amizade, em especial os doutorandos **José Sérgio Possomato Vieira** e o **Victor Hugo Gonçalves Rizzi** que nunca mediram esforços para me ajudar em qualquer atividade que fosse necessária. Muito obrigada mesmo!!!

Ao Dr. **Alaor Aparecido Almeida** pela determinação em ajudar!!!

Aos colaboradores Dr^a **Flavia Karina Delella**, Dr. **Hélio Kushima** e os funcionários da **UNIPEX** pela realização das técnicas.

Aos meus pais **Estanislau da Silva Nascimento** e **Luzia Pinheiro Nascimento** por toda força que sempre tem dado e as inefáveis orações ao meu favor!!!

Aos meus irmãos **Rildo Pinheiro do Nascimento** e **Urcely Simone Nascimento Ribeiro** juntamente com seus cônjuges pelo apoio e entusiasmo!!!

A **CAPES** e **FAPESP** pelo auxílio financeiro.

***Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças
de nenhum de seus benefícios (Salmo 103; 2).***

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

FIGURA 1- Mecanismo de ativação das MMPs.....	4
FIGURA 2- Concentração de chumbo em sangue total	22
FIGURA 3- Pressão Arterial Sistólica.....	23
FIGURA 4- Concentração plasmática de adrenomedulina.....	24
FIGURA 5- Concentrações plasmáticas de CGRP.....	25
FIGURA 6- Concentrações plasmáticas de endotelina.....	26
FIGURA 7- Níveis circulantes de MMP-2.....	27
FIGURA 8-(a-b) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	29
FIGURA 8-(a-c) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9	30
FIGURA 8-(a-d) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	31
FIGURA 8-(a-e) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	32
FIGURA 8-(a-f) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	33
FIGURA 9- Níveis de óxido nítrico - NOx no plasma.....	34
FIGURA 10 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre a capacidade antioxidante no plasma [MTT].....	35
QUADRO 01 – Otimização do espectrômetro de absorção atômica para determinação de chumbo no sangue total	17

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

MMPs-Metaloproteinases

MMP-2-Metaloproteinases da Matriz do tipo 2

MMP9-Metaloproteinases da Matriz do tipo 9

n- número de animais

NO- óxido nítrico

g- grama

mg- miligrama

µg- micrograma

mg/Kg/dia - miligramas por quilograma por dia

mmHg – milímetros de mercúrio

dL- decilitro

mL- Mililitro

ppm- Partes por milhão

Pb-Chumbo

Doxy- Doxiciclina

CGRP- Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

ELISA- Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima

ATSDR- Registry, Agency for Toxic Substances and Disease.

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

2, 3 DHBA- 2,3- Ácido dihidroxibenzóico

Ca² – cálcio

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

PAGE – (“PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”): Eletroforese em gel de poliacrilamida

p.c. – peso corpóreo

TIMP - Inibidor tecidual de metaloproteinase

(Pb (C₂H₃O₂)₂ + 3H₂O)- Acetato de chumbo

(Na (C₂H₃O₂) + 3H₂O) – Acetato de sódio

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

RPM- Rotações por minutos

HNO₃- Ácido Nítrico

EPM – Erro padrão da média

Mmol/L- Milimol por litro

KDa- Unidade de Massa atômica

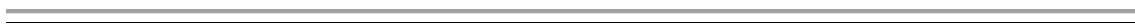
nm- Nanometro

RESUMO

RESUMO

Neste trabalho foi investigado a participação de MMP's na intoxicação aguda por chumbo, bem como se a doxíciclina reverte a hipertensão induzida pelo chumbo e a alteração dos níveis plasmáticos de CGRP- (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), adrenomedulina ou endotelina após hipertensão induzida pelo chumbo. Utilizamos 40 ratos machos Wistar adultos jovens (pesando 200g). Grupo Pb (n=12) foi intoxicado com acetato de chumbo (1ª dose 8 µg /100g do rato, e subsequentes doses 0.1µg/100g intra-peritoneal para cobrir a perda diária, durante sete dias) e tratados com doxíciclina 30mg/kg/dia do rato (Pb+Doxy = 12) via oral uma vez ao dia. Grupo controle (n=8) recebeu acetato de sódio para oferecer quantidade equimolar de moléculas de acetato do grupo Pb. Grupo controle também foi tratado com doxíciclina (Grupo Doxy, n=8). Todos os tratamentos foram realizados por sete dias. A concentração em chumbo em sangue total foi determinada em forno de grafite por espectrometria de absorção atômica. Concentrações plasmáticas de adrenomedulina, CGRP, endotelina e MMP-2 foram avaliadas usando kits comerciais de imunoenensaio enzimático (ELISA). O comitê de ética institucional (protocolo nº 458/2013) aprovou todos os experimentos. Houve aumento na pressão sistólica (grupo Pb $167 \pm$ mmHg vs. 142 ± 2 ou 143 ± 3 mmHg no grupo controle) ($P < 0.05$), entretanto, doxíciclina mostrou diminuir valores (137 ± 3 mmHg no grupo Pb+Doxy). A concentração de chumbo no sangue foi significativamente aumentada em ambos os grupos intoxicados (Pb e Pb + Doxy) que apresentou $10 \mu\text{g/dL}$ ($\pm 1,0$) vs. $2,0 \mu\text{g/dL}$ ($\pm 1,0$) em grupos não intoxicados (grupos Controle ou Doxy). Doxíciclina reverteu a redução de 45% nos níveis de adrenomedulina induzido pelo chumbo (grupo Pb apresentou 0.43 ($\pm 0,2$) vs. 1.0 pg/mL ($\pm 0,2$) em grupo Pb+Doxy). Não observamos mudança nos níveis plasmáticos de CGRP, endotelina e MMP-2. Sugerimos que a hipertensão induzida pela exposição ao chumbo 8 µg /100g p.c. (dose inicial), e subsequentes doses 0,10 µg /100g p.c. rato pela via intra-peritoneal, diariamente durante sete dias, com nível médio sanguíneo de $10,0 \pm 1 \mu\text{g/dL}$, possivelmente aumenta a atividade das MMP-2. Entretanto, o teste de zimografia, revelou ser MMP-9 a metaloproteinase com a atividade aumentada em nosso modelo experimental. Esta hiperatividade pode estar relacionada com a diminuída concentração de adrenomedulina plasmática, mas não com CGRP e endotelina, que pode contribuir para hipertensão induzida pela exposição aguda ao chumbo. **Palavras chave:** Hipertensão, Chumbo, Doxíciclina, Peptídeos vasoativos.

ABSTRACT



ABSTRACT

In this work was investigated the participation of MMP's in acute lead intoxication, as well as if doxycycline reverses the lead-induced hypertension, and whether there are changes in CGRP (calcitonin gene related peptide), adrenomedullin or endothelin plasma levels after lead-induced hypertension. 40 Wistar young adult male rats (weighting 200g) were used. Pb group (n=12) was intoxicated with lead acetate (1st dose 8 µg/100g of body weight, and subsequent doses 0.10 µg/100g, intra-peritoneal to cover daily loss, during seven days) and treated with doxycycline (30mg/kg of body weight) (Pb+Doxy group, = 12) or saline (Pb group, = 12) by gavage, once a day. Control groups (n=8) received sodium acetate in order to offer the same amount of acetate molecules as Pb group. Control group was also treated with doxycycline (Doxy group, n=8). All treatments were performed for seven days. Lead concentrations in whole blood were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Plasma adrenomedullin, CGRP, endothelin and MMP-2 concentrations were evaluated using commercial enzyme immunoassays (ELISA) kits. All experiments were approved by the Institution ethics committee (protocol nº 458/2013). There was an increase ($P < 0.05$) in the systolic blood pressure of Pb group (167 mmHg vs. 142 ± 2 or 143 ± 3 mmHg in Control group), however, doxycycline showed a decrease in these values ($137 \pm$ mmHg in Pb+Doxy group). The lead concentrations in blood were significantly increased in both intoxicated groups (Pb and Pb+Doxy groups) which presented $10 \mu\text{g/dL} \pm 1,0 \mu\text{g/dL}$ vs. $2 \mu\text{g/dL} \pm 1,0 \mu\text{g/dL}$, in non-intoxicated groups (Saline or Doxy groups). Doxycycline reversed the reduction of 45% in the levels of adrenomedullin induced by lead (Pb group presented 0.43 pg/mL vs. 1.0 pg/mL in Pb+Doxy group). We did not observe changes in the plasmatic levels of CGRP, endothelin and MMP-2. We suggest that hypertension induced by lead exposure (8 µg/100g body weight – first dose, and subsequent doses 0,10 µg/100g body weight, intraperitoneal, daily, for seven days) with mean blood levels of 10,0 ug/dL, possibly increases plasma activity of MMP-2. However, when zymography test was performed, MMP-9 revealed to be the metalloproteinase with increased activity in this experimental model. This hyperactivity could be related with decreased plasma levels of adrenomedullin, but not with CGRP and endothelin, which may contribute to lead-induced hypertension in acute exposures.

Keywords: Hypertension, Lead, Doxycycline, Vasoactive peptides

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1-Relevância e implicações da exposição ao chumbo	1
1.2- Efeitos cardiovasculares da exposição ao chumbo	2
1.3- A relação entre as metaloproteinases - MMPs e a hipertensão induzida pelo chumbo	4
2- HIPÓTESES	8
3 - OBJETIVOS	10
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1- Determinação do peso corporal e da pressão arterial sistólica	15
4.2- Obtenção das amostras dos animais	15
4.3- Determinação das concentrações de chumbo em sangue total.....	16
4.4- Determinação da expressão e da atividade das MMPs	17
4.5- Avaliação dos níveis plasmáticos de adrenomedulina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e endotelina-1.....	19
4.6- Determinações das concentrações de Nitrito/nitrato (NOx).....	19
4.7- Avaliação da capacidade antioxidante do plasma	20
4.8 Análise de dados e estatística	20
5 - RESULTADOS	22
5.1 – Efeitos da exposição ao chumbo e a concentração encontrada em sangue total	22
5.2 – Efeitos da exposição ao chumbo na pressão sistólica	23
5.3 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre as concentrações de adrenomedulina circulante	24
5.4 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre a concentração de CGRP circulante	25
5.5 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre a concentração de endotelina-1 circulante	26
5.6 - Doxíciclina atenuou o aumento induzido pela exposição ao chumbo da atividade da MMP-9	27
5.7 – Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9	28
5.8 – Efeitos da exposição ao chumbo sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico	34
5.9 – Efeitos da exposição ao chumbo sobre a capacidade antioxidante no plasma [MTT].	35
6 - DISCUSSÃO	37
7 – CONCLUSÕES	42
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

INTRODUÇÃO



1-INTRODUÇÃO

1.1-Relevância e implicações da exposição ao chumbo

O chumbo é uma toxina ambiental capaz de causar doenças agudas e crônicas (BROWN & MARGOLIS, 2012). O chumbo é um metal pesado de cor cinza-azulado que ocorre naturalmente na crosta terrestre mas que, raramente é encontrado como um metal isolado e sim combinado com dois ou mais elementos, para formar os compostos de chumbo ou ainda com outros metais para formar ligas de chumbo nas munições de armas, cabo de cobre e equipamentos de proteção à radiação. O maior uso de chumbo é em baterias de carros é também encontrado em tintas, corantes, e esmaltes cerâmicos e outros (ATSDR, 2007). Este metal é considerado de alto risco para saúde pública (FIORIN, 2011). Atualmente é conhecido como principal poluente industrial e os efeitos maléficos variam conforme a concentração e o tempo de exposição, faixa etária, estado de saúde em geral (TAHERI et al., 2014). A toxicidade do chumbo produz efeitos clínicos, ou bioquímicos que envolvem vários sistemas de órgãos e atividades bioquímicas (MOREIRA & MOREIRA, 2004). A Agência de Registros de Substâncias Tóxicas e Doenças - (ATSDR, 2007) recomenda que o nível de segurança para a exposição ocupacional ao chumbo é abaixo de 60 µg/dL (SILVEIRA et al., 2013). No entanto, estudos têm demonstrado que indivíduos com concentração entre 31,4 e 53,5 µg/dL apresentaram hipertensão arterial, porém, não tem sido dada a devida atenção aos efeitos da exposição a baixas concentrações de chumbo a que são expostos muitos profissionais (SILVEIRA et al., 2013).

Historicamente, as principais fontes de exposição ao chumbo nos Estados Unidos e em diversos países foram tintas, gasolina, reparos por soldas de encanamentos, tubulações, alimentos enlatados, bebidas alcoólicas contaminadas, bem como a exposição ocupacional durante a mineração (FLEGAL, & SMITH, 1995). Atualmente, a contaminação do solo permanece sendo uma importante fonte de exposição ao chumbo nas sociedades industriais (DOUAY et al., 2012 ; PELTRENE et al., 2012) e a exposição ao chumbo continua ocorrendo de maneira preocupante em países como o Brasil. Recentemente, a reciclagem de computadores descartados emergiu como uma fonte de exposição ao chumbo entre os trabalhadores envolvidos neste tipo de ofício (EL-HELALY et al., 2011). Apesar dos esforços para controlar a exposição ao chumbo, casos graves de intoxicação ocorre cada vez mais como resultado de um maior tráfego de veículos e da industrialização (SHAIK, SULTANA & ALSAEED, 2014).

Após ser absorvido, o chumbo é distribuído no sangue, ossos e tecidos moles. Aproximadamente 99% da concentração de chumbo no sangue estão ligados aos eritrócitos, apenas 1% está presente no plasma (XIE, 1998). A meia-vida do chumbo no sangue é de aproximadamente 30 dias em indivíduos com função renal normal (HRYHORCZUK, et al., 1985), sendo o rim a principal via de excreção de chumbo. No entanto, mais de 95% da quantidade total de chumbo no corpo humano encontra-se depositado nos ossos (SANIN et al., 1998).

O chumbo é qualitativamente um análogo biológico do cálcio, sua entrada e liberação do esqueleto são, em parte, controladas por muitos dos mecanismos que regulam a homeostase do mineral (SMITH; OSTERLOH & FLEGAL, 1996). O chumbo depositado nos ossos pode sofrer mobilização para a circulação, principalmente em certos estados fisiológicos e patológicos que promovem a reabsorção óssea (PIRES; MIEKELEY & DONANGELO, 2002). Sendo assim, a toxicidade persiste por muito tempo após cessar a exposição externa (RABINOWITZ, 1991; SMITH; OSTERLOH, & FLEGAL, 1996). Portanto, é difícil determinar a quantidade de chumbo total no organismo, sendo a quantificação da concentração de chumbo no sangue total um reflexo (principalmente) da exposição recente ou atual a este metal pesado (TSAIH, et al., 1999).

1.2- Efeitos cardiovasculares da exposição ao chumbo

Estudos em populações gerais identificaram associação da exposição ao chumbo com alterações cardiovasculares (doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral e de doença arterial periférica), em alguns casos foram observadas essas associações com níveis de chumbo no sangue $<5 \text{ ug/ dL}$ (NAVAS-ACIEN, et al., 2007).

Recentemente muitos estudos têm sido direcionados aos efeitos do chumbo no sistema cardiovascular e a hipertensão arterial (FIORIN, 2011). Pesquisas tanto em humanos como em ratos, demonstraram uma relação entre a exposição em longo prazo ao chumbo e o aumento da pressão arterial (BOST et al., 1999; MARTIN et al 2006; NAVAS-ACIEN et al., 2007; REZA, et al 2008; GRIZZO & CORDELLINI, 2008).

Dado o impacto que a hipertensão causa nos humanos a remodelagem na estrutura e funcionamento das artérias é um dos parâmetros de maior importância a ser analisado (CASTORENA-GONZALES et al., 2014). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar, ao menos em parte, as alterações cardiovasculares e especialmente a hipertensão arterial induzida pela exposição ao chumbo. Neste

contexto, incluem-se: a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS), visto que estudos demonstraram que o radical hidroxila pode ser o principal radical envolvido. Neste estudo, as células endoteliais da aorta de ratas foram incubadas na presença de 0, 0,01, 0,1, 0,5, e 1,0 ppm de acetato de chumbo para 1, 24, e 48 h. Após a exposição ao chumbo durante 48 h, a formação 2,3 ADHB foi significativamente aumentada, demonstrando claramente que a exposição ao chumbo promove a geração de radicais hidroxilas e induz o stress oxidativo em células endoteliais isoladas (DING, GONICK & VAZIRI, 2000). Além disso, efeitos semelhantes foram observados em animais expostos ao chumbo, houve inativação de óxido nítrico derivado do endotélio por radicais livres de oxigênio produzidos localmente, o que parece ser um dos eventos principais a contribuir para a disfunção endotelial e hipertensão em animais expostos ao chumbo (DING, GONICK & VAZIRI, 2000; DING et al., 2001), redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (CARMIGNANI et al., 2000), aumento da reatividade vascular aos vasoconstritores endotelina e uma diminuição nos níveis de fatores de relaxamento endotelial como guanosina monofosfato cíclico - (GMPc) (KHALIL-MANESH et al., 1993). Enquanto muitas hipóteses já foram levantadas para explicar o patogênese da hipertensão induzida por chumbo, afirma-se que há um aumento da concentração de cálcio intracelular nas células da musculatura lisa vascular (MARQUES et al., 2001) catecolaminas (SKOCZYNSKA et al., 1986) e angiotensina (CARMIGNANI et al., 2000; SKOCZYNSKA; WROBEL & ANDRZEJAK, 2001; SIMOES et al., 2011) e diminuição da resposta a vasodilatadores como a acetilcolina e o nitroprussiato de sódio (VAZIRI, 2008). Uma vez que a disfunção endotelial está associada à hipertensão arterial (FIORIN, 2011) e a hipertensão é um fator de risco para outras doenças cardiovasculares (BERNATOVA, 2014). No entanto, resultados paradoxais têm sido relatados. Por exemplo, alguns estudos demonstraram que não há alterações significativas na reatividade vascular após exposição ao chumbo (PURDY et al., 1997; SHELKOVNIKOV & GONICK, 2001) ou a hipertensão induzida pelo chumbo foi acompanhada da indução de fatores responsáveis pela vasodilatação (FIORIM et al., 2011). Estas inconsistências são provavelmente devido a diferenças em fatores relevantes, tais como a idade dos animais estudados, as doses de chumbo administradas, a quantidade de chumbo absorvido pelos animais e o tempo de tratamento (WINNEKE; COLLET & LILIENTHAL, 1988; WINNEKE, 2011). A avaliação das concentrações de chumbo em sangue total pode demonstrar melhor comparação entre os estudos.

1.3-A relação entre as metaloproteinases - MMPs e a hipertensão induzida pelo chumbo

Tem sido demonstrado que muitas MMPs podem estar envolvidas na degradação de peptídeos e outras substâncias que quando alteradas podem levar ao desenvolvimento de várias doenças (GRASSO & BONNET, 2014). MMPs são enzimas zinco-dependente envolvidas na degradação de componentes da matrix extracelular durante processos fisiológicos e também patológicos bem como em diversos eventos cardiovasculares (BARBOSA-JR et al., 2006). Estas endopeptidases são sintetizadas e secretadas como pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs). A pró-forma da enzima, latente na matriz extracelular dos tecidos, inclusive na remodelagem de vasos sanguíneos, pode ser ativada por diversos fatores entre eles o estresse oxidativo. Estudos têm mostrado que atividade aumentada ou desequilibrada de MMPs está associada à patogênese de várias doenças como doenças inflamatórias crônicas e doenças cardiovasculares indicando que MMPs podem estar envolvidas no mecanismo de remodelagem cardiovascular (GALIS & KHATRI, 2002). As MMPs parecem ter uma importante participação na hipertensão (SPINALE, 2002). A seguir, a **figura 1** demonstra o mecanismo de ação para ativação das MMPs.

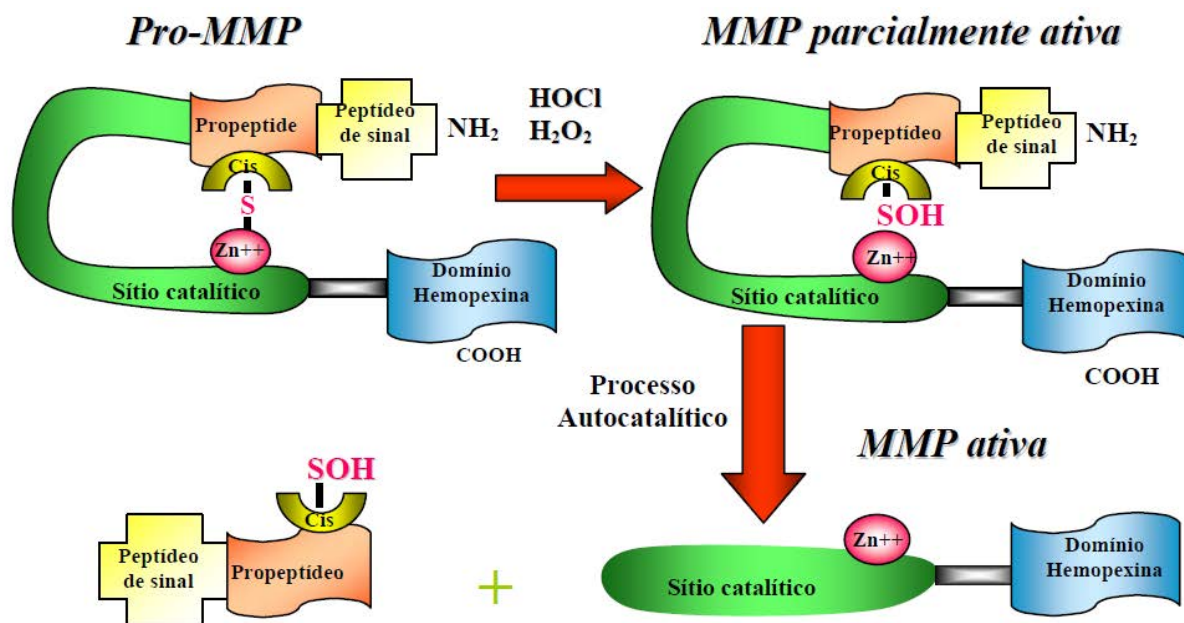


Figura 1- Mecanismo de ativação das MMPs: As MMPs são secretadas como zimógenos inativos que devem ser acionados para tornarem-se ativos. O sítio catalítico contém o zinco que é ligado à cisteína na região do propeptídeo. É necessário manter este arranjo para que a enzima se mantenha inativa. As MMPs

são secretadas como zimógenos inativos que dependem de ser processados para tornarem-se ativos. No local catalítico tem o zinco ligado à cisteína na região do pro peptídeo. No entanto, sob condições de stress oxidativo alguns oxidantes, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode interagir com a enzima e modificar o resíduo tiol. Tais alterações clivam a ligação do zinco no sítio catalítico com o domínio do pro peptídeo, expondo este sítio catalítico da enzima tornando-a ativa (NELSON & MELENDEZ, 2004).

Recentes resultados revelaram o aumento dos níveis de MMP-2 “matrix metalloproteinase type-2” ou metaloproteinase da matriz do tipo 2 após oito semanas de exposição a 90 ppm de chumbo (90mg de Pb por litro de água) e este aumento foi acompanhado da hipertensão induzida pela exposição ao chumbo (RIZZI et al., 2009). De fato, o tratamento de ratos expostos ao chumbo com um inibidor conhecido de MMPs (doxíciclina) (BENDECK et al., 2002) resultou num padrão de atividade da MMP-2 que é muito semelhante ao encontrado em animais não-expostos ao chumbo (RIZZI et al., 2009). Além disso, a doxíciclina inibiu significativamente os aumentos da pressão arterial induzidos pela exposição ao chumbo (Rizzi et al., 2009). Portanto, estes achados sugerem que a MMP-2 tenha um papel nos estágios iniciais da hipertensão induzida pela exposição ao chumbo.

O papel das metaloproteinases (especialmente a MMP-2) na hipertensão pode ser confirmado por estudos recentes sugerindo que a MMP-2 participe da patogênese de diferentes modelos animais de hipertensão (WALTER et al., 2008; CASTRO, TANUS-SANTOS & GERLACH, 2011) assim como em humanos hipertensos (YASMIN et al., 2005; AHMED et al., 2006). Os aumentos dos níveis de MMP-2 foram associados às significativas alterações funcionais bem como na remodelação vascular secundária a hipertensão em ratos e estas alterações são atenuadas pela doxíciclina (GUIMARAES & TANUS-SANTOS, 2011; CASTRO et al., 2012). O mecanismo exato pelo qual a atividade aumentada da MMP-2 correlaciona-se com o aumento da pressão sanguínea que ainda não está esclarecido, no entanto, a MMP-2 pode aumentar a contratilidade vascular ao clivar peptídeos envolvidos no controle do tônus vascular, promovendo a degradação de peptídeos vasodilatadores, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000) adrenomedulina (MARTINEZ et al., 2004), bem como a formação de peptídeos vasoconstritores como endotelina-1 (FERNANDEZ-PATRON; RADOMSKI & DAVIDGE, 1999).

O chumbo pode ativar diretamente as MMPs. Estas consistem em uma família de endopeptidases compostas de um sítio catalítico contendo zinco e cálcio e de um pró-

peptídio que está ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidrila (VISSE & NAGASE, 2003; RAFFETTO & KHALIL, 2008). A ativação enzimática das MMPs requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como a plasmina (MURPHY & NAGASE, 2008) e assim a perturbação desta interação é crucial para a ativação das MMPs (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Neste contexto, o chumbo pode ativar as MMPs através da interação com o resíduo sulfidrila promovendo assim a instabilidade no domínio crítico pro-peptídeo e perturbando a sua interação com íon zinco do sítio catalítico, o que pode resultar numa enzima ativa (LAHAT et al., 2002; TALLANT; MARRERO & GOMIS-RUTH, 2010).

O chumbo pode ativar as MMPs (GERLACH et al., 2000) e resultados recentes mostraram o aumento dos níveis de MMP-2 em ratos expostos ao chumbo por oito semanas, sugerindo um papel da MMP-2 nas fases iniciais da hipertensão induzida pela exposição ao chumbo (RIZZI et al., 2009). A doxíciclina (inibidor das MMPs) (BENDECK ET AL & FARWELL, 2002) inibiu o aumento dos níveis de MMP-2 e este efeito foi associado à redução da hipertensão induzidos pela exposição ao chumbo (RIZZI et al., 2009).

A atividade aumentada da MMP-2 correlaciona-se com a elevação da pressão arterial (CASTRO; TANUS-SANTOS & GERLACH, 2011), esta correlação pode ser explicada pelo fato de que a MMP-2 parece clivar peptídeos envolvidos no controle do tônus vascular, promovendo a degradação de peptídeos vasodilatadores o CGRP (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000) e adrenomedulina (MARTINEZ et al., 2004) e clivando a big-endotelina-1 em endotelina-1 que é um peptídeo vasoconstritor (FERNANDEZ-PATRON & DAVIDGE, 1999).

HIPÓTESES

2- HIPÓTESES

1. A exposição ao chumbo induz hipertensão em ratos e a hipertensão correlaciona-se com os aumentos dos níveis plasmáticos da MMP-2 e a doxíciclina inibe ambos os efeitos;
2. O aumento dos níveis plasmáticos da MMP-2 correlacionam-se com alterações dos níveis plasmáticos de peptídeos vasoativos (reduções dos peptídeos vasodilatadores: adrenomedulina e CGRP e elevação do peptídeo vasoconstritor: endotelina-1) e a doxíciclina inibe estes efeitos.

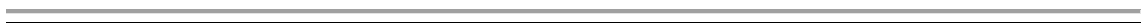
OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

1. Avaliar os efeitos pressóricos da doxíciclina na hipertensão arterial induzida pela baixa exposição ao chumbo;
2. Examinar se o aumento dos níveis plasmáticos de MMP-2 induzido pela exposição ao chumbo correlacionam-se com a redução dos níveis plasmáticos do CGRP e adrenomedulina ou com o aumento da endotelina-1 e se a doxíciclina inibe estes efeitos.

MATERIAIS e

MÉTODOS



4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e intoxicação com chumbo e tratamento com inibidor de MMPs

Foram utilizados 40 ratos Wistar (peso: 190-210 g) provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp) em Botucatu (SP). Os animais foram alojados em uma sala apropriadamente climatizada (com manutenção da temperatura em $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com controle cíclico de luz (com 12 horas de luz /12 horas de escuridão) e tiveram livre acesso a água e a ração própria para ratos. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética institucional (protocolo nº 458/2013).

Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo dois grupos de ratos que foram expostos ao acetato de chumbo [$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + 3\text{H}_2\text{O}$], 99,9% de pureza (Merck, EUA) ou dois grupos não-expostos ao chumbo (controles). No grupo acetato de chumbo e doxíciclina (inibidor inespecífico das metaloproteínas) [**Grupo (1) acetato de Pb + Doxíciclina, n = 12**] os animais receberam (1ª dose 8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ peso corpóreo (p.c) do rato, e subsequentes doses 0,10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ p.c. do rato intra-peritoneal para cobrir a perda diária, durante sete dias) e tratados com doxíciclina 3mg/100g p.c. do rato via oral uma vez ao dia durante sete dias. No grupo acetato de chumbo e salina [**Grupo (2) acetato de Pb + Salina, n = 12**] os animais receberam a 1ª dose 8 $\text{m}\mu/100\text{g}$ p.c., e subsequentes doses 0,10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ p.c. do rato intra-peritoneal para cobrir a perda diária, durante sete dias e receberam salina no mesmo volume que doxíciclina por via oral uma vez ao dia durante sete dias.

Dois grupos controles não foram expostos ao acetato de chumbo, porém um grupo foi exposto ao acetato de sódio [$\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2) + 3\text{H}_2\text{O}$], 99% de pureza (JT Baker, Canadá) e recebeu 30mg/kg/dia de doxíciclina por gavagem. O grupo controle acetato de sódio e doxíciclina [**Grupo (3) acetato de Na + Doxíciclina, n = 8**] os animais receberam acetato de sódio em quantidade equimolar de moléculas de acetato do grupo Pb, este grupo controle também foi tratado com doxíciclina 30 mg/kg/dia. E também o grupo acetato de sódio e salina [**Grupo (4) acetato de sódio + salina, n = 8**] onde os animais foram tratados da mesma forma que os animais do grupo acetato de sódio + Doxíciclina, porém no lugar da doxíciclina os ratos receberam o mesmo volume de salina por gavagem uma vez por dia.

Materiais:**Reagentes e soluções utilizados nos experimentos:****Reagentes:**

- ✓ Acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 + 3\text{H}_2\text{O}$), 99,9% de pureza (Merck, EUA).
- ✓ Acetato de sódio ($\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2) + 3\text{H}_2\text{O}$), 99% de pureza (JT Baker, Canadá).
- ✓ Doxíciclina foi adquirida da clínica veterinária Polivet (Botucatu, SP, Brasil)

Soluções:**Preparação das soluções para intoxicação e tratamento dos animais:**Intoxicação com chumbo:

- ✓ Acetato de chumbo 8mg/100g p.c. do rato.
- ✓ Solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio.

Tratamento do grupo controle:

- ✓ Acetato de sódio 8 mg/100g p.c.do rato.
- ✓ Solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio.

Tratamento com doxíciclina

- ✓ Doxíciclina 30 mg/kg p.c. do rato.
- ✓ Solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio (1:1 de volume de doxíciclina).

Determinação da concentração de chumbo no sangue

Ácido Nítrico 65% PA (Carlo Erba, Italia);

Dosagem das MMP-2 e MMP-9 e dos peptídeos

Kits de ELISA;

Zimografia e eletroforese para MMPs pelo sistema SDS-PAGE

- ✓ Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%: Acrilamida (30 g), bisacrilamida: (0,8 g) e água destilada q.s.p 100 mL. (6% no gel de largada e 12% no gel de corrida)
- ✓ Tampão do Gel de Separação 4 x Tris HCl/ SDS - pH 8,8: Tris Base: 91 g em 300 ml de água destilada, HCl 1 N para ajustar pH para 8,8, água destilada q.s.p 500 mL e SDS: 2 g.

- ✓ Tampão do Gel de Larga 4 x Tris HCl/SDS – pH 6,8: Tris Base: 6,05 g em 40 mL de água destilada, HCl 1 N para ajustar o pH 6,8, água destilada q.s.p 100 mL e SDS : 0,66 g.
- ✓ Persulfato de Amônio (APS) 10%: APS: 1,0 g e Água destilada q.s.p 10 mL.
- ✓ Gelatina 40 mg/ml (w/v): Gelatina: 1,0 g e água destilada: 20 mL.
- ✓ Tampão de Corrida 5x : Tris Base: 15,1 g, Glicina: 72,0 g, SDS: 5,0 g, água destilada q.s.p 1000 mL (Diluído 1x quando usado).
- ✓ Solução Renaturante Triton X-100 a 2 % (v/v): Triton X-100 10 mL em água quente e água destilada q.s.p. 500 mL.
- ✓ Tris.HCl 1 M – pH 7,4: Trizma Base (Tris): 121 g, HCl 1 N para pH para 7,4.
- ✓ Tampão Tris a 50 mM com CaCl₂ a 10 mM – pH 7,4: Tris.HCl 1 M pH 7,4: 50 mL em água destilada q.s.p 1000 mL e CaCl₂. 6 H₂O: 2,2g.
- ✓ Corante Coomassie Blue: Metanol 30 %, Ácido acético 5%, Coomassie Blue G-250 0,05%.
- ✓ Descorante: Metanol 30 %, Ácido acético 10 %.
- ✓ Tampão de Amostra Não Redutor 2 X: Tris HCl/SDS (4x) - pH 6,8: 25,0 mL , Glicerol: 20,0 mL, SDS: 4 g, azul de bromofenol: 1,0 mg (dentro do dessecador) e água destilada q.sp. 100 mL.
- ✓ Solução de encolhimento: Metanol 50%, Glicerol 5 %.
- ✓ Tampão de extração: CaCl₂ 10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM.

Equipamentos utilizados nos experimentos:

- ✓ Aparelho de aferir pressão- Pletismógrafo de cauda V2. 11-INSIGHT;
- ✓ Agitador de placas – BIOSAN;
- ✓ Balança de precisão- OHAUS, ANALITICAL Standard;
- ✓ Balança para pequenos animais;
- ✓ Centrífuga – UNIVERSAL 320 R, Hettich Zentrifugen;
- ✓ Espectrômetro de absorção atômica (Marca GBC modelo AA 932); Forno de micro-ondas (marca PROVECTO, modelo DGT 100 plus)
- ✓ Leitor de Elisa SYNERGY 4 (Biotek);
- ✓ Programa ImageJ versão 1.43u (NIH – National Institutes of Health).

Métodos:**4.1- Determinação do peso corporal e da pressão arterial sistólica**

O peso dos animais e a pressão arterial de cauda foram determinados uma vez por dia, durante sete dias de exposição ao chumbo e tratamento com doxiciclina. Os animais foram pesados em uma balança para pequenos animais. O método utilizado para aferir pressão arterial sistólica dos ratos foi por pletismografia de cauda. Este método consiste em colocar a cauda do animal dentro de um esfignomanômetro conectado a um sensor. O animal é colocado em um contensor de acrílico e levado ao bioaquecedor de 40 °C dentro de um contensor de acrílico. O animal permanece neste local por 10 minutos e em seguida levado ao pletismógrafo contendo um esfignomanômetro que será envolvido na cauda do rato. O animal permanece neste local por cerca de 3-5 minutos em estado de vigília para se acostumar com o ambiente evitando que o estresse induzido por ele não interfira na pressão arterial. A temperatura é necessária para promover um aquecimento do animal, levando a uma dilatação da artéria caudal. Após este período, o esfignomanômetro é inflado, promovendo a compressão da artéria caudal do animal e possibilitando a medida de pressão realizada pelo aparelho. São aferidas três mediadas sucessivas para cada animal.

4.2- Obtenção das amostras dos animais

Após o período de uma semana de exposição ao Pb e de tratamento os animais foram decapitados e 1mL de sangue foi recolhido em tubo Vacutainer (BD System) livre de metal para análise da concentração de chumbo no sangue total. Outros 4 mL de sangue foram coletados em tubos heparinizados marca BD Flanklin lakes NJ USA 8362817 centrifugados por 5 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Estas amostras foram aliqotadas em tubos Eppendorf para determinação da expressão e atividade das metaloproteinases e concentrações de chumbo, respectivamente. As amostras de sangue utilizadas para posteriores análises foram armazenadas em seus respectivos tubos devidamente etiquetados a uma temperatura de -80°C para determinação de metaloproteinases e -40 °C para determinação das concentrações de chumbo no sangue.

4.3- Determinação das concentrações de chumbo em sangue total

As análises de chumbo foram realizadas em colaboração com o Dr. Alaor Aparecido Almeida, Centro de Assistência Toxicológica – Instituto de Biociências - Universidade do Estado de São Paulo CEATOX - IBB – UNESP, Brasil.

Preparo de mineralização do sangue

Foram pesadas de 2 a 4 gramas de sangue homogeneizado (agitador de tubo tipo Vortex®) em balança analítica, colocadas no vaso de reação (Oxtaflon®). Adicionou-se entre 4 a 8 mL de ácido nítrico (HNO_3 65%), neste vaso de reação que foi introduzido na “camisa de contenção” devidamente ajustado e travado. Em seguida colocou-se no micro-ondas (dgt 100 - provecto) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Preparo de soluções padrão para Pb e realização da leitura

O preparo da solução estoque foi feito em um balão volumétrico de 1 litro e adicionado chumbo 1000 mg/L (ampola - padrão certificado Merck, Carlo Erba, Fluka ou J Baker), sendo acondicionado em frasco de polietileno. Para preparar a solução padrão intermediária (SI) de chumbo 100,0 ug/mL, pipetou-se 10,0 mL da solução estoque de chumbo em balão volumétrico de 100 mL, completou o volume com HNO_3 a 10% em água deionizada e acondicioná-lo em frasco de polietileno. Já para preparar a curva padrão com padrões de: 0, 10, 20, 40 e 80 ug/dL, foram considerados valores de fator de correlação - R^2 da curva acima de 99,0 %. Para a realização da leitura utilizou-se espectrômetro de absorção atômica otimizado para elemento químico de interesse vide quadro 01 como exemplo determinação de Pb.

Quadro 1 – Otimização do espectrômetro de absorção atômica para determinação de chumbo.

Comprimento de Onda	283,3 nm (opcional 217,0)
Altura e Largura da Fenda	Altura = 1,0 nm Largura 0,5 nm
Tipo de Chama	Ar-Acetileno (parc. Redutora)
Tipo de Correção	UV (lâmpada deutério).
Técnica de Mensuração	Absorção Atômica (Abs)
Fator de Correção	Det. soft tabela de pesos/volumes
Fator de Determinação - R^2	> 0,9
Corrente de lâmpada	Recomendado 5-8 mA
Calibração com 5ppm de cobre (Abs média de 6 leituras).	Mínimo de 0,7 (abs)
Limite de detecção	< 0,05 ppm (ug/mL ou g) ou < 5,0 ug/dL
Atenuação (amplitude)	2,0

Valores de referências (ex: Pb):

-
- Valor normal (NR-7) até 40 µg/100 mL.
 - Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP – NR-7) = 60 µg/100 mL.
-

4.4- Determinação da expressão e da atividade das MMPs

Todas as análises por kits de ELISA foram realizadas em colaboração com Dr. Hélio Kushima - Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências - IBB, Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, Brasil. Enquanto que os ensaios de zimografia foram realizados em colaboração com a Prof^a Dr^a Flavia Dedella - Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências - IBB, Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, Brasil

Determinação dos níveis de MMP-2 e MMP-9

Foram determinados os níveis das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) em plasma sanguíneo através de método imunoenzimático (ELISA) fornecido pelos kits ab100730 MMP2 Mouse e Quantikine MMPT90 (MMP-9). Este ensaio utilizou anticorpos específicos para MMP-2 e MMP-9 de camundongos adsorvidos a uma placa

de 96 poços. Em resumo, as amostras foram pipetadas nos poços e as MMP-2 e MMP-9 presente nas amostras que se ligaram aos anticorpos. Os poços foram lavados e adicionados anticorpos biotinilados anti-MMP-2 e anti-MMP-9 de camundongo. Após a lavagem para retirar os anticorpos biotinilados não-ligados, estreptavidina conjugada com HRP foi pipetada em cada poço. Os poços foram novamente lavados, uma solução de substrato TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionada aos poços e a cor azul desenvolveu-se em proporção à quantidade de MMP-2 ligada e MMP-9 ligada. A solução de parada (ácido sulfúrico) da reação mudou a cor de azul para amarelo, e a intensidade da cor foi medida a 450 nm.

Quantificação das MMP-2 e MMP-9 por zimografia em amostras de plasma

Foi realizado ensaio de zimografia para avaliar a quantidade das MMP-2 e MMP-9 no plasma dos ratos, este ensaio consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de acrilamida co-polimerizado com gelatina (substrato para as MMPs-2 e 9) (RIZZI et al, 2013). Resumidamente, amostras de plasma foram colocadas em tampão de extração (50 mmol/L de Tris-HCL, Ph 7,4 mmol/L de 1,10- fenantrolina e 1 mmol/L PMSF, Nm NEM, e 10 nM Ca Cl₂). Após 16 horas de incubação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteínas (método de Bradford). Os extratos de plasma foram normalizados de acordo com a concentração de proteínas (40µg para MMP-2 e 70µg para MMP-9) depois as amostras foram submetidas à eletroforese em 9% SDS – PAGE co-polimerizado com gelatina (1%) como substrato. Após eletroforese, os géis foram colocados em solução de Triton X- 10 a 2% por 30 minutos a temperatura ambiente, por três vezes, e incubadas a 37 °C durante 16 horas em tampãoTris- HCl, pH 7,4, contendo 10mmol/L CaCl₂. Os géis foram fixados em 30% de metanol e 10% em ácido acético, coradas com 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 por 4 horas, em seguida, descorados com 30% de metanol e 10 % de ácido acético. A atividade gelatinolítica foi detectada como as bandas não coradas contra o fundo azul de gelatina corado em Coomassie azul. As bandas de 72 KDa e de 92 KDa, correspondentes as MMPs 2 e 9 respectivamente, foram identificadas por densitometria utilizando o programa imageJ versão 1. 43u (NIH- National Institutes of Health). A análise entre gel foi possível após a normalização da atividade gelatinolítica com um padrão interno (soro fetal bovino).

Atividade das MMP-2 e MMP-9 por zimografia em amostras de plasma

A atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma foram determinadas pelo método da zimografia, que consiste em uma eletroforese das amostras em um sistema SDS/PAGE que inclui o substrato da enzima (gelatina) no gel de separação, de modo a permitir a evidênciação e quantificação da atividade da MMP-2 e MMP-9.

As amostras de plasma foram diluídas em um tampão de amostra não redutor (Tris HCL/SDS; Glicerol; SDS; e azul de bromofenol; Tris-HCl/SDS) de maneira que cada 10 µL desta solução continha 1µL de plasma.

A determinação da atividade foi feita por meio do perfil das bandas que se tornaram capases de ser visualizadas após coloração com Cromassie Blue. (A atividade das enzimas foi determinada através de análise densitométrica utilizando um sistema de documentação Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System- EDAS 290; Kodak, Rochester, NY). As formas latente e ativa das MMP-2 e MMP-9 foram identificadas através de suas massas moleculares 72 KDa, 68 KDa, 92 KDa e 87 KDa; respectivamente.

4.5- Avaliação dos níveis plasmáticos de adrenomedulina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e endotelina-1

Estas determinações foram feitas utilizando-se kit's comerciais para ensaio imunoenzimático (ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) e seguidas as instruções dos fabricantes para adrenomedulina (Phoenix Pharmaceuticals nº Cat# EK-010-08, (LIAO et al., 2012) ou para CGRP (Phoenix Pharmaceuticals nº Cat# EK-015-09 (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000) ou para endotelina-1 (R&D System nº Cat# DET-100, (TOMOBE et al., 1993).

4.6- Determinações das concentrações de Nitrito/nitrato (NOx)

O níveis de NOx no plasma foram mensurados como previamente citados (Dias-Junior et al., 2010). Brevemente, após a ultrafiltração de plasma através de uma membrana 10 KDa, as amostras foram incubadas com nitrato redutase e cofatores enzimáticos por três horas para a conversão de nitrato em nitrito. Absorbância foi lida a 540 nm usando um leitor de placa após adicionar o reagente Griess que converte o nitrito em um composto azo púrpura.

4.7- Avaliação da capacidade antioxidante do plasma

Reduções directas de MTT (brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi medido como anteriormente descrito (MEDINA et al., 2007). Resumidamente, 100 mL de plasma foram misturados com 12,5 ml de solução de corante (5 mg / mL em PBS); o volume final foi ajustado para 200 mL com PBS e a mistura foi incubada durante 60 min a 37 ° C. A reação foi terminada pela adição de 750 ul de ácido clorídrico 0,04 M em isopropanol. Os tubos foram centrifugados durante 10 min a 1000 g, o sobrenadante foi recolhido e a absorvância foi medida a 570 nm.

4.8 Análise de dados e estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ SEM. As comparações entre os grupos foram avaliadas por duas vias de análise de variância (Prism® 5.0 para Windows), ou ANOVA de uma via seguido do teste Dunn Tukey ou teste T. Um valor de probabilidade $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 – Efeitos da exposição ao chumbo e a concentração encontrada em sangue total

A administração diária de acetato de chumbo causou um aumento significativo em sangue total que atingiu $9 \pm 1 \mu\text{g/dL}$ em ambos os grupos expostos ao chumbo nos (grupos Pb + Doxíciclina e Pb (* $P < 0,05$)) e como já esperado, tratamento com doxíciclina não afetou a toxicinética do chumbo. O nível de chumbo no sangue dos ratos controle (grupos Salina ou Doxíciclina) foram baixos comparado aos ratos que receberam Pb (figura 2).

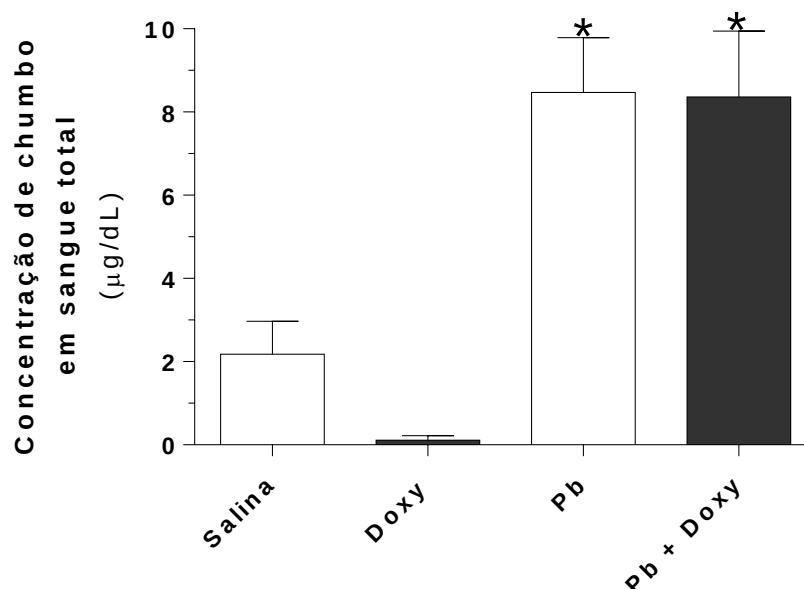


Figura 2- Concentração de chumbo em sangue total. A concentração de chumbo no sangue total aumentou em ambos os grupos expostos ao chumbo (Pb e Pb+Doxy) apresentaram média $10 \mu\text{g/dL}$ vs. $2,0 \mu\text{g/dL}$ nos grupos controle.

5.2 – Efeitos da exposição ao chumbo na pressão sistólica

Os efeitos na pressão arterial sistólica dos ratos expostos ao chumbo por sete dias (1ª dose 8 µg/100g p.c. do rato, e subsequentes doses 0,10 µg/100g do rato intra-peritoneal para cobrir a perda diária, durante sete dias) foi avaliado como mostra na figura 3. O chumbo causou um aumento significativo na pressão arterial sistólica ($167 \pm$ mmHg no grupo chumbo) após sete dias. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores de pressão arterial sistólica dos grupos controle (Salina ou doxiciclina 142 ± 2 ou 143 ± 3 mmHg, respectivamente). Entretanto, o tratamento com doxiciclina preveniu o aumento da pressão arterial sistólica associada à exposição ao chumbo pois, foi encontrado o menor valor de pressão arterial sistólica no grupo (Pb + Doxiciclina 137 ± 3 mmHg) comparado com o grupo Pb ($<0,05$; figura 3).

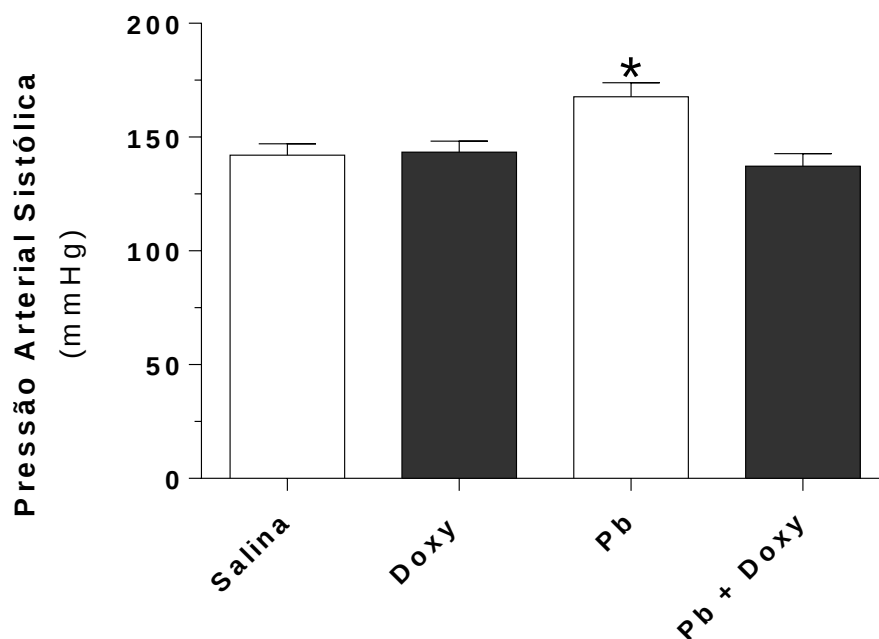


Figura 3- Pressão Arterial Sistólica. Os animais receberam acetato de chumbo com doxiciclina (grupo Pb + Doxiciclina; n= 12) ou veículo (grupo Pb; n=12) por sete dias; os grupos controle receberam acetato de sódio e foram tratados com doxiciclina (grupo Doxy; n=8) ou veículo (grupo Salina; n=8) por sete dias. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM (*p<0,05).

5.3 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre as concentrações de adrenomedulina circulante

Ao final da exposição ao chumbo e do tratamento com doxiciclina por sete dias os animais foram decapitados ao oitavo dia e o sangue destes animais, coletado e imediatamente centrifugados (10 min a 3000 rpm) para obtenção do plasma. Enquanto a exposição ao chumbo resultou na redução de adrenomedulina circulante (grupo Pb, figura 4), os níveis de adrenomedulina foram restabelecidos no grupo Pb + Doxy comparado aos grupos controle (grupos Salina ou Doxy).

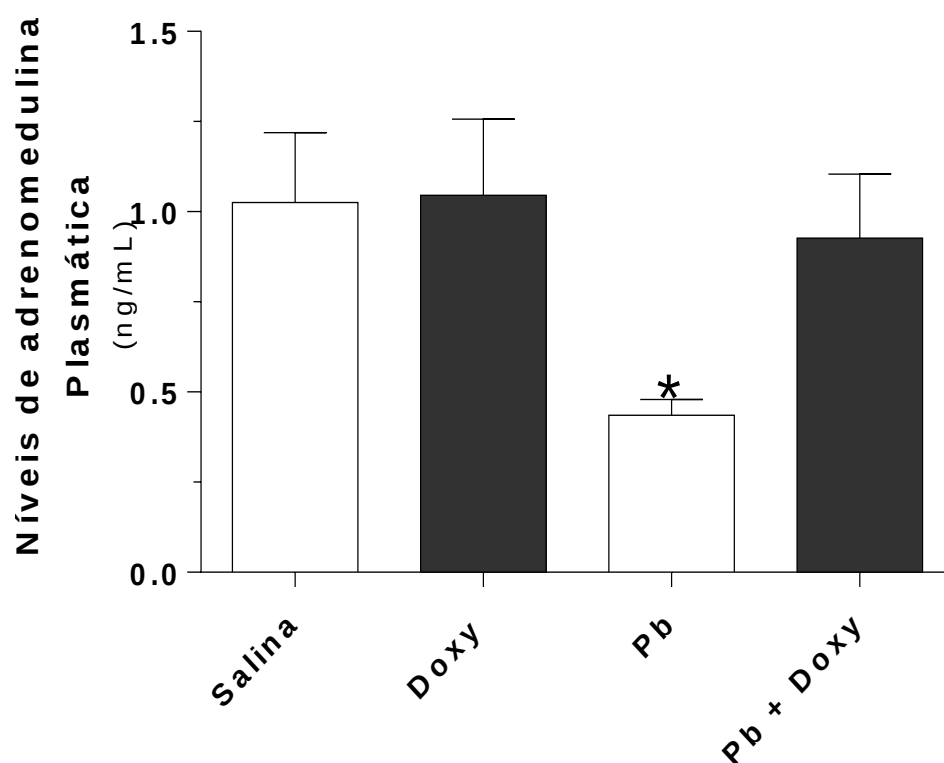


Figura 4- Concentração plasmática de adrenomedulina. Doxiciclina reverteu a redução de 45% nos níveis de ADM, grupo (Pb) apresentou 0,43 vs. 1.0 pg/mL no grupo Pb+Doxy. Dados são apresentados como significativos a Média do desvio padrão (* $p < 0,05$) quando comparados com os respectivos grupos controle.

5.4 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre a concentração de CGRP circulante

A exposição ao chumbo não provocou mudanças significativas para a concentração de CGRP circulantes, conforme mostra a figura 5.

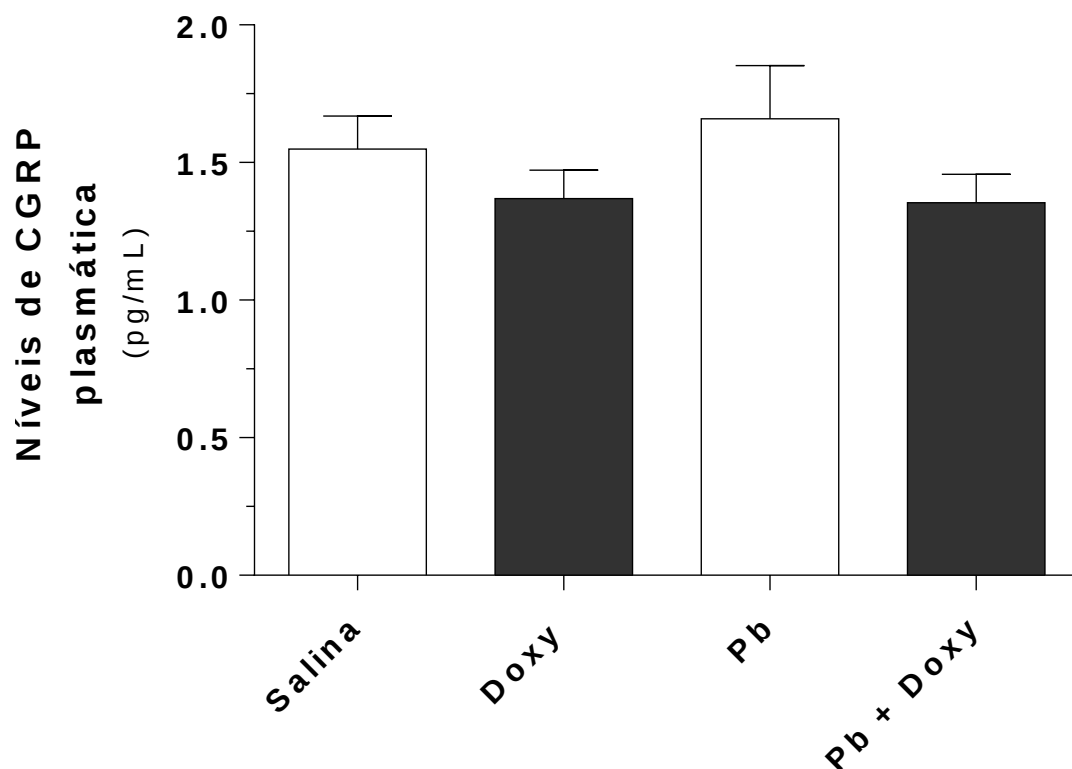


Figura 5- Concentrações plasmáticas de CGRP. O acetato de chumbo não provocou alterações significativas nos níveis de CGRP circulante. Dados são apresentados como significativos a Média do desvio padrão (* $p < 0,05$) quando comparados com os respectivos grupos controle.

5.5 - Efeitos da exposição ao chumbo sobre a concentração de endotelina-1 circulante

A exposição ao chumbo não provocou mudanças significativas para a concentração de endotelina-1 circulantes, conforme mostra a figura 6.

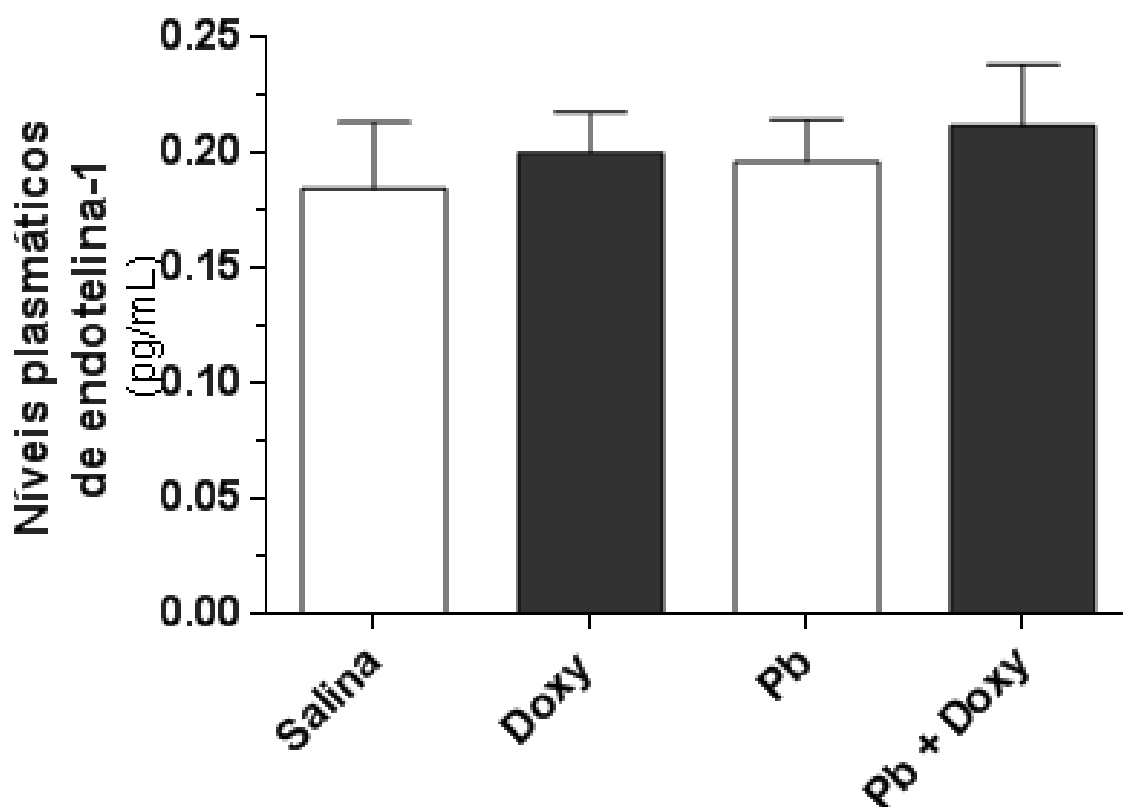


Figura 6- Concentrações plasmáticas de endotelina. A exposição ao chumbo não provocou mudanças significativas para a concentração de endotelina-1 circulantes. Dados são apresentados como significativos a Média do desvio padrão (* $p < 0,05$) quando comparados com os respectivos grupos controle.

5.6 - Doxíciclina atenuou o aumento induzido pela exposição ao chumbo da atividade da MMP-9

Embora no plasma não fossem encontradas diferenças significativas nos níveis/atividade de MMP-2 na forma pró-ativa ou ativa ou MMP-9 ($p > 0,05$, figura 7 e 8), o chumbo aumentou a atividade gelatinolítica da MMP-9 ativa no plasma devido (grupo Pb, $P < 0,05$, figura 7), e este aumento foi evitado pela doxíciclina (Pb + Doxy vs. grupo Pb, $p > 0,05$, figura 7). Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos Salina e Doxy.

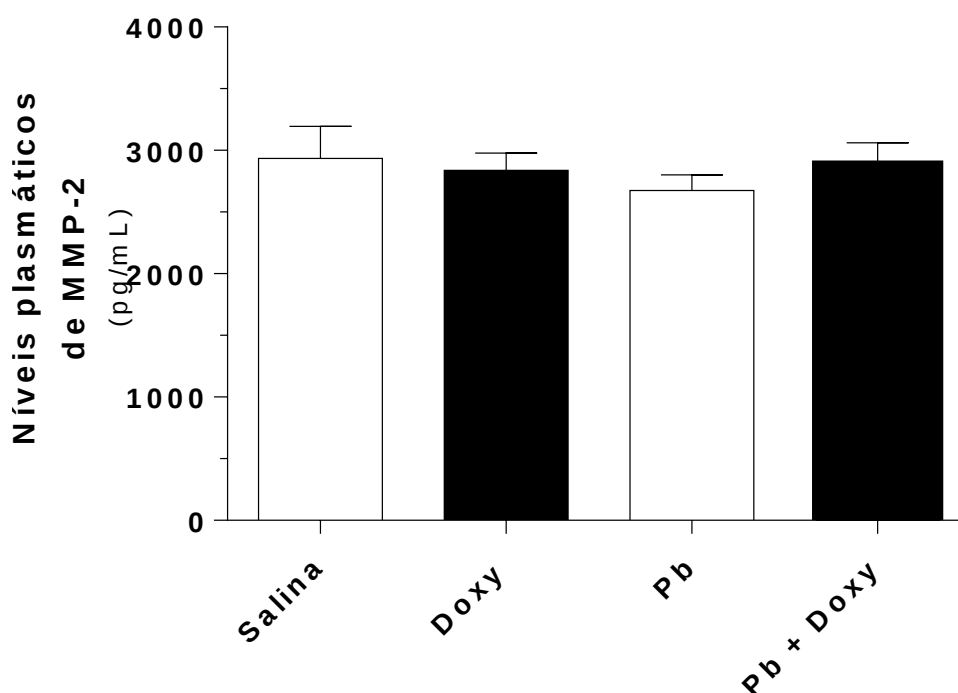


Figura 7- Níveis circulantes de MMP-2. Os ratos receberam acetato de chumbo e tratados com doxíciclina (grupo Pb + Doxy; n=12) ou veículo (grupo Pb; n=12) por sete dias; ou grupo controle receberam acetato de sódio e tratamento com doxíciclina (grupo Doxy; n=8) ou veículo (grupo Salina; n=8) por sete dias. Os dados são apresentados como não significativo ($p > 0,05$) versus respectivo grupo controle.

5.7 – Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9

Zimografia em gel SDS-PAGE (sodium dodecil sulfate - poliacrylamide gel eletroforesis gelatin zymogram) para amostras de plasma representando metaloproteinases da matrix do tipo 2 e tipo 9 [92 e 81 KDa para enzimas pró e ativa, respectivamente [a] relacionando com [b e c] aos valores da atividade genolítica de MMP-9 no plasma e [a] relacionando com [d-f] respectivamente; os ratos receberam acetato de chumbo e foram tratados com doxiciclina [grupo Pb + Doxy; n= 12] ou veículo [grupo Pb; n=12] por sete dias; ou grupos controle receberam acetato de sódio e tratados com doxiciclina [grupo Doxy; n=8] ou veículo [grupo Salina; n=8] por sete dias. Dados são representados como significativo $\pm$ média do erro padrão (*p< 0,05) versus respectivo grupo controle.

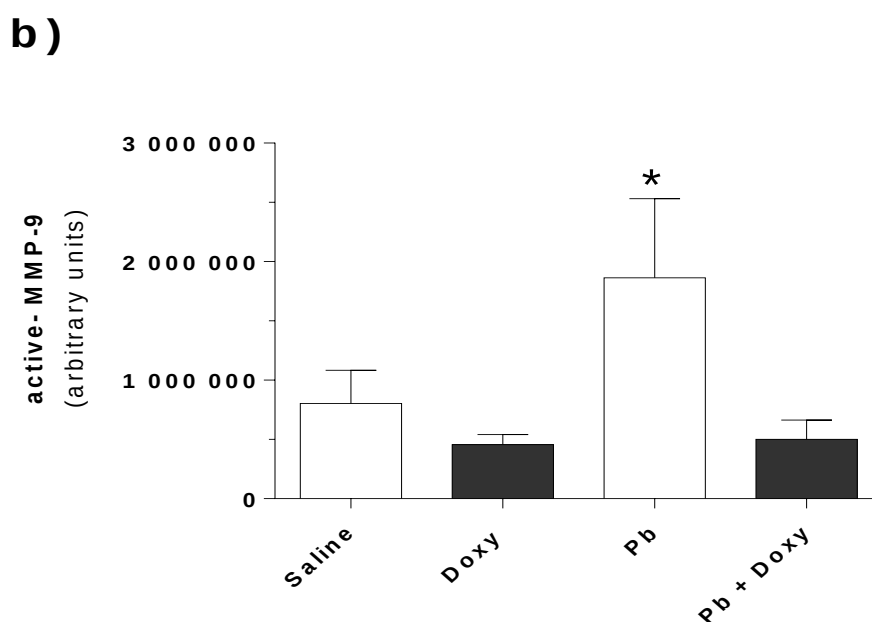
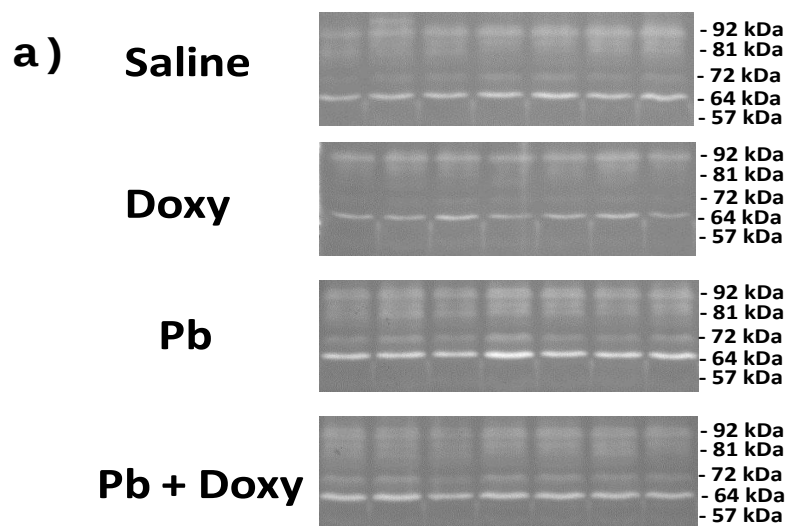
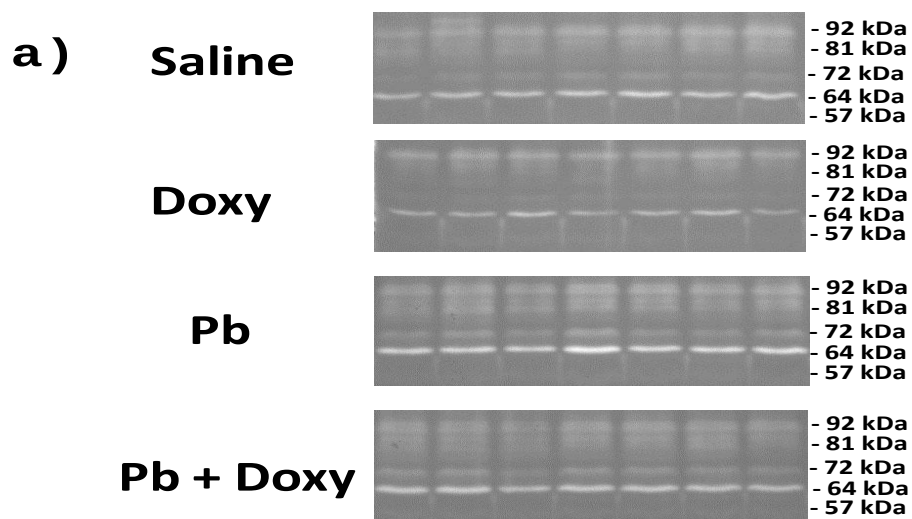


Figura 8-(a-b) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 Zimografia em gel SDS-PAGE para amostras de plasma figura [a] relacionando com figura [b]. Dados são representados como significativo $\pm$ média do erro padrão (* $p < 0,05$) versus respectivo grupo controle.



c)

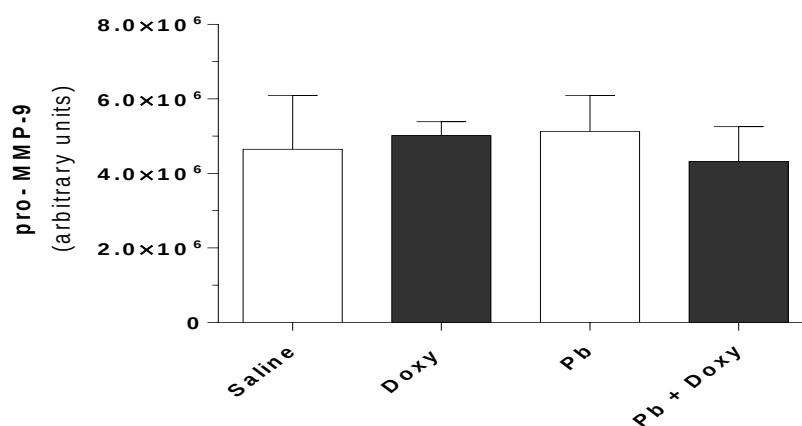
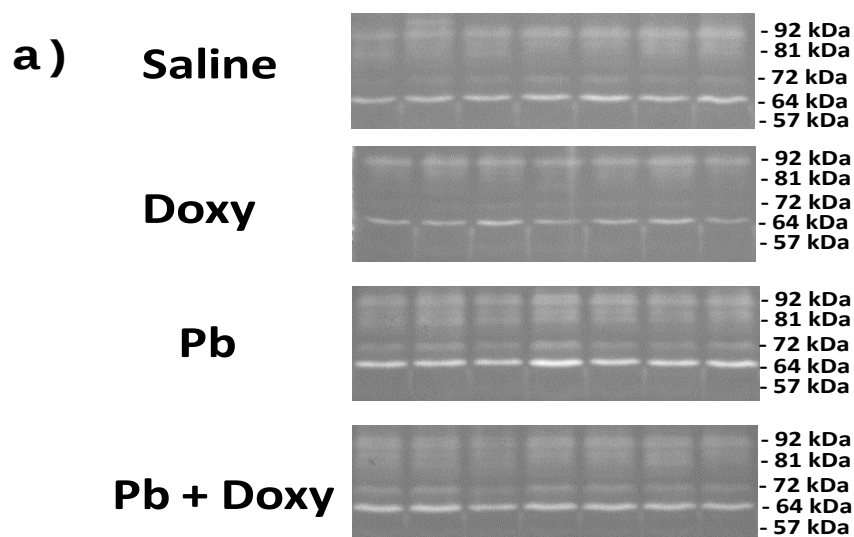


Figura 8-(a-c) Atividade das metaloproteínases MMP-2 e MMP-9 Zimografia em gel SDS-PAGE para amostras de plasma figura [a] relacionando com figura [c]. Os dados são representados como não significativos EPM ($p > 0,05$) versus respectivo grupo controle.



d)

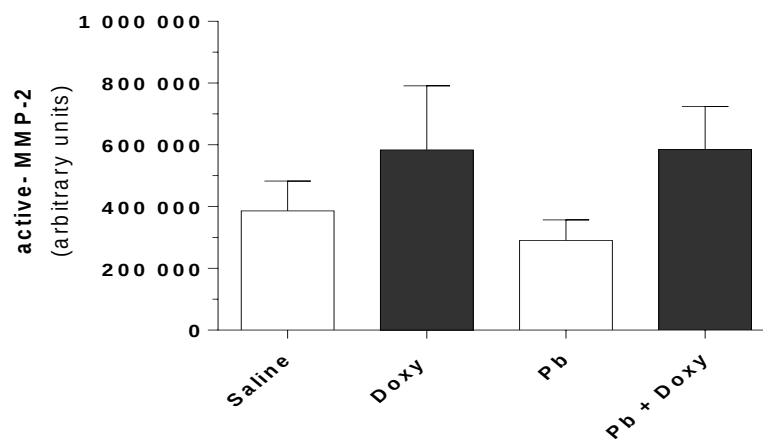


Figura 8-(a-d) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 Zimografia em gel SDS-PAGE para amostras de plasma figura [a] relacionando com figura [d]. Os dados são representados como não significativos EPM ($p > 0,05$) versus respectivo grupo controle.

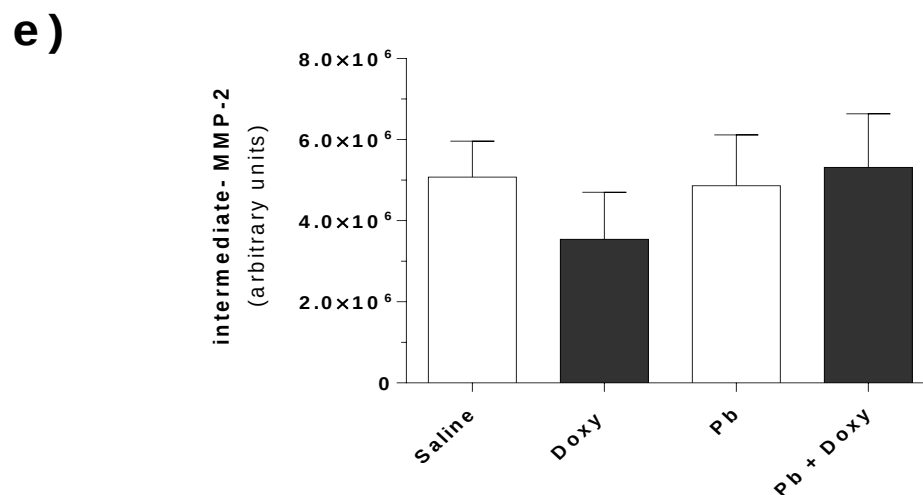
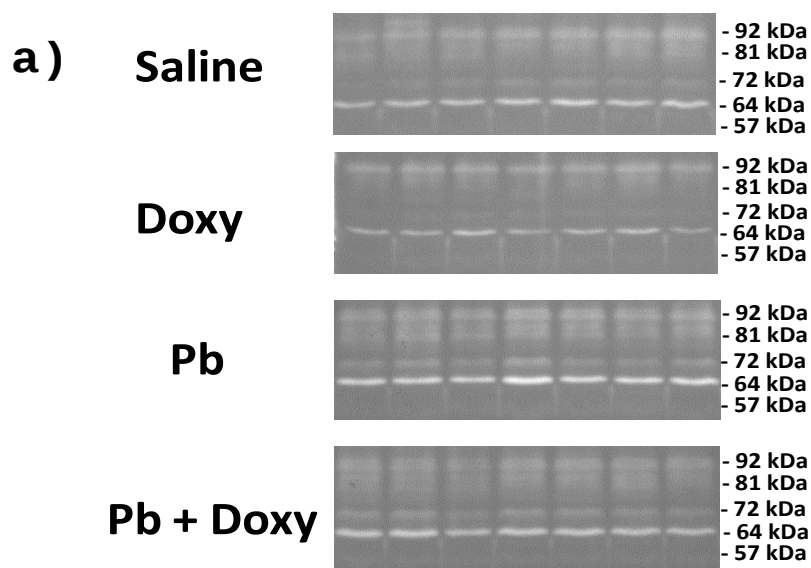


Figura 8-(a-e) Atividade das metaloproteinasas MMP-2 e MMP-9 Zimografia em gel SDS-PAGE para amostras de plasma figura [a] relacionando com figura [e]. Os dados são representados como não significativos EPM ($p > 0,05$) versus respectivo grupo controle.

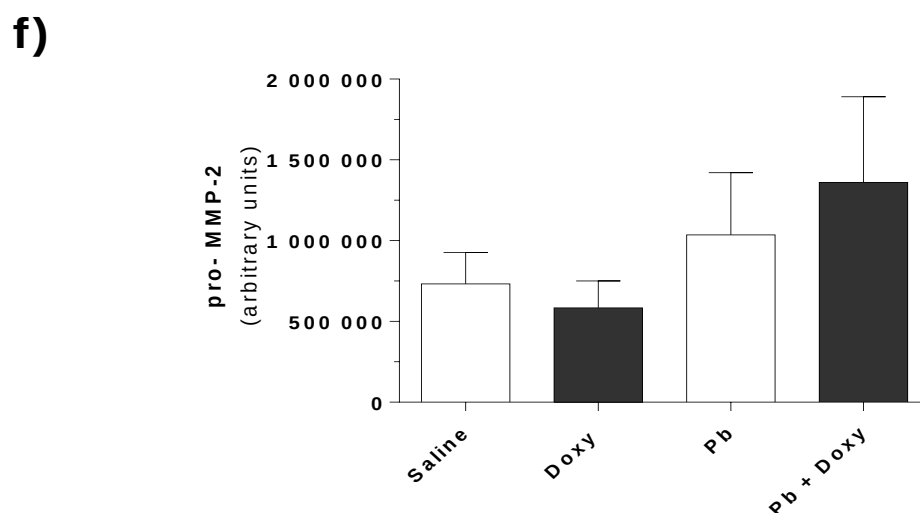
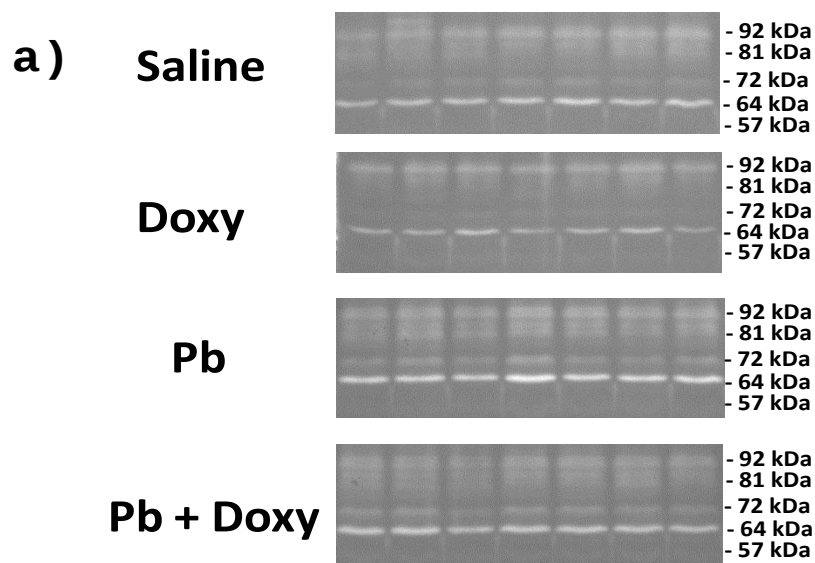


Figura 8-(a-f) Atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 Zimografia em gel SDS-PAGE para amostras de plasma figura [a] relacionando com figura [f]. Os dados são representados como não significativos EPM ($p > 0,05$) versus respectivo grupo controle.

5.8 – Efeitos da exposição ao chumbo sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico

Chumbo reduziu de forma significativa as concentrações de NOx no plasma medidos após sete dias de intoxicação com chumbo tanto no grupo Pb como no grupo Pb + Doxy (ambos $*p < 0,05$, figura-9). Entretanto, doxiciclina não afetou a biodisponibilidade do óxido nítrico.

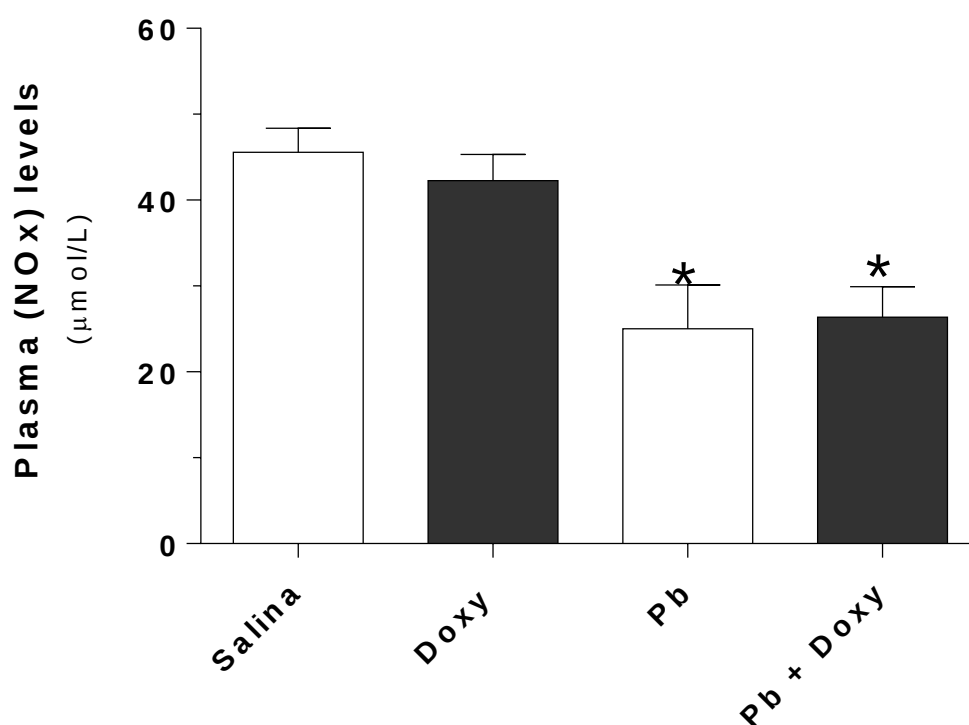


Figura 9- Níveis de óxido nítrico - NOx no plasma. Os ratos foram intoxicados com acetato de chumbo e foram tratados com doxiciclina [grupo Pb + Doxy; n=12] ou veículo por sete dias; ou grupos controle receberam acetato de sódio e tratados com doxiciclina [grupo Doxy; n=8] ou veículo por sete dias. Os dados são representados como significativo $\pm$ média do erro padrão ($*p < 0,05$) versus respectivo grupo controle.

5.9 – Efeitos da exposição ao chumbo sobre a capacidade antioxidante no plasma [MTT].

Chumbo reduziu de forma significativa a capacidade antioxidante plasmática determinada após sete dias de intoxicação com chumbo tanto no grupo Pb como no grupo Pb + Doxy ($P < 0,05$, figura-10). Porém, doxiciclina não reverteu a redução da capacidade antioxidante.

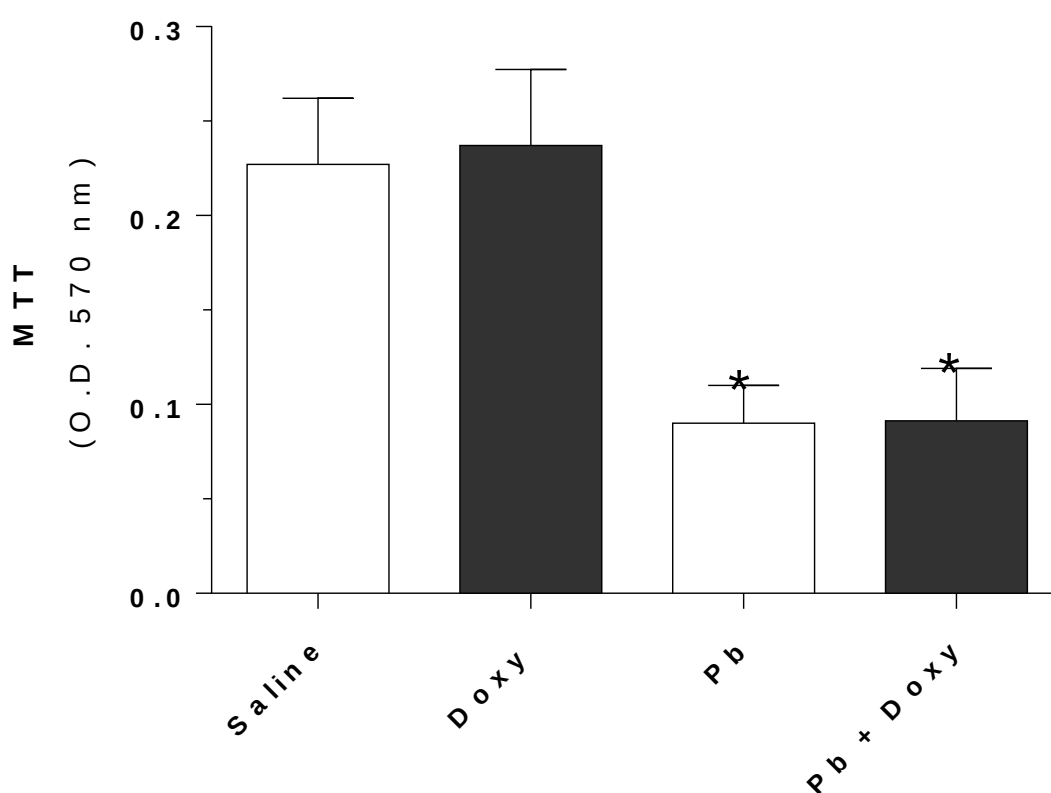


Figura 10 - Efeitos da exposição ao chumbo e capacidade antioxidante no plasma [MTT]. Os ratos foram intoxicados com acetato de chumbo e foram tratados com doxiciclina [grupo Pb + Doxy; n=12] ou veículo por sete dias; ou grupos controle receberam acetato de sódio e tratados com doxiciclina [grupo Doxy; n=8] ou veículo por sete dias. Dados são representados como significativo $\pm$ média do erro padrão (* $p < 0,05$) versus respectivo grupo controle.

DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

Os principais achados no presente estudo revelam pela primeira vez que o tratamento de (uma semana) de exposição ao acetato de chumbo em baixa concentração, resultou em $10,0 \pm 1 \mu\text{g/dL}$ de chumbo em sangue total, que foi suficiente para elevar tanto a pressão arterial sistólica como para aumentar a atividade da MMP-9. Estas respostas estavam associadas com baixos níveis de adrenomedulina circulante no plasma. Mas nenhuma mudança foi observada nos níveis de CGRP e nem de endotelina-1 no plasma. Da mesma forma, nenhuma alteração na atividade da MMP-2 e nem sua concentração no plasma. Nós também observamos que a doxíciclina evitou a redução de adrenomedulina circulante e o aumento da pressão induzida pelo chumbo, que pode estar associada com a inibição de MMP-9. Juntos, esses dados sugerem que a MMP-9 mantém um papel no aumento da pressão sanguínea induzida pelo chumbo, confirmando a hipótese que MMPs age através da clivagem e desta forma inativa os peptídeos vasodilatadores.

Embora alguns estudos prévios já demonstraram que a exposição ao chumbo está associada com hipertensão em humanos (KOSNET et al., 2007) e em animais (FIORIN et al., 2011), em concentrações sanguíneas abaixo de $40 \mu\text{g/dL}$, pouca atenção tem sido dada aos efeitos de concentrações de chumbo encontradas abaixo destas concentrações em humanos expostos ocupacionalmente e aos efeitos deletérios que ocorrem provavelmente durante os estágios iniciais da exposição ao chumbo. De fato, tem sido relatado experimentalmente que a concentração de $19 \mu\text{g/dL}$ de chumbo no sangue após oito semanas (RIZZI et al., 2009) ou $12 \mu\text{g/dL}$ após quatro semanas (SILVEIRA et al., 2014) ou $9 \mu\text{g/dL}$ após uma semana (FIORIN et al., 2011) ou $37 \mu\text{g/dL}$ após duas horas (SIMÕES et al., 2011) a intoxicação com o chumbo foi associada ao continuado aumento na pressão sanguínea. Surpreendentemente, nós encontramos que a injeção por via intraperitoneal com a 1ª dose de $8 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corpóreo do rato e subseqüentes doses de $0,10 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corpóreo do rato para cobrir a perda diária, por uma semana, induziu aumento na pressão arterial sistólica dos ratos, que foi de forma semelhante aqueles previamente associados aos níveis de $10 \mu\text{g/dL}$ (FIORIN et al., 2011). Baseado nestes dados, conjuntamente com outros pesquisadores (CDC, 1999; GLENN et al., 2003) recomendamos que os indivíduos devam ser afastados da fonte de exposição ocupacional com plumbemia a partir da concentração que exceder a $10 \mu\text{g/dL}$.

Os mecanismos que explicam como a administração de baixas concentrações de chumbo resulta em hipertensão ainda não estão bem esclarecidos. O presente estudo relata que o aumento na atividade da MMP-9, após intoxicação por chumbo durante uma semana, pode estar envolvido nos estágios iniciais da hipertensão induzida pelo chumbo. Além disso, tratamento com doxiciclina (um inibidor de MMPs) impediu a ativação da MMP-9 e o aumento da pressão arterial sistólica induzido pelo chumbo. Estes achados estão de acordo com dados recentes que implica o papel da MMPs na patogênese da hipertensão (HE et al., 2007; CASTRO & TANUS-SANTOS, 2013), incluindo hipertensão induzida pelo chumbo (RIZZI et al., 2009).

Como previamente sugerido, MMP-2 pode clivar peptídeos vasodilatadores tais como adrenomedulina (KOSNET et al., 2007) e CGRP (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000), comprometendo sua ação vasodilatadora. Também, MMP-2 parece induzir a formação de vasoconstritores tais como peptídeos relacionados à endotelina-1, contribuindo para a ação vasoconstritora (FERNANDEZ-PATRON et al., 1999; HE et al., 2007). Portanto, todos estes peptídeos clivados pela MMP-2 podem estar contribuindo para manter a pressão sanguínea elevada. Sendo assim, considerando o possível papel destes três peptídeos vasoativos no controle da pressão sanguínea (FERNANDES-PATRON et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2004) e das MMPs na hipertensão (CASTRO & TANUS-SANTOS, 2013), decidimos estudar se existe uma interação entre estes sistemas de controle.

Adrenomedulina, um vasodilatador potente e duradouro, está se tornando cada vez mais atrativo como uma potencial chave na homeostase da pressão sanguínea (NISHIKIMI et al., 2013). Tem sido sugerido que os peptídeos maiores são vasodilatadores, como é a adrenomedulina intacta (um peptídeo com 52 aminoácidos), enquanto fragmentos de adrenomedulina (11-22) resultante da clivagem pela MMP-2 provocam vasoconstrição, contribuindo para o aumento da pressão sanguínea (MARTINEZ et al., 2004). Estas sugestões estão fundamentadas em nossas descobertas recentes que mostraram significativa redução nos níveis de adrenomedulina intacta foi associada com aumento da pressão arterial sistólica e atividade da MMP-9. Além disso, a doxiciclina impediu a redução de adrenomedulina circulante e este efeito foi associado tanto com uma pressão sanguínea sistólica mais baixa como também inibiu a atividade da MMP-9. Desta forma é possível que a doxiciclina tenha protegido a adrenomedulina de ser clivada pela MMP-9 após exposição ao chumbo como sugerido anteriormente (MARTINEZ et al., 2004; CASTRO & TANUS-SANTOS, 2013).

Pela razão das MMPs terem a capacidade de clivar outros peptídeos do endotélio vascular ou de nervos perivascular como foi revelado ao ser analisado a sequência de aminoácidos de vários peptídeos vasoativos que apresentaram ligações peptídicas sensíveis às MMPs, incluindo a big-endotelina -1 and CGRP contendo estas ligações e, desta forma, ambos também poderiam ser suscetíveis a clivagem pelas MMPs, e produzir novos péptidos. A este respeito, os resultados experimentais mostraram que a clivagem de CGRP pela MMP-2 diminui a ação vasodilatadora de CGRP (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000). Além disso, a MMP-2 podem contribuir para os efeitos vasoconstritores da grande endotelina-1 por clivar endotelina-1e produzir um novo vasoconstritor: endotelina-1 (1 a 32), que é mais potente do que a endotelina-1 (1 a 21) (Fernandez-Patron et al., 1999). Por outro lado, nossos resultados não mostraram alterações significativas nos níveis de ambos CGRP e endotelina-1 circulante. Sendo assim, os resultados deste estudo sugerem que tanto CGRP como endotelina-1 pode não estar envolvida, pelo menos nas fases iniciais da hipertensão induzida por chumbo. Embora este estudo sugere o envolvimento de adrenomedulina por clivagem de MMP-9, deve ter em conta a importância de outros péptidos vasoativos (CGRP e da endotelina-1) e da MMP-2 para os efeitos prejudiciais causados pela exposição ao chumbo e, provavelmente, todos eles podem estar envolvidos na regulação de parâmetros hemodinâmicos e metabólicos, principalmente em doenças cardiovasculares crônicas, seguido por remodelação do vaso (CHARVAT et al., 2014), o que exige maior tempo de manifestar suas ações. Então, é possível que o nosso protocolo de intoxicação com chumbo durante um período de sete dias, não teve duração suficiente para induzir as alterações nos níveis de ambos os péptidos, ainda como os níveis de concentração ou atividade de MMP-2 da circulação, uma vez que foi demonstrado em protocolos crônicas de chumbo exposição durante meses, mostrando elevações na endotelina-1 circulante (KHALIL-MANESH et al., 1993; KHALILMANESH et al., 2014) ou aumento da atividade da MMP-2 (RIZZI et al., 2009). No entanto, estas sugestões ainda precisam ser confirmadas em estudos futuros. Em seguida, a fim de ampliar o nosso estudo na compreensão dos mecanismos responsáveis pela hipertensão induzida por intoxicação aguda com chumbo, avaliou a biodisponibilidade plasmática de óxido nítrico e da capacidade antioxidante. Os relatórios anteriores sobre ratos intoxicados por 30 dias com dosagem semelhante de acetato de chumbo utilizado aqui indica o aumento da pressão sanguínea sistólica associados com a produção de espécies reativas de oxigénio, os quais foram acompanhados por redução da biodisponibilidade do óxido

nítrico (SILVEIRA et al., 2014). Uma vez que o estresse oxidativo aumentado eleva tanto a expressão como a ativação de MMP-9 (ALI & SCHULZ, 2009) explica ser possível que o aumento do estresse oxidativo de acordo com a redução da capacidade antioxidante (MEDINA et al., 2007), em ratos intoxicados com chumbo (CAYLAK et al., 2007; CAYLAK & HALIFEOGLU, 2010) é responsável tanto pela ativação de MMP-9 como pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico. Apoiando esta hipótese, encontramos redução significativa nos níveis plasmáticos de marcadores de óxido nítrico igualmente reduções na capacidade antioxidante de ratos intoxicados com chumbo (Pb grupos e Pb + Doxy), confirmando que o aumento do estresse oxidativo induz tanto a ativação de MMPs como a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico. No entanto, os resultados do presente estudo não foram consistentes com descobertas anteriores demonstrando que adrenomedulina dilata os vasos sanguíneos através da produção de óxido nítrico (HAMID et al., 2010) ou a doxíciclina promove a atividade antioxidante (CASTRO et al., 2012), uma vez que a doxíciclina não foi capaz de inverter as reduções nem da biodisponibilidade do óxido nítrico e nem do estado antioxidante, apesar da doxíciclina ter atenuado diminuições na adrenomedulina circulante induzida pelo chumbo.

CONCLUSÕES

7 – CONCLUSÕES

Em conclusão, as principais descobertas deste estudo são consistentes com a ideia de que a hipertensão induzida pela exposição ao chumbo 8 µg/100g p.c., e subseqüentes doses 0,10 µg/100g p.c. rato, pela via intra-peritoneal, diariamente durante sete dias, com nível médio sanguíneos de 10,0 ug/dL, levou ao aumento da atividade de MMP-9 que pode ter contribuído com hipertensão e sendo responsável pela clivagem da adrenomedulina que é um peptídico vasodilatador e assim, inibir a redução da pressão arterial dependente da adrenomedulina.

Nós sugerimos que a MMP-9 pode ser um novo e importante modulador da função vascular, uma vez que a doxíciclina impediu tanto a redução adrenomedulina circulantes como os aumentos na pressão sanguínea sistólica, que foram associados com a inibição da MMP-9.

REFERÊNCIAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.H.; CLARK, L.L.; PENNINGTON, W. R.; WEBB, C. S.; BONNEMA, D. D.; LEONARD, A. H.; MCCLURE, C. D.; SPINALE, F. G.; ZILE, M. R. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical

manifestations of hypertensive heart disease. **Circulation**, v.113, n.17, p.2089-96. 2006.
ALI, M.; SCHULZ, R. Activation of MMP-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart. **Front Biosci Landmark**; n.14, p.699–716. Ed 2009

ATHANASOPOULOS, N. **Flame Methods Manual GBC for Atomic Absorption**, Victoria, Australia, p 1-11, 1994.

ATSDR- REGISTRY, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE. TOXICOLOGICAL Profile for Lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease. Registry, **Atlanta**. 2007

BARBOSA JR, F.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Plasma Correlates with Plasma and Whole Blood Lead Concentrations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 559–564. 2006.

BASSET, J.; DENNEY, R, C.; JEFFERY, G. H. MENDHAM, J. **Vogel – Análise Inorgânica Quantitativa**. 4º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 80-1. 1981.

BERNATOVA, I.: Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? **BioMed Research International**, v. 14, 2014.

BENDECK, M. P.; CONTE, M.; ZHANG, M.; NILI, N.; STRAUSS, B. H. FARWELL, S. M. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. **Am J Pathol**, v.160, n.3, p.1089-95. 2002.

BOST, L.; PRIMATESTA, P. DONG, W.; POULTER, N. Blood lead and blood pressure: evidence from the Health Survey for England 1995. **J Hum Hypertens**, v.13, n.2, p.123-8. 1999.

BROWN, M. J. E MARGOLIS, S. Lead in drinking water and human blood lead levels in the United States. **MMWR Surveill Summ**, v.61, p.1-9. 2012.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; POMA, A.; VOLPE, A. R. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. **Immunopharmacology**, v.44, n.1-2, p.105-10. 1999.

CARMIGNANI, M.; VOLPE, A. R.; BOSCOLO, P.; QIAO, N. DI.; GIOACCHINO, M.; GRILLI, A.; FELACO, M. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. **Life Sci**, v.68, n.4, p.401-15. 2000.

CASTORENA-GONZALEZ, J. A.; STAICULESCU, M. C.; FOOTE, C.; MARTINEZ-LEMUS, L. A. Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: is the actin cytoskeleton involved? **Microcirculation** n. 21: 219–229, 2014.

CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; GUIMARAES, D. A.; RODRIGUES, G. J. BENDHACK, L. M.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, v.26, n.3, p.162-8. 2012.

CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Inhibition of matrix metalloproteinases [MMPs] as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. **Curr Drug Targets**, n.14, p.335–43. 2013.

CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacol Res**, v.64, n.6, p.567-72. 2011.

CAYLAK, E.; HALIFEOGLU, I. Effects of sulfur-containing antioxidants on malondialdehyde and catalase levels of liver, kidney and brain in lead-exposed rats. **Turk Klinikleri J Med Sci**, n.27p. 1–8. 2007.

CAYLAK, E.; AYTEKIN, M.; Halifeoglu, I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. **Exp Toxicol Pathol**, n. 60, p.289–94. 2008.

CAYLAK, E.; HALIFEOGLU, I. The effects of lead on antioxidants enzymes in children and the therapeutic/prophylactic role of antioxidants. **Cocuk Sagligi Hastaliklari Dergisi**, n.53, p.159–73. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Blood lead levels--United States, 1999-2002. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, n.54, p.513–6. 2005.

CHARVAT, J.; SVAB, P.; HAVLIN, J.; BILEK, R.; ZAMRAZIL, V. The significance of plasma adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide concentration in patients with Type 2 diabetes mellitus who are treated for cardiovascular risk factors. **Neuro Endocrinol Lett**, n.35, p.154–8. 2014.

DIAS-JUNIOR, C. A.; NETO-NEVES, E. M.; MONTENEGRO, M. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. **Nitric Oxide**, n. 23, p.284–8. 2010.

DING, Y.; GONICK, H. C.; VAZIRI, N. D.; LIANG, K.; WEI, L. Lead-induced hypertension. III. Increased hydroxyl radical production. **Am J Hypertens**, v.14, n.2, p.169-73. 2001.

DING, Y.; GONICK, H. C.; VAZIRI, N. D.; Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. **Am J Hypertens**, v.13, n.5 Pt 1, p.552-5. 2000.

DOUAY, F.; PELFRENE, A.; PLANQUE, J.; FOURRIER, H.; RICHARD, A.; ROUSSEL, H.; GIRONDELOT, B. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. **Environ Monit Assess**, v.2012, p.11. 2012.

EL-HELALY, M. ABDEL-ELAH, K. HAUSSEIN, A., SHALABY, H. Paternal occupational exposures and the risk of congenital malformations--a case-control study. *Int J Occup Med Environ Health.*, v. 24, n. 2, p. 218-27. 2011.

FERNANDEZ-PATRON, C.; RADOMSKI, M. W.; DAVIDGE, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. **Circ Res**, v.85, n.10, p.906-11. 1999.

FERNANDEZ-PATRON, C.; STEWART, K. G.; ZHANG, Y.; KOIVUNEN, E.; RADOMSKI, M. W.; DAVIDGE, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. **Circ Res**, v.87, n.8, p.670-6. 2000.

FIORIM, J.; RIBEIRO JÚNIOR, R. F.; SILVEIRA, E. A.; PADILHA, A. S.; VESCOVI, M. V.; DE JESUS, H. C.; STEFANON, I.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. **PLoS One**, v.6, n.2, p.e17117. 2011.

FLEGAL, A. R. E SMITH, D. R. Measurements of environmental lead contamination and human exposure. **Rev Environ Contam Toxicol**, v.143, p.1-45. 1995.

GALIS, Z. S. E KHATRI, J. J.; Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, v. 90, n. 3, p. 251-62. 2002.

GERLACH, R. F.; DE SOUZA, A. P.; CURY, J. A.; LINE, S. R. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. **Eur J Oral Sci**, v.108, n.4, p.327-34. 2000.

GLENN, B. S.; STEWART, W. F.; LINKS, J. M.; TODD, A. C.; SCHWARTZ, B. S. The longitudinal association of lead with blood pressure. **Epidemiol**, n.14, p. 30-6. 2003.

GRASSO, G. E BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases: targeting conformational diseases. **Metallomics**, v. 6, n.8, p.1346-57. 2014.

GRIZZO, L. T. E CORDELLINI, S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. **Toxicol Sci**, v.103, n.1, p.207-14. 2008.

GUIMARAES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, D. M.; CASTRO, M. M.; TIRAPELLI, C. R.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E.

Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.108, n.5, p.318-25. 2011.

HAMID, S. A.; TOTZECK, M.; DREXHAGE, C.; THOMPSON, I.; FOWKES, R. C.; RASSAF, T.; BAXTER, G. F. Nitric oxide/cGMP signalling mediates the cardioprotective action of adrenomedullin in reperfused myocardium. **Basic Res Cardiol**, n. 105, p. 257–66. 2010.

HEALEY, N.; Lead toxicity, vulnerable subpopulations and emergency preparedness. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 134, n. 3 e 4, p. 143–151. 2009.

HE, J. Z.; QUAN, A.; XU, Y.; TEOH, H.; WANG, G.; FISH, J. E.; STEER, B. M.; ITOHARA, S.; MARSDEN, P. A.; DAVIDGE, S. T.; WARD, M. E. Induction of matrix metalloproteinase-2 enhances systemic arterial contraction after hypoxia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, n.292, p.H684–H693. 2007.

HRYHORCZUK, D. O.; RABINOWITZ, M. B.; HESSL, S. M.; HOFFMAN, D.; HOGAN, M. M.; MALLIN, K.; FINCH, H.; ORRIS, P.; BERMAN, E. Elimination kinetics of blood lead in workers with chronic lead intoxication. **Am J Ind Med**, v.8, n.1, p.33-42. 1985.

IPCS – ENVIRONMENTAL HEALTH – CRITERIA 85 – Lead – **Environmental aspects**, 1989.

KHALIL-MANESH, F.; GONICK, H. C.; WEILER, E. W. J.; PRINS, B.; WEBER, M. A.; PURDY, R.; REN, Q. Effect of Chelation Treatment with Dimercaptosuccinic Acid [DMSA] on Lead-Related Blood Pressure Changes. **Environ Res**, n.65, p.86–99. 1994.

KHALIL-MANESH F, GONICK H, WEILER E, PRINS B, WEBER M, PURDY R. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. **Am J Hypertens**, n.6, p.723– 9. 1993.

KOSNETT, M. J.; WEDEEN, R. P.; ROTHENBERG, S. J.; HIPKINS, K. L.; MATERNA, B. L.; SCHWARTZ, B. S.; HU, H.; WOOLF, A. Recommendations for medical management of adult lead exposure. **Environ Health Perspect**, n.15, p.463–71. 2007.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H.; BECKER, K.; SEIWERT, M.; GOUVEIA, N. Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. **Int J Hyg Environ Health**, v. 216, n. 3, p. 243-9. 2013.

LAHAT, N.; SHAPIRO, S.; FROOM, P.; KRISTAL-BONEH, E.; INSPECTOR, M.; MILLER, A. Inorganic lead enhances cytokine-induced elevation of matrix metalloproteinase MMP-9 expression in glial cells. **J Neuroimmunol**, v.132, n.1-2, p.123-8. 2002.

LIAO, S. B.; LI, H. W.; HO, J. C.; YEUNG, W. S.; NG, E. H.; CHEUNG, A. N.; TANG, F.; O, W. S. Possible role of adrenomedullin in the pathogenesis of tubal ectopic pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, n.6, p.2105-12. 2012.

MANUAL PROVECTO ANALITICA, Ltda. Campinas – S.P, p. 18. 2000,

MARQUES, M.; MILLAS, I.; JIMENEZ, A.; GARCIA-COLIS, E.; RODRIGUEZ-FEO, J. A.; VELASCO, S.; BARRIENTOS, A.; CASADO, S.; LOPEZ-FARRE, A. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n.12, p. 2594-600. 2001.

MARTIN, D.; GLASS, T. A.; BANDEEN-ROCHE, K.; TODD, A. C.; SHI, W.; SCHWARTZ, B. S. Association of blood lead and tibia lead with blood pressure and hypertension in a community sample of older adults. **Am J Epidemiol**, v.163, n.5, p.467-78. 2006.

MARTINEZ, A.; OH, H. R.; UNSWORTH, E. J.; BREGONZIO, C.; SAAVEDRA, J. M.; STETLER-STEVENSON, W. CUTTITTA, F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. **Biochem J**, v.383, n. Pt. 3, p.413-8. 2004.

MEDINA, L. O.; VELOSO, C. A.; DE ABREU BORGES, E.; ISONI, C. A.; CALSOLARI, M. R.; CHAVES, M. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract**, n.77, p.193–7. 2007.

MOREIRA, F. R. & MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 2, p.119–29. 2004.

MURPHY, G. & NAGAS, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol Aspects Med**, v.29, n.5, p.290-308. 2008.

NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E.; SILBERGELD, E. K.; ROTHENBERG, S. J. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. **Environ Health Perspect**, v.115, n.3, p.472-82. 2007.

NELSON, K. K.; MELENDEZ, J. A.; Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. **Free Radic Biol Med**. v. 15, n. 37(6), p.768-84. 2004.

NISHIKIMI, T.; KUWAHARA, K.; NAKAGAWA, Y.; KANGAWA, K.; NAKAO, K. Adrenomedullin in cardiovascular disease: a useful biomarker, its pathological roles and therapeutic application. **Curr Protein Pept Sci**, n.14, p.256–267. 2013.

PAOLIELO, M.; GUTIERREZ, P.; TURINI, C. A.; MATSUO, T.; MEZZAROBIA, L.; BARBOSA, D. S.; ALVARENGA, A. L.; CARVALHO, S. R.; FIGUEIROA, G. A.; LEITE, V. G.; GUTIERREZ, A. C.; NOGUEIRA, K. B.; INAMINE, W. A.; ZAVATTI, A. M.; Lead reference values in the blood of the urban population. **Journal of Public Health**, v.31, p. 144-8, 1997.

PELFRENE, A.; DOUAY, F.; RICHARD, A.; ROUSSEL, H.; GIRONDELLOT, B. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter.

Part 2: site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. **Environ Monit Assess**, v.185, n.4, p. 2999-3012. 2013.

PIRES, J. B.; MIEKELEY, N.; DONANGELO, C. M.; Calcium supplementation during lactation blunts erythrocyte lead levels and delta-aminolevulinic acid dehydratase zinc-reactivation in women non-exposed to lead and with marginal calcium intakes. **Toxicology**, v.175, n.1-3, p.247-55. 2002.

PURDY, R. E.; SMITH, J. R.; DING, Y.; OVEISI, F.; VAZIRI, N. D.; GONICK, H. C. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. **Am J Hypertens**, v.10, n.9 Pt 1, p.997-1003. 1997.

RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. **Environ Health Perspect**, v.91, p.33-7. 1991.

RAFFETTO, J. D. & R. A. KHALIL. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v.75, n.2, p.346-59. 2008.

REZA, B.; ALI, N.; AZHDAR, H.; ALIREZA, A.; ALI, K.; Effects of low-level lead exposure on blood pressure and function of the rat isolated heart. **Indian J Pharmacol**, v.40, n.2, p.69-72. 2008.

RIZZI, E.; CASTRO, M. M.; FERNANDES, K.; BARBOSA, F. JR.; ARISI, G. M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; BENDHACK, L. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Arch Toxicol**, v.83, n.5, p.439-49. 2009.

RIZZI, E.; CASTRO, M. M.; CERON, C. S.; NETO-NEVES, E. M.; PRADO, C. M.; ROSSI, M. A.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Tempol inhibits TGF- β and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **International Journal of Cardiology**, v.165, p. 165–173. 2013.

SANIN, L. H.; GONZÁLEZ-COSSÍO, T.; ROMIEU, I.; HERNÁNDEZ-AVILA, M.; [Accumulation of lead in bone and its effects on health]. **Salud Publica Mex**, v.40, n.4, p.359-68. 1998.

SHAIK, A. P.; SULTANA, S. A.; ALSAEED, A. H. Lead Exposure: A Summary of Global Studies and the Need for New Studies from Saudi Arabia. **Dis Markers**, 2014: 415160. 2014.

SHELKOVNIKOV, S. A. & H. C. GONICK. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. **Am J Hypertens**, v.14, n.9 Pt 1, p.873-8. 2001.

SILVEIRA, E. A.; SIMAN, F. D. M.; DE OLIVEIRA FARIA, T.; VESCOVI, M. V. A.; FURIERI, L. B.; LIZARDO, J. H. F.; STEFANON, I.; PADILHA, A. S.; VASSALLO, D. V.; Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. **Free Radic Biol Med**, v.67, p.366–76. 2014.

SIMOES, M. R.; RIBEIRO, JÚNIOR, R. F.; VESCOVI, M. V.; DE JESUS, H. C.; PADILHA, A. S.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V.; SALAICES, M.; FIORESI, M.; Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. **PloS ONE**, v.6, p.18730. 2011.

SKOCZYNSKA, A.; JUZWA, W.; SMOLIK, R.; SZECHÍŃSKI, J.; BĚHAL, F. J.; Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. **Toxicology**, v.39, n.3, p.275-89. 1986.

SKOCZYNSKA, A.; WRÓBEL, J.; ANDRZEJAK, R. Lead-cadmium interaction effect on the responsiveness of rat mesenteric vessels to norepinephrine and angiotensin II. **Toxicology**, v.162, n.3, p.157-70. 2001.

SMITH, D. R.; OSTERLOH, J. D.; Flegal, A. R. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. **Environ Health Perspect**, v.104, n.1, p.60-6. 1996.

SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circ Res**, v.90, n.5, p.520-30. 2002.

TAHERI, L., SADEGHI, M., SANEI, H., RABIEI, K., ARABZADEH, S., GOLSHAHI, J., AFSHAR, H AND TZALEV, D.L., ZAPRIANOV, Z.K. – Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice – Analytical aspects healthy significance. **Boca Raton CRC Press**, v.1, 1983.

TAHERI, L.; SADEGHI, M.; SANEI, H.; RABIEI, K.; ARABZADEH S, GOLSHAHI, J.; AFSHAR, H.; SARRAFZADEGAN, N. The relation between occupational exposure to lead and blood pressure among employed normotensive mem. **J Res Med Sci**, v. 19, n.6, p 490–494. 2014.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim Biophys Acta**, v.1803, n.1, p.20-8. 2010.

TEIXEIRA, P E., VALLE S. Biossegurança: Uma abordagem Multidisciplinar. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro. 20^o ed. P.362. 2000.

TOMOBE, Y.; YANAGISAWA, M.; FUJIMORI, A.; MASAKI, T.; GOTO, K. Arginine-vasopressin increases the release of ET-1 into perfusate of rat mesenteric artery. **Biochem Biophys Res Commun**, v.191, n.2, p.654-61. 1993.

TSAIH, S. W.; SCHWARTZ, J.; LEE, M. L.; AMARASIRIWARDENA, C.; ARO, A.; SPARROW, D.; HU, H. The independent contribution of bone and erythrocyte lead to urinary lead among middle-aged and elderly men: the normative aging study. **Environ Health Perspect**, v.107, n.5, p.391-6. 1999.

VAN WART, H. E. & BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.14, p.5578-82. 1990

VAZIRI, N. D. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, n.2, p.H454-65. 2008.

VISSE, R. & H. NAGASE. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.8, p.827-39. 2003.

WALTER, A.; ETIENNE-SELLOUM, N.; SARR, M.; KANE, M. O.; BERETZ, A.; SCHINI-KERTH, V. B. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols. **J Vasc Res**, v.45, n.5, p.386-94. 2008.

Webb, R. C., Winquist, R. J., Victory W, Vander AJ. In vivo and in vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. **Am J Physiol**, v. 241, n.2, p.H211-6. 1981.

WINNEKE, G. Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls. **J Neurol Sci**, v.308, n.1-2, p.9-15. 2011.

WINNEKE, G.; COLLET, W.; LILIENTHAL, H. The effects of lead in laboratory animals and environmentally-exposed children. **Toxicology**, v.49, n.2-3, p.291-8. 1988.

WHO -Task Group on Environmental Health Criteria for Lead. 1997.

XIE, Y.; CHIBA, M.; SHINOHARA, A.; WATANABE, H.; INABA, Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. **Ind Health**, v.36, n.3, p.234-9. 1998.

YASMIN, C. M.; ENIERY, C. M.; WALLACE, S.; DAKHAM, Z.; PULSALKAR, P.; MAKI-PETAJA, K.; ASHBY, M. J.; COCKCROFT, J. R.; WILKINSON, I. B. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.2, p.372. 2005.

ZHOUA, Y.; YING, Z.; ZANÃO, R. A.; BARBOSA JR, F.; PATRICK, J.; PARSONS, KRUG, F. J.; Investigations of a W-Rh permanent modifier for the determination of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochim Acta**, v.57, p.1291-1300. 2002.

ANEXO



Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension

Regina A. Nascimento¹, Gabriella Mendes¹, Jose S. Possomato-Vieira¹, Victor Hugo Gonçalves-Rizzi¹, Hélio Kushima¹, Flavia K. Delella³ and Carlos A. Dias-Junior^{1,2}

¹Department of Pharmacology, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil, ²Center for Toxicological Assistance, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil and ³Department of Morphology, Biosciences Institute of Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil

(Received 15 August 2014; Accepted 1 October 2014)

Abstract: Intoxication with lead (Pb) results in increased blood pressure by mechanisms involving matrix metalloproteinases (MMPs). Recent findings have revealed that MMP type two (MMP-2) seems to cleave vasoactive peptides. This study examined whether MMP-2 and MMP-9 levels/activities increase after acute intoxication with low lead concentrations and whether these changes were associated with increases in blood pressure and circulating endothelin-1 or with reductions in circulating adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide (CGRP). Here, we expand previous findings and examine whether doxycycline (a MMPs inhibitor) affects these alterations. *Wistar* rats received intraperitoneally (i.p.) 1st dose 8 µg/100 g of lead (or sodium) acetate, a subsequent dose of 0.1 µg/100 g to cover daily loss and treatment with doxycycline (30 mg/kg/day) or water by gavage for 7 days. Similar whole-blood lead levels (9 µg/dL) were found in lead-exposed rats treated with either doxycycline or water. Lead-induced increases in systolic blood pressure (from 143 ± 2 to 167 ± 3 mmHg) and gelatin zymography of plasma samples showed that lead increased MMP-9 (but not MMP-2) levels. Both lead-induced increased MMP-9 activity and hypertension were blunted by doxycycline. Doxycycline also prevented lead-induced reductions in circulating adrenomedullin. No significant changes in plasma levels of endothelin-1 or CGRP were found. Lead-induced decreases in nitric oxide markers and antioxidant status were not prevented by doxycycline. In conclusion, acute lead exposure increases blood pressure and MMP-9 activity, which were blunted by doxycycline. These findings suggest that MMP-9 may contribute with lead-induced hypertension by cleaving the vasodilatory peptide adrenomedullin, thereby inhibiting adrenomedullin-dependent lowering of blood pressure.