

**JOSÉ SÉRGIO POSSOMATO VIEIRA**

**Efeitos da exposição pré-natal ao etanol e ao chumbo,  
isoladamente e em associação, sobre a pressão arterial e a  
reatividade da aorta de ratos recém-desmamados**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Farmacologia)

**Orientadora:** Profa. Dra. Sandra Cordellini

Botucatu-SP  
2014

**JOSÉ SÉRGIO POSSOMATO VIEIRA**

**Efeitos da exposição pré-natal ao etanol e ao chumbo,  
isoladamente e em associação, sobre a pressão arterial e a  
reatividade da aorta de ratos recém-desmamados**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Farmacologia)

**Orientadora:** Profa. Dra. Sandra Cordellini

Botucatu-SP  
2014

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

Possomato-Vieira, José Sérgio.

Efeitos da exposição pré-natal ao etanol e ao chumbo, isoladamente e em associação, sobre a pressão arterial e a reatividade da aorta de ratos recém-desmamados / José Sérgio Possomato-Vieira. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sandra Cordellini

Capes: 21007004

1. Alcool. 2. Chumbo. 3. Compostos nitrogênicos. 4. Cuidado pré-natal. 5. Óxido nítrico. 6. Pressão arterial.

Palavras-chave: Atividades do sistema óxido nítrico; Chumbo; Etanol; Produtos da ciclooxigenas; Reatividade vascular.

***Dedicatória***

---

## A DEUS

À Deus toda a honra, à Deus toda a glória e todo o louvor. Razão da minha vida,  
dono do meu coração, meu amado!

“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”  
Romanos 11:36

## **Aos meus pais**

Aos meus pais Aparecido José Vieira e Maria José Possomato Vieira, este trabalho é fruto das incansáveis orações, apoio e dedicação a mim. Obrigado por sempre me apoiarem e apostarem na minha educação e mesmo em meio às dificuldades me incentivarem sempre.

**Aos meus pastores Lourival e Jandira**

Obrigado por tudo. Este trabalho também possui muito de vocês. Obrigado por estarem comigo em tantos momentos e me orientarem sempre. Obrigado por todo o apoio ao longo de todos esses anos.

**A minha orientadora Dra. Sandra Cordellini**

Por toda amizade, paciência e dedicação à minha formação. Sempre serei grato pela oportunidade de ter sido seu aluno. Muito obrigado!

***Agradecimientos***

---

Às minhas irmãs Talita e Adriana pelo apoio durante toda essa e muitas outras jornadas.

Ao meu tio José Vieira e à minha vó Julieta, obrigado pelo apoio.

À minha amiga-irmã Tatiane. Obrigado por muitas vezes clarear a minha mente.

À minha amiga de laboratório Andréia. Obrigado pela companhia, pela ajuda, pelas conversas, pelas músicas. Sem você seria bem mais difícil.

À minha amiga Nathália por toda a ajuda nesse período.

Aos amigos Alessandra, André, Marília, Margarete, Rita e Viviane. Os nossos almoços sempre tão divertidos fizeram toda a diferença.

À todos os amigos e colegas da pós-graduação. Em especial ao Fernando, Larissa, Paula e Victor.

Aos irmãos da Comunidade Cristã Semear, agradeço a Deus por poder conviver com cada um de vocês e saber que posso contar com suas orações, sempre.

Aos membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Andréia Fresneda Gaspar e Prof. Dr. Carlos Alan Cândido Dias Júnior por tão solícitamente aceitarem o convite para compor a mesa.

Aos docentes do departamento de Farmacologia do IBB-UNESP, por tanto contribuírem para a minha formação profissional.

À secretária do departamento de Farmacologia do IBB, Cristina. Obrigado por ser sempre tão solícita e prestativa.

Aos técnicos Luís e Paulo, obrigado por todo o auxílio dispensado.

Ao Sr. Fábio Iaschel e Dr. Alaor Aparecido Almeida do CEATOX pela colaboração nas análises de etanol e chumbo.

À CAPES, pelo apoio financeiro

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para edificação deste trabalho.  
Muito obrigado!

## ***Lista de Figuras***

---

Figura 1 Protocolos de exposição .....	29
Figura 2 Peso corpóreo materno durante a prenhez .....	37
Figura 3 Consumo de ração e líquidos durante a prenhez .....	39
Figura 4 Pressão arterial de ratos recém-desmamados .....	43
Figura 5 Curvas concentração-efeito ao L-NAME .....	45
Figura 6 Curvas concentração-efeito à ACh na presença e ausência de inibidores .....	48
Figura 7 Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio .....	51

## ***Lista de Tabelas***

---

Tabela 1 Características gerais dos animais ao nascimento e desmame .....	40
Tabela 2 Peso dos órgãos dos animais ao desmame .....	41
Tabela 3 Resposta máxima e CE50 ao L-NAME .....	44
Tabela 4 Resposta máxima à ACh na presença e ausência de inibidores .....	46
Tabela 5 CE50 à ACh na presença e ausência de inibidores .....	47
Tabela 6 Resposta máxima e CE50 ao nitroprussiato de sódio .....	50

## ***Sumário***

---

Introdução .....	17
Objetivos .....	24
Materiais e Métodos .....	26
1 Animais .....	27
2 Acasalamento .....	27
3 Procedimentos Pós-natal e Evolução do peso corpóreo materno .....	30
4 Determinação da pressão arterial .....	30
5 Protocolos experimentais .....	30
5.1 Avaliação do peso das adrenais, rins, fígado e massa cardíaca .....	31
5.2 Análise quantitativa de Pb .....	31
5.3 Determinação dos níveis plasmáticos de etanol .....	31
5.4 Reatividade vascular .....	32
5.4.1 Liberação basal de NO .....	33
5.4.2 Liberação estimulada de NO e Participação da via ciclooxigenase.....	33
5.4.3 Atividade da via guanilato ciclase/GMPc – resposta à doador exógeno de NO .....	33
6 Avaliação dos dados .....	34
7 Análise estatística .....	34
8 Drogas e soluções .....	34
Resultados .....	36
1 Características gerais dos animais .....	37
2 Dosagem de Pb e etanol .....	42
3 Pressão arterial .....	42
4 Reatividade vascular .....	44
4.1 Liberação basal de NO .....	44
4.2 Liberação estimulada de NO .....	46
4.3 Participação da via ciclooxigenase .....	49

4.4 Resposta ao doador exógeno de NO .....	49
Discussão .....	52
Conclusão .....	60
Referências .....	62
Abstract .....	72
Resumo .....	74

## ***Introdução***

---

Atualmente, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de diminuição da qualidade e expectativa de vida na população mundial. Qualquer influência da dieta, de exposições e de hábitos de vida sobre o sistema cardiovascular tem implicações importantes sobre a saúde pública. Deve-se considerar ainda que várias doenças que ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo são provavelmente determinadas durante os primeiros estágios da vida, sob o efeito da exposição ou dieta preferencial da mãe durante a gravidez.

O chumbo (Pb) é um contaminante ambiental conhecido, ocorrendo em diferentes concentrações no ar, abastecimento de água, solos, alimentos e outros. Assim, a exposição ao Pb constitui-se num risco significativo para a população em geral e um importante problema de saúde pública, particularmente para os organismos em desenvolvimento. Intoxicação crônica pelo Pb, como consequência da exposição ambiental e ocupacional, ocorre em regiões altamente industrializadas e, geralmente, determina alterações endócrinas, hematológicas, disfunções gastrointestinais, neurobiológicas e comportamentais em adultos e crianças (HAMMOND; DIETRICH, 1990; LOCKITCH, 1993; NIETO-FERNANDEZ et al, 2006).

Embora o sistema cardiovascular não seja normalmente visto como um alvo primário da toxicidade ao Pb, altas concentrações, como aquelas que ocorrem durante a exposição ocupacional, são tóxicas para o coração e vasos (MALVEZZI et al., 2001; PROZIALECK et al., 2008; VAZIRI, 2008). Ainda, dados epidemiológicos sugerem que a exposição ao Pb tem papel importante no desenvolvimento de hipertensão arterial em indivíduos ocupacionalmente expostos (SELEVAN et al., 1985; KHALIL-MANESH et al., 1994; KASPERCZYK et al., 2009) e na população em geral (PIRKLE et al., 1985; BOST et al., 1999).

Em ratos adultos, a hipertensão arterial induzida pela exposição ao Pb durante a vida pós-natal é caracterizada por aumento na reatividade vascular às catecolaminas (SKOCZYNSKA et al., 1986), aumento no nível plasmático de noradrenalina, bem como diminuição de receptores beta-adrenérgicos (TSAO et al., 2000). Entretanto, Purdy et al.

(1997) não relataram qualquer alteração de reatividade da aorta, quer para agentes vasoconstritores (noradrenalina e fenilefrina) quanto para agentes vasodilatadores (acetilcolina - ACh e nitroprussiato de sódio) associada à hipertensão induzida pelo Pb em ratos.

A maioria dos estudos concentra-se no conceito de que este metal pesado interage com: 1) processos regulatórios envolvendo íons cálcio, GMP cíclico como segundo mensageiro e da proteína quinase C (KHALIL-MANESH et al., 1993; WATTS; CHAI; WEBB, 1995; VAZIRI, 2008), 2) sistemas renina-angiotensina-aldosterona, calicreína-cininas e outros autacóides (endotelina, por exemplo) e transducional (por exemplo, o óxido nítrico, NO) (KHALIL-MANESH et al., 1993; VAZIRI, 2008; GRIZZO; CORDELLINI, 2008); 3) proliferação de músculo liso e células endoteliais (FUJIWARA et al., 1995; KAJI et al., 1995; VAZIRI, 2008); 4) estresse oxidativo (DING; GONICK; VAZIRI, 2000; VAZIRI, 2008); 5) aumento da participação de prostanóides constritores derivados da ciclooxygenase (SILVEIRA et al., 2014).

Embora um grande progresso tenha ocorrido em relação às alterações neuroquímica, comportamentais e outras induzidas pela exposição perinatal ao Pb (DEARTH et al., 2002; LASLEY; LANE, 1988; MOREIRA; VASSILIEFF; VASSILIEFF, 2001; TROMBINI et al., 2001), os efeitos da exposição pré-natal a este metal sobre o sistema cardiovascular ainda não foram completamente esclarecidos.

Enquanto muitos estudos examinam os efeitos do Pb isoladamente, sua exposição, assim como qualquer outra, geralmente ocorre no contexto de inúmeros fatores de risco, incluindo fatores genéticos e ambientais capazes de modificar o impacto da exposição ao Pb sobre o organismo (CORY-SLECHTA et al., 2008). Um fator de risco susceptível de interagir com a exposição ao Pb é o consumo de etanol.

Assim como a exposição ao Pb, o consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas das funções cardíacas e circulatórias, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SUN; MAYHAN 2001; HUSAIN et al., 2005, 2008; TIRAPELLI et al., 2007, 2008a; PARKINGTON et al., 2010). Em seres

humanos, o consumo crônico de etanol tem sido associado à elevação da pressão arterial. Nesse sentido, Miller et al. (2005) relataram aumento da pressão arterial em homens e mulheres que consumiam etanol regularmente, independentemente de outros fatores associados como fumo e obesidade. Outros estudos também mostraram que o consumo regular de etanol, isoladamente, eleva a pressão arterial no homem (ABDEL-RAHMAN; MERRILL; WOOLLES, 1987; MOORE et al., 1990; PUDDEY; BEILIN, 2006). Em 2007, Tirapelli et al. observaram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica de ratos Wistar após a segunda e sexta semanas de tratamento com etanol a 20%. Ainda, Husain et al. (2010) mostraram que ratos Fisher tratados com 20% de solução de etanol por 12 semanas manifestam elevação da pressão arterial.

Dentre as alterações associadas à elevação da pressão arterial após consumo de etanol temos: 1) aumento da resposta vascular a agentes vasoconstritores (noradrenalina e PHE) (HATTON et al., 1992; LADIPO et al., 2002; TIRAPELLI et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2008a); 2) aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (LI et al., 2001; DEY; CEDERBAUM, 2006; HUSAIN et al., 2007); 3) aumento dos níveis de angiotensina II no plasma e na aorta (HUSAIN et al., 2008); e 4) redução da expressão da óxido nítrico sintase endotelial com conseqüente diminuição da biodisponibilidade de NO (HUSAIN et al., 2008; TODA; AYAJIKI 2010). Corroborando estes achados, Toda e Ayajiki (2010) também relataram que a ingestão crônica de etanol em altas doses induz disfunção endotelial associada à redução na biodisponibilidade de NO.

Contrariamente, diminuição da pressão arterial associada a baixas doses de etanol tem sido relatada como conseqüência da produção aumentada de NO (TODA; AYAJIKI, 2010), do aumento na expressão da sintase de óxido nítrico endotelial e na reatividade à ACh (KLEINHENZ et al., 2008), bem como do aumento nos níveis da sintase de óxido nítrico induzível (TIRAPELLI et al., 2008b).

Sabe-se que disfunções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estão intimamente relacionadas com uma variedade de disfunções e patologias, incluindo doenças cardiovasculares e hipertensão arterial, doenças metabólicas como obesidade e diabetes,

depressão, entre outras (SECKL; HOLMES, 2007). Ambos, exposição ao Pb e consumo de etanol, atuam sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (VYSKOCIL et al., 1990; VYSKOCIL et al., 1991; ZHANG et al., 2005; CORY-SLECHTA et al., 2004; WEINBERG et al., 2008). Assim, o potencial para a interação entre exposição ao Pb e consumo de etanol pode ser postulado no contexto de diversos modelos, por ex., situações nas quais múltiplos fatores de risco afetam um sistema comum levando a danos sustentados ou cumulativos. Entretanto, a literatura ainda apresenta poucos estudos focando os efeitos cardiovasculares da exposição ao Pb e do consumo de etanol, isoladamente e em associação, principalmente durante o desenvolvimento pré-natal.

A literatura relata que o número de mulheres que bebem álcool durante a gravidez não mudou substancialmente ao longo do tempo, de acordo com um estudo de 15 anos realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças-USA (CDC) onde, aproximadamente 1 em cada 8 mulheres ingeriu álcool durante a gravidez (CDC, 2009). A maior prevalência de consumo de álcool é observada entre as mulheres mais jovens, fumantes atuais e solteiras em idade fértil. Devem-se considerar ainda as seguintes condições: 1) qualquer uso de álcool - definido como uma dose de qualquer bebida alcoólica nos últimos 30 dias e 2) *binge drinking* - definido como cinco ou mais doses de bebida alcoólica em pelo menos uma ocasião nos últimos 30 dias. Sendo que, estudos mostram que a ocorrência de *binge drinking* durante a gravidez é particularmente danosa para o desenvolvimento cerebral (MAIER; WEST, 2001).

Os índices de prevalência mundial da síndrome fetal alcoólica encontram-se entre 0,5 e 3 casos para cada 1.000 nascidos vivos em várias populações. Dados epidemiológicos mostram que em populações vulneráveis, como os italianos das regiões vinícolas, populações em condições de pobreza e outras minorias, a síndrome fetal alcoólica alcança 6:1.000 nascidos vivos, e em uma população sul-africana de alto risco pode atingir níveis muito mais elevados, de até 68 a 89:1.000 nascidos vivos (ANDRADE et al., 2009).

Apesar da melhoria das políticas ambientais e das reduções significativas dos níveis médios de chumbo no sangue na população mundial, há evidências de que um número

significativo de mulheres grávidas e, presumivelmente, seus filhos, estão sendo expostos ao chumbo no mundo hoje. É claro que subgrupos expostos existem e alguns podem ser altamente expostos, tais como os trabalhadores em determinadas ocupações de alto risco (CALVERT; ROSCOE 2007); indivíduos envolvidos na renovação de casas antigas (MARINO et al. 1990; JACOBS et al. 2002); praticantes de certos comportamentos, tais como pica (HACKLEY; KATZ-JACOBSON 2003; SHANNON, 2003); uso cultural de remédios (por exemplo, alarcon, alkohl, azarcon, bali Goli, coral, ghasard, greta, liga, pay-loo-ah, e rueda) e produtos específicos (CDC, 2004; SAPER et al. 2004, 2008); entre outros. Mulheres que vivem próximo ao local de resíduos perigosos, fundições ativas, refinarias (GARCIA-VARGAS et al., 2001) e residentes em países que ainda usam gasolina com chumbo (ALBALAK et al. 2003) também podem ser altamente expostas.

De acordo com o CDC, a exposição ocupacional ao chumbo é comum entre os policiais (munição), mecânicos de automóveis, artistas, trabalhadores da construção civil, fabricantes de vidro, e muitos outros trabalhadores (porcelana, baterias, soldas, brinquedos, velas, jóias e bijuterias). Latas de alimentos importados costumam ter solda contendo chumbo. O chumbo também pode ser encontrado em peças de cristal e em algumas cerâmicas importadas ou velhos pratos de cerâmica (por exemplo, pratos de cerâmica do México). Um estudo de 2003 (CDC, 2004) de casos de envenenamento por chumbo em mulheres grávidas mostrou que 70% das pessoas afetadas eram hispânicas, a maioria das quais tinha absorvido o chumbo através de sua cerâmica. Além disso, o alimento pode ser contaminado por chumbo na água ou no solo e quantidades tóxicas de chumbo podem ser absorvidas de balas ou fragmentos de balas que permanecem no corpo. Finalmente, deve-se considerar a intoxicação por chumbo devida à ingestão de bebidas alcoólicas ilegalmente destiladas e o uso de cosméticos tradicionais (*Kohl*, por exemplo) que contêm altas concentrações de chumbo.

Mesmo mulheres grávidas que não trabalham em ambiente contaminado podem ser expostas ao chumbo através de seus maridos ou outros membros da família que podem carregar chumbo para casa através de suas vestimentas, por exemplo, mineradores,

construtores civis, entre outros (Despress, 2011). Ressalta-se que baixas doses de exposição ao Pb pode elevar a pressão arterial de mulheres grávidas, com níveis de chumbo no cordão umbilical  $< 2 \mu\text{g/dl}$ , durante o trabalho de parto e ao nascimento (WELLS et al., 2011). Ainda, o CDC (2007) relata que 0,08 a cada 100.000 mulheres ocupacionalmente expostas entre 16 e 44 anos tem níveis de chumbo no sangue  $\geq 40 \mu\text{g/dl}$  (valor de referência para o indivíduo adulto em muitos países, incluindo o Brasil). Se uma política de avaliação universal fosse aplicada, o número de casos relatados seria substancialmente maior. Deve-se reconhecer que uma proporção significativa de mulheres não grávidas com níveis sanguíneos de chumbo  $\geq 40 \mu\text{g/dl}$  podem engravidar e potencialmente expor seus fetos aos efeitos adversos do chumbo. Ainda, na ausência de sinais e sintomas de intoxicação, as mulheres grávidas expostas ocupacionalmente ao chumbo permanecem em seus postos de trabalho, aumentando os riscos de exposição dos fetos ao chumbo.

Pelo exposto, fica evidente que muitos subgrupos de populações podem estar potencialmente expostos à associação de ambos os fatores de riscos cardiovasculares aqui citados, consumo crônico de etanol e exposição ao Pb, representando um grave problema de saúde pública e sócio-econômico mundial.

## ***Objetivos***

---

## **Geral**

Investigar possíveis alterações nas respostas cardiovasculares de ratos recém-desmamados expostos pré-natalmente ao etanol e ao Pb, isoladamente e em associação. Ainda, avançar na compreensão dos mecanismos envolvidos nestas alterações.

## **Específicos**

Investigar, em ratos recém-desmamados expostos pré-natalmente ao etanol e ao Pb isoladamente e em associação: (1) alterações de pressão arterial; (2) alterações de reatividade da aorta torácica ao nitro L-arginina metil-éster (L-NAME), à ACh e nitroprussiato de sódio, com enfoque sobre a célula endotelial e o músculo liso vascular; (3) alterações de reatividade da aorta torácica à ACh na presença de indometacina e/ou L-NAME; e (4) níveis de etanol e Pb no sangue e/ou ossos.

## ***Material e Métodos***

---

## 1 Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas (12-16 semanas de idade) foram obtidos do Biotério Central Campus de Botucatu-UNESP e usados para o acasalamento. Somente filhotes machos desmamados com 25-28 dias foram utilizados para os estudos de reatividade vascular. Como a ninhada é considerada a unidade experimental, irmãos não foram usados dentro de um mesmo grupo.

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

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu (protocolo n° 384-CEUA).

## 2 Acasalamento

Para o acasalamento, foi colocado um macho dentro de cada gaiola contendo duas fêmeas, ao final da tarde. As ratas foram diariamente observadas e o dia em que se detectou a presença de espermatozóides e a fase estro do ciclo estral no esfregaço vaginal foi nomeado dia zero de prenhez. Neste dia, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e aleatoriamente separadas em quatro grupos:

**2.1 Controle (CTRL):** recebeu água “*ad libitum*” durante a prenhez e a amamentação.

**2.2 Chumbo (Pb):** recebeu diariamente Pb 500 ppm na forma de acetato na água de beber durante a prenhez e água durante a amamentação, “*ad libitum*”.

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

**2.3 Etanol (EtOH):** recebeu diariamente uma solução de etanol a 10% na água de beber durante a prenhez e água a partir do quinto dia de amamentação, *-ad libitum*”.

O procedimento de exposição ao EtOH foi adaptado de Ojeda et al. (2008) e Akers et al. (2011). Os animais a serem submetidos ao consumo de etanol passaram por um período de adaptação à ingestão deste agente antes da prenhez. A concentração de EtOH na água de beber foi gradualmente aumentada, a saber, primeira semana, 2%; segunda semana, 5%; terceira semana, 10%. As ratas continuaram a receber EtOH 10% durante os quatro dias do período de coabitação com o macho e durante toda a prenhez. Imediatamente após o nascimento dos filhotes, a concentração de EtOH foi gradualmente diminuída. Dois dias, 5%; dois dias, 2%; e então substituída por água filtrada *-ad libitum*” até o desmame.

O procedimento de administração líquida de EtOH oferece algumas vantagens sobre outros métodos. Primeiro, a administração de EtOH na água ao invés de intubação gástrica ou injeção reduz o estresse materno. Segundo, as ratas têm livre acesso ao alimento durante todo o período, ao invés de receber a dieta líquida como fonte de seu nutriente sólido. Terceiro, a diminuição de etanol durante os primeiros dias após o nascimento, permite a retirada gradual de EtOH sem comprometer o cuidado materno.

**2.4 Chumbo e Etanol (Pb/EtOH):** recebeu concomitantemente na água de beber Pb 500 ppm e etanol a 10% durante a prenhez e água durante a amamentação, *-ad libitum*”. À semelhança do grupo EtOH, as ratas passaram por um período de adaptação e de retirada à ingestão de EtOH, sendo o Pb introduzido no dia zero de prenhez e sua remoção ocorrendo no dia do nascimento dos filhotes.

Os protocolos de exposição estão apresentados na Figura 1.

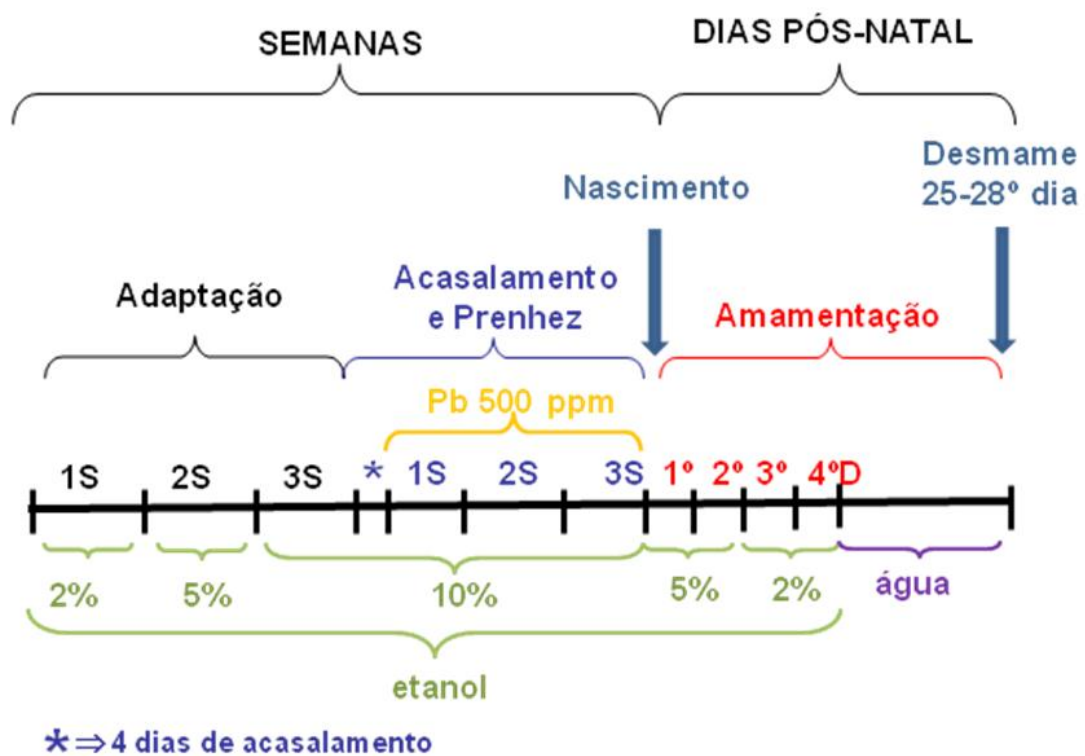


Figura 1. Protocolos de exposição

### **3 Procedimentos Pós-Natal e Evolução do Peso Corpóreo materno**

Para minimizar o estresse materno, o peso das mães foi avaliado uma vez por semana. Ao nascimento, foram verificados o número total de filhotes machos e fêmeas por ninhada, bem como a distância anogenital dos filhotes.

Cada ninhada foi pesada ao nascimento e cada filhote macho foi pesado imediatamente antes do protocolo de reatividade vascular, a saber, 25-28° dia de vida pós-natal.

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

### **4 Determinação da Pressão Arterial**

Os ratos foram pré-aquecidos por aproximadamente 10 min. e colocados em tubo plástico para contenção e avaliação da pressão arterial. A pressão arterial sistólica e diastólica caudal do filhote macho, não anestesiado, foi verificada através de um eletroesfigmomanômetro (Insight, Ribeirão Preto - SP), 24 horas antes da realização do protocolo de reatividade vascular. O valor da pressão arterial foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 1 minuto.

### **5 Protocolos experimentais**

Mães no dia do desmame e filhotes machos com 25-28 dias de idade foram anestesiados com uretano (1,25 g/kg, i.p.). Em seguida, o fêmur foi isolado e, após toracotomia, foram recolhidas amostras de sangue do ventrículo esquerdo. Posteriormente, ambos seguiram para a dosagem de Pb e EtOH.

### **5.1 Avaliação do peso das adrenais, rins, fígado e massa cardíaca**

Imediatamente após a coleta de sangue, foram avaliados, em filhotes machos, os pesos líquidos das adrenais, rins e fígado e o grau de hipertrofia ventricular que foi determinado através das seguintes variáveis: VE/PCF= relação entre o peso do ventrículo esquerdo (VE) e o peso corporal final (PCF); VD/PCF= relação entre o peso do ventrículo direito (VD) e PCF. Posteriormente, os animais seguiram para os protocolos de reatividade vascular.

### **5.2 Análise Quantitativa de Pb**

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

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

### **5.3 Determinação dos níveis plasmáticos de etanol**

Os níveis de etanol no sangue foram quantificados em mães ao desmame e seus filhotes machos com 25-28 dias de idade. As amostras foram analisadas no CEATOX-

IBB-UNESP por cromatografia gasosa utilizando-se o cromatógrafo GC modelo Trace 1310 (Thermo Scientific).

Amostras de 150 µl de sangue total (heparinizado) foram transferidas para Vials de 20 ml contendo 1,0 ml do padrão interno n-propanol a 0,015% (v/v).

Os Vials foram colocados no amostrador automático por *head space*, modelo Versa, da marca Tekmar Teledyne e em seguida, aquecidos a 90°C por 10 minutos. 1,0 µl dos vapores volatilizados foi injetado no CG, com coluna TR-WAX de 30m x 0,25mm x 0,25 µm. O detector utilizado foi o FID (*Flame Ionization Detector*) a 250°C.

A curva de calibração foi feita com soluções padrão de etanol P.A. (Anidrol) nas concentrações de 0,025%, 0,050%, 0,100%, 0,200% e 0,400%, diluídas em água ultra purificada por osmose reversa (Millipore).

O limite de detecção encontrado foi 0,005% e o  $r^2 = 0,9998$ .

#### **5.4 Reatividade Vascul**

Após toracotomia, procedeu-se o isolamento da aorta torácica, que, livre de tecido conjuntivo e gordura foi dividida em 2 anéis transversais. Indistintamente, um dos anéis teve seu endotélio removido mecanicamente (aorta desnuda). Os anéis foram suspensos em cuba para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; Glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11). A solução nutriente foi mantida a 37,0 ± 0,5°C e saturada com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométricos, acoplados a um fisiógrafo (Ugo Basile, Itália). O período de estabilização foi de 1h, sob uma tensão inicial de 0,5 g mantida ao longo de todo o experimento, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 15 min. Quando pertinente, preparações com e sem endotélio dos diferentes grupos experimentais foram estudadas em paralelo. Transcorridos 25 minutos de estabilização as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (10<sup>-6</sup> M) e subsequentemente desafiadas com ACh (10<sup>-6</sup> M) para se testar a integridade da célula endotelial. Em seguida, os anéis foram lavados com solução Krebs-

Henseleit e mantidos nesta condição até se completar o período de estabilização. A integridade do músculo liso foi avaliada ao término das curvas concentração-efeito (CCEs) aos agentes vasoativos através da adição de ( $10^{-4}$  M) de nitroprussiato de sódio. O endotélio e o músculo liso foram considerados intactos se o relaxamento induzido pela ACh e NP em aorta pré-contraída foi maior do que 70 e 90%, respectivamente.

#### **5.4.1 Liberação basal de NO**

Ao término do período de estabilização, anéis com e sem endotélio de aorta isolada de ratos CTRL, Pb, EtOH e Pb/EtOH foram pré-contraídos com fenilefrina em concentração que induziu de 60 a 80% do efeito máximo ( $10^{-6}$  ou  $3 \times 10^{-7}$  M). Após a estabilização desta resposta, CCEs cumulativas ao L-NAME ( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M, inibidor inespecífico da sintase de óxido nítrico) (REES et al., 1990; CIGNARELLA et al., 2000) foram obtidas.

#### **5.4.2 Liberação estimulada de NO e Participação da via ciclooxygenase**

Em outra série de experimentos, ao término do período de estabilização, CCEs cumulativas à ACh ( $10^{-11}$  –  $10^{-3}$  M), vasodilatador dependente do endotélio, foram obtidas em anéis de aorta intacta isolada de ratos CTRL, Pb, EtOH e Pb/EtOH pré-contraídos com fenilefrina em concentração que induziu de 60 a 80% do efeito máximo ( $10^{-6}$  ou  $3 \times 10^{-7}$  M) na ausência e presença de L-NAME ( $3 \times 10^{-4}$  M) e/ou indometacina ( $10^{-5}$  M, inibidor inespecífico da ciclooxygenase) (VANE, 1971). A remoção do endotélio abole a resposta vasodilatadora da ACh.

#### **5.4.3 Atividade da via guanilato ciclase/GMPc - resposta ao doador exógeno de NO**

Ao se completar o período de estabilização, CCEs cumulativas ao NP ( $10^{-15}$  -  $10^{-9}$  M), vasodilatador independente do endotélio, foram ainda obtidas em anéis de aorta, com e sem endotélio, isolada de ratos CTRL, Pb, EtOH e Pb/EtOH pré-contraídos

com fenilefrina em concentração que induziu de 60 a 80% do efeito máximo ( $10^{-6}$  ou  $3 \times 10^{-7}$  M).

## **6 Avaliação dos dados**

Ambas respostas vasodilatadora e vasoconstritora foram expressas em porcentagem da pré-contracção à fenilefrina.

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido aos agentes vasoativos em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50s foram obtidas através de determinação gráfica.

## **7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média ou desvio padrão. Os resultados foram comparados através da análise de variância multifatorial. De modo a testar as diferenças entre as médias, o teste de múltiplas comparações de Tukey ou Kolmogorov-Smirnov foi utilizado. Os fatores na comparação foram EtOH e Pb.

O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%

## **8 Drogas e Soluções**

As seguintes drogas foram utilizadas: acetato de chumbo (Vetec Química Fina Ltda.); cloridrato de acetilcolina (Sigma Chemical Co.); fenilefrina HCl (Sigma Chemical Co.); indometacina (Sigma Chemical Co.); L-NAME (Sigma Chemical Co.); nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Co.); e uretano (Sigma Chemical Co.).

O acetato de Pb foi diluído em água filtrada. Para prevenir a precipitação do Pb foi adicionado 0,5 ml de ácido acético glacial em cada litro de solução de acetato de Pb. A indometacina foi diluída em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M e o pH ajustado para 7,4. As demais soluções

foram preparadas utilizando-se solução Krebs-Henseleit e as concentrações expressas em molar.

***Resultados***

---

## 1 Características gerais dos animais

O peso materno aumentou em função da evolução da prenhez, mas não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 2).

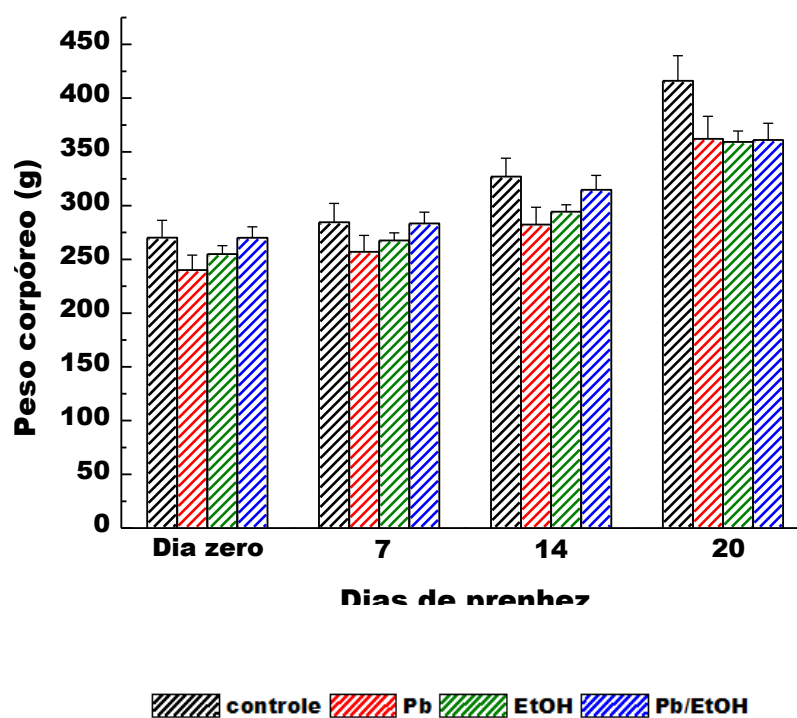


Figura 2. Peso corpóreo materno durante a prenhez. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  EPM. MANOVA/Tukey;  $P > 0,05$ . Número de animais por grupo = 7-9.

O consumo de etanol, tanto isoladamente como em associação à exposição ao Pb durante a prenhez, determinou diminuição significativa da ingestão de ração e líquidos ao longo de toda a prenhez (Figuras 3A e 3B).

Da mesma maneira, a exposição ao Pb durante a prenhez determinou diminuição significativa da ingestão de ração e líquidos, apenas na primeira semana de gestação (Figuras 3A e 3B).

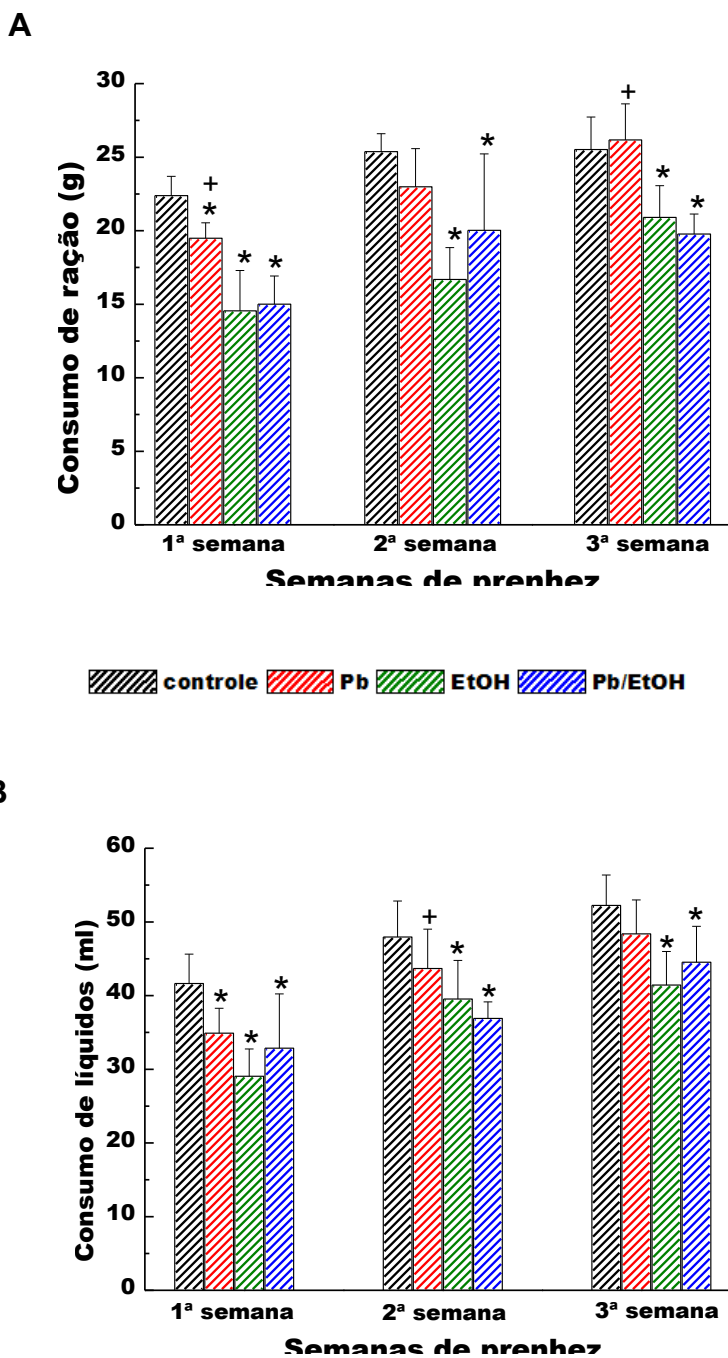


Figura 3. Consumo de ração (A) e líquidos (B) durante a prenhez por mães dos grupos controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. MANOVA/Kolmogorov-Smirnov; \*P < 0,05 vs controle; +P < 0,05 vs Pb/EtOH. Número de animais por grupo = 6-8.

Nenhum dos protocolos de exposição determinou qualquer alteração do número de filhotes machos e fêmeas por ninhada bem como da distância anogenital (Tabela 1). O mesmo foi observado para o peso dos filhotes machos ao 25º dia de vida pós-natal (Tabela 1). Entretanto, a exposição ao Pb *in utero* determinou diminuição do peso corpóreo de filhotes fêmeas ao nascimento em relação ao grupo controle, sem alterar o peso de filhotes machos. Contrariamente, a exposição ao etanol *in utero*, isoladamente e em associação ao Pb, não determinou qualquer alteração no peso dos filhotes ao nascimento (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios do número de filhotes por ninhada, da distância anogenital e do peso corpóreo ao nascimento e ao 25º dia de vida pós-natal de filhotes provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Parâmetros	Filhotes	Grupos			
		Controle	Pb	EtOH	Pb/EtOH
Número de filhotes por ninhada (n = 11-13)	Total	11,42 ± 2,19	11,55 ± 2,66	10,73 ± 1,74	9,46 ± 3,23
	Machos	5,66 ± 2,23	5,73 ± 1,68	5,82 ± 2,14	4,92 ± 2,78
	Fêmeas	5,75 ± 1,76	5,82 ± 1,25	4,91 ± 1,30	4,54 ± 1,71
Distância anogenital (mm) ao nascimento (n = 54-81)	Machos	3,07 ± 0,34	2,95 ± 0,29	3,03 ± 0,14	3,01 ± 0,54
	Fêmeas	1,40 ± 0,27	1,47 ± 0,43	1,58 ± 0,39	1,28 ± 0,24
Peso dos filhotes (g) ao nascimento (n = 54-81)	Machos	6,88 ± 0,75	6,51 ± 0,50	7,11 ± 0,52	6,89 ± 1,08
	Fêmeas	6,71 ± 0,59	6,05 ± 0,26*	6,89 ± 0,60	6,27 ± 0,95
Peso dos filhotes (g) ao 25º dia de vida pós-natal (n = 12)	Machos	85,64 ± 9,79	93,07 ± 14,10	90,60 ± 13,02	83,56 ± 12,23

Os valores representam a média ± desvio padrão. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH - ambos protocolos em associação. MANOVA/Kolmogorov-Smirnov; \*P < 0,05 vs respectivo controle.

Nenhum dos protocolos de exposição determinou qualquer alteração dos pesos dos ventrículos, rins, adrenais e fígado de filhotes recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios dos pesos dos ventrículos, rins, adrenais e fígado de filhotes machos recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Parâmetros	Grupos			
	Controle	Pb	EtOH	Pb/EtOH
<b>VE/PCF x 100</b>	0,30 ± 0,04	0,32 ± 0,11	0,29 ± 0,06	0,30 ± 0,02
<b>VD/PCF x 100</b>	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02
<b>Rim direito (g)</b>	0,42 ± 0,06	0,43 ± 0,11	0,41 ± 0,05	0,46 ± 0,03
<b>Rim esquerdo (g)</b>	0,38 ± 0,05	0,41 ± 0,12	0,39 ± 0,05	0,44 ± 0,03
<b>Adrenal direita (g) x 100</b>	1,33 ± 0,31	1,47 ± 0,55	1,39 ± 0,61	1,77 ± 0,45
<b>Adrenal esquerda (g) x 100</b>	1,70 ± 0,43	1,75 ± 0,71	1,50 ± 0,80	2,09 ± 0,48
<b>Fígado (g)</b>	3,20 ± 1,15	3,46 ± 0,96	3,38 ± 0,77	3,47 ± 0,40

Os valores representam a média ± desvio padrão. VE/PCF e VD/PCF = peso dos ventrículos esquerdo e direito, respectivamente, em relação ao peso corporal final. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. MANOVA/Kolmogorov-Smirnov; P > 0,05. Número de animais por grupo = 10.

## 2 Dosagem de Pb e Etanol

A exposição ao Pb, na dose de 500 ppm durante a prenhez, determinou níveis sanguíneos de  $37,57 \pm 2,39$  µg/dl nas mães ao nascimento dos filhotes, n=6, e correspondeu a  $2,32 \pm 0,17$  µg/g nos filhotes machos ao nascimento, n=6.

Por sua vez, o consumo de etanol durante a prenhez determinou níveis sanguíneos em mães ao desmame e filhotes machos recém-desmamados abaixo do nível de detecção que foi de 0,005% (n = 8-10).

## 3 Pressão arterial

A pressão arterial de filhotes recém-desmamados provenientes de mães dos grupos controle, EtOH e Pb foram semelhantes entre si. Entretanto, a associação dos protocolos de exposição ao Pb e etanol *in utero* determinou aumento significativo da pressão arterial, tanto sistólica quanto diastólica, em filhotes recém-desmamados (sistólica – controle  $135,5 \pm 3,0$ , Pb  $130,4 \pm 3,7$ , EtOH  $139,2 \pm 5,2$ , Pb/EtOH  $157,8 \pm 4,6^*$ ; diastólica – controle  $97,5 \pm 1,4$ , Pb  $96,0 \pm 2,3$ , EtOH  $102,0 \pm 2,0$ , Pb/EtOH  $125,9 \pm 3,2^*$ . \* P < 0,05 vs controle, n = 11) (Figura 4).

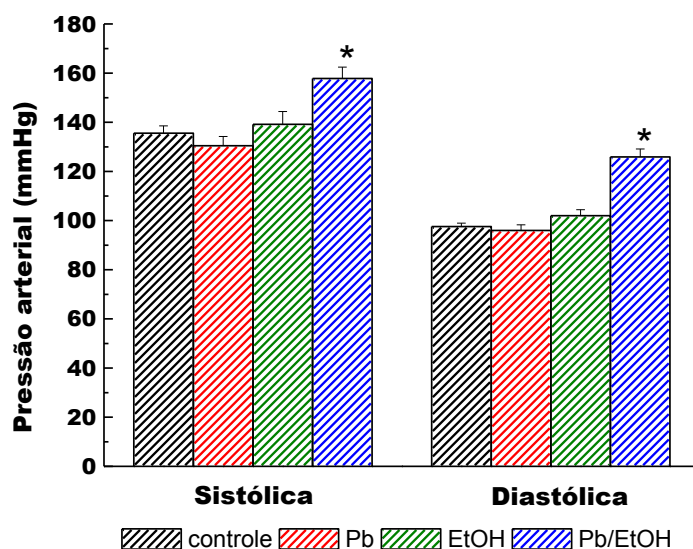


Figura 4. Pressão arterial caudal de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães dos grupos: controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  EPM. MANOVA/Tukey; \*P < 0,05 vs controle. Número de animais por grupo = 11.

## 4 Reatividade Vascular

### 4.1 Liberação basal de NO

Primeiramente, as respostas vasculares mediadas pela via NO foram avaliadas em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. As repostas ao L-NAME ( $10^{-7}$  –  $10^{-3}$  M) foram utilizadas para avaliar a liberação basal de NO. Ambos, exposição pré-natal ao Pb e consumo de etanol, isoladamente e em associação, não determinaram qualquer alteração de resposta máxima ou CE50 ao L-NAME em aortas intactas e desnudas (Figura 5, Tabela 3).

Tabela 3. Resposta máxima e CE50 ao L-NAME obtidas em anéis de aorta torácica, com e sem endotélio, isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Grupos	<sup>a</sup> Resposta máxima (% contração em relação à fenilefrina)		<sup>b</sup> CE50 ( $\times 10^{-5}$ M)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
<b>Controle</b>	243,15 ± 25,39	141,70 ± 8,42	0,80 (0,42 – 1,55)	0,86 (0,26 – 2,84)
<b>Pb</b>	233,01 ± 14,95	142,50 ± 9,94	0,54 (0,17- 1,70)	2,33 (0,89 – 6,08)
<b>EtOH</b>	238,20 ± 19,01	146,07 ± 6,67	0,64 (0,45 – 0,91)	0,52 (0,13 – 2,15)
<b>Pb/EtOH</b>	228,39 ± 11,07	153,82 ± 8,51	1,27 (0,57 – 2,83)	1,07 (0,22 – 5,21)

CE50 = concentração que produz 50% do efeito máximo. Os valores representam a média ± EPM<sup>a</sup> ou intervalo de confiança 95%<sup>b</sup>. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. MANOVA/Tukey; P > 0,05. Número de animais por grupo = 7-8.

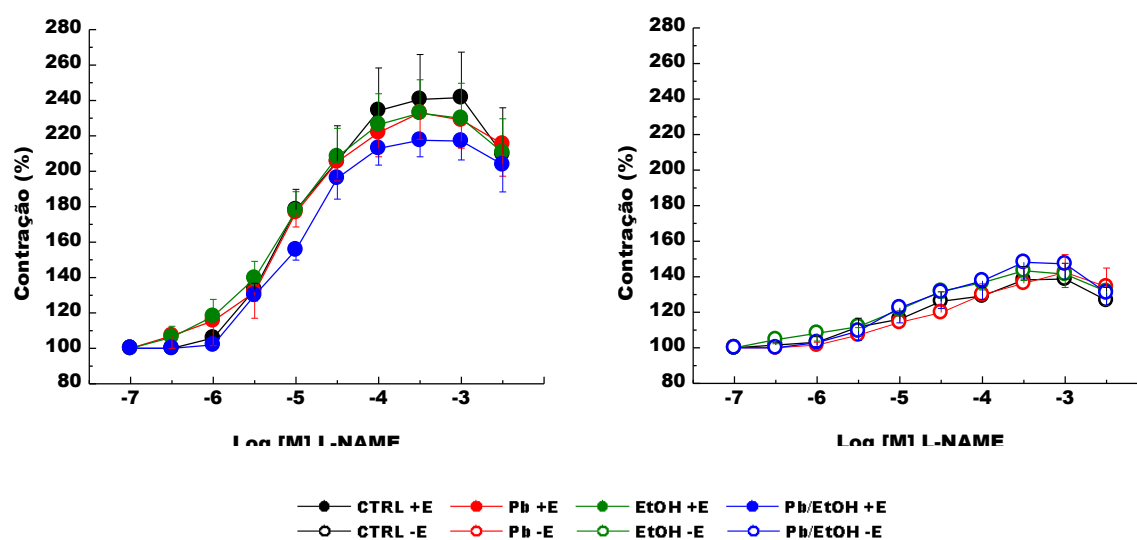


Figura 5. Curvas concentração-efeito ao L-NAME em anéis de aorta torácica, com (+E) e sem (-E) endotélio, pré-contráidos com fenilefrina ( $10^{-6}$  e  $3 \times 10^{-7}$  M, respectivamente), isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães dos grupos controle (CTRL) - recebeu água *ad libitum*; Pb - recebeu diariamente chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; etanol (EtOH) - recebeu diariamente uma solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH - ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  EPM. MANOVA/Tukey.  $P > 0,05$ . Número de animais por grupo=7-8.

#### 4.2 Liberação estimulada de NO

A resposta vasodilatadora da ACh ( $10^{-11}$  -  $10^{-3}$  M), a qual evoca a liberação de NO das células endoteliais, foi investigada em anéis de aorta intacta pré-contraídos com fenilefrina na ausência e presença de L-NAME.

Na ausência de inibidor a ACh promoveu um relaxamento concentração-dependente semelhante entre os diferentes grupos experimentais, à exceção do grupo etanol onde a resposta máxima à ACh mostrou-se reduzida em relação ao grupo controle (Figura 6 e Tabela 4).

A presença de L-NAME ( $3 \times 10^{-4}$  M) determinou diminuição de resposta máxima e aumento de EC50 em anéis de aorta intacta que alcançaram valores semelhantes em todos os grupos experimentais (Figura 6 e Tabela 5).

Tabela 4. Resposta máxima à acetilcolina, na ausência e presença de inibidores, obtida em anéis de aorta torácica intacta isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Grupos	Resposta máxima (% relaxamento em relação à fenilefrina)			
	Sem inibidor	Indometacina	L-NAME	L-NAME /indometacina
<b>Controle</b>	88,15 ± 3,29	82,90 ± 3,62	16,39 ± 1,69	13,83 ± 1,56
<b>Pb</b>	83,35 ± 1,92	76,81 ± 1,33	24,74 ± 6,10	11,37 ± 1,44
<b>EtOH</b>	70,64 ± 3,21*	88,58 ± 2,89	17,57 ± 1,50	14,96 ± 1,19
<b>Pb/EtOH</b>	77,76 ± 3,84	76,38 ± 3,72	24,42 ± 3,14	12,19 ± 1,12

Os valores representam a média ± EPM. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. MANOVA/Tukey; \*P < 0,05 vs controle. Número de animais por grupo = 6-11.

Tabela 5. CE50 à acetilcolina, na ausência e presença de inibidores, obtida em anéis de aorta torácica intacta isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Grupos	CE50 ( $\times 10^{-8}$ M)			
	Sem inibidor	Indometacina	L-NAME	L-NAME/indometacina
<b>Controle</b>	14,22 (2,23 – 90,36)	16,72 (3,03 – 92,26)	1071,38 (465,59 – 2466,04)	517,95 (183,23 – 1465,55)
<b>Pb</b>	45,81 (16,48 – 127,35)	81,98* <sup>†</sup> (28,38 – 236,59)	676,88 (78,52 – 5834,45)	994,33 <sup>†</sup> (345,14 – 2864,18)
<b>EtOH</b>	15,22 (1,70 – 136,14)	1,19* (0,19 – 7,22)	2796,12 (946,24 – 8260,38)	846,90 <sup>†</sup> (505,82 – 1415,79)
<b>Pb/EtOH</b>	15,91 (1,53 – 165,96)	4,97 (1,13 – 21,83)	638,78 (231,74 – 1757,92)	207,71 (107,15 – 402,72)

CE50 = concentração que produz 50% do efeito máximo. Os valores representam a média  $\pm$  intervalo de confiança 95%. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. MANOVA/Tukey; \*P < 0,05 vs controle. <sup>†</sup>P < 0,05 vs Pb/EtOH. Número de animais por grupo = 6-11.

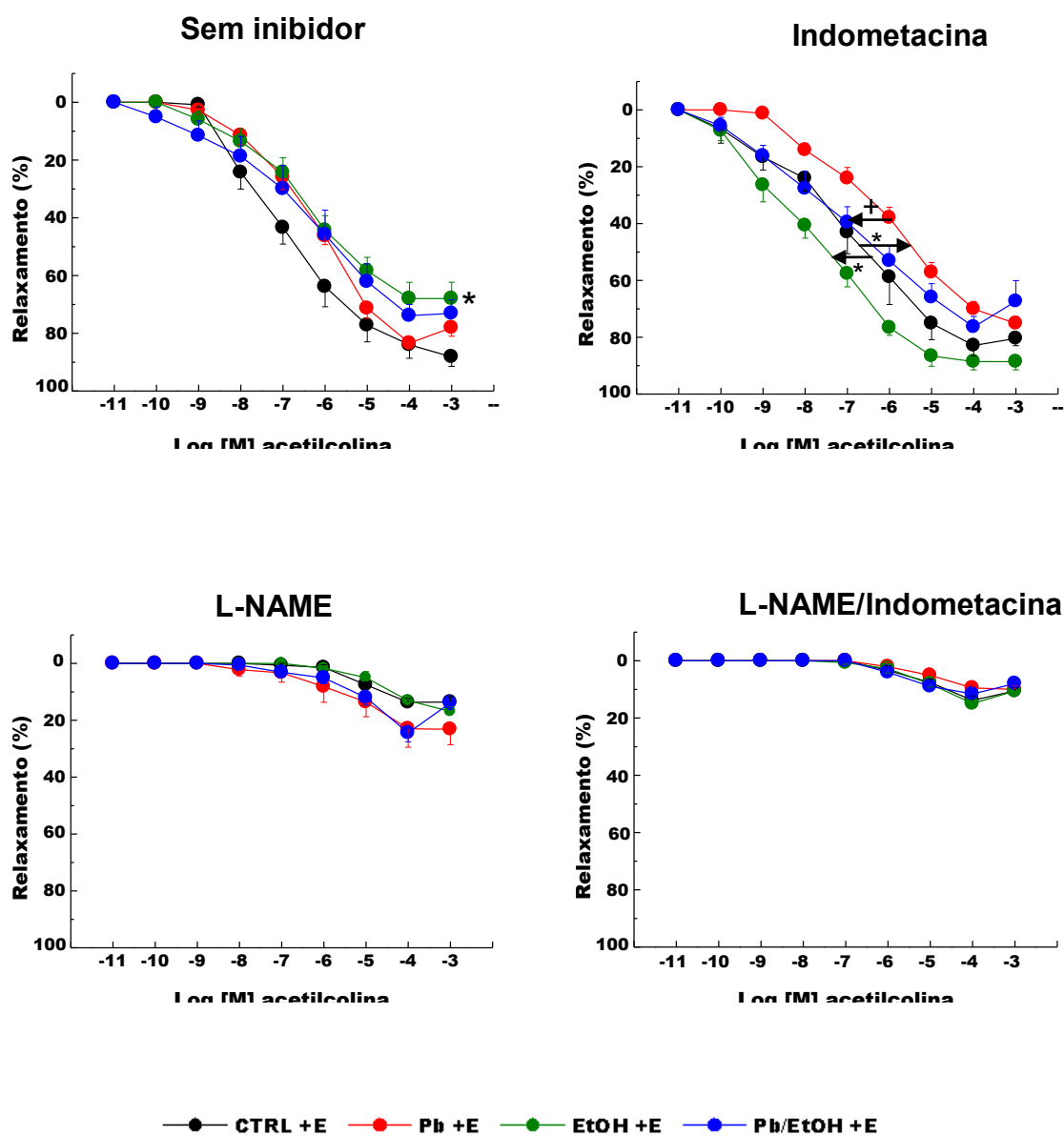


Figura 6. Curvas concentração-efeito à acetilcolina, na ausência e presença de inibidor, em anéis de aorta torácica intacta (+E) pré-contráidos com fenilefrina ( $10^{-6}$  ou  $3 \times 10^{-7}$  M), isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães dos grupos controle (CTRL) - recebeu água *ad libitum*; Pb - recebeu diariamente chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; etanol (EtOH) - recebeu diariamente uma solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH - ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  EPM. MANOVA/Tukey. \*P < 0,05 vs controle. <sup>†</sup>P < 0,05 vs Pb/EtOH. Número de animais por grupo = 6-11.

### **4.3 Participação da Via Ciclooxygenase**

Alterações nos metabólitos da via ciclooxygenase foram avaliados através do relaxamento induzido pela ACh em aortas intactas na presença de indometacina ( $10^{-5}$ M) (Figura 6 e Tabela 4 e 5).

A presença de indometacina determinou aumento de EC50 em anéis de aorta intacta do grupo Pb em relação ao controle e Pb/EtOH. Por sua vez, o valor deste parâmetro mostrou-se diminuído em anéis de aorta intacta do grupo EtOH em relação ao controle, mas semelhante ao observado no grupo Pb/EtOH (Figura 6 e Tabela 4 e 5).

Contrariamente, a presença deste inibidor não determinou qualquer alteração de resposta máxima à ACh em todos os grupos experimentais, a saber, controle, Pb, EtOH e Pb/EtOH (Figura 6 e Tabela 4 e 5).

A presença concomitante de ambos inibidores, indometacina e L-NAME, não determinou qualquer alteração de resposta máxima à ACh em todos os grupos experimentais (Figura 6 e Tabela 4 e 5). Entretanto, este procedimento determinou diminuição do valor de CE50 no grupo Pb/EtOH em relação aos grupos Pb e EtOH, mas não em relação ao grupo controle (Figura 6 e Tabela 4).

### **4.4 Resposta ao Doador Exógeno de NO**

A resposta vasodilatadora independente do endotélio induzida pelo doador exógeno de NO, nitroprussiato de sódio ( $10^{-15}$  -  $10^{-9}$  M), em aorta intacta e desnuda foi semelhante em todos os grupos experimentais (Figura 7 e Tabela 6).

Tabela 6. Resposta máxima e CE50 ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis de aorta torácica, com e sem endotélio, isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães expostas ou não ao chumbo e etanol, isoladamente e em associação, durante a prenhez

Grupos	<sup>a</sup> Resposta máxima (% relaxamento à fenilefrina)		<sup>b</sup> CE50 ( $\times 10^{-12}$ M)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
<b>Controle</b>	100	100	2,94 (0,87 – 9,95)	3,23 (0,76 – 13,80)
<b>Pb</b>	100	100	2,62 (1,60 – 4,28)	2,71 (0,87 – 8,45)
<b>EtOH</b>	100	100	5,75 (1,13 – 29,10)	2,76 (0,66 – 11,59)
<b>Pb/EtOH</b>	100	100	2,83 (0,43 – 18,84)	1,44 (0,94 – 2,18)

CE50 = concentração que produz 50% do efeito máximo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM<sup>a</sup> ou intervalo de confiança 95%<sup>b</sup>. Controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. MANOVA/Tukey; P > 0,05. Número de animais por grupo = 6-8.

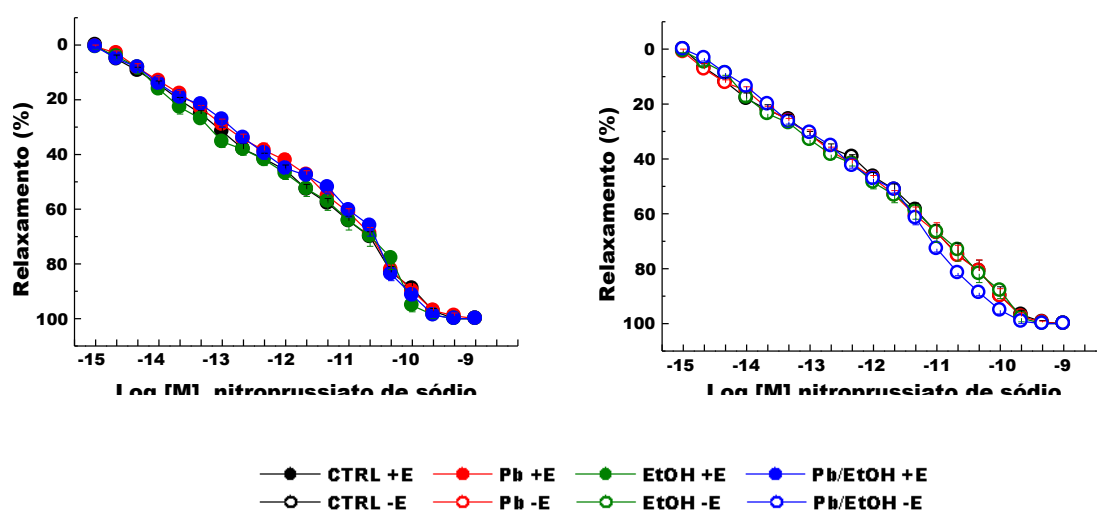


Figura 7. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica, com (+E) e sem (-E) endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ( $10^{-6}$  e  $3 \times 10^{-7}$  M, respectivamente), isolada de ratos machos recém-desmamados provenientes de mães dos grupos controle (CTRL) -recebeu água *ad libitum*; Pb - recebeu diariamente chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; etanol (EtOH) - recebeu diariamente uma solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH – ambos protocolos em associação. Valores representam a média  $\pm$  EPM. MANOVA/Tukey.  $P > 0,05$ . Número de animais por grupo = 6-8.

***Discussão***

---

O consumo de álcool, bem como a exposição ao Pb, durante a gravidez estão associados a problemas de saúde que afetam de modo adverso a mãe e o feto. Ainda, eventos *in utero* são determinantes para o fenótipo do indivíduo adulto (IGOSHEVA et al., 2007).

O regime de exposição materna ao Pb e/ou etanol usados no presente estudo não causou qualquer alteração na evolução do peso corpóreo das mães durante a gestação e amamentação ou no número de filhotes por ninhada. Da mesma maneira, o peso de filhotes machos ao nascimento e desmame e fêmeas ao desmame foi semelhante entre os grupos, embora o consumo de ração de mães dos grupos EtOH e Pb/EtOH durante a gestação tenha sido significativamente menor em relação ao grupo controle. Ainda, não foi observada qualquer alteração no peso dos órgãos, a saber, ventrículos, rins, fígado e adrenais dos filhotes dos diferentes grupos, ao desmame. Todos os animais tiveram a aparência saudável e nenhum deles mostrou sinais de intoxicação.

O consumo de álcool é categorizado como leve (0,1 – 9,9 g/dia, ou < 1 dose diária), moderado (10,0 – 29,9 g/dia, ou 1 a 2 doses diárias), e pesado ( $\geq$  30,0 g/dia, ou  $\geq$  3 doses diárias) (MUKAMAL et al., 2005). No presente estudo, o uso de 10% de etanol corresponde à ingestão diária de aproximadamente 3 a 4 g de etanol. Assim, o protocolo de exposição ao etanol utilizado pode ser considerado como ingestão diária leve de álcool. Ainda, considerando-se que o  $t_{1/2}$  do etanol no sangue em humanos é cerca de 2-4 horas e que em animais de pequeno porte é ainda mais rápido, a observação de níveis de etanol abaixo do limite de detecção no sangue de mães e filhotes ao desmame justifica-se (KLAASSEN et al., 1986; CEDERBAUM, 2012).

Como anteriormente descrito, o CDC (2007) relata que 0,08 a cada 100.000 mulheres ocupacionalmente expostas entre 16 e 44 anos tem níveis de Pb no sangue  $\geq$  40  $\mu\text{g/dl}$  (valor de referência para o indivíduo adulto em muitos países, incluindo o Brasil). Estas mulheres podem engravidar e potencialmente expor seus filhos aos efeitos deletérios do Pb. No presente estudo investigamos alterações cardiovasculares em filhotes machos

provenientes de mães expostas ao Pb durante a prenhez com níveis sanguíneos de aproximadamente 40 µg/dl.

Sabe-se que o desenvolvimento do sistema nervoso simpático é suscetível à modificação por exposições no início da vida de modo que a exposição a diferentes agentes podem alterar o controle simpático da pressão arterial ao longo do desenvolvimento pós-natal (YOUNG, 2006).

No presente estudo, apenas a associação de ambos fatores de risco cardiovascular, a saber, etanol e Pb, durante a prenhez determinou hipertensão arterial no início da vida pós-natal. Este dado sugere que a exposição ao Pb e o consumo de etanol durante a prenhez se constituíram em fator de risco cardiovascular adicional. Ainda, os efeitos cardiovasculares da exposição ao Pb e ao etanol estão na dependência da dose, do momento da exposição ao longo do desenvolvimento, do tempo de exposição aos agentes, entre outros (KOPP et al., 1988; HIPÓLITO et al., 2011; PARKINGTON et al., 2010). Este fato poderia assim explicar a não observação de alterações na pressão arterial de proles de mães submetidas aos protocolos de exposição isolados.

A hipertensão arterial pode estar associada a um prejuízo na resposta vascular à ACh que é frequentemente relacionada a alterações na via NO (GAO et al., 2007; KAGOTA et al., 2007). Neste contexto, o consumo crônico de etanol durante a prenhez determinou comprometimento da resposta vasodilatadora da ACh. Entretanto, o relaxamento dependente do endotélio induzido pela ACh não foi afetado pela exposição pré-natal ao Pb nem por sua associação ao consumo crônico de etanol. Apesar disso, experimentos adicionais foram realizados para determinar se o componente NO do relaxamento-dependente de endotélio estava alterado nestas condições.

A literatura concorda que os efeitos contráteis e de inibição do relaxamento dependente do endotélio induzidos por análogos da L-arginina refletem a inibição da atividade “basal” ou “estimada” da NOS constitutiva, respectivamente. De modo a investigar a hipótese de que os efeitos da exposição pré-natal ao Pb e/ou etanol nas mães pudessem estar relacionados a anormalidades vasculares na via NO em filhotes recém-

desmamados, a resposta vasoconstritora ao L-NAME foi primeiramente usada para investigar a liberação basal de NO. Ainda, o relaxamento induzido pela ACh, o qual libera NO das células endoteliais, foi investigado na presença de L-NAME. A mesma estratégia foi utilizada para investigar tanto a liberação basal quanto a estimulada de NO em ratos gonadectomizados (CIGNARELLA et al., 2000) e ratos perinatalmente expostos ao Pb (GRIZZO ; CORDELLINI, 2008).

O procedimento acima relatado mostrou liberação basal de NO tanto no endotélio quanto no músculo liso vascular de aorta de ratos recém-desmamados submetidos ou não aos protocolos de exposição isolados e em associação. Esta conclusão vem da observação de que, independentemente da integridade endotelial, o L-NAME induziu contração em aortas de ratos de todos os grupos experimentais. Entretanto, a contração induzida pelo L-NAME não diferiu entre os grupos, seja em aortas intactas ou naquelas desnudas, sugerindo não haver alteração na liberação basal de NO entre os grupos. Diferentemente, Grizzo e Cordellini (2008) mostraram que a exposição perinatal ao Pb aumenta a liberação basal de NO e afeta esta via de forma mais acentuada no endotélio do que no músculo liso. Tal discrepância pode estar relacionada a diferenças no protocolo de exposição materna, já que a idade pós-natal dos filhotes em ambos estudos foram semelhantes.

As células endoteliais liberam não apenas NO e várias sinalizações hiperpolarizantes, mas também podem gerar endoperóxidos, prostanóides e EROs através da via ciclooxigenase, conhecidos como EDCFs, i.e, fatores de contração derivados do endotélio (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; CORDELLINI, 1999; GRIZZO; CORDELLINI, 2008; VANHOUTTE et al., 2009; VANHOUTTE, 2011).

Ainda que a taxa de produção de metabólitos da ciclooxigenase em células normais pareça favorecer substâncias vasodilatadoras, é possível que esta taxa possa diferir em resposta a estados fisiopatológicos, por ex., hipertensão arterial (CORDELLINI et al., 1990). Há uma concordância na literatura de que o uso de inibidores específicos da ciclooxigenase, por ex. indometacina, pode esclarecer o envolvimento de produtos vasodilatadores e/ou vasoconstritores desta via, liberados pelas células endoteliais. De modo a investigar a

hipótese de que os efeitos da exposição pré-natal ao Pb e/ou etanol nas mães pudessem estar relacionados a anormalidades vasculares na via ciclooxigenase em filhotes recém-desmamados, a reatividade à ACh em anéis de aorta intacta foi avaliada na presença de indometacina.

A presença de indometacina determinou diminuição de sensibilidade à ACh em aorta de ratos expostos pré-natalmente ao Pb em relação ao grupo controle na presença deste inibidor. Estes dados sugerem que a vasodilatação induzida pela ACh em ratos expostos ao Pb *in utero*, mas não em ratos controles, é parcialmente modulada por metabólitos vasodilatadores da via ciclooxigenase, cuja identidade merece investigação futura. Interessantemente, estes fatores não se expressaram na ausência de indometacina, uma vez que a vasodilatação induzida pela ACh foi semelhante entre os grupos Pb e controle nesta condição. A não expressão destes fatores na ausência de indometacina sugere uma diminuição concomitante na produção de EDRFs não-prostanóides em aorta de ratos expostos ao Pb, a qual estaria mascarando os efeitos dos metabólitos vasodilatadores da via ciclooxigenase liberados na ausência deste inibidor.

Embora uma vasodilatação à ACh semelhante entre os grupos Pb e controles na ausência de inibidores possa sugerir uma não alteração na liberação estimulada de NO induzida pela exposição pré-natal ao Pb, a presença de L-NAME revelou um comprometimento nesta via. Esta hipótese vem da observação de que a presença deste inibidor aboliu a diminuição de sensibilidade à ACh em aorta de ratos expostos pré-natalmente ao Pb observada na presença de indometacina, o que aponta o NO como o fator de relaxamento comprometido na exposição ao Pb *in utero*. Todavia, maior investigação faz-se necessária para confirmar sua identidade.

Em conjunto, os resultados de reatividade vascular obtidos com o protocolo de exposição ao Pb *in utero* corroboram parcialmente estudos anteriores em nosso laboratório onde a exposição ao Pb durante a prenhez e a lactação determinou alterações na produção e/ou liberação basal e estimulada de EDRF-NO e produtos constritores da via ciclooxigenase (GRIZZO; CORDELLINI, 2008). Recentemente, Silveira et al. (2014)

relataram que a exposição ao Pb por 30 dias (12 µg/dl no sangue) aumenta a pressão arterial e a vasoconstrição induzida pela fenilefrina em aorta de ratos. Este efeito estava associado com uma redução na biodisponibilidade de NO, aumento na produção de EROS, aumento da participação de prostanóides constritores derivados da ciclooxigenase, e aumento da atividade do sistema renina-angiotensina.

O presente estudo mostra ainda uma diminuição na resposta vasodilatadora à ACh em aorta de ratos expostos ao EtOH *in utero* em relação ao grupo controle na ausência de inibidores, sugerindo uma provável diminuição da liberação estimulada de NO no grupo EtOH. Ainda, a presença de L-NAME aboliu esta hiporeatividade à ACh, confirmando o envolvimento da via NO nesta alteração.

Por sua vez, a presença de indometacina determinou aumento de sensibilidade à ACh em aorta intacta de ratos expostos pré-natalmente ao etanol, sem alterar a resposta vasodilatadora a este agente em aorta de ratos controles na mesma condição. Estes dados sugerem que, na ausência de indometacina, a vasodilatação induzida pela ACh em aorta intacta de ratos expostos ao etanol *in utero*, mas não em ratos controles, é parcialmente modulada por metabólitos da via ciclooxigenase.

Sabe-se que a ciclooxigenase endotelial metaboliza o ácido araquidônico em endoperóxidos, que são por si só EDCFs, ou são transformados em prostanóides que podem atuar como EDCFs ou EDRFs. Entretanto, em condições fisiopatológicas como a hipertensão arterial, a via ciclooxigenase parece ser uma fonte importante de EROs (TANG et al., 2007). As EROs geradas no endotélio podem diminuir a biodisponibilidade de NO e/ou alcançar as células musculares lisas através de junções *gap* mioendoteliais e ativar a ciclooxigenase do músculo liso vascular levando à vasoconstrição (TANG; VANHOUTTE, 2008; VANHOUTTE, 2011).

Uma vez que a presença de L-NAME sugere um comprometimento da via NO em aortas intactas do grupo EtOH, uma hipótese plausível para a identidade dos metabólitos da via ciclooxigenase envolvidos na hiporeatividade à ACh em aortas de ratos expostos ao

etanol *in utero* seriam as EROs, diminuindo a biodisponibilidade de NO. Entretanto, esta hipótese necessita maior investigação.

Pelo exposto, levanta-se a possibilidade de uma diminuição na biodisponibilidade de NO como responsável pela hiporeatividade à ACh na ausência de inibidores, afastando-se a idéia de uma provável diminuição na sua liberação estimulada, como inicialmente sugerido.

Surpreendentemente, embora a associação da exposição ao Pb e ao consumo de etanol durante a prenhez tenha determinado aumento de pressão arterial em ratos recém-desmamados, não se observou qualquer alteração da vasodilatação induzida pela ACh em aortas destes animais na ausência ou presença de L-NAME, sugerindo não haver alteração na liberação estimulada de NO nesta condição.

Por sua vez, na presença de indometacina, a sensibilidade à ACh em aorta de ratos do grupo Pb/EtOH foi semelhante àquelas dos grupos EtOH e controle, mas significativamente maior do que a observada em aorta do grupo Pb. Estes dados sugerem que, na associação dos protocolos de exposição, o provável aumento das EROs induzido pela exposição ao etanol isoladamente estaria prevalecendo sobre as alterações induzidas pela exposição ao Pb isoladamente.

Ainda, a presença concomitante de L-NAME e indometacina aboliu as alterações de sensibilidade à ACh observadas na presença de indometacina em aorta de ratos expostos ao Pb e etanol *in utero*, isoladamente. Entretanto, este procedimento revelou um aumento de sensibilidade à ACh em aorta de ratos do grupo Pb/EtOH em relação às exposições isoladas, não diferindo, contudo, do grupo controle. Em conjunto, estes dados sugerem o envolvimento de outro EDRF, não sensível à indometacina e ao L-NAME, como mecanismo compensatório aos efeitos cardiovasculares da exposição pré-natal ao Pb e etanol em associação.

Neste contexto, Csányi et al. (2012) sugeriram que o comprometimento do relaxamento dependente de NO precede o desenvolvimento de arterosclerose em aorta, e uma precoce *upregulation* das vias COX-2/PGI<sub>2</sub> e EDHF podem compensar a perda da atividade biológica do NO. Omanwar, Ravi e Fahim (2010) relataram que a exposição

crônica ao mercúrio compromete a via NO em aorta como consequência do estresse oxidativo, enquanto que o EDHF é capaz de manter o relaxamento dependente de endotélio em nível reduzido. Ainda, López-Miranda et al. (2010) demonstraram que a vasodilatação da aorta induzida pela metanandamida é dependente da geração de um fator de relaxamento hiperpolarizante da via citocromo P450 epoxigenase do ácido araquidônico.

Considerando-se o acima exposto, nossos dados permitem sugerir o fator hiperpolarizante como provável EDRF em aorta de ratos do grupo Pb/EtOH, revelado na presença simultânea de indometacina e L-NAME, cuja identidade merece ser investigada.

Sabe-se que o NO é gerado no endotélio e induz vasodilatação por estimular a guanilato ciclase solúvel no músculo liso adjacente. Nitrovasodilatadores exógenos também induzem vasodilatação independentemente do endotélio, por ativar a formação de GMP-cíclico no músculo adjacente. Dessa maneira, respostas semelhantes em aortas intactas e desnudas para o nitroprussiato de sódio, o qual induz relaxamento independentemente da liberação de NO pelo endotélio, sugere que a transdução da sinalização NO-mediada no músculo liso vascular não foi afetada pelos diferentes protocolos de exposição *in utero*, quer isolados ou em associação.

O presente estudo avança a compreensão dos efeitos cardiovasculares na vida pós-natal induzidos pela exposição *in utero* ao Pb e ao etanol, isoladamente e em associação, e pode levar a vantagens terapêuticas contra doenças cardiovasculares induzidas nestas condições.

***Conclusão***

---

- A associação da exposição ao etanol e Pb *in utero* constituiu-se em fator de risco adicional para o desenvolvimento de hipertensão arterial no início da vida pós-natal;
- Os protocolos de exposição *in utero* não afetaram a liberação basal de NO pelo endotélio e músculo liso vascular no início da vida pós-natal;
- O comprometimento na liberação de EDRF-NO em aorta de ratos expostos ao Pb *in utero*, revelado na presença dos inibidores da ciclooxigenase e da sintase de óxido nítrico, suscita preocupação quanto a vulnerabilidade cardiovascular na vida pós-natal dos indivíduos expostos ao Pb *in utero* quando em presença de patologias associadas que levem à disfunções da atividade do sistema NO;
- A expressão, na vida pós-natal, de um comprometimento vascular na biodisponibilidade de NO em ratos expostos ao etanol *in utero*, observado na ausência de inibidores, revela que este protocolo foi relativamente mais prejudicial à função vascular do que o protocolo de exposição ao Pb;
- A presença de um EDRF, não sensível ao L-NAME e à indometacina, em aorta de ratos expostos ao etanol e ao Pb *in utero* mostra a versatilidade das respostas orgânicas em se opor a perturbações da homeostase biológica.

## ***Referências Bibliográficas***

---

1. ABDEL-RAHMAN, A.R.; MERRILL, R.H.; WOOLLES, W.R. Effect of acute ethanol administration on the baroreceptor reflex control of heart rate in normotensive human volunteers. **Clinical Science**, v. 72, p. 113-22, 1987.
2. ALBALAK, R., et al. Blood lead levels and risk factors for lead poisoning among children in Jakarta, Indonesia. **Science of the Total Environment**, v.301(1-3), p.75-85, 2003.
3. **Álcool e suas conseqüências: uma abordagem multiconceitual**. Editores: Arthur Guerra de Andrade, James C. Anthony e Camila Magalhães Silveira. Editora: Minha editora, Barueri, São Paulo, 2009.
4. AKERS, K.G. et al. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. **Molecular brain**, v. 4:29, 2011.
5. BOST, L. et al. Blood lead and blood pressure: Evidence from the Health Survey for England. **Journal of Human Hypertension**, v.13, p. 123-128, 1999.
6. CALVERT, G.M.; ROSCOE, R.J. Lead exposure among females of childbearing age—United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56(16), p.397-400, 2007.
7. CDC. Alcohol use among pregnant and non pregnant women of childbearing age – United States, 1991-2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.58(19), p.529-532, 2009.
8. CDC. Lead exposure among females of childbearing age – United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, p.397-400, 2007.
9. CDC. Lead poisoning associated with ayurvedic medications—five states, 2000-2003. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.53(26), p. 582-584, 2004.
10. CEDERBAUM, A.I. Alcohol metabolism. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, p. 667-685, 2012.
11. CIGNARELLA, A. et al. Androgen deprivation, estrogen treatment and vascular function in male rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, p. 166-172, 2000.

12. CORDELLINI, S. Endothelial dysfunction in DOC-salt hypertension: Possible involvement of prostaglandin endoperoxides. **General Pharmacology**, v. 32, p. 315-320, 1999.
13. CORDELLINI, S. et al. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 8 (1), p. 53-60, 1990.
14. CORY-SLECHTA, D.A. et al. Lifetime consequences of combined maternal lead and stress. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 218-227, 2008.
15. CORY-SLECHTA, D.A. et al. Maternal stress modulates effects of developmental lead exposure. **Environmental Health Perspect**, v. 112, p. 717-730, 2004.
16. CSÁNYI, G. et al. Functional alterations in endothelial NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF pathways in aorta in ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 98 (3-4), p. 107-115, 2012.
17. DEARTH, R.K. et al. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 343-352, 2002.
18. DEY, A.; CEDERBAUM, A.I. Alcohol and oxidative liver injury. **Hepatology**, v. 43, p. 63-74, 2006.
19. DING, Y.; GONICK, H.C.; VAZIRI, N.D. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. **American Journal of Hypertension**, v. 13, p. 552-555, 2000.
20. FUJIWARA, Y. et al. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. **Toxicology**, v. 98, p. 105-110, 1995.
21. FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB Journal**, v. 3, p. 2007-2018, 1989.
22. GAO, Y. et al. Effects of long-term high-saturated and unsaturated fatty acid diets on relaxation and contraction of renal arteries in insulin resistant rats. **Acta Physiologica Sinica**, v. 59, p. 363-368, 2007.

23. GARCIA VARGAS, G.G., et al. Lead exposure in children living in a smelter community in region Lagunera, Mexico. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 62(6), p.417-429, 2001.
24. GRIZZO, L. T.; CORDELLINI, S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. **Toxicological Sciences**, v. 103, p. 207-214, 2008.
25. HACKLEY, B.; KATZ-JACOBSON, A. Lead poisoning in pregnancy: a case study with implications for midwives. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v.48(1), p.30-38, 2003.
26. HAMMOND, P. B.; DIETRICH, K.N. Lead exposure in early life: health consequences. In: WARE, G.W., editor. **Review of environmental contamination and toxicology**, v. 115, p. 91-124, 1990.
27. HATTON, D.C. et al. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. **Journal of Hypertension**, v. 6, p.529-537, 1992.
28. HIPÓLITO, U.V. et al. Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. **Alcohol**, v. 45, p. 805-814, 2011.
29. HUSAIN, K. et al. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 51-58, 2008.
30. HUSAIN, K. et al. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. **Human & Experimental Toxicology**, 2010.
31. HUSAIN, K. et al. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 337-343, 2005.
32. HUSAIN, K. Vascular endothelial oxidative stress in alcohol-induced hypertension. **Cell and Molecular Biology**, v. 53, p. 70-77, 2007.
33. IGOSHEVA, N. et al. Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood. **Journal of Physiology**, v. 582 [part 2], p. 665-674, 2007.

34. JACOBS, D.E., et al. The prevalence of lead-based paint hazards in U.S. housing. **Environmental Health Perspectives**, v.110(10), p. A599-606, 2002.
35. KAGOTA, S. et al. Impaired effect of salt loading on nitric oxide-mediated relaxation in aortas from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 48-54, 2007.
36. KAJI, T. et al. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. **Toxicology**, v. 95, p. 87-92, 1995.
37. KASPERCZYK, S. et al. The role of the antioxidant enzymes in erythrocytes in the development of arterial hypertension among humans exposed to lead. **Biological Trace Element Research**, v. 130, p. 95-106, 2009.
38. KHALIL-MANESH, F. et al. Effects of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. **Environmental Research**, v. 65, p. 86-99, 1994.
39. KHALIL-MANESH, F. et al. Lead-induced hypertension: Possible role of endothelial factors. **American Journal of Hypertension**, v. 6, p. 723-729, 1993.
40. KLAASEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 3ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1986.
41. KLEINHENZ, D.J. et al. Chronic ethanol ingestion increases aortic endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 32, p. 148-154, 2008.
42. KOPP, S.J.; BARRON, J.T.; TOW, J.P. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 78, p. 91-99, 1988.
43. LADIPO, C.O. et al. Chronic ethanol consumption alters vascular smooth muscle responses in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p.707-709, 2002.
44. LASLEY, S.M.; LANE, J.D. Diminished regulation of mesolimbic dopaminergic activity in rat after chronic inorganic lead exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 95, p. 474-483, 1988.

45. **Lead exposure during pregnancy – What you need to know?** Renne Despress, 2011. Disponível em: <<http://ehealthmd.com/content/lead-exposure-during-pregnancy-what-you-need-know>>. Acesso em: 03 jun. 2012.
46. LI, W. et al. Antioxidants prevent ethanol-induced contractions of canine cerebral vascular smooth muscle: relation to alcohol-induced brain injury. **Neuroscience Letters**, v. 301, p. 91-94, 2001.
47. LOCKITCH, G. Perspectives on lead toxicity. **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 371-381, 1993.
48. LÓPEZ-MIRANDA, v. et al. Cytochrome P450 pathway contributes to methanandamide-induced vasorelaxation in rat aorta. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 24 (5-6), p. 379-389, 2010.
49. MAIER, S.E.; WEST, J.R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Research & Health**, v.25, p.168-174, 2001.
50. MALVEZZI, C.K. et al. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biomedical Research**, v. 34, p. 1341-1346, 2001.
51. MARINO, P.E., et al. A case report of lead paint poisoning during renovation of a Victorian farmhouse. **American Journal of Public Health**, v.80(10), p.1183-1185, 1990.
52. MILLER, P.M. et al. Excessive alcohol consumption and hypertension: clinical implications of current research. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 7, p. 346-351, 2005.
53. MOORE, R.D. et al. Alcohol consumption and blood pressure in the 1982 Maryland Hypertension Survey. **American Journal of Hypertension**, v. 3, p. 1–7, 1990.
54. MOREIRA, G.E.; VASSILIEFF, I.; VASSILIEFF, S.V. Developmental lead exposure: Behavioral alterations in the short and long term. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 489-495, 2001.

55. MUKAMAL, K.L. et al. Alcohol and risk for ischemic stroke in men: the role of drinking patterns and usual beverage. **Annals of Intern Medicine**, v. 142(1), p. 11-19, 2005.
56. NIETO-FERNANDEZ, F.E. et al. Short term lead exposure induces a stress-like response in adult mice. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 325-329, 2006.
57. OJEDA, M.L. et al. Lipid metabolism in ethanol-treated rat pups and adults: effects of folic acid. **Alcohol & Alcoholism**, v. 43, p. 544-550, 2008.
58. OMANWAR, S.; RAVI, K.; FAHIM, M. Persistence of EDHF pathway and impairment of the nitric oxide pathway after chronic mercury chloride exposure in rats: mechanisms of endothelial dysfunction. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30 (11), p. 1777-1784, 2010.
59. PARKINGTON, H.C. et al. Prenatal alcohol exposure: Implications for cardiovascular function in the fetus and beyond. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, p. e91-e98, 2010.
60. PIRKLE, J.L. et al. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. **American Journal of Epidemiology**, v. 121, p. 246-258, 1985.
61. PROZIALECK, W.C. et al. The vascular system as a target of metal toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 102, p. 207-218, 2008.
62. PUDDEY, I.B.; BEILIN, L.J. Alcohol is bad for blood pressure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 847-852, 2006.
63. PURDY, R.E. et al. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity *in vitro*. **American Journal of Hypertension**, v. 10, p. 977-1003, 1997.
64. REES, D.D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746-752, 1990.
65. SAPER, R.B., et al. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. **JAMA**, v.292(23), p.2868-2873, 2004.
66. SAPER, R.B., et al. Lead, mercury, and arsenic in US- and Indian-manufactured ayurvedic medicines sold via the Internet. **JAMA**, v.300, p.915-923, 2008.

67. SECKL, J.R.; HOLMES, M.C. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal "programming" of adult pathophysiology. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 3, p. 479-488, 2007.
68. SELEVAN, S.G. et al. Mortality of lead workers. **American Journal of Epidemiology**, v. 122, p. 673-683, 1985.
69. SHANNON, M. Severe lead poisoning in pregnancy. **Ambulatory Pediatrics**, v.3(1), p.37-39, 2003.
70. SILVEIRA, E.A. et al. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 366-376, 2014.
71. SKOCZYNSKA, A. et al. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. **Toxicology**, v. 39, p. 275-289, 1986.
72. SUN, H.; MAYHAN, W.G. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, p.992-1001, 2001.
73. TANG E. H., et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 15-23, 2007.
74. TANG, E. H. C.; VANHOUTE, P.M. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! **Journal of Physiology**, v. 586.22, p. 5295-5304, 2008.
75. TIRAPELLI, C.R. et al. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p.233-241, 2006.
76. TIRAPELLI, C.R. et al. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 985-993, 2007.

77. TIRAPELLI, C.R. et al. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p.331-341, 2008b.
78. TIRAPELLI, C.R. et al. Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 468-479, 2008a.
79. TODA, N.; AYAJIKI, K. Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. **Alcohol & Alcoholism**, p. 347-355, 2010.
80. TROMBINI, T.V. et al. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation?. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 743-751, 2001.
81. TSAO, D.A. et al. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 127-133, 2000.
82. VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthase as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 23, p. 232-235, 1971.
83. VANHOUTE, P.M. et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196 (2), p. 193-222, 2009.
84. VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions in hypertension. **Hypertension**, v. 57 [part 2], p. 526-531, 2011.
85. VAZIRI, N.D. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, p. 454-465, 2008.
86. VYSKOCIL, A. et al. A chronic study with lead acetate in female rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 11, p. 385-386, 1991.
87. VYSKOCIL, A. et al. Influence of chronic lead exposure on hormone levels in developing rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 10, p. 301-302, 1990.

88. WATTS, S.W.; CHAI, S.; WEBB, R.C. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: Interaction with calcium and protein kinase C. **Toxicology**, v. 99, p. 55-65, 1995.
89. WEINBERG, J. et al. Prenatal alcohol exposure: fetal programming, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex differences in outcome. **Journal of Endocrinology**, v. 20, p. 470-488, 2008.
90. WELLS, E.M., et al. Low-Level Lead Exposure and Elevations in Blood Pressure during Pregnancy. **Environmental Health**, v. 119 (5), p. 664-669, 2011.
91. YOUNG, J.B. Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. 41-49, 2006.
92. ZHANG, X.; SLIWOWSKA, J.H.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 376-388, 2005.

***Abstract***

---

**Introduction:** although the literature reports cardiovascular changes induced by exposure to ethanol and lead (Pb) alone in adulthood, few studies focus on postnatal cardiovascular effects of exposure to ethanol and/or Pb *in utero*. **Objectives:** it was to investigate possible changes in the cardiovascular responses of weaned rats prenatally exposed to ethanol and Pb, alone and in combination. Still, advancing our understanding of the mechanisms involved in these changes. **Materials and Methods:** mothers were separated in 4 groups: control - received drinking water *ad libitum*; Pb - received lead 500 ppm *ad libitum* during pregnancy; EtOH - received a solution of 10% ethanol *ad libitum* in drinking water during pregnancy, and Pb / EtOH - both protocols in combination. Male Wistar rats (25 to 28-day old) from exposed mothers were used. The animals were sacrificed and thoracic aortic rings were collected and kept in organ bath containing Krebs- Henseleit solution, 37°C, pH 7.4, saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Concentration-effect curves to L-NAME, acetylcholine (ACh) in absence and presence of indomethacin and/or L-NAME, and sodium nitroprusside were obtained in intact and/or denuded aortas. It was also evaluated the blood pressure of 25-day old rats from all groups. Effective concentration 50% (EC50) and maximum response (MR) were evaluated (MANOVA/Tukey). **Results:** association of Pb exposure and ethanol *in utero*, but not the isolated protocols, determined hypertension on the 25th day of postnatal life (systolic - control 135.5 ± 3.0, Pb/EtOH 157.8 ± 4.6\*; diastolic - control 97.5 ± 1.4, Pb/EtOH 125.9 ± 3.2\*, \*P < 0.05, n=11). None of the protocols determined any change in reactivity of intact and denuded aortas to L-NAME and sodium nitroprusside (MR and EC50) and EC50 to ACh in intact aortas (data not shown). Removal of endothelium abolished vasorelaxation to ACh. Unlike *in utero* exposure to Pb alone and in combination with ethanol, ethanol exposure alone determined hyporeactivity to ACh (% relaxation - control 88.15 ± 3.29, EtOH 70.64 ± 3.21\*, \*P < 0.05, n = 5-7). None of the inhibitors determined any change in MR to ACh in aorta of the different experimental groups (data not shown). However, indomethacin presence in aorta from Pb and EtOH groups determined, respectively, increase and decrease of the EC50 to ACh related to control as well as an increase in this value in Pb group compared to Pb/EtOH [control 16.72 (3.03 - 92.26), 81.98 Pb (28.38 - 236.59)\*\*\*, EtOH 1.19 (0.19 - 7.22)\*; Pb/EtOH 4.97 (1.13 - 21.83); \*P < 0.05 vs control; \*\*P < 0.05 vs Pb/EtOH, n = 6-11]. These differences were abolished in the presence of L-NAME (data not shown). The combination of L-NAME and indomethacin determined a decrease in EC50 to ACh in aorta from Pb/EtOH group compared to Pb and EtOH groups [control 517.95 (183.23 - 1465.55); Pb 994.33 (345.14 - 2864.18), EtOH 846.90 (505.82 - 1415.79); Pb/EtOH 207.71 (107.15 - 402.72)\*; \*P < 0.05 vs EtOH and Pb; n = 6-11]. **Conclusions:** The association of ethanol and Pb exposure *in utero* constituted an additional risk factor for the development of hypertension in early postnatal life. The protocols of *in utero* exposure did not affect the basal release of NO by the endothelium and vascular smooth muscle cells in early postnatal life. An impairment in the release of EDRF-NO in aorta of rats exposed to Pb *in utero* was unveiled in the presence of inhibitors of cyclooxygenase and nitric oxide synthase. Exposure to ethanol *in utero* determined impairment of NO bioavailability in rat aorta during postnatal life, which was observed in the absence of inhibitors. Aorta of rats exposed to ethanol and Pb *in utero* releases EDRF not sensitive to L-NAME and indomethacin as a compensatory mechanism to the deleterious effects of *in utero* exposure to these compounds. This study advances the understanding of the cardiovascular effects in postnatal life induced by *in utero* exposure to Pb and ethanol, alone and in combination, and may lead to therapeutical benefits against cardiovascular diseases induced in these conditions.

***Resumo***

---

**Introdução:** embora a literatura relate alterações cardiovasculares induzidas pela exposição ao etanol e ao chumbo (Pb) isoladamente na vida adulta, há escassez de estudos focando os efeitos cardiovasculares pós-natal da exposição ao etanol e/ou Pb *in utero*. **Objetivos:** investigar possíveis alterações nas respostas cardiovasculares de ratos recém-desmamados expostos pré-natalmente ao etanol e ao Pb, isoladamente e em associação. Ainda, avançar na compreensão dos mecanismos envolvidos nestas alterações. **Materiais e Métodos:** foram utilizados ratos machos Wistar recém-desmamados (25-28 dias de idade) provenientes de mães dos grupos: controle - recebeu água de beber *ad libitum*; Pb - recebeu chumbo 500 ppm *ad libitum* durante a prenhez; EtOH - recebeu solução de etanol a 10% na água de beber *ad libitum* durante a prenhez; e Pb/EtOH - ambos protocolos em associação. Esses animais foram mortos e anéis de aorta torácica foram coletados e mantidos em banho isolado contendo solução de Krebs-Henseleit, 37°C, pH 7.4, saturado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Curvas concentração-efeito ao L-NAME, à acetilcolina (ACh), na ausência e presença de indometacina e/ou L-NAME, e ao nitroprussiato de sódio foram obtidas de anéis de aorta intacta e desnuda. Avaliou-se ainda a pressão arterial no 25º dia de vida pós-natal. Concentração eficaz 50% (CE50) e resposta máxima (RM) foram avaliadas (MANOVA/Tukey). **Resultados:** a associação da exposição ao Pb e ao etanol *in utero*, mas não os protocolos isolados, determinou hipertensão arterial no 25º dia de vida pós-natal (sistólica - controle 135,5 ± 3,0, Pb/EtOH 157,8 ± 4,6\*; diastólica - controle 97,5 ± 1,4, Pb/EtOH 125,9 ± 3,2\*; \*P < 0,05, n=11). Nenhum dos protocolos determinou qualquer alteração da reatividade da aorta intacta e desnuda ao L-NAME e ao nitroprussiato de sódio (RM e CE50) e de CE50 à ACh em aorta intacta (dados não mostrados). A remoção do endotélio abole o relaxamento vascular à ACh. Diferentemente da exposição *in utero* ao Pb isoladamente e em associação ao etanol, a exposição ao etanol isoladamente determinou hiporeatividade à ACh (% relaxamento - controle 88,15 ± 3,29; EtOH 70,64 ± 3,21\*; \*P < 0,05, n = 5-7). Nenhum dos inibidores determinou qualquer alteração de RM à ACh em aorta dos diferentes grupos experimentais (dados não mostrados). Entretanto, a presença de indometacina determinou em ratos do grupo Pb e EtOH, respectivamente, aumento e diminuição da CE50 à ACh em relação ao grupo controle e aumento deste valor no grupo Pb em relação ao grupo Pb/EtOH [controle 16,72 (3,03 - 92,26); Pb 81,98 (28,38 - 236,59)\*; EtOH 1,19 (0,19 - 7,22)\*; Pb/EtOH 4,97 (1,13 - 21,83); \*P < 0,05 vs controle; \*P < 0,05 vs Pb/EtOH; n = 6-11]. Estas diferenças foram abolidas na presença de L-NAME (dados não mostrados). A associação de L-NAME e indometacina determinou diminuição da CE50 à ACh em aorta do grupo Pb/EtOH em relação aos grupos Pb e EtOH [controle 517,95 (183,23 - 1465,55); Pb 994,33 (345,14 - 2864,18); EtOH 846,90 (505,82 - 1415,79); Pb/EtOH 207,71 (107,15 - 402,72) \*; \*P < 0,05 vs Pb e EtOH; n = 6-11]. **Conclusões:** a associação da exposição ao etanol e Pb *in utero* constituiu-se em fator de risco adicional para o desenvolvimento de hipertensão arterial no início da vida pós-natal. Os protocolos de exposição *in utero* não afetaram a liberação basal de NO pelo endotélio e músculo liso vascular no início da vida pós-natal. Um comprometimento na liberação de EDRF-NO em aorta de ratos expostos ao Pb *in utero* foi revelada na presença dos inibidores da ciclooxigenase e da sintase de óxido nítrico. A exposição ao etanol *in utero* determinou comprometimento da biodisponibilidade de NO em aorta de ratos na vida pós-natal observado na ausência de inibidores. A aorta de ratos expostos ao etanol e ao Pb *in utero* libera EDRF não sensível ao L-NAME e à indometacina como mecanismo compensatório aos efeitos deletérios da exposição *in utero* a estes componentes. O presente estudo avança a compreensão dos efeitos cardiovasculares na vida pós-natal induzidos pela exposição *in utero* ao Pb e ao etanol, isoladamente e em associação, e pode levar a vantagens terapêuticas contra doenças cardiovasculares induzidas nestas condições.