

Alterações Cardiovasculares da Exposição Perinatal ao Chumbo em Ratos Jovens e Adultos: Papel da Terapia Combinada

Combination Therapy for the Cardiovascular Effects of Perinatal Lead Exposure in Young and Adult Rats

Andréia Fresneda Gaspar^{1,2} e Sandra Cordellini¹

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista (UNESP)¹, Botucatu, SP; Faculdade da Alta Paulista (FAP)², Tupã, SP - Brasil

Resumo

Introdução: A terapia combinada parece desempenhar papel significativo em reduzir os efeitos cardiovasculares deletérios da exposição ao chumbo (Pb).

Objetivo: Para investigar esta possibilidade, ratos Wistar receberam Pb (500 ppm na água de beber) ou água durante a prenhez e a lactação. Ratos com 22 e 70 dias, expostos perinatalmente ao Pb ou não, receberam DMSA, L- arginina, enalapril e a combinação destes por 30 dias adicionais.

Métodos: Curvas concentração-efeito à noradrenalina foram obtidas em aortas intactas e desnudas, de ratos com 23, 52, 70 e 100 dias expostos ou não ao Pb, tratados ou não.

Resultados: A pressão arterial sistólica caudal (mmHg) foi avaliada e mostrou-se aumentada em ratos expostos ao Pb [23, 52, 70 e 100 dias, respectivamente: controle $107,1 \pm 1,8$, $118,8 \pm 2,1$, $126,1 \pm 1,1$, $120,5 \pm 2,2$; Pb $117,8 \pm 3,9^*$, $135,2 \pm 1,3^*$, $139,6 \pm 1,6^*$ e $131,7 \pm 2,8^*$]. Observou-se aumento de reatividade à noradrenalina em aorta intacta, mas não desnudada, de ratos com 52, 70 e 100 dias expostos ao Pb [resposta máxima (g de tensão) 52 dias: Pb $3,43 \pm 0,16^*$, controle $2,38 \pm 0,33$; 70 dias: Pb $4,32 \pm 0,18^*$, controle $3,37 \pm 0,13$; 100 dias: Pb $4,21 \pm 0,23^*$, controle $3,22 \pm 0,21$]. (*) $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

Conclusões: Todos os tratamentos restauraram as alterações de reatividade à noradrenalina em aortas de ratos expostos perinatalmente ao Pb. Exceto pelo enalapril em ratos jovens, a terapia combinada restaurou mais precocemente a pressão arterial de ratos expostos ao Pb em relação aos tratamentos isolados. Estes resultados representam uma nova abordagem no desenvolvimento de protocolos terapêuticos no tratamento da hipertensão induzida pela exposição ao Pb. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(3):219-230)

Palavras-chave: Exposição Perinatal; Efeitos Cardiovasculares; Chumbo / toxicidade; Ratos.

Abstract

Background: Combination therapy can play a significant role in the amelioration of several toxic effects of lead (Pb) and recovery from associated cardiovascular changes.

Objective: To investigate the effects of combination therapy on the cardiovascular effects of perinatal lead exposure in young and adult rats

Methods: Female Wistar rats received drinking water with or without 500 ppm of Pb during pregnancy and lactation. Twenty-two- and 70-day-old rat offspring who were or were not exposed to Pb in the perinatal period received meso-dimercaptosuccinic acid (DMSA), L-arginine, or enalapril and a combination of these compounds for 30 additional days. Noradrenaline response curves were plotted for intact and denuded aortas from 23-, 52-, 70-, and 100-day-old rats stratified by perinatal Pb exposure (exposed/unexposed) and treatment received (treated/untreated).

Results: Systolic blood pressure was evaluated and shown to be higher in the 23-, 52-, 70-, and 100-day age groups with Pb exposure than in the corresponding control age groups: $117.8 \pm 3.9^*$, $135.2 \pm 1.3^*$, $139.6 \pm 1.6^*$, and $131.7 \pm 2.8^*$, respectively and 107.1 ± 1.8 , 118.8 ± 2.1 , 126.1 ± 1.1 , and 120.5 ± 2.2 , respectively ($p < 0.05$). Increased reactivity to noradrenaline was observed in intact, but not denuded, aortas from 52-, 70-, and 100-day-old exposed rats, and the maximum responses (g of tension) in the respective Pb-exposed and control age groups were as follows: $3.43 \pm 0.16^*$, $4.32 \pm 0.18^*$, and $4.21 \pm 0.23^*$, respectively and 2.38 ± 0.33 , 3.37 ± 0.13 , and 3.22 ± 0.21 , respectively ($p < 0.05$).

Conclusions: All treatments reversed the changes in vascular reactivity to noradrenaline in rats perinatally exposed to Pb. The combination therapy resulted in an earlier restoration of blood pressure in Pb-exposed rats compared with the monotherapies, except for enalapril therapy in young rats. These findings represent a new approach to the development of therapeutic protocols for the treatment of Pb-induced hypertension. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(3):219-230)

Keywords: Perinatal Exposure; Cardiovascular Effects; Lead / toxicity; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Sandra Cordellini •

Rua João Carmelo 145, Jardim Paraíso. CEP 18610-290, Botucatu, SP – Brasil

Email: cordelli@ibb.unesp.br

Artigo recebido em 30/01/14; revisado em 03/04/14; aceito em 17/04/14.

DOI: 10.5935/abc.20140103

Introdução

Dados epidemiológicos têm mostrado que o chumbo (Pb) desempenha um papel importante no desenvolvimento da hipertensão arterial em indivíduos ocupacionalmente expostos, assim como na população em geral¹.

A hipertensão arterial induzida pela exposição ao Pb, durante o período pós-natal, é caracterizada por um aumento na reatividade vascular às catecolaminas², uma diminuição do número de receptores beta-adrenérgicos³, e uma redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina e nitroprussiato de sódio⁴. Por outro lado, Purdy e cols.⁵ relataram que não houve alterações na reatividade da aorta torácica associada à hipertensão induzida por Pb, tanto utilizando os vasoconstritores noradrenalina e fenilefrina, como os vasodiladores acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

Apesar dos grandes avanços científicos relacionados às alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pela exposição perinatal ao Pb^{6,7}, os efeitos cardiovasculares desta exposição ainda não foram completamente esclarecidos.

Estudos têm focado principalmente nas interações do Pb com: 1) processos regulatórios envolvendo Ca^{+2} , GMP cíclico, e proteína quinase $C^{1,8,9}$, 2) renina-angiotensina-aldosterona, calcitriol-cinina, e outros sistemas autacóides (e.g., endotelina) e os sistemas transducionais (e.g., óxido nítrico-ON)^{1,8,10}, 3) fatores relacionados à proliferação do endotélio e do músculo liso^{11,12} e 4) fatores relacionados ao estresse oxidativo¹³.

Apesar do grande avanço científico, ainda estamos longe de desenvolver um tratamento eficaz para a toxicidade causada pela exposição a metais pesados. A terapia de quelação é o tratamento mais indicado para diminuir os efeitos tóxicos de metais, embora a utilização de quelantes esteja largamente restrita a casos de envenenamento agudo^{14,15}. Vários suplementos, tais como vitaminas, aminoácidos contendo enxofre, antioxidantes e minerais essenciais também são utilizados no tratamento da toxicidade por metais¹⁵. Além disso, a terapia combinada é uma abordagem mais recente e mais eficaz utilizada para o tratamento de casos de envenenamento por metais^{14,15}. Considerando a pouca evidência experimental disponível, existe a necessidade de uma investigação mais aprofundada nesta área.

Com base em estudos anteriores, nós investigamos a terapia combinada no tratamento da toxicidade cardiovascular induzida por Pb. Primeiramente, os efeitos da exposição ao Pb, durante a prenhez e lactação, sobre a pressão arterial e reatividade vascular da aorta torácica foram investigados em ratos jovens e adultos, com foco na células endoteliais e musculares lisas. Em seguida, avaliamos o potencial terapêutico do ácido dimercaptosuccínico (DMSA, agente quelante e sequestrante de espécies reativas de oxigênio-EROs)^{16,17}, da L-arginina (precursor de ON)¹⁸, e do enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina), seja isoladamente ou em combinação, sobre os efeitos cardiovasculares adversos da exposição perinatal de ratos jovens e adultos ao Pb.

Métodos

Animais e exposição ao chumbo

Ratos Wistar adultos foram obtidos do biotério da Universidade de São Paulo e utilizados como geração parental. Os animais foram acasalados aos 90 dias de idade (duas fêmeas e um macho por gaiola). No primeiro dia de prenhez (determinado pela presença de esperma nos esfregaços vaginais), as fêmeas grávidas foram divididas em 2 grupos: um grupo não exposto ao Pb, e outro exposto ao Pb, e os grupos foram separados. As fêmeas grávidas receberam água contendo 500 ppm de Pb (na forma de acetato de chumbo), ou apenas água corrente. Um grupo de animais recebeu acetato de sódio para equalizar a exposição do grupo experimental ao acetato. O nível de exposição ao Pb foi escolhido com base em trabalhos anteriores^{6,7,19}. Para impedir a precipitação do Pb, 0,5 mL de ácido acético glacial foi adicionado às soluções de acetato de chumbo e acetato de sódio para a preparação de um volume final de 1000 mL de cada solução. O grupo experimental foi exposto ao Pb durante toda a prenhez e lactação (Figura 1). O número de filhotes por ninhada foi registrado e reduzido para 8 filhotes. Sempre que possível, apenas ratos machos foram mantidos nas ninhadas, e fêmeas foram mantidas apenas para equalizar o tamanho das ninhadas. Os filhotes foram desmamados aos 22 dias de idade através da ingestão de água corrente e avaliados aos 23 e 70 dias de idade (Figura 1). Os grupos controles pareados por idade receberam acetato de sódio durante os mesmos períodos de exposição ao Pb. Os pesos corporais maternos foram medidos no primeiro dia de prenhez, no dia anterior ao parto, logo após o parto, e ao desmame dos filhotes. O peso dos filhotes foi registrado logo após o nascimento e semanalmente até 100 dias de idade.

A iluminação do biotério foi mantida em ciclos de 12 horas e a temperatura mantida a 22 ± 1 °C. Os animais foram alimentados com ração. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CEEA), conforme processo nº 25/05.

Determinação da pressão arterial

A partir dos 22 dias de vida, a pressão arterial sistólica foi determinada semanalmente em ratos conscientes usando o método de pletismografia de cauda (Narco Bio-Systems, Inc., Houston, Texas, EUA). Os ratos foram pré-aquecidos por aproximadamente 10 minutos e confinados para a medição da pressão arterial. Três determinações consecutivas foram realizadas, com aproximadamente 1 minuto de intervalo entre elas, obtendo-se a média das três determinações.

Determinação da concentração sanguínea de Pb

O sangue total foi coletado do coração de fêmeas anestesiadas no período de desmame e de filhotes com 23, 52, 70, e 100 dias de idade anestesiados com uretano (1,25 mg/kg de peso).

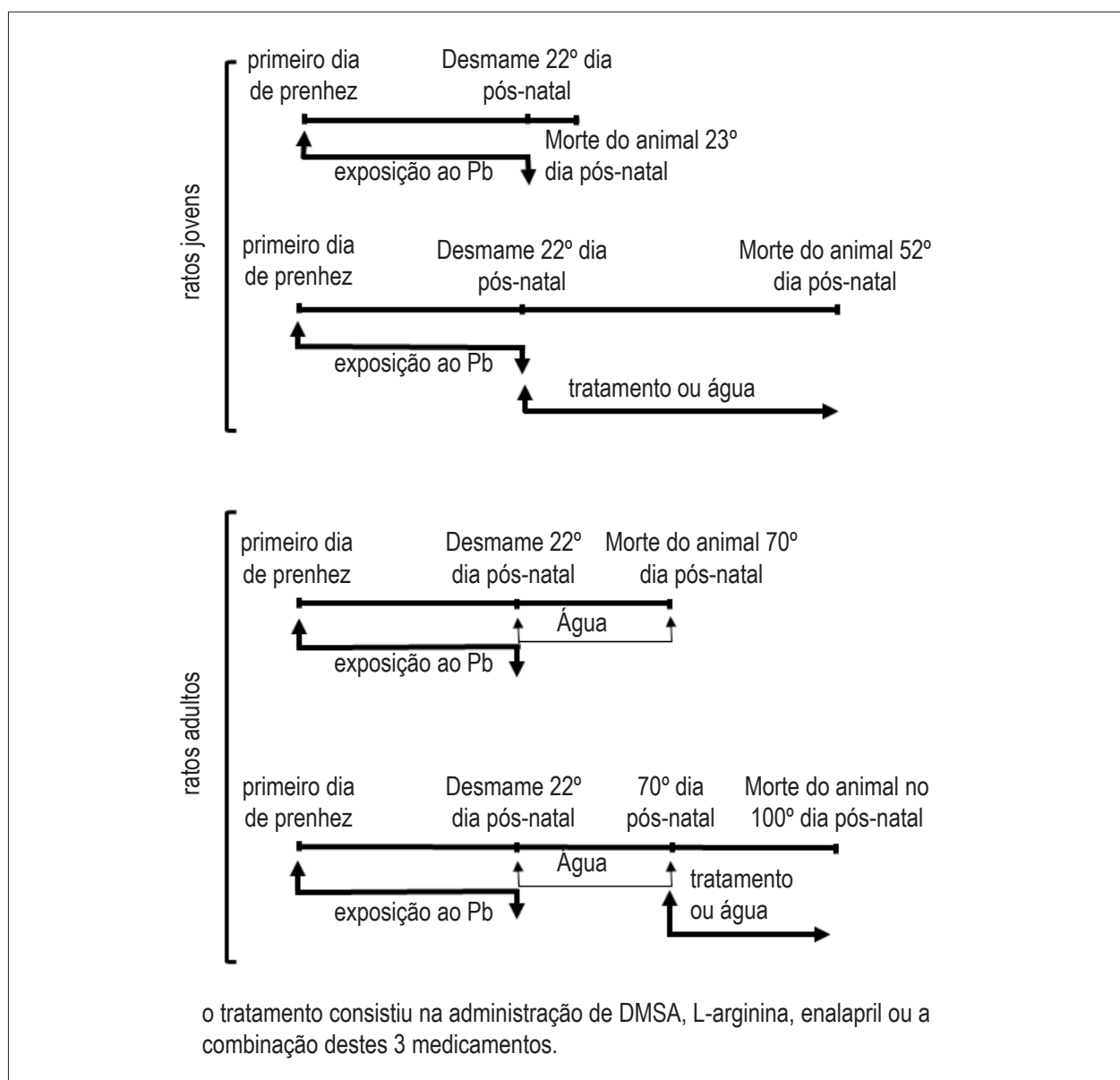


Figura 1 – Delineamento experimental.

O sangue foi preparado para análise de Pb por procedimento de dissolução por microondas utilizando um sistema de digestão por microondas, modelo DGT-100 plus (Provecto, Brasil). Ácido nítrico foi adicionado aos tubos de digestão contendo 1,0 mL de sangue.

A concentração de chumbo no sangue total foi determinada utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica, modelo GBC AA 932 (EAA-chama)²⁰. A recuperação do chumbo adicionado às amostras controle foi consistentemente superior a 96%. Um método adicional padrão foi utilizado para a determinação do teor de chumbo no intuito de eliminar possível interferência de matriz. A quantidade de chumbo no sangue total foi expressa em $\mu\text{g/dL}$, e o limite máximo de detecção foi de 5 $\mu\text{g/dL}$.

Tratamento

Um grupo de ratos com 22 e 70 dias de idade, expostos ou não ao Pb durante o período perinatal, receberam DMSA, L-arginina, enalapril, ou a combinação destes compostos durante 30 dias adicionais (Figura 1). Quando DMSA foi utilizado, uma dose de 60 mg/kg foi fornecida, via gavagem gástrica, 2 vezes ao dia na dose de 30 mg/kg, 5 dias por semana. L-arginina a 1,0% foi fornecida na água potável *ad libitum*. Enalapril foi fornecido na água potável na dose de aproximadamente 5 mg/dia/animal. Os controles pareados por idade receberam água corrente.

Protocolos experimentais

Imediatamente após a coleta de sangue, a aorta torácica foi removida, seguido da retirada de tecido adiposo e conjuntivo.

Dois anéis transversais, cada um com aproximadamente 4 mm de comprimento, foram cortados e preparados no comprimento ideal para a determinação da tensão isométrica. Um anel serviu como controle, ao passo que o endotélio foi removido mecanicamente do outro anel, esfregando suavemente a superfície luminal das aortas intactas e lavadas. Os tecidos foram imersos em 7,0 mL de uma solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição: 113,0 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl_2 , 25,0 mM de NaHCO_3 , 1,1 mM de MgSO_4 , 1,2 mM de KH_2PO_4 , 0,11 mM de ácido ascórbico e 11,1 mM de glicose. A solução de imersão foi mantida a 37 °C e saturada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 . As preparações foram equilibradas durante pelo menos 1 hora sob uma tensão de repouso de 1,5 g, que é a tensão ideal para induzir a contração máxima. A tensão foi registrada em um transdutor de força, modelo Myograph F-60 (Narco Bio Systems Inc., Houston, Texas, EUA), conectado a um fisiógrafo. As aortas intactas e desnudas dos animais expostos ou não ao Pb foram avaliadas em paralelo.

As curvas cumulativas de concentração-efeito foram construídas a partir da resposta da aorta à noradrenalina. No final das curvas, acetilcolina (10^{-6} M) e nitroprussiato de sódio (10^{-4} M) foram utilizados para testar a integridade do endotélio e do músculo liso, respectivamente.

Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados nos experimentos: brometo de acetilcolina, DMSA, maleato de enalapril, L-arginina, acetato de chumbo, bitartrato de noradrenalina, nitroprussiato de sódio e uretano (todos obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA). Todos os reagentes foram dissolvidos em solução de Krebs-Henseleit, e as concentrações foram expressas em molaridade. O acetato de chumbo e o acetato de sódio foram dissolvidos em água corrente acidificada conforme descrito acima. L-arginina e enalapril foram dissolvidos em água corrente. A solução de DMSA foi preparada em NaHCO_3 a 5% no momento da realização dos ensaios.

Análise dos dados e testes estatísticos

A prole foi considerada a unidade experimental em todas as análises efetuadas. A concentração do agente vasoativo que produziu uma resposta correspondente a 50% da resposta máxima (CE_{50}) foi calculada em cada experimento. Os valores de CE_{50} para noradrenalina estão representados como médias, com um intervalo de confiança de 95%. As respostas máximas para noradrenalina são apresentados como média \pm erro padrão. A pressão arterial, os valores de CE_{50} e as respostas máximas foram comparados utilizando a análise de variância com dois fatores utilizando o programa SigmaStat 3.2. A exposição ao Pb e os tratamentos com as drogas foram considerados variáveis na análise. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para testar diferenças entre as médias. Os demais parâmetros (peso, número de filhotes, e quantificação de Pb) são apresentados como média \pm erro padrão, e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney utilizando o programa InStat 4.0.

Resultados

Peso corporal, número de filhotes, concentração sanguínea de Pb e pressão arterial

A exposição ao Pb não afetou o peso corporal das fêmeas e da prole (Tabela 1), nem o número de filhotes por ninhada (controle: $11,3 \pm 0,4$, Pb: $10,5 \pm 0,5$, $p > 0,05$; número de ninhadas por grupo: 10–20).

Os níveis sanguíneos de Pb nas fêmeas e nos filhotes com 23, 52, 70, e 100 dias de idade foram significativamente maiores comparados com os respectivos controles (Tabela 2). Após a interrupção do tratamento com Pb, os níveis sanguíneos de Pb nos animais expostos diminuíram, mas permaneceram mais altos do que os níveis observados no grupo controle (Tabela 2). Após a utilização dos diferentes protocolos de tratamento, observamos a diminuição significativa dos níveis sanguíneos de Pb nos animais com 52 e 100 dias de idade (Tabela 2). Esta diminuição alcançou valores semelhantes àqueles observados nos grupos controle da mesma idade, exceto para o tratamento com L-arginina, onde estes níveis permaneceram altos em relação ao controle (Tabela 2).

A pressão arterial sistólica não foi alterada pela exposição ao acetato de sódio em comparação com os animais que receberam água corrente (dados não apresentados), mas apresentou aumento gradual durante o desenvolvimento pós-natal (Figuras 2 e 3). Além disso, os valores observados em ratos expostos ao Pb foram significativamente maiores quando comparados ao grupo controle (Figuras 2 e 3).

Todos os tratamentos resultaram na diminuição da pressão arterial de ratos jovens expostos ao Pb para valores muito próximos aos de animais não expostos. Esta diminuição na pressão arterial aconteceu aos 49, 35, 28, e 28 dias de idade utilizando L-arginina, DMSA, enalapril e terapia combinada, respectivamente (Figura 2). Em relação aos ratos adultos expostos ao Pb, foi observada diminuição semelhante da pressão arterial utilizando L-arginina, enalapril, e a terapia de combinação aos 84, 84, e 77 dias de idade, respectivamente (Figura 3). Embora o tratamento com DMSA tenha diminuído a pressão sanguínea de ratos adultos expostos ao Pb, este valor foi semelhante ao observado em animais não tratados com DMSA, tanto os expostos como os não expostos ao Pb (Figura 3).

Reatividade vascular

A reatividade vascular de aortas torácicas intactas e desnudas não foi alterada pela exposição dos animais ao acetato de sódio, em comparação com as aortas de animais que receberam água corrente (dados não apresentados). A gavagem gástrica não causou qualquer alteração na reatividade vascular da aorta (dados não apresentados). A exposição ao Pb e os tratamentos com as drogas não alteraram a reatividade vascular de aortas desnudas à noradrenalina (Tabelas 3 e 4).

A remoção do endotélio causou um deslocamento da curva para a esquerda para a noradrenalina, e este deslocamento foi semelhante em aortas de animais do grupo controle e dos grupos expostos ao Pb (tratados e não tratados) (Tabelas 3 e 4). Este procedimento também resultou

Tabela 1 – Peso corporal de fêmeas expostas ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação e da prole do sexo masculino tratados ou não com DMSA, L-arginina, enalapril, ou terapia combinada

Animais	Grupos	Peso corporal (g)						
		Prenhez		Lactação		Idade pós-desmame		
		0 dia	21 dias	1 dia	21 dias	52 dias	70 dias	100 dias
Fêmeas	Controle (n = 20)	272,2 ± 6,2	378,8 ± 9,0	304,6 ± 7,0	276,9 ± 5,6	-	-	-
	Pb (n = 20)	269,0 ± 4,9	360,3 ± 8,1	293,1 ± 5,0	275,44 ± 5,3	-	-	-
Prole do sexo masculino	Controle (n = 20)	-	-	6,2 ± 0,2	39,1 ± 0,5	208,3 ± 0,2	323,1 ± 5,3	357,0 ± 2,7
	Pb (n = 20)	-	-	5,8 ± 1,7	40,0 ± 1,2	198,6 ± 4,1	327,9 ± 8,6	357,1 ± 3,2
	Pb/DMSA (n = 20)	-	-	-	41,2 ± 2,2	195,0 ± 2,2	326,8 ± 6,1	365,7 ± 1,7
	Pb/L-arginina (n = 15)	-	-	-	43,0 ± 2,3	205,5 ± 2,3	325,4 ± 2,5	369,9 ± 2,2
	Pb/enalapril (n = 15)	-	-	-	42,4 ± 1,8	194,8 ± 4,2	301,7 ± 2,4	351,1 ± 1,8
	Terapia combinada (n = 20)	-	-	-	43,0 ± 5,5	206,0 ± 8,5	314,7 ± 2,6	360,6 ± 1,2

Os valores representam médias ± erro padrão. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo durante a prenhez e lactação. Tratamento: um grupo de animais de 22 e 70 dias de idade, exposto ou não ao Pb durante a vida perinatal, recebeu DMSA, L-arginina, enalapril, ou a combinação desses compostos por 30 dias adicionais. Quando administrado, DMSA na dose de 60 mg/kg foi fornecido, via gavagem gástrica, 2 vezes ao dia (30 mg/kg) durante 5 dias por semana. L-arginina a 1,0% foi fornecida ad libitum em água potável. Enalapril foi fornecido em água potável na dose de 5 mg/dia/animal. Os grupos controle pareados por idade receberam água corrente. N = número de animais por grupo.

Tabela 2 – Concentração sanguínea de chumbo em fêmeas expostas ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação e da prole do sexo masculino tratados ou não com DMSA, L-arginina, enalapril, ou terapia combinada

Grupos	Concentração sanguínea de chumbo (µg/dl)				
	Fêmeas	Idade pós-natal da prole			
		23 dias	52 dias	70 dias	100 dias
Controle (n = 5)	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0	< 5,0
Pb (n = 6)	53,39 ± 5,88*	35,61 ± 7,43*	-	-	-
Pb/água (n = 6)	-	-	19,98 ± 6,31*	13,15 ± 0,97**	11,17 ± 2,11**
Pb/DMSA (n = 5)	-	-	< 5,0 [§]	-	< 5,0 [§]
Pb/L-arginina (n = 6)	-	-	10,65 ± 2,12*	-	6,55 ± 3,29*
Pb/enalapril (n = 5)	-	-	< 5,0 [§]	-	< 5,0 [§]
Terapia combinada (n = 5)	-	-	< 5,0 [§]	-	< 5,0 [§]

Os valores representam médias ± erro padrão. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo durante a prenhez e lactação. Tratamento: um grupo de animais de 22 e 70 dias de idade, exposto ou não ao Pb durante a vida perinatal, recebeu DMSA, L-arginina, enalapril, ou a combinação desses compostos por 30 dias adicionais. Quando administrado, DMSA na dose de 60 mg/kg foi fornecido, via gavagem gástrica, 2 vezes ao dia (30 mg/kg) durante 5 dias por semana. L-arginina a 1,0% foi fornecida ad libitum em água potável. Enalapril foi fornecido em água potável na dose de 5 mg/dia/animal. Os controles pareados por idade receberam água corrente. *p < 0,05 em relação aos respectivos grupos controle. **p < 0,05 em relação aos ratos de 23 dias de idade expostos ao Pb. [§]p < 0,05 em relação aos respectivos grupos expostos ao Pb. N = número de animais por grupo.

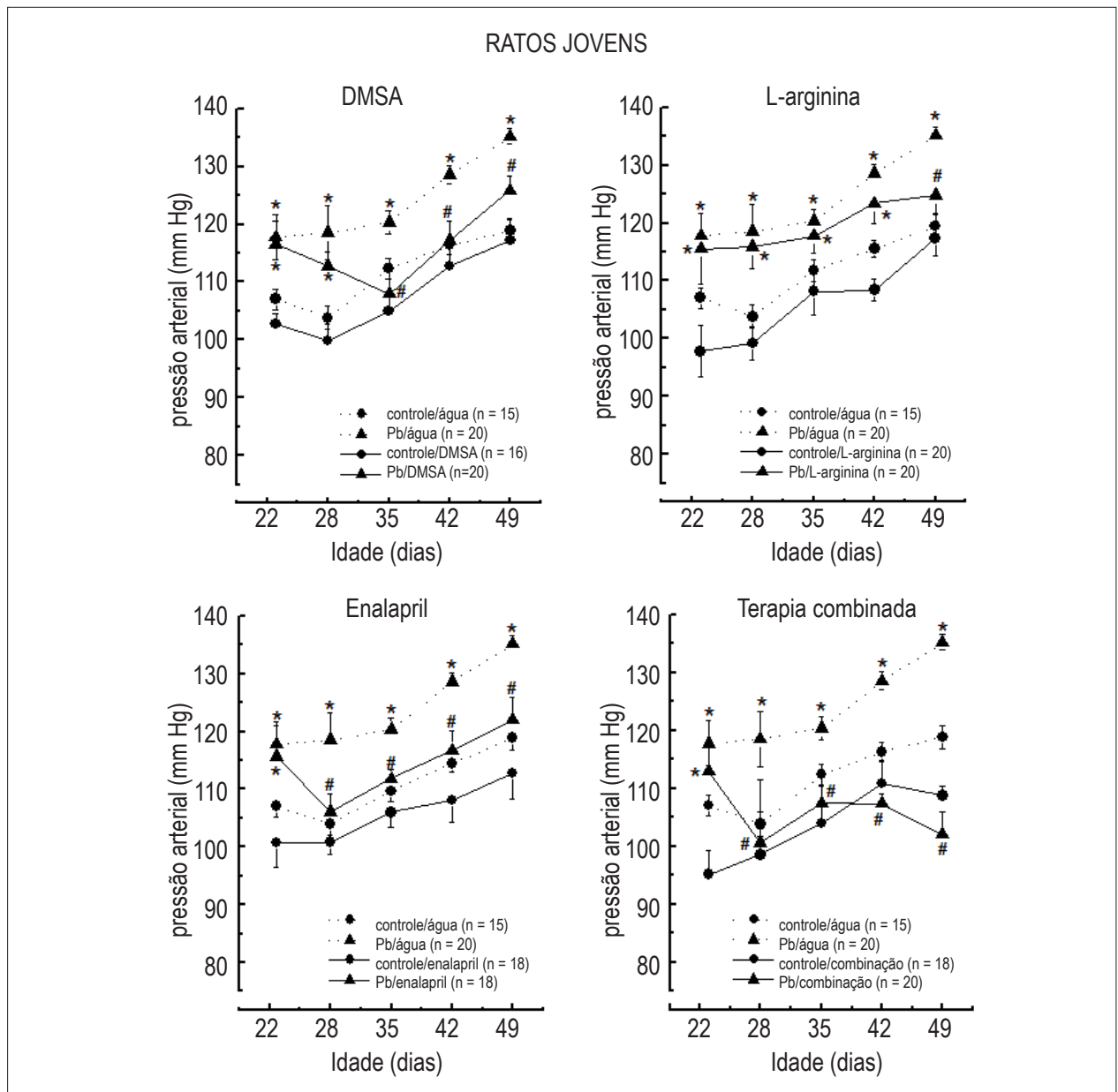


Figura 2 – Pressão arterial em ratos com 52 dias de idade expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação, tratados ou não com DMSA, L-arginina, enalapril, ou terapia combinada. Tratamento: um grupo de animais com 22 dias de idade recebeu DMSA, L-arginina, enalapril, ou a combinação desses compostos por 30 dias adicionais. Quando administrada, DMSA foi fornecida na dose de 60 mg/kg, via gavagem gástrica, 2 vezes ao dia (30 mg/kg) durante 5 dias por semana. L-arginina a 1,0% foi fornecida ad libitum em água potável. Enalapril foi fornecido em água potável na dose de 5 mg/dia/animal. Os controles pareados por idade receberam água corrente. Os valores representam média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto ao Pb; N = número de animais por grupo.

no aumento da resposta máxima à noradrenalina em aortas de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais (Tabelas 3 e 4). Após a remoção do endotélio, a resposta máxima de aortas torácicas à noradrenalina foi semelhante em todos os grupos experimentais (Tabelas 3 e 4).

No que diz respeito às aortas intactas, nenhuma alteração na resposta máxima à noradrenalina foi observada em filhotes com 23 dias de idade expostos ao Pb durante o período perinatal (Tabela 3). Em contrapartida, o aumento

da reatividade da aorta intacta foi observado em ratos aos 52, 70, e 100 dias de idade expostos ao Pb no período perinatal (Tabela 3). Independente do protocolo de tratamento, a reatividade à noradrenalina não diferiu em aortas com endotélio (Tabelas 3 e 4).

Os diferentes tratamentos não alteraram a reatividade à noradrenalina de aortas intactas de animais não expostos ao Pb (Tabelas 3 e 4). No entanto, a L-arginina, DMSA, enalapril, e a terapia de combinação foram eficazes em restabelecer

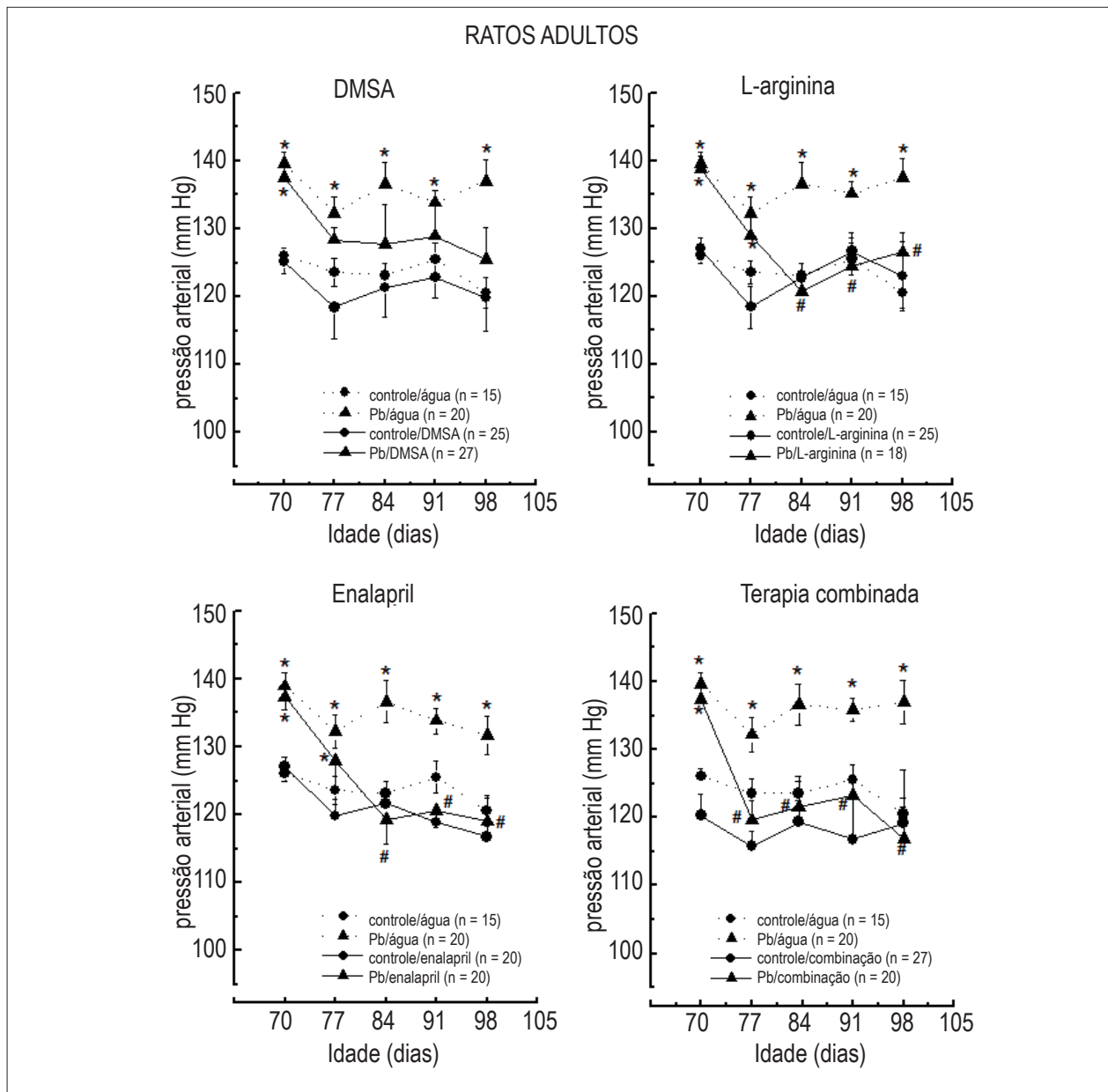


Figura 3 – Pressão arterial em ratos com 100 dias de idade expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação, tratados ou não com DMSA, L-arginina, enalapril, ou terapia combinada. Tratamento: um grupo de animais com 70 dias de idade recebeu DMSA, L-arginina, enalapril, ou a combinação desses compostos por 30 dias adicionais. Quando administrada, DMSA na dose de 60 mg/kg foi fornecida, via gavagem gástrica, 2 vezes ao dia (30 mg/kg) durante 5 dias por semana. L-arginina a 1,0% foi fornecida ad libitum em água potável. Enalapril foi fornecido em água potável na dose de 5 mg/dia/animal. Os controles pareados por idade receberam água corrente. Os valores representam média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto ao Pb; N = número de animais por grupo.

o aumento induzido por Pb na resposta máxima da aorta a valores semelhantes aos dos respectivos controles (Tabelas 3 e 4).

Discussão

Autoridades de saúde pública utilizam concentrações altas (40 $\mu\text{g/dL}$) para a definição dos critérios de contaminação por Pb no sangue de mulheres não grávidas, que é o valor de referência em adultos em muitos países.

Devemos reconhecer que uma fração significativa de mulheres não grávidas com níveis sanguíneos de Pb $\geq 40 \mu\text{g/dL}$ poderá ficar grávida e potencialmente expor seus filhos aos efeitos do Pb, adversos à saúde²¹. Os níveis sanguíneos maternos e fetais de Pb são quase idênticos porque este metal é capaz de atravessar a placenta livremente. Isso tem gerado preocupação com relação aos elevados níveis sanguíneos de Pb entre mulheres em idade fértil, pois muitas gestações não são planejadas. Além disso, as mulheres grávidas assintomáticas permanecem frequentemente

Tabela 3 – Respostas máximas e valores de CE_{50} para noradrenalina obtidos em aortas torácicas com e sem endotélio isoladas de ratos, expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação, e tratados ou não com L-arginina ou enalapril

Ratos	Grupos	Aorta Com Endotélio			Aorta Sem Endotélio		
		¹ Resposta máxima (g de tensão)	² CE_{50} ($\times 10^{-8}$ M)	³ N	¹ Resposta máxima (g de tensão)	² CE_{50} ($\times 10^{-8}$ M)	³ N
Não tratados							
23 dias	Controle	1,8 ± 0,1	1,3 (0,5 – 3,4)	6	2,6 ± 0,2*	1,4* (0,3 – 6,4)	8
	Pb	2,1 ± 0,2	1,5 (0,4 – 4,9)	6	3,0 ± 0,1*	1,1* (0,1 – 7,5)	8
52 dias	Controle	2,4 ± 0,3	2,0 (0,4 – 10,8)	7	4,1 ± 0,4*	1,0* (2,8 – 6,4)	8
	Pb	3,4 ± 0,2*	11,0 (6,0 – 20,3)	6	4,5 ± 0,2*	1,0* (0,3 – 4,2)	8
70 dias	Controle	3,4 ± 0,1	16,0 (7,1 – 35,4)	5	5,2 ± 0,4*	5,0* (0,7 – 36,0)	7
	Pb	4,3 ± 0,2*	4,8 (1,7 – 13,3)	6	5,0 ± 0,3*	1,3* (0,4 – 4,2)	8
100 dias	Controle	3,2 ± 0,2	8,5 (4,6 – 15,6)	6	5,3 ± 0,3*	5,6* (1,4 – 21,9)	8
	Pb	4,2 ± 0,2*	4,3 (0,9 – 20,7)	6	5,2 ± 0,4*	3,8* (0,7 – 19,7)	8
Tratados com L-arginina							
52 dias	Controle	2,8 ± 0,1	3,3 (1,5 – 7,3)	5	4,5 ± 0,3*	1,6* (0,1 – 29,0)	8
	Pb	2,7 ± 0,1	10,0 (4,1 – 37,3)	6	4,3 ± 0,3*	8,5* (1,0 – 27,5)	8
100 dias	Controle	3,3 ± 0,2	8,9 (5,5 – 14,5)	8	4,8 ± 0,2*	9,2* (3,2 – 26,3)	8
	Pb	3,2 ± 0,4	8,6 (2,3 – 31,4)	12	4,9 ± 0,5*	0,9* (0,2 – 7,3)	14
Tratados com Enalapril							
52 dias	Controle	2,7 ± 0,4	3,0 (0,4 – 23,4)	12	4,2 ± 0,3*	0,4* (0,1 – 8,7)	12
	Pb	2,7 ± 0,2	6,15 (1,31 – 28,91)	7	4,2 ± 0,2*	6,2* (1,0 – 38,0)	8
100 dias	Controle	3,1 ± 0,2	5,4 (1,0 – 27,5)	8	5,0 ± 0,4*	4,1* (0,6 – 25,9)	11
	Pb	3,2 ± 0,1	9,4 (3,0 – 30,1)	5	5,6 ± 0,6*	1,2* (0,2 – 19,3)	14

¹Valores representam médias ± erro padrão. ² CE_{50} : concentração capaz de produzir 50% da resposta máxima e os valores representam as médias com intervalos de confiança de 95%. ³N = número de animais. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo durante a prenhez e lactação. Tratamento: um grupo de ratos com 22 e 70 dias de idade exposto ou não ao Pb durante o período perinatal recebeu L-arginina ou enalapril durante 30 dias adicionais. L-arginina a 1,0% foi fornecida ad libitum em água potável. Enalapril foi fornecido em água potável na dose de 5 mg/dia/animal. Os controles pareados por idade receberam água corrente. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ em relação a respectiva aorta com endotélio.

em contato com a fonte de exposição durante a prenhez e lactação, especialmente em países em desenvolvimento.

A gravidade dos efeitos e o grau em que o sistema cardiovascular é afetado por Pb parecem ser influenciados mais diretamente pela concentração e duração da exposição ao Pb e por outros fatores, incluindo a via de exposição e a fase de vida de cada indivíduo^{22,23}. No presente estudo, investigamos as alterações cardiovasculares em filhotes durante o período de gestação e lactação, provenientes de

fêmeas com níveis sanguíneos de Pb em torno de 50 μ g/dL. O regime de exposição ao Pb não teve nenhum efeito sobre o peso das fêmeas, ou sobre o peso dos filhotes ao nascimento, no desmame, no período pós-natal, ou no número de filhotes por ninhada. Todos os animais pareciam saudáveis e nenhum deles mostrou sinais de toxicidade.

No entanto, os diferentes protocolos de exposição ao Pb resultaram no aumento da pressão arterial sistólica associada a alterações na reatividade vascular. O aumento contínuo

Tabela 4 – Respostas máximas e valores de CE_{50} para noradrenalina obtidos em aortas com e sem endotélio isolados de ratos, expostos ou não ao chumbo durante a prenhez e lactação, e tratadas ou não com DMSA ou terapia combinada

Ratos	Grupos	Aorta Com Endotélio			Aorta Sem Endotélio		
		¹ Resposta máxima (g de tensão)	² CE_{50} ($\times 10^{-8}$ M)	³ N	¹ Resposta máxima (g de tensão)	² CE_{50} ($\times 10^{-8}$ M)	³ N
Não tratados							
52 dias de idade	Controle	2,8 ± 0,4	9,0 (3,6 – 22,9)	8	4,1 ± 0,4*	12,8* (1,3 – 93,3)	8
	Pb	4,0 ± 0,4*	11,5 (5,3 – 25,1)	8	4,8 ± 0,2*	2,7* (0,4 – 20,2)	6
100 dias de idade	Controle	2,7 ± 0,3	7,9 (2,2 – 28,0)	5	5,1 ± 0,4*	10,5* (0,3 – 49,1)	7
	Pb	4,1 ± 0,2*	15,4 (2,8 – 31,5)	5	5,4 ± 0,4*	15,2* (0,4 – 69,6)	12
Tratados com DMSA							
52 dias de idade	Control	2,8 ± 0,3	13,7 (5,7 – 32,7)	6	4,5 ± 0,3*	13,9* (2,4 – 81,0)	7
	Pb	2,7 ± 0,3	9,1 (3,8 – 21,8)	6	4,3 ± 0,4*	1,7* (0,1 – 67,1)	12
100 dias de idade	Control	2,3 ± 0,2	18,1 (4,4 – 43,8)	6	4,6 ± 0,4*	35,1* (3,6 – 141,2)	7
	Pb	2,8 ± 0,2	27,6 (11,6 – 55,6)	6	4,3 ± 0,5*	11,8* (0,1 – 151,7)	14
Terapia combinada							
52 dias de idade	Control	3,1 ± 0,2	7,1 (3,7 – 13,5)	5	4,9 ± 0,3*	0,3* (0,1 – 17,8)	6
	Pb	2,4 ± 0,3	5,0 (2,8 – 9,1)	6	3,9 ± 0,6*	10,1* (0,1 – 23,3)	14
100 dias de idade	Control	3,2 ± 0,3	7,0 (2,2 – 22,5)	7	4,8 ± 0,3*	4,7* (1,2 – 18,0)	6
	Pb	2,8 ± 0,2	9,7 (1,6 – 30,3)	6	4,4 ± 0,3*	6,2* (0,1 – 39,7)	8

¹Valores são médias ± erro padrão. ² CE_{50} : concentração capaz de produzir 50% da resposta máxima e os valores representam as médias com intervalos de confiança de 95%. ³N = número de animais. Pb: 500 ppm de acetato de chumbo durante a prenhez e lactação. Tratamento: um grupo de ratos com 22 e 70 dias de idade expostos ou não ao Pb durante o período perinatal recebeu DMSA ou a terapia combinada durante 30 dias adicionais. Terapia combinada: L-arginina (1.0%, em água potável) + enalapril (5 mg/dia/animal, em água potável) + DMSA (60 mg/kg/dia). DMSA foi fornecido via gavagem gástrica 2 vezes ao dia (30 mg/kg). Os controles pareados por idade receberam água corrente. * $p < 0,05$ em relação ao valores obtidos nos respectivos grupos controles. * $p < 0,05$ em relação aos valores da respectiva aorta com endotélio.

da pressão arterial em filhotes desmamados, ratos jovens, e adultos com exposição perinatal ao Pb confirmaram os resultados de estudos anteriores que demonstraram uma correlação positiva entre os níveis sanguíneos de Pb e hipertensão arterial^{23,24}.

No presente estudo, objetivamos investigar os efeitos do Pb sobre as células endoteliais vasculares e células musculares lisas. Alterações no equilíbrio entre os fatores de contração e de relaxamento derivados do endotélio contribuem para a hipertensão arterial associada ao saturnismo. A diminuição dos níveis de um componente vasodilatador (ON) e o aumento dos níveis de componentes vasoconstritores (endotelina-3 e o hormônio natriurético) já foram reportados como sendo responsáveis pela hipertensão arterial em ratos expostos a baixas concentrações de chumbo^{8,25-27}. Sendo assim, nossos resultados corroboram estes estudos, pois observamos que

a hipertensão arterial induzida pela exposição perinatal ao Pb está associada a um aumento na reatividade vascular da aorta à noradrenalina. Além disso, esta hiper-reatividade é consequência de uma disfunção das células endoteliais, considerando que a remoção do endotélio aboliu este efeito.

Outra observação interessante foi a ocorrência tempo-dependente, no período pós-natal, de alterações na reatividade vascular induzidas pela exposição perinatal ao Pb, visto que ratos com 52, 70, e 100 dias de idade, mas não filhotes de 23 dias de idade, apresentaram estas alterações. Provavelmente, aos 23 dias de vida pós-natal, o estado hipertensivo induzido pela exposição perinatal ao Pb seja devido à presença de fator(es) circulante(s) e à alterações hemodinâmicas.

Alterações da musculatura lisa vascular na hipertensão induzida por Pb também têm sido relatadas na literatura, e estão associadas com: 1) aumento das concentrações de

cálcio intracelular^{9,22}, 2) interação com a proteína quinase C⁹, 3) inibição da Na⁺/K⁺-ATPase^{28,29}, e 4) efeito inibitório ou estimulador sobre vários fatores humorais relacionados à pressão arterial⁸. No entanto, nenhuma alteração na musculatura lisa foi observada em aortas torácicas de ratos jovens e adultos expostos ao Pb no período perinatal. Esta controvérsia pode ser devida à diferenças nos protocolos de exposição ao Pb relacionadas às doses e/ou ao tempo de exposição.

Além disso, outros mecanismos pelos quais o Pb pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial envolvem o aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina e o aumento nos níveis plasmáticos de renina, angiotensina II, aldosterona e quininas¹.

O problema contínuo e generalizado de intoxicação por Pb é inicialmente tratado pela remoção do indivíduo do ambiente contaminado e, posteriormente, pela administração de um agente quelante de Pb. Uma nova tendência na terapia de quelação de metais tóxicos surgiu recentemente, através da utilização de terapia combinada, ao invés de monoterapia com agentes quelantes^{13,14,26,30}. Desta forma, o suplemento de aminoácidos durante a terapia de quelação contribui para aumentar a mobilidade do metal e garantir o restabelecimento de algumas variáveis fisiológicas alteradas^{24,30}.

DMSA é um composto hidrossolúvel que forma um complexo forte com o Pb⁺² no sangue, e em seguida é secretado pelos rins³¹. Aminoácidos de enxofre, tais como a metionina e cisteína, bem como outros aminoácidos metabolicamente relacionados, podem aumentar a biodisponibilidade da glutatona, que possui atividade quelante de Pb, neutralizando os seus efeitos tóxicos e podendo ser utilizados como terapia de suporte^{32,33}. Além disso, os metais presentes em proteínas metaloreguladoras são frequentemente localizados em sítios de ligação e ligados a resíduos de cisteína. Vários estudos indicam que as proteínas ligantes de metais, ricas em cisteína, bem como centros metálicos de metaloproteínas sensíveis à reações redox, são sensores naturais de radicais biológicos, tais como ON³⁴. Neste sentido, Misra e cols.³⁵ mostraram que o ON medeia a liberação de cádmio presente na metalotioneína. Assim, um aumento dos níveis de ON através do tratamento com L-arginina pode deslocar o Pb de seus sítios de ligação celular, conforme anteriormente descrito por Malvezzi e cols.²⁴.

Corroborando os dados anteriores de nosso laboratório²⁴, a carga de Pb no corpo foi reduzida significativamente através da remoção da fonte de Pb, embora estes níveis não tenham atingido os valores observados em animais não expostos ao Pb. No entanto, este procedimento foi ineficaz para restabelecer a reatividade vascular e as alterações na pressão arterial induzidas pela exposição perinatal ao Pb. Levando em consideração estes resultados, foi avaliado o potencial terapêutico de DMSA, L-arginina, e enalapril, tanto isoladamente como em combinação, sobre a mobilização de Pb e sobre os efeitos cardiovasculares adversos da intoxicação perinatal por Pb.

Mobilidade do chumbo

Independentemente da idade, DMSA, enalapril, e a terapia de combinação, mas não a L-arginina, foram mais eficazes do que a interrupção da administração de Pb na diminuição dos

níveis sanguíneos de Pb. Estes dados corroboram resultados anteriores de nosso laboratório que demonstraram que o tratamento com L-arginina foi ineficaz na diminuição dos níveis sanguíneos de Pb²⁴. A mobilização de Pb a partir de tecidos pode provocar uma redistribuição indesejável do metal. Isto pode explicar a manutenção de níveis elevados de Pb no sangue após o tratamento com L-arginina, pois L-arginina é capaz de mobilizar Pb a partir de tecidos como fêmur, fígado, e rins²⁴.

O tratamento com enalapril também foi capaz de reduzir os níveis sanguíneos de Pb, e estes níveis atingiram valores semelhantes àqueles observados em animais não intoxicados. Talvez este resultado possa ser explicado pelo aumento na excreção de Pb como resultado do aumento da taxa de filtração glomerular induzida por inibidores da enzima conversora de angiotensina, em condições de baixa filtração glomerular, como observado em condições de intoxicação por Pb³⁶. De fato, Pb também afeta as funções renais, e a taxa de filtração glomerular parece ser afetada em baixos níveis sanguíneos de Pb. A diminuição da taxa de filtração glomerular foi observada de forma sistemática em populações com uma média do nível sanguíneo de Pb <20 µg/dL. Além disso, o aumento da pressão arterial e o comprometimento da taxa de filtração glomerular estão estreitamente relacionados e, provavelmente, possuem efeitos sinérgicos entre si²¹.

Pressão sanguínea

Independente da idade, todos os tratamentos foram capazes de reduzir o aumento da pressão arterial induzido pela exposição perinatal ao Pb.

No entanto, ao contrário das outras terapias, o DMSA isoladamente não foi totalmente eficaz em normalizar a pressão sanguínea de ratos adultos com exposição perinatal ao Pb. Esse resultado corrobora dados anteriores de nosso laboratório que indicaram que o tratamento com DMSA durante 30 dias foi incapaz de abolir completamente o aumento sustentado da pressão arterial sistólica observado em ratos expostos ao Pb durante a vida adulta²⁴. Em contrapartida, outros estudos demonstraram que o tratamento com DMSA foi capaz de abolir a hipertensão induzida por Pb^{16,37}. Esta discrepância nos resultados pode ser devida à diferenças nos protocolos experimentais relacionados às doses e duração do tratamento, visto que estes parâmetros são importantes em reverter a hipertensão induzida por Pb³⁸. Outra possibilidade pode estar relacionada à diferenças nos mecanismos de manutenção da hipertensão induzida por Pb em diferentes períodos de desenvolvimento dos animais. Esta hipótese baseia-se no fato de que o tratamento com DMSA foi eficaz no restabelecimento integral da hipertensão induzida por Pb em ratos jovens, mas não em adultos.

A L-arginina causou um aumento no tempo de latência para a geração de um efeito benéfico sobre a pressão arterial em ratos jovens quando comparados com ratos adultos. O oposto foi observado para o tratamento com enalapril. Além disso, o tratamento com L-arginina mostrou-se mais eficaz do que o tratamento com DMSA em reverter a pressão arterial de adultos, mas não de ratos jovens. Estas observações também suportam a hipótese da ocorrência de mecanismos distintos atuando na manutenção da hipertensão induzida por Pb em diferentes períodos de vida.

Além disso, a terapia combinada induziu um restabelecimento mais precoce da pressão sanguínea de ratos expostos ao Pb em comparação com todos os tratamentos realizados isoladamente, exceto para o tratamento com enalapril em ratos jovens. Uma explicação possível seria os efeitos aditivos da L-arginina, um precursor de ON, do DMSA, um agente quelante e sequestrante de EROs, e do enalapril, um inibidor do sistema renina-angiotensina, sobre a pressão arterial. Considerando que a frequência cardíaca é maior em animais jovens do que em adultos, e que a presença de enalapril aumenta a filtração glomerular, pode-se esperar uma maior excreção de Pb em ratos jovens. Este fato pode explicar a eficácia semelhante de enalapril e da terapia combinada no restabelecimento da pressão arterial em ratos jovens expostos ao Pb, e a maior eficácia da terapia de combinação em ratos adultos.

Reatividade vascular

Independente da idade pós-natal, todos os tratamentos foram capazes de restabelecer as alterações na reatividade vascular induzidas pela exposição perinatal ao Pb. Especula-se que tais alterações podem ser causadas pela diminuição dos níveis de ON e/ou de uma forma de ERO, e que o fornecimento adicional de ON através da administração de L-arginina poderia atuar como sequestrante de ERO e/ou diretamente como vasodilatador, desta forma restabelecendo as alterações vasculares. Além disso, além da atividade quelante, DMSA apresenta atividade sequestrante de ERO, o que pode contribuir para restabelecer tais alterações na reatividade vascular^{16,39}. Alguns outros mecanismos relacionados ao Pb que poderiam contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial envolvem o aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina, e o aumento nos níveis plasmáticos de renina, angiotensina II, aldosterona, e quininas¹. No presente estudo, o enalapril foi capaz de normalizar as alterações funcionais na reatividade vascular induzida pela exposição perinatal ao Pb. Sendo assim, os resultados do presente estudo corroboram resultados de estudos anteriores que mostraram que os tratamentos capazes de interromper o sistema renina-angiotensina também podem reduzir as alterações cardiovasculares em diversos estados hipertensivos, incluindo os decorrentes da exposição ao Pb³⁶.

Referências

1. Vaziri ND. Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(2):H454-65.
2. Skoczynska A, Juzwa W, Smolik R, Szechinski J, Behal FJ. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology*. 1986;39(3):275-89.
3. Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;164(2):127-33.
4. Marques M, Millás I, Jiménez A, García-Colis C, Rodríguez-Feo JA, Velasco S, et al. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2594-600.
5. Purdy RE, Smith JR, Ding Y, Oveisi F, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am J Hypertens*. 1997;10(9 Pt 1):997-1003.
6. Moreira EG, Rosa CJ, Barros SB, Vassilief VS, Vassilief I. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*. 2001;169(2):145-51.
7. Moreira EG, Vassilief I, Vassilief VS. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(5):489-95.
8. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens*. 1993;6(9):723-9.

A maioria dos agentes quelantes convencionais possuem efeitos secundários, especialmente no que diz respeito à sua ligação a metais essenciais em sistemas biológicos, o que reduz a sua eficácia. Até o momento, não há nenhum tratamento eficaz e seguro disponível para o tratamento de intoxicação por Pb^{13,30}. Assim, a terapia combinada pode desempenhar um papel importante em diminuir os efeitos tóxicos do Pb em comparação com tratamentos isolados, além de ser capaz de restabelecer a pressão arterial. Neste contexto, o presente estudo contribuiu para elucidar os efeitos cardiovasculares da exposição perinatal ao Pb e pode auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos para o controle da hipertensão induzida por Pb.

Agradecimentos

Somos gratos ao Sr. Alaor Aparecido Almeida e ao CEATOX-IBB-UNESP pelos ensaios de quantificação de Pb no sangue e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP (processo número: 03/06760-5 e 04/00640-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–PROAP, pelo apoio financeiro.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados, Análise estatística e Redação do manuscrito: Fresneda-Gaspar A, Cordellini S; Obtenção de financiamento e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cordellini S.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP e CAPES/PROAP.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Andréia Fresneda Gaspar pela UNESP

9. Watts SW, Chai S, Webb RC. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology*. 1995;99(1-2):55-65.
10. Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M, Ríos C. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. *J Mol Histol*. 2012;43(5):553-63.
11. Fujiwara Y, Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology*. 1995;98(1-3):105-10.
12. Kaji T, Fujiwara Y, Hoshino M, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*. 1995;95(1-3):87-92.
13. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):501-23.
14. Flora SJ, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(7):2745-88.
15. Sears ME. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification--a review. *Scientific World Journal*. 2013;2013:219840.
16. Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy R, et al. Effects of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. *Environ Res*. 1994;65(1):86-99.
17. Cory-Slechta DA. Mobilization of lead over the course of DMSA chelation therapy and long term efficacy. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;246(1):84-91.
18. Mayer B, Hemmes B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(12):477-81.
19. Wang J, Wu J, Zhang Z. Oxidative Stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg*. 2006;50(4):405-9.
20. Athanasopoulos, N. *Flame Methods Manual GBC for Atomic Absorption*. Australia: Vitoria; 1994. p. 1-11.
21. Agency for Toxic Substances & Diseases Registry. (ATSDR). Toxicological profile for lead [Internet]. Atlanta: ATSDR; 2007 [Cited on 2014 Apr 2]. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22>.
22. Kopp SJ, Barron JT, Tow JP. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ Health Perspect*. 1988;78:91-9.
23. Vaziri ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):426-35.
24. Malvezzi CK, Moreira EG, Vassilieff I, Vassilieff VS, Cordellini S. Effect of L-arginine, dimercaptosuccinic acid (DMSA) and the association of L-arginine and DMSA on tissue lead mobilization and blood pressure level in plumbism. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(10):1341-6.
25. Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Chasemi A, Najafi S, et al. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett*. 2006;166(1):88-94.
26. Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*. 2006;11(1):2-22.
27. Grizzo LT, Cordellini S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol Sci*. 2008;103(1):207-14.
28. Weiler E, Khalil-Manesh F, Gonick HC. Effects of lead and low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin Sci*. 1990;79(2):185-92.
29. Hart WM Jr, Titus EO. Sulfhydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*. 1973;248(13):4674-81.
30. Kalia K, Flora SJ. Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health*. 2005;47(1):1-21.
31. Hamidinia SA, Erdahl WL, Chapman CJ, Steinbaugh GE, Taylor RW, Pfeiffer DR. Monensin improves the effectiveness of meso-dimercaptosuccinate when used to treat lead intoxication in rats. *Environ Health Perspect*. 2006;114(4):484-93.
32. Kachru DN, Khandelwal S, Tandon SK. Influence of methionine supplementation in chelation of lead in rats. *Biomed Environ Sci*. 1989;2(3):265-70.
33. Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev*. 1998;3(4):262-70.
34. Drapier JC, Bouton C. Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. *Bioessays*. 1996;18(7):549-56.
35. Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(1):326-32.
36. Ng HY, Tain YL, Lee YT, Hsu CY, Chiou TT, Huang PC, et al. Renin angiotensin system blockade ameliorates lead nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(2):359-63.
37. Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced hypertension II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res*. 1998;76(2):107-13.
38. Pappas JB, Nuttall KL, Ahlquist JT, Allen EM, Banner W Jr. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;133(1):121-9.
39. Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*. 2006;11(2):114-27.